

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie
vom Zentrum Innere Medizin der Medizinischen Hochschule Hannover.

Varianten der Konjugatexportpumpe
***ABCC2* beim hepatozellulären Karzinom**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
in der medizinischen Hochschule Hannover

Vorgelegt von

Christoph Meyer-Heithuis

aus Hannover

Hannover 2011

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	3
2	Abkürzungsverzeichnis	5
3	Einleitung	7
3.1	Das hepatozelluläre Karzinom	7
3.1.1	Epidemiologie, Inzidenz und aktueller Trend beim <i>HCC</i>	7
3.1.2	Die Ätiologie des <i>HCC</i> und seine Risikofaktoren	8
3.2	Die Superfamilie der ABC-Transporterproteine.....	10
3.1.3	Eigenschaften und Funktion der ABC-Transporter.....	10
3.1.4	Die apikale Konjugatexportpumpe <i>ABCC2</i> (MRP2)	12
3.1.5	Substratspezifität und physiologische Funktion von MRP2	13
3.1.6	Varianten von <i>ABCC2</i> und das Dubin-Johnson Syndrom	14
4	Fragestellung und Ziele dieser Arbeit	17
5	Material und Methoden	18
5.1	Patientenkollektiv und Kontrollgruppe.....	18
5.2	Altersstruktur und Geschlechterverteilung in der Kontrollgruppe.....	19
5.3	Altersstruktur und Geschlechterverteilung im <i>HCC</i> -Kollektiv	19
5.4	Experimentelle Strategie.....	20
5.5	DNA-Extraktion aus EDTA-Vollblut	20
5.5.1	Material:.....	20
5.5.2	Methode	21
5.6	Polymerase-Kettenreaktion.....	21
5.6.1	Amplifikation von Exon 1 und der 5'-UTR	23
5.6.2	Amplifikation von Exon 10.....	23
5.6.3	Amplifikation von Exon 23.....	24
5.6.4	Amplifikation von Exon 25.....	24
5.6.5	Amplifikation von Exon 28.....	25
5.7	Agarosegel-Elektrophorese	25
5.7.1	Material.....	25
5.7.2	Methode	26
5.7.3	Detektion von Sequenzvarianten im <i>ABCC2</i> -Gen.....	27
5.8	Statistik.....	28
5.8.1	Berechnung der Allelfrequenzen.....	28
5.8.2	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und De Finetti-Dreieck	29
6	Ergebnisse	31
6.1	5-UTR Promoterregion und Exon 1 im <i>ABCC2</i> Gen.....	31
6.1.1	Detektion des Promotorpolymorphismus -24C>T (<i>rs717620</i>).....	31
6.1.2	Genotypedistribution des Polymorphismus -24C>T	31
6.1.3	Allelfrequenzen des SNP -24C>T	32
6.1.4	Allelfrequenzen und Genotypedistribution beim <i>HCC</i> viraler Genese.....	33
6.1.5	Allelfrequenzen beim <i>HCC</i> : Diabetes mellitus, Tabak und Alkohol.....	34
6.2	Exon 10 im <i>ABCC2</i> -Gen.....	36
6.2.1	Detektion des Polymorphismus V417I (<i>rs2273697</i>)	36
6.2.2	Genotypedistribution des Polymorphismus V417I.....	36
6.2.3	Allelfrequenzen des Polymorphismus V417I	37

6.2.4	Allelfrequenzen und Genotypedistribution beim <i>HCC</i> viraler Genese.....	38
6.2.5	Allelfrequenzen beim <i>HCC</i> : Diabetes mellitus, Tabak und Alkohol.....	39
6.3	Exon 23 im <i>ABCC2</i> Gen	40
6.3.1	Detektion der Mutation I1036T (<i>rs45441199</i>).....	40
6.3.2	Genotypedistribution der Mutation I1036T	40
6.3.3	Allelfrequenzen der Mutation I1036T	41
6.3.4	Detektion des Polymorphismus IVS23+56C>T (<i>rs4148396</i>)	42
6.3.5	Genotypedistribution des Polymorphismus IVS23+56C>T	42
6.3.6	Allelfrequenzen des Polymorphismus IVS23+56.....	42
6.3.7	Allelfrequenzen und Genotypedistribution beim <i>HCC</i> viraler Genese.....	43
6.3.8	Allelfrequenzen beim <i>HCC</i> : Diabetes mellitus, Tabak und Alkohol.....	44
6.4	Exon 25 im <i>ABCC2</i> Gen	45
6.4.1	Detektion des Polymorphismus I1173F (<i>rs72558201</i>).....	45
6.4.2	Genotypedistribution der Mutation I1173F	46
6.4.3	Allelfrequenzen der Mutation I1173F	46
6.5	Sequenzanalyse von Exon 28 des humanen <i>ABCC2</i> Gens	48
6.5.1	Detektion des Polymorphismus I1324I (<i>rs3740066</i>).....	48
6.5.2	Genotypedistribution des Polymorphismus I1324I	48
6.5.3	Allelfrequenzen des Polymorphismus I1324I.....	49
6.5.4	Allelfrequenzen und Genotypedistribution beim <i>HCC</i> viraler Genese.....	50
6.5.5	Allelfrequenzen beim <i>HCC</i> : Diabetes mellitus, Tabak und Alkohol.....	51
6.5.6	Übersicht der Prävalenz homozygoter Genotypen.....	52
7	Diskussion	53
7.1	Die physiologische Bedeutung von hepatobiliären Transportproteinen	53
7.2	Varianten von <i>ABCC2</i> und die Disposition für hepatobiliäre Erkrankungen.....	54
7.3	Ergebnisse dieser Arbeit.....	55
7.3.1	Der Polymorphismus <i>rs717620</i> beim hepatozellulären Karzinom	55
7.3.2	Der Polymorphismus <i>rs2273697</i> beim hepatozellulären Karzinom	56
7.3.3	Der Polymorphismus <i>rs45441199</i> beim hepatozellulären Karzinom	57
7.3.4	Der Polymorphismus <i>rs4148396</i> beim hepatozellulären Karzinom	58
7.3.5	Der Polymorphismus <i>rs72558201</i> beim hepatozellulären Karzinom	58
7.3.6	Der Polymorphismus <i>rs3740066</i> beim hepatozellulären Karzinom	58
7.4	Interpretation der beobachteten Ergebnisse	60
7.4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	60
7.4.2	Methodische Aspekte	61
7.4.3	Notwendigkeit von Haplotypenanalysen	61
7.4.4	Klinische Relevanz und Ausblick	62
8	Zusammenfassung	63
9	Literaturverzeichnis	65
10	Curriculum Vitae	76
11	Wissenschaftliche Arbeiten & Publikationen	77
12	Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 6 und 7 der Promotionsordnung	78

2 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	ATP-Binding-Cassette-Transporter
ATP	Adenosintri-phosphat
BCRP	breast cancer related protein
bp	Basenpaare
BSEP	Bile Salt Export Pump
bzw.	beziehungsweise
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CI	confidence interval
cMOAT	canalicular multispecific organic anion transporter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP-SG	Glutathion-S-Dinitrophenol
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphospha
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E217betaG	Estradiol-17-beta-d-Glukuronid
°C	Grad Celsius
GSH	Glutathion
GSSH	Glutathion-Disulfid
HWG	Hardy-Weinberg Gleichgewicht
HBV	Hepatitis B Virus
<i>HCC</i>	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
kDa	Kilodalton
K_m	Michaelis-Konstante
LLC-PK1	Nierenzelllinie des prox. Tubulus vom Hampshire Schwein

LTC4	Leukotrien C4
MDR	multidrug resistance
MSD	membrane spanning domain
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NBD	nucleotid binding domain
NKK	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
OAT	organic anion transporter
OR	odds ratio
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PCR	Polymerasekettenreaktion
PhiP	2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo(4,5-b)Pyridin
ROS	Sauerstoffradikale (Reaktive Oxygen Species)
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	revolutions per minute
sec	Sekunde
Sf9-Zellen	Ovarialzelllinie aus Spodoptera frugiperda
SLC	solute carrier
SNP	Single nucleotide polymorphism
SUR	Sulfonylurearezeptor
Tab.	Tabelle
TGF	transforming growth factor
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
5`UTR	5` untranslatierte Region

3 Einleitung

3.1 Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)

3.1.1 Epidemiologie, Inzidenz und aktueller Trend beim HCC

Das hepatozelluläre Karzinom ist ein vom Hepatozyten ausgehender maligner Tumor der Leber und weltweit eine wesentliche Ursache für Morbidität und Mortalität: Es ist weltweit die siebthäufigste maligne Tumorentität und macht 85-90% aller primären Leberzellkarzinome aus.^[1] Als global gesehen dritthäufigste Ursache für Mortalität durch einen malignen Tumor, hat die Erkrankung an einem HCC für die betroffenen Patienten in vielen Fällen eine schlechte Prognose.^[2, 3] In Europa und den USA stellt das HCC für Patienten mit einer Leberzirrhose die häufigste Todesursache dar.^[4-7] Mit einer 5-Jahres Überlebensrate von weniger als 5% haben Patienten, bei denen keine Lebertransplantation möglich ist, eine besonders schlechte Prognose.^[5]

Seit Ende der neunziger Jahre kann weltweit eine Zunahme der Inzidenz und der Prävalenz des HCC beobachtet werden.^[5, 8-11] Dieser Trend setzt sich aktuell kontinuierlich fort: Im Jahr 2008 wurden weltweit schätzungsweise 748,000 Neuerkrankungen und 696,000 Todesfälle durch das HCC registriert^[2], im Jahr 2002 waren es noch 626,000 Neuerkrankungen und 598,000 HCC-assoziierte Todesfälle gewesen^[3]. Somit stellt das HCC immer noch ein zunehmendes globales Gesundheitsproblem dar.

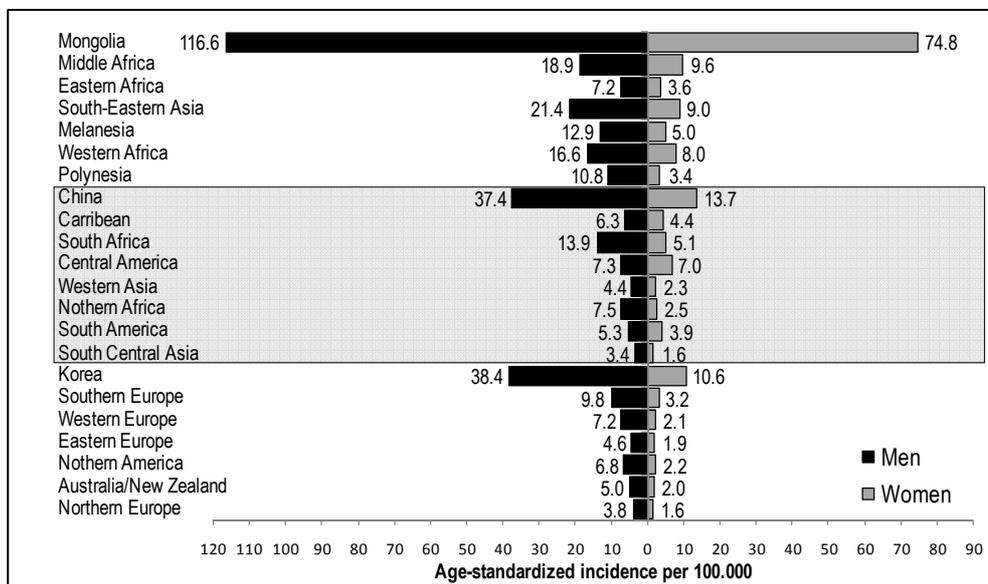


Abb. 1: Globale Unterschiede der Inzidenz des HCC der Weltbevölkerung in 2008 (Quelle: GLOBOCAN 2008) (Ferlay, J. et al. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 Lyon, France:International Agency for Research on Cancer [online], <http://globocan.iarc.fr> (2010))

Die Inzidenz des HCC weist eine außerordentliche geografische Variabilität auf (**Abb.1**). Sie ist in der Mongolei am höchsten mit 116.6 Neuerkrankungen pro 100.000 Lebensjah-

ren bei Männern und 74.8 Neuerkrankungen pro 100.000 Lebensjahren bei Frauen^[2]. Über 80% der *HCCs* betreffen die Entwicklungsländer der Subsahara-Region Afrikas, Südostasien und Ostasien einschließlich der Mongolei. Im Gegensatz dazu ist die Inzidenz des *HCC* in den entwickelten Industrienationen wie Nordamerika, Europa (außer Südeuropa), Australien und Neuseeland deutlich geringer^[2]. Die geographische Inzidenz des *HCC* ist eng mit der Inzidenz und Prävalenz von Virushepatitiserkrankungen als Zirrhoseursache assoziiert.

Ein interessanter Trend kann seit Ende der siebziger Jahre beobachtet werden. Im Beobachtungszeitraum von 1978-92 stieg die Anzahl der diagnostizierten *HCCs* in einigen industrialisierten Nationen an, während parallel dazu die Inzidenz in den Entwicklungsländern regredient war^[12]. Daten aus den USA belegen, daß sich dort zum Beispiel die Inzidenz des *HCC* in den letzten dreißig Jahren bis 2005 verdreifacht hat^[13].

In Abhängigkeit von der geografischen Lage ist für Männer das Risiko an einem *HCC* zu erkranken 2-7-fach erhöht im Vergleich zur weiblichen Bevölkerung^[12, 14] und es war insgesamt für 7,5% der soliden malignen Tumorerkrankungen von Männern und 3,5% der Frauen verantwortlich^[14].

3.1.2 Die Ätiologie des *HCC* und seine Risikofaktoren

Das hepatozelluläre Karzinom ist eine komplexe Erkrankung und obwohl bereits eine Vielzahl an Risikofaktoren für die Entstehung eines *HCC* identifiziert werden konnten nimmt die Anzahl der Neuerkrankungen weiterhin zu und hat trotz aller Bemühungen einer frühzeitigen Diagnosestellung für die Patienten oft eine infauste Prognose^[15]. 80-90% der *HCC* Patienten leiden bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose an einer Leberzirrhose. Die Leberzirrhose stellt somit die wichtigste Präkanzerose des *HCC* dar und beeinflusst auch unabhängig vom Tumor das Patientenüberleben und die Behandlungsstrategien maßgeblich^[4]. Drei Viertel der *HCCs* können auf eine chronische Hepatitis B oder Hepatitis C Infektion als weltweit bedeutendste Risikofaktoren für die Entwicklung eines *HCCs* in einer Leberzirrhose zurückgeführt werden^[16, 17]. Übermäßiger Alkoholkonsum kann zu einer Leberzirrhose führen und erhöht auf diesem Wege ebenfalls das Risiko für die Entwicklung eines *HCC*.^[18-20] Obwohl die Abrenzung zur ethyltoxischen Leberzirrhose problematisch ist, scheint ein regelmäßiger Alkoholkonsum von mehr als 80 mL Ethanol/d als Kofaktor auch bei der chronischen Virushepatitis das Risiko für die Entwicklung eines *HCC* zusätzlich zu erhöhen^[21].

Wie in mehreren Studien gezeigt werden konnte, trägt der Tabakkonsum ebenfalls zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms bei^[22-25].

Neben diesen Umweltfaktoren sind auch seltene genetische Erkrankungen wie der Alpha1-Antitrypsinmangel^[26], die hereditäre Hämochromatose^[27], Porphyria cutanea tarda^[28], Tyrosinämie Typ I^[29] und die Autoimmunhepatitis^[30] mit der Entwicklung einer Leberzirrhose und sukzessive eines *HCCs* assoziiert. Das Vorkommen hereditärer Erkrankungen, die mit einem hohen Risiko für ein *HCC* assoziiert sind, ist in der Allgemeinbevölkerung normalerweise gering, sodass sie nur in geringem Maße zum allgemeinen Risiko für ein *HCC* beitragen, obwohl sie für das Individuum ein hohes *HCC*-Risiko begründen können, wie zum Beispiel bei der hereditären Hämochromatose^[31, 32].

Ein weiterer prädisponierender Faktor ist in der zunehmenden Adipositas der Weltbevölkerung zu sehen. In einer großen prospektiven Kohortenstudie in den USA wiesen Männer mit einem BMI >35 ein fünffach erhöhtes Risiko für ein *HCC* im Vergleich zur normalgewichtigen Bevölkerung auf^[33]. Zwei Studien aus Schweden und Dänemark kamen zu ähnlichen Ergebnissen^[34, 35]. In engem klinischen Zusammenhang mit der Adipositas steht der Diabetes mellitus Typ II. Diabetes mellitus verdoppelt das Risiko für die Entwicklung eines *HCCs* und stellt unabhängig von einer weiteren zugrundeliegenden Lebererkrankung einen eigenständigen Risikofaktor dar^[36]. In industrialisierten Ländern ist zur Zeit die nicht-alkoholische Fettleber (NAFL) die am weitesten verbreitete Lebererkrankung und vor dem Hintergrund zunehmender Verbreitung von Adipositas und Diabetes ist zu erwarten, daß die NAFL zukünftig auch in anderen Teilen der Welt an Bedeutung gewinnt^[37-40]. Allein die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 ist mit einem deutlich erhöhtem Risiko eines *HCC* verbunden (El Seraq Gastro 2004)

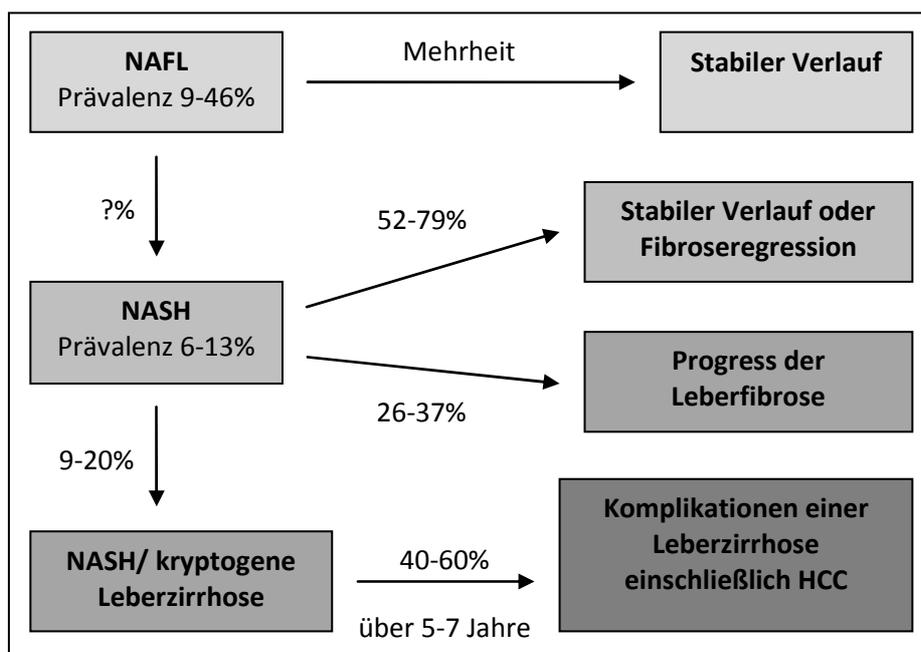


Abb. 2: Natürlicher Verlauf der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung. NAFL:Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung. NASH:Nicht-alkoholische Steatohepatitis. Modifiziert nach^[41]

Ausgehend von der NAFL ist der klinische Verlauf sehr variabel und reicht von der isolierten asymptomatischen Steatosis hepatis bis zu schweren Formen der Nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH), die schließlich in eine Leberzirrhose übergehen kann und diese Patienten somit für die Entwicklung eines *HCC* prädisponiert^[42].

Besonders in Ländern wie im subsaharischen Afrika und in Asien, in denen die Rate der HBV-Infektionen hoch ist, hat Aflatoxin B1 (AFB1) als Risikofaktor der Hepatokarzinogenese eine besondere Bedeutung, da es bei bestehender HBV-Infektion einen synergistischen Effekt auf die Pathogenese des *HCCs* hat.^[43] Aflatoxin B1 ist der Hauptmetabolit der Schimmelpilze *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* die häufig in tropischen und subtropischen Regionen vorkommen. Unter feuchten und warmen Lagerungsbedingungen kommt es dort besonders leicht zur Kontamination von Nahrungsmitteln wie z.B. Getreideprodukten und Erdnüssen.^[1] Nach dem Genuss kontaminierter Nahrungsmittel wird AFB1 in der Leber durch Phase I Biotransformation durch CYP1A1 und CYP3A4 zum hochreaktiven AFB1-8,9-Epoxid prozessiert, das kovalent an die DNA bindet und typische DNA-Addukte bildet.^[44] Durch diese Schädigung des Erbgutes kommt es zur Bildung von Punktmutationen, besonders im p53-Tumorsuppressorgen. Die kausale Verbindung zwischen AFB1 Exposition und der Entstehung eines *HCC* gilt als gesichert.^[45-48]

3.2 Die Superfamilie der ABC-Transporterproteine

3.2.1 Eigenschaften und Funktion der ABC-Transporter

Neben der Lipophilie stellt der aktive Transmembrantransport für zahlreiche Endobiotika und Xenobiotika eine wesentliche Voraussetzung für die Passage von Plasmamembranen dar. Die Superfamilie der ATP-Binding-Cassette(ABC)-Transporter stellt eine der größten Familien membrangebundener Transporterproteine dar, die in allen Organismen exprimiert werden. Die Familie der humanen ABC-Transporter besteht aus 49 Mitgliedern, die basierend auf ihrer Genstruktur, Anordnung der Domänen und anhand ihrer Aminosäuresequenzhomologie in sieben Subgruppen von A bis G unterteilt werden. Die meisten dieser Proteine sind primär energieabhängige Transporter, die angetrieben durch intrazelluläre Hydrolyse von ATP in der Lage sind, zahlreiche Substrate auch gegen ein Konzentrationsgefälle aktiv transmembranär nach extra- oder intrazellulär zu pumpen. Sie beeinflussen dadurch nicht nur die Verteilung vieler Substanzen im Körpergewebe, sondern auch die Bioverfügbarkeit und die Elimination in Ausscheidungsorgane wie Leber und Nieren.^[49-51] Die Bandbreite der exogenen und endogenen Transportsubstrate der ABC-Proteine ist vielfältig. Die wichtigste funktionelle Einheit aller ABC-Transporter besteht aus zwei polytopen zellmembran-gebundenen Domänen (membrane spanning do-

main, MSD, typischerweise 6 transmembranäre Helices, und zwei Nukleotid-Bindungsstellen (nucleotid binding domain, NBD). Die Nukleotid-bindenden Domänen der ABC-Transporter enthalten alle ein sogenanntes Walker A und B Motiv, das die ATP-Bindungsstelle enthält und für die Hydrolyse essentiell ist. Zusätzlich enthalten sie das für die ABC-ATPase typische Sequenzmotiv LSGGQ, was allgemein als „C“-Signatur bezeichnet wird. Obwohl diese „C“-Signatur eindeutig bei der Hydrolyse von ATP involviert ist, ist die genaue funktionelle Rolle bei der Nukleotidbindung bisher unklar, scheint hierfür jedoch nicht essentiell zu sein. Die angenommene Membrantopologie von MRP2 (ABCC2) besteht aus 17 transmembranären Helices, aus denen die 3 Transmembrandomänen (MSD1, -2, -3) gebildet werden. Diese werden durch gering konservierte intrazelluläre Schleifen, die sogenannten „linker regions“ L0 und L1, und die hoch konservierten Nukleotid-bindenden Domänen (NBD1 und NBD2) miteinander verbunden.^[52, 53] Sowohl die ungerade Anzahl an Transmembrandomänen als auch Immunfluoreszenzstudien deuten darauf hin, dass der Amino-Terminus (NH₂) extrazellulär lokalisiert ist und sich das Carboxy-Ende (COOH) intrazellulär befindet.^[53]

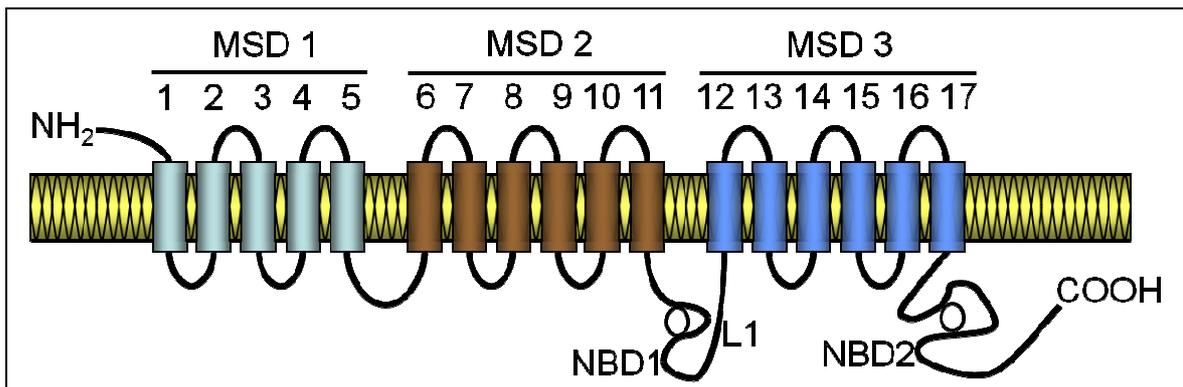


Abb. 3: Zweidimensionales Modell der Membrantopologie des Konjugateffluxtransporters ABCC2. NH₂: Aminogruppe, COOH: Carboxyl-Gruppe, MSD: Transmembrandomäne, NBD: Nukleotid-bindende Domäne, L1: Linkerregion. Modifiziert nach^[54]

In den letzten zwanzig Jahren wurde deutlich, dass P-gp/MDR1 nicht der einzige ABC-Transporter war, der zumindest *in vitro* für Resistenzen gegen klinisch wichtige Chemotherapeutika verantwortlich war. Mittlerweile sind bisher 10 Transporter identifiziert worden, die bis auf das Protein (BCRP/ABCG2) alle zur Familie der multidrug resistance proteins (MRP/ABCC) gehören. *In vitro* sind die MRPs alle in der Lage im Rahmen der Bio-transformation Resistenzen sowohl gegen Medikamente und deren Metabolite zu entwickeln, als auch gegen platin-enthaltende Substanzen, Folsäureantimetaboliten, Nukleotid- und Nukleosidanaloga und Peptid-basierte Substanzen.^[55-57]

Aufgrund ihrer Expression an einer Vielzahl von Gewebe-Blutstranken haben sie als funktionelle „Barriere“ großen Einfluß auf die individuelle Disposition für viele endogene

und exogene Noxen. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Konjugatexportpumpe *ABCC2*. Die Bezeichnungen *ABCC2*, *MRP2* und *cMOAT* sind synonym. Der offizielle Genname lautet *ABCC2*.

3.2.2 Die apikale Konjugatexportpumpe *ABCC2* (*MRP2*)

Der erste ABC-Transporter (*MRP1*) wurde 1992 von Cole et al. aus Doxorubicin-resistenten Lungenkarzinomzellen H69AR kloniert.^[58] Ein Jahr später wurde *MRP2* als ein hepatozellulärer kanalikulärer organischer Anionentransporter identifiziert.^[59] Das *ABCC2*-Gen wurde erstmals 1996 aus Lebergewebe gesunder Ratten kloniert.^[60, 61] Zu dieser Zeit gab es bereits genaue Informationen über die Gewebedistribution und Substratspezifität von *MRP1*. Dieses Protein ist in der Lage eine Vielzahl konjugierter organischer Anionen zu transportieren.^[62-66] *MRP1* zeigt ein sehr ähnliches Substratspektrum wie der bereits in Studien mit Ratten über die hepatobiliäre Elimination organischer Anionen funktionell charakterisierte *cMOAT*-Transporter (canalicular multispecific organic anion transporter), der in spontan mutierten hyperbilirubinämischen Rattenstämmen defekt war und die in der Folge nicht in der Lage waren Bilirubinglukuronide und Glukuronid- und Glutathionkonjugate von Xenobiotika biliär zu eliminieren.^[60, 61, 67] Korrelierend konnten mehrere Arbeitsgruppen nachweisen, dass Mutationen in der humanen Isoform ursächlich dem Dubin-Johnson Syndrom zugrundeliegen.^[68-70]

Aufgrund des ähnlichen Substratspektrums wurde *MRP1* zum potentiellen Kandidat für den im Mausmodell identifizierten kanalikulären Transporter *cMOAT*. Jedoch stellte sich bei weiteren Studien heraus, dass der im Mausmodell charakterisierte Transporter dem humanen *MRP2* entsprach.

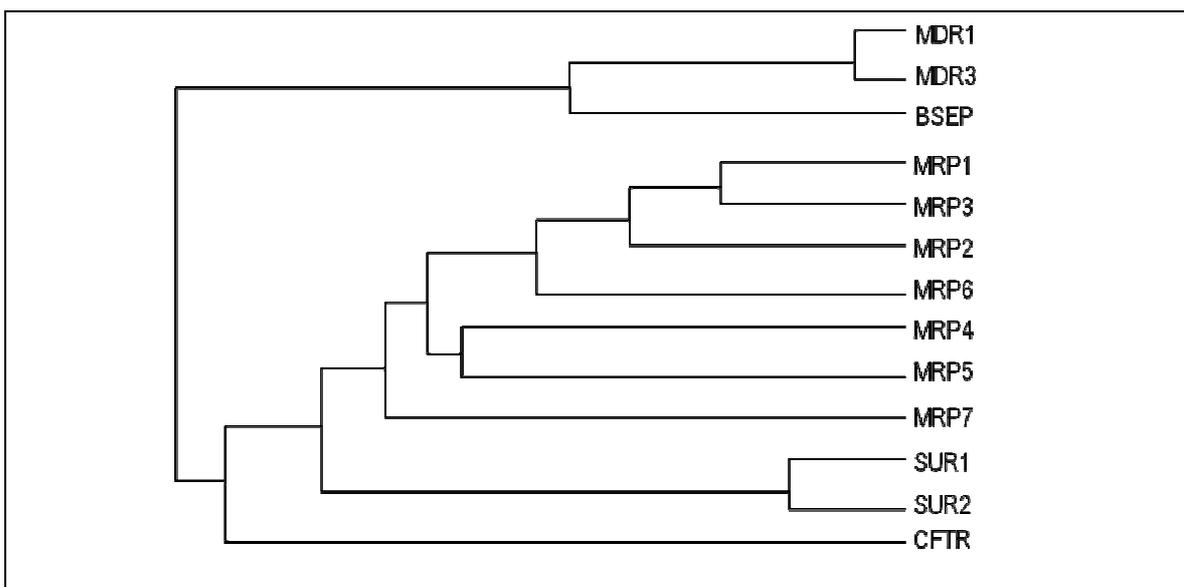


Abbildung 4. Phylogenetischer Baum der humanen MRP-Transporterfamilie. MDR: Multidrug Resistance Protein. MRP: Multidrug Resistance-associated Protein. BSEP: bile salt export pump. CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. SUR: Sulfonylurea Receptor. Modifiziert nach ^[52]

Das humane *ABCC2*-Gen ist auf Chromosom 10q24 lokalisiert.^[56] Das Protein besteht aus 1545 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 174 kDa in seiner deglykosilierten Form.^[55, 56, 71, 72] Es wird in der Leber, Dünndarm, Kolon, Gallenblase, Niere, Plazenta und Lunge exprimiert.^[73-77] MRP2 ist der einzige ABC-Transporter, der durchgehend nur in apikalen Membranen polarisierter Zellen vorkommt. Somit findet es sich in der Leber in den apikalen Hepatozytenmembranen und der apikalen Membran der Epithelien des proximalen Tubulus, plazentaren Synzytiotrophoblasten und intestinalen Epithelien.

3.2.3 Substratspezifität und physiologische Funktion von MRP2

Die Lokalisation des *ABCC2*-Proteins in apikalen Membranen verschiedener polarisierter Zellen, die in die Sekretion von konjugierten endogenen und exogenen Substanzen involviert sind, impliziert, dass diese Effluxpumpe eine besondere Rolle in der terminalen Phase der Detoxifikation und Eliminierung von in der Phase I und Phase II Biotransformation elaborierten endogenen und exogenen Noxen spielt.^[53, 78] *In vitro* Studien mittels inside-out Membranvesikeln, die humanes rekombinantes *ABCC2* enthielten, was in Zelllinien wie z.B. HEK 293, MDCKII oder Sf9 Insektenzellen exprimiert wurde, bestätigten, dass MRP2 eine Vielzahl von organischen Konjugaten transportieren konnte.^[79-81] Doch die Substratspezifität von MRP2 beschränkt sich nicht nur auf Glutathionkonjugate, sondern es kann auch viele Glukuronide und Sulfatkonjugate sowohl von Endobiotika als auch von Xenobiotika transportieren. Demzufolge leistet MRP2 aufgrund seines sehr breiten Substratspektrums einen entscheidenden Beitrag zur zellulären Clearance und Elimination von relativ hydrophilen Stoffwechselprodukten der Phase II Biotransformationsreaktionen, die regelhaft bei der Detoxifikation von hydrophoben Xenobiotika benötigt werden, wie zum Beispiel bei der Elimination des potenten karzinogenen Mykotoxins Aflatoxin B. MRP2 zeigt ebenfalls eine hohe Expression in der apikalen Membran von Enterozyten.^[82] Die höchste Expression findet sich im Gastrointestinaltrakt in den Villi des proximalen Jejunum, nach distal nimmt die Expression ab.^[83] Durch die Elimination aus der intestinalen Mukosa und Sekretion in das Darmlumen konstituiert die Expression von MRP2 in der intestinalen Mukosa durch eine reduzierte Absorption in den menschlichen Organismus einen primären Schutzmechanismus gegen mit der Nahrung aufgenommene Xenobiotika, Karzinogene und Medikamente.^[49, 51, 84]

Zu den ersten und am besten charakterisierten physiologischen Substraten mit der höchsten Affinität für MRP2 zählen das proinflammatorische Leukotrien C₄ und dessen Metabolite LTD₄ und LTE₄.^[63, 85] Steroidkonjugate und besonders Gallensäuren zählen zu weiteren wichtigen physiologischen Substraten. *ABCC2* spielt die entscheidende Rolle bei

der Elimination von Bilirubinglukuroniden aus dem Hepatozyten in die Galle. Eine detaillierte Zusammenstellung wichtiger Substrate und der entsprechenden K_m -Werte aus Transportversuchen mit rekombinantes humanes *ABCC2* enthaltenden inside-out Membranvesikeln zeigt Tabelle 1.

Substrat	K_m Werte (μM)	Literaturreferenz
Bilirubinmonoglukuronosyl	0.7	Hepatology 1999; 30:485–490 ^[86]
Bilirubinbisglukuronosyl	0.9	Hepatology 1999; 30:485–490 ^[86]
Leukotrien C4	1	Mol Pharmacol 2000; 55:929–937 ^[79]
S-Glutathionyl 2,4-dinitrobenzen	6.5	Hepatology 2001; 34:351–359 ^[80]
17 β -Glukuronosylöstradiol	7.2	Mol Pharmacol 2000; 55:929–937 ^[79]
Cholezystokinin (CCK-8)	8.1	J Pharmacol Exp Ther 2005; 313:549–556 ^[87]
Monoglutathionylchlorambucil	10	J Pharmacol Exp Ther 2004; 308:260–267 ^[88]
Bromosulfophthalein	12	Mol Pharmacol 2001; 60:934–943 ^[89]
Ethinylestradiol-3-O-glukuronid	35	J Pharmacol Exp Ther 2004; 309:156–164 ^[90]
p-Aminohippurat	880 2100	Kidney Int 2000; 57:1636–1642 ^[91] J Am Soc Nephrol 2004; 15:2828–2835 ^[92]
Methotrexat		Cancer Res 1999; 59:2532–2535 ^[93]
S-Glutathionylethakrynsäure		J Clin Invest 1998; 101:1310–1319 ^[80]
Ochratoxin A		Kidney Int 2000; 57:1636–1642 ^[91]
Estron 3-sulfat		Mol Pharmacol 2005; 68:1031–1038 ^[94]

Tabelle 1: Substratspezifität und K_m -Werte des humanen *ABCC2*. Modifiziert nach^[95]

3.2.4 Varianten von *ABCC2* und das Dubin-Johnson Syndrom

Bis zum heutigen Tag wurden eine Vielzahl von Sequenzvarianten des *ABCC2*-Gens beschrieben. Mittlerweile sind mehr als 200 natürlich vorkommende Varianten in den Exons, Introns und der 5`- und 3`-flankierenden Region des humanen *ABCC2*-Gens identifiziert worden. Bei vielen dieser Sequenzvarianten kommt es lediglich zum Austausch eines Nukleotids in den Introns oder in den Exons ohne Auswirkung auf die Aminosäuresequenz, und somit wahrscheinlich nicht zu Veränderungen der Funktion des Transporterproteins.^[84, 96-100] Sequenzvarianten die zum Fehlen eines funktionellen aktiven *ABCC2*-Proteins in der kanalikulären Hepatozytenmembran führen, stellen die molekulare Basis des Dubin-Johnson Syndroms beim Menschen dar.^[68, 69, 101-103] Der Phänotyp der hereditären *ABCC2*-Defizienz beim Menschen verdeutlicht die Schlüsselfunktion dieses apikalen Transporters bei der Elimination von organischen Anionen und insbesondere von

Bilirubinglukuroniden. Erstmals wurde es 1954 von den beiden Pathologen Dubin und Johnson beschrieben^[104]

Es wird autosomal-rezessiv vererbt und ist durch eine intermittierende milde konjugierte Hyperbilirubinämie und Ablagerung eines dunklen Pigments in den Hepatozyten charakterisiert, sodass die Leber eines betroffenen Patienten laparoskopisch dunkelblau oder sogar schwarz erscheint.^[104, 105] Typischerweise lässt sich bei Patienten mit Dubin-Johnson Syndrom eine erhöhte fraktionelle Ausscheidung von Koproporphyrin I, einem Zwischenprodukt der Häm-synthese, im Urin nachweisen. Mit einer Inzidenz von 1:1,300 bei Iranern jüdischer Abstammung und bis zu 1:300.000 innerhalb der japanischen Bevölkerung ist es eine seltene Erkrankung.

Sequenzvarianten des humanen *ABCC2* Gens, die bei Patienten mit Dubin-Johnson Syndrom identifiziert wurden bestehen aus Mutationen der Splice-Site, die zu einem Exonverlust und subsequent zur Bildung eines vorzeitigen Stopcodons führen^[69, 101, 102, 106], Missense-Mutationen^[69, 98, 101, 107-111], einer Deletionsmutante, die zum Verlust von zwei Aminosäuren der zweiten nukleotidbindenden Domäne führt^[103], einer Deletions-Insertionsmutation^[112] und Nonsense Mutationen, die ebenfalls zur Bildung vorzeitiger Stopkodons führen.^[68, 110, 113]

Obwohl alle mit dem Dubin-Johnson Syndrom assoziierten Sequenzvarianten letztendlich zum Funktionsverlust des Proteins führen, bestehen komplexe Unterschiede in der Auswirkung auf Proteinsynthese und dessen Funktion. Wenn ein solches vorzeitiges Stopkodon vor der letzten Splice site erkannt wird, kann es zum Strangabbruch bei der Translation und in der Folge zur schnelleren Degradation der mutierten *ABCC2* mRNA führen, was das Fehlen des *ABCC2*-Proteins bei einigen Fällen des Dubin-Johnson Syndroms erklärt. Tatsächlich konnte bisher noch kein verkürztes *ABCC2*-Protein detektiert werden. Andere mit dem Dubin-Johnson Syndrom assoziierte Sequenzvarianten führen zu einer defizienten Proteinmaturation und eingeschränktem Transport zur apikalen Zellmembran oder das Protein ist zwar apikal lokalisiert, jedoch funktionell inaktiv. Eine große Zahl von natürlich vorkommenden kodierender Sequenzvarianten konnte bisher identifiziert werden, deren Konsequenzen auf die Funktion von *ABCC2* noch nicht charakterisiert wurden.

Lokalisation	Basenaustausch	Aminosäureaustausch	DJS	Funktion	Allelfrequenz
Exon 3	c.298 C>T	p.R100X	DJS	[113]	
Exon 9	c.1177 C>T	p.R393W	DJS	[109, 114]	
Exon 16	c.2026 G>C	p.G676R	DJS	[111]	
Exon 17	c.2125 T>C	p.W709R	DJS	[108]	
Exon 18	c.2302 C>T	p.R768W	DJS	Proteinreifung und zell. Lokalisation[69, 101]	T: 0.010
Exon 23	c.3196 C>T	p.R1066X	DJS	Proteinexpression[68]	
Exon 25	c.3449 G>A	p.R1150H	DJS	Transportfunktion[98]	A: 0-0.009
Exon 25	c.3517 A>T	p.I1173F	DJS	Proteinreifung, zell. Lokalisation und Transportfunktion[98, 115]	T: 0-0.029
Exon 27	c.3825 C>G	p.Y1275X	DJS	Proteinexpression[114]	
Exon 28	c.3928 C>T	p.R1310X	DJS	[110]	
Exon 29	c.4145 A>G	p.Q1382R	DJS	Transportfunktion[69, 107]	
Exon 30	c.4175_4180del6	p.R1392_M1393del2	DJS	Proteinexpression[103, 116]	

Tabelle 2: Bisher identifizierte und molekularbiologisch charakterisierte Mutationen, die zum Dubin-Johnson Syndrom(DJS) führen. Modifiziert nach ^[95]

4 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Das Risiko an einem hepatozellulärem Leberzellkarzinom zu erkranken, ist mit der chronischen Hepatitis B, der chronischen Hepatitis C, der Leberzirrhose als wichtigste Präkanzerose, chronischem Alkoholabusus, der nicht-alkoholischen Steatohepatitis, Diabetes mellitus, bestimmten genetischen Lebererkrankungen und der Exposition mit karzinogenen Umwelttoxinen assoziiert. Bei 5-30% der Patienten mit einem *HCC* lassen sich jedoch bisher keine eindeutigen Risikofaktoren identifizieren. Neben den bekannten Faktoren könnten auch genetische Unterschiede in xenobiotika-metabolisierenden Enzymen zu einer unterschiedlichen Suszeptibilität beitragen und die Prädisposition für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms modifizieren. Dies ist vor allem für Patienten mit einer Leberzirrhose relevant, deren weiteres neoplastisches Risiko schwer einzugrenzen ist.

MRP2, ein Mitglied der ABC-Transporterfamilie, wird in der apikalen Hepatozytenmembran exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle bei der ATP-abhängigen hepatischen Clearance von endobiotischen und xenobiotischen Konjugaten, die im Rahmen der Phase II Biotransformation entstehen. Es ist verantwortlich für die hepatobiliäre Exkretion organischer Anionen in die Galle, einschließlich Bilirubin- und Gallensäurenkonjugaten. Aufgrund seiner breiten Substratspezifität beeinflusst MRP2 maßgeblich die individuelle biliäre Disposition für viele Medikamente, Xenobiotika und deren Konjugate. MRP2 beeinflusst die orale Bioverfügbarkeit des heterozyklischen aromatischen Amins 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo(4,5-b)Pyridin (PhIP), einem bekannten mit der Nahrung aufgenommenen Karzinogen.^[50] Leslie et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass MRP2 eine entscheidende Rolle bei der biliären Clearance des karzinogenen tabakspezifischen Nitrosamins 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon spielt und die MRP2-Defizienz zu einer Anhäufung von NNK-Metaboliten im Organismus führt.^[117] Dies unterstreicht die wichtige Aufgabe der Chemoprotektion des Gewebes durch die Exkretion toxischer Karzinogene und ihrer Metaboliten. Da Glutathion (GSH) und Glutathion-Disulfid (GSSH) Substrate von MRP2 sind, könnten genetische Varianten dieses Transportproteins Einfluß auf den hepatozellulären Redoxstatus und Reaktionen auf oxidativen Stress haben.

In einer aktuellen genetischen Assoziationsstudie zeigen sich Hinweise dafür, dass genetische Varianten von *ABCC2* möglicherweise die Suszeptibilität für die nichtalkoholische Fettlebererkrankung und den Schweregrad der Erkrankung beeinflussen.^[118] Zuvor konnte die Arbeitsgruppe von Ji et al. eine Assoziation zwischen MRP2 Haplotypen und einer medikamenten-induzierten toxischen Hepatitis aufzeigen.^[119]

Höblinger et al. beschreiben erstmals eine Assoziation der *ABCC2*-Sequenzvariante I1324I und der Suszeptibilität für ein cholangiozelluläres Karzinom.^[120]

Beim hepatozellulären Karzinom handelt es sich um eine multifaktoriell bedingte Erkrankung, bei deren Entstehung sowohl Umweltfaktoren als auch individuelle genetische Risikofaktoren beteiligt sind, die bislang nur unzureichend untersucht sind.

Zielsetzung dieser Arbeit war die Detektion von *ABCC2* Genvarianten in einem Kollektiv von Patienten mit hepatozellulären Karzinom auf dem Boden einer Leberzirrhose und einem Kontrollkollektiv von gesunden Blutspendern kaukasischer Abstammung. Hierzu sollten zunächst Sequenzvarianten in der 5' UTR, Exon 1, Exon 10, Exon 23, Exon 25 und Exon 28 und den flankierenden intronischen Gensequenzen mittels Sequenzanalyse detektiert und deren Prävalenz im jeweiligen Kollektiv charakterisiert werden.

Gleichzeitig sollten die detektierten Polymorphismen auf eine mögliche Assoziation mit einer erhöhten Suszeptibilität für ein *HCC* untersucht werden.

Unter Berücksichtigung der Ätiologie der Leberzirrhose und begleitender Risikofaktoren wie inhalativer Tabakkonsum, Alkoholkonsum und Diabetes mellitus sollte die Subgruppenanalyse zeigen, ob es innerhalb des *HCC*-Kollektivs Unterschiede bei der Prävalenz von Varianten von *ABCC2* gibt.

5 Material und Methoden

5.1 Patientenkollektiv und Kontrollgruppe

Untersucht wurden die Blutproben von Patienten, die zwischen 1999 und 2002 in der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover betreut wurden. Alle Patienten waren von kaukasischer Herkunft. Das schriftliche Einverständnis wurde von allen Patienten vor der Entnahme der Blutprobe eingeholt und das Studienprotokoll von der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule angenommen. Zwei Gruppen wurden untersucht: Als Kontrollgruppe diente ein Kollektiv von gesunden Blutspendern. Bei den *HCC* Patienten erfolgte die Diagnosestellung anhand eines abdominalen Ultraschalls oder einer abdominalen Computertomographie. In jedem Fall wurde die Diagnose mit Hilfe einer Ultraschall-gesteuerten Feinnadelbiopsie oder anhand der Resektionspräparate histologisch gesichert. Bei keinem der *HCC*-Patienten konnten im Rahmen der diagnostischen Maßnahmen des Tumorstaging mittels abdominalen Computertomographie, Röntgen-Thorax und Knochenszintigraphie Hinweise für eine weitere maligne Tumorerkrankung festgestellt werden.

5.2 Altersstruktur und Geschlechterverteilung in der Kontrollgruppe

Das Alter der insgesamt 142 untersuchten gesunden Blutspender der Kontrollgruppe beträgt im Mittel 38,44 Jahre. Der jüngste Proband war zum Zeitpunkt der Untersuchung 21 Jahre alt, der älteste Proband war zum Zeitpunkt der Untersuchung 69 Jahre alt.

Alter	Frauen		Männer		Gesamt	
	Anzahl (n)	%	Anzahl (n)	%	Anzahl (n)	%
20-29	20	15	19	14	39	29
30-39	11	8	28	21	39	29
40-49	6	4	21	16	27	20
50-59	8	6	16	12	24	18
60-69	1	1	4	3	5	4
Gesamt	46	34	88	66	134	100

Tabelle 3: Alters- und Geschlechtsstruktur der Kontrollgruppe

5.3 Altersstruktur und Geschlechterverteilung im HCC-Kollektiv

Das Alter der insgesamt 157 untersuchten Patienten im HCC-Kollektiv beträgt im Mittel 61,47 Jahre. Der jüngste Patient war zum Zeitpunkt der Untersuchung 31 Jahre alt, der älteste Patient war zum Zeitpunkt der Untersuchung 86 Jahre alt.

Alter	Frauen		Männer		Gesamt	
	Anzahl (n)	%	Anzahl (n)	%	Anzahl (n)	%
30-39	5	3,2	3	1,9	8	5,1
40-49	2	1,3	12	7,6	14	8,9
50-59	2	1,3	35	22,3	37	23,6
60-69	10	6,4	50	31,8	60	38,2
70-79	8	5,1	26	16,6	34	21,7
80-89	0	0	4	2,5	4	2,5
Gesamt	27	17,3	130	82,7	157	100

Tabelle 4: Alters- und Geschlechtsstruktur des *HCC*-Kollektivs

5.4 Experimentelle Strategie

Aufgrund der großen Anzahl von Exons beschränkt sich die Untersuchung zunächst auf Genabschnitte, in denen vorherige molekularepidemiologische Studien häufige natürliche vorkommende Sequenzvarianten mit funktioneller Auswirkung auf die Transporterfunktion beschrieben wurden. Darüberhinaus wurde ein häufig vorkommender mit dem Dubin-Johnson Syndrom assoziierter Polymorphismus in Exon 25 untersucht. Die DNA der Patienten wurde aus Leukozyten isoliert und die zu untersuchenden Abschnitte anschließend mit Hilfe der Polymerasenkettenreaktion amplifiziert.

5.5 DNA-Extraktion aus EDTA-Vollblut

5.5.1 Material:

Geräte:

- Zentrifuge Typ: Zentrifuge 5417 R (Eppendorf, Hamburg)
- Vortex-Gerät
- Wasserbad

Reagenzien:

- QIAamp blood kit (Qiagen, Hilden) Inhalt:
 - AL-Puffer
 - AW-Puffer
 - AE-Puffer
- Protease (Qiagen, Hilden) Konz.: 20 mg/ml
- Ethanol Konz.: 96-100%

Sonstiges:

- QIAamp spin column (Qiagen, Hilden)
- QIAamp Reaktionsgefäß 2 ml (Qiagen, Hilden)
- Reaktionsgefäß 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg)

5.5.2 Methode

Das EDTA-Vollblut der *HCC*-Patienten und Kontrollpersonen wurde gesammelt, und die DNA mit dem QIAamp blood kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers nach folgender Methode isoliert und aufgereinigt:

200 µl EDTA-Blut werden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und mit 25 µl Protease versetzt. Nach der Zugabe von 200 µl AL-Puffer wird das Gemisch direkt intensiv gemischt und anschließend zur kompletten Lyse zellulärer Bestandteile bei 70°C für zehn Minuten im Wasserbad inkubiert. Danach wird zur Fällung der genomischen DNA 210 µl Ethanol hinzugefügt, erneut gemischt und die Lösung auf eine QIAamp Zentrifugensäule gegeben. Während einer Inkubationszeit von einer Minute kann die DNA optimal an die Silicamembran der QIAamp-Säulen binden. Nach Zentrifugation bei 6000 x g für eine Minute wird die QIAamp Zentrifugensäule in ein neues 2 ml-Gefäß überführt. Das Filtrat wird verworfen. Die an die QIAamp Membran gebundene DNA wird in zwei Zentrifugationsschritten zur Beseitigung von Zelldetritus und anderen Verunreinigungen gewaschen. Zunächst erfolgt die Zugabe von 500 µl AW-Waschpuffer auf die Säule und wird bei 6000 x g für eine Minute zentrifugiert. Die QIAamp spin column wird erneut in ein 2 ml-Gefäß umgefüllt und diesmal nach der Zugabe von 500 µl AW-Puffer bei 14000 rpm für drei Minuten zentrifugiert. Danach wird die QIAamp spin column in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt, und die DNA mit 50 µl eines auf 70°C vorgewärmten AE-Puffers oder destilliertem Wasser eluiert. Nach einer Minute Einwirkzeit wird bei 6000 x g für eine Minute zentrifugiert. Im Eluat befindet sich die gebrauchsfertige DNA. Anschließend erfolgt die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der isolierten DNA durch photometrische Messung bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm. Alle Proben wurden bis zur Analyse in 10 mM Tris/EDTA Puffer (ph 8.0) bei -20°C aufbewahrt.

5.6 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Mullis können gezielt Nukleotidsequenzen in-vitro exponentiell amplifiziert werden und so weiteren molekulargenetischen Methoden zugänglich gemacht werden. Durch dieses Verfahren wird es möglich gezielt bestimmte Abschnitte der genomischen DNA zu untersuchen. Zur Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion wird als Reaktionsansatz im Allgemeinen die original genomische DNA mit der zu amplifizierenden Sequenz als Template benötigt. Man benötigt darüber hinaus zwei Oligonukleotide (Primer), die den zu analysierenden Abschnitt der DNA flankieren und zum gegenüberliegenden DNA-Einzelstrang jeweils komplementär sind, um jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese festzulegen, eine thermo-

stabile DNA-Polymerase, die bei hohen Temperaturen nicht denaturiert und somit in der Lage ist, den gewünschten Abschnitt zu amplifizieren und Desoxyribonukleosidtriphosphate als die Bausteine für den von der Polymerase synthetisierten DNA-Strang.

Die Polymerase-Kettenreaktion besteht in der Regel aus einer Anzahl von 12-50 Zyklen und findet in einem sogenannten Thermocycler statt, der den Reaktionsansatz automatisch präzise auf die Temperatur erhitzt oder herunterkühlt, die für den jeweiligen Reaktionsschritt benötigt wird. Kondensatbildung im Deckel des Reaktionsgefäßes wird durch einen beheizbaren Gerätedeckel verhindert. Jeder Zyklus besteht aus denselben 3 Schritten: Um die Bindung der Primer, das sogenannte Annealing, an die zu amplifizierende Sequenz der DNA überhaupt zu ermöglichen, müssen zunächst die Wasserstoffbrücken, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten aufgebrochen werden. Dies erreicht man durch Erhitzen der doppelsträngigen DNA auf 94-96°C. Nach der Denaturierung der genomischen DNA wird der Reaktionsansatz abhängig von der Schmelztemperatur der gewählten Primer, die durch die Länge und Sequenz der Oligonukleotide bestimmt wird, auf eine Temperatur von meist 55-65°C heruntergekühlt. In dieser Phase der Primerhybridisierung kommt es zur zufälligen Anlagerung der Oligonukleotide an die zu amplifizierende Sequenz. Im letzten Schritt erfolgt nun bei einer optimalen Arbeitstemperatur von 72°C mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase ausgehend von den beiden Primern die Synthese eines zum Template komplementären DNA-Stranges.

In den nachfolgenden Zyklen dienen die neu synthetisierten DNA-Stränge jeweils als neue Matrizen. Während der weiteren Zyklen kommt es nun zu einer exponentiellen Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente. Als Negativkontrolle dient eine Lösung des jeweiligen Reaktionsansatzes ohne DNA-Template, um eventuelle Kontaminationen der Materialien und eventuelle falsch-positive PCR-Ergebnisse zu erkennen.

Exon	Fragmentlänge	Name	Primer-Sequenz	Annealing-Temp.
1	404 bp	1 F	5'-TTGTTGGCCAGCTCTGTTG-3'	55°C
		1 R	5'-ACTACCACTTGTCTGAGTC-3'	
10	435 bp	10 F	5'-ACTCCCTAGTATCCTTGGC-3'	57.5°C
		10 R	5'-GATGGTAGAAAGTCTCCACCAGC-3'	
23	352 bp	23 F	5'-CACAAGTCTTCAGGGATTCC-3'	55°C
		23 R	5'-GGTACTCAAGAAACACTTGC-3'	
25	460 bp	25 F	5'-GGAGCCTCTCATATTCTGC-3'	55°C
		25 R	5'-TTTCACACCACTAGCCATGC-3'	
28	323 bp	28 F	5'-TCTATGTCTCGAGTCTGGG-3'	56°C
		28 R	5'-CAAATGATGAAGGCTTAGGG-3'	

Tabelle 5: Primersequenzen für die Amplifikation der Exons des *ABCC2*-Gens

5.6.1 Amplifikation von Exon 1 und der 5'-UTR

Der PCR-Ansatz enthielt folgende Reagenzien:

DNA (20 ng/ μ l)	2.5 μ l
10 x PCR-Puffer + 1,5 mM MgCl ₂	5.0 μ l
dNTP (jeweils 2,0 mM)	1.0 μ l
Forward-Primer (10 pmol/ μ l)	2.5 μ l
Reverse-Primer (10 pmol/ μ l)	2.5 μ l
Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	0.5 μ l
ddH ₂ O	36.0 μ l
gesamt	50.0 μ l

Tabelle 6: PCR-Ansatz Exon 1 und 5'-UTR

PCR-Protokoll zur Amplifikation von Exon 1 und der 5'-UTR:

	1 x		29 x			1 x	
Dauer	5 min	45 s	45 s	45 s	45 s	7 min	∞
Temperatur	95 °C	95 °C	55 °C	72 °C	72 °C	72 °C	4 °C

Tabelle 7: PCR-Protokoll Exon 1 und 5'-UTR

5.6.2 Amplifikation von Exon 10

Der PCR-Ansatz enthielt folgende Reagenzien:

DNA (20 ng/ μ l)	2.5 μ l
10 x PCR-Puffer + 1,5 mM MgCl ₂	5.0 μ l
dNTP (jeweils 2,0 mM)	1.0 μ l
Forward-Primer (10 pmol/ μ l)	2.5 μ l
Reverse-Primer (10 pmol/ μ l)	2.5 μ l
DMSO 3%	0.5 μ l
Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	0.5 μ l
ddH ₂ O	36.0 μ l
gesamt	50.0 μ l

Tabelle 8: PCR-Ansatz Exon 10

PCR-Protokoll zur Amplifikation von Exon 10:

	1 x		34 x			1 x	
Dauer	5 min	45 s	45 s	60 s	5 min	∞	

Temperatur	94° C	95° C	57.5° C	72° C	72° C	4° C
------------	-------	-------	---------	-------	-------	------

Tabelle 9: PCR-Protokoll Exon 10

5.6.3 Amplifikation von Exon 23

Der PCR-Ansatz enthielt folgende Reagenzien:

DNA (20 ng/μl)	2.5 μl
10 x PCR-Puffer + 1,5 mM MgCl ₂	5.0 μl
dNTP (jeweils 2,0 mM)	1.0 μl
Forward-Primer (10 pmol/μl)	2.5 μl
Reverse-Primer (10 pmol/μl)	2.5 μl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	0.5 μl
ddH ₂ O	36.0 μl
Gesamt	50.0 μl

Tabelle 10: PCR-Ansatz Exon 23

PCR-Protokoll zur Amplifikation von Exon 23:

	1 x		30 x		1 x	
Dauer	5 min	30 s	30 s	50 s	5 min	∞
Temperatur	95° C	94° C	55° C	72° C	72° C	4° C

Tabelle 11: PCR-Protokoll Exon 23

5.6.4 Amplifikation von Exon 25

Der PCR-Ansatz enthielt folgende Reagenzien:

DNA (20 ng/μl)	2.5 μl
10 x PCR-Puffer + 1,5 mM MgCl ₂	5.0 μl
dNTP (jeweils 2,0 mM)	1.0 μl
Forward-Primer (10 pmol/μl)	2.5 μl
Reverse-Primer (10 pmol/μl)	2.5 μl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	0.5 μl
ddH ₂ O	36.0 μl
Gesamt	50.0 μl

Tabelle 12: PCR-Ansatz Exon 25

PCR-Protokoll zur Amplifikation von Exon 25:

	1 x		30 x			1 x	
Dauer	5 min	50 s	50 s	60 s	7 min	∞	
Temperatur	94° C	94° C	55° C	77° C	72° C	4° C	

Tabelle 13: PCR-Protokoll Exon 25

5.6.5 Amplifikation von Exon 28

Der PCR-Ansatz enthielt folgende Reagenzien:

DNA (20 ng/μl)	2.5 μl
10 x PCR-Puffer + 1,5 mM MgCl ₂	5.0 μl
dNTP (jeweils 2,0 mM)	1.0 μl
Forward-Primer (10 pmol/μl)	2.5 μl
Reverse-Primer (10 pmol/μl)	2.5 μl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	0.5 μl
ddH ₂ O	36.0 μl
gesamt	50.0 μl

Tabelle 14: PCR-Ansatz Exon 28

PCR-Protokoll zur Amplifikation von Exon 28:

	1 x		30 x			1 x	
Dauer	5 min	30 s	30 s	50 s	5 min	∞	
Temperatur	95° C	94° C	56° C	72° C	72° C	4° C	

Tabelle 15: PCR-Protokoll Exon 28

5.7 Agarosegel-Elektrophorese

5.7.1 Material

Geräte:

- Elektrophoresekammer (Gibco)
- Gelkämme
- Elektrophorese-Gerät
- Spannungsgerät E 865 (Consort, Heidelberg)

- UV-Bank
- Videodokumentation (Biometra)

Reagenzien:

- LE Agarose (FMC, Rockland, Maine)
- TAE-Puffer
 - 40 mM Tris
 - 20 mM Essigsäure
 - 1 mM EDTA (pH 7,8)
- Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt) Konz.: 1%
- 10fach DNA-Gel-Ladepuffer:
 - Orange G (Sigma, Deisendorf)
 - Konz.: 0,25%, gemischt mit
 - 2,5% Ficoll 400 (Pharmacia, Freiburg)
- DNA Elektrophorese Längenstandard 100 bp (Bio-Rad, Kalifornien)

Sonstiges:

- Film (Polaroid, Waltham, Massachusetts)

5.7.2 Methode

Zum Nachweis von Spezifität und Quantität der jeweiligen PCR-Produkte erfolgte zunächst die Elektrophorese in einem 1,5%igen Agarosegel. Zur Herstellung eines 1,5%igen Agarosegels wurden für 100 ml Gel-Lösung 1,5 g Agarose mit 100 ml TAE-Puffer vermischt und aufgekocht. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid als Interkalator pro 100 ml Gel-Lösung. Das noch flüssige Gel wurde nun zum Abkühlen in eine Elektrophoresekammer gegossen und mit den entsprechenden Gelkämmen bestückt. Nach dem Erkalten war das Gel gebrauchsfertig und wurde in ein mit TAE-Puffer gefülltes Elektrophoresegerät gelegt.

Jeweils 7 µl der PCR-Amplifikationsprodukte wurden mit 3 µl Ladepuffer versehen und anschließend in die Gelkammern pipettiert. Parallel wurde ein 100bp DNA-Längenstandard zur Bestimmung der Fragmentgröße aufgetragen. Die Proben wurden in einem Spannungsfeld von 100 Volt bei einer Laufzeit von 50 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Das dem Gel zugesetzte Ethidiumbromid interkaliert mit den Nukleinsäuren

der spezifischen DNA-Banden und ermöglicht es somit, aufgrund der Fluoreszenz bei Anregung mit UV-Licht, die DNA-Banden sichtbar zu machen.

Anschließend wurden die Gele mit einer Videodokumentationsanlage dokumentiert. Die PCR-Produkte wurden zur Aufreinigung auf QiaQuick Sepharosesäulen aufgetragen und entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

5.7.3 Detektion von Sequenzvarianten im *ABCC2*-Gen

Zur Detektion von Sequenzvarianten in den amplifizierten Bereichen des *ABCC2*-Gens wurden alle Proben in einem ABI Prism™ 310 Kapillarsequenzierer sequenziert, basierend auf der enzymatischen Methode von Sanger.

Bei dieser Methode wird einzelsträngige DNA von einem Startpunkt aus mit Hilfe einer DNA-Polymerase durch einen komplementären Strang zum Doppelstrang ergänzt. Da neben den üblicherweise verwendeten Desoxy-Nukleotidtriphosphaten (dNTP) auch 2',3'-Dideoxy-Nukleotidtriphosphate (ddNTP) zugegeben werden, kommt es beim Einbau eines ddNTP zum Strangabbruch. Zusätzlich ist jedes ddNTP mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert, der ein spezifisches Emissions- und Absorptionsspektrum besitzt. In der Elongationsphase, entstehen auf diese Weise unterschiedlich lange DNA-Fragmente in einem Größenbereich von einem bis mehreren hundert Nukleotiden. Diese Fragmente werden ihrer Größe entsprechend in einer Gelkapillare elektrophoretisch aufgetrennt. Der basenspezifische Fluoreszenzfarbstoff am Ende eines DNA-Stranges wird schließlich durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt. Anhand des Fluoreszenzmusters wird die Nukleotidsequenz des DNA-Produkts durch das ABI Prism™ Sequencing System analysiert und in einem Elektropherogramm dargestellt.

Die beschriebene Sequenz-PCR erfolgte mit dem BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) in einem GeneAmp 9600 Thermocycler(Perkin Elmer). Für die Sequenzreaktion wurden die selben Primer wie für die konventionelle PCR zur Amplifikation der einzelnen Exons des *ABCC2*-Gens (**Tabelle 15**).

Der Sequenz-PCR-Ansatz enthielt folgende Reagenzien:

aufgereinigte DNA (500 ng)	3.0 µl
Terminationsmix	2.0 µl
Forward-Primer (1 pmol/µl)	1.0 µl
ddH ₂ O	5.0 µl

gesamt	11.0 μ l
--------	--------------

Tabelle 16: Sequenz-PCR-Ansatz

Zur Absicherung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte jeweils zusätzlich die Sequenzierung mit dem Reverse-Primer.

Standard-Protokoll für die Sequenzierungsreaktion:

	1 x		30 x		
Dauer	60 s	10 s	10 s	4 min	∞
Temperatur	96 °C	96 °C	50 °C	60 °C	4 °C

Tabelle 17: Protokoll der Sequenz-PCR

Anschließend wurden die Sequenz-PCR Produkte gereinigt und die überschüssigen ddNTPs entfernt, um Fluoreszenzartefakte bei der Sequenzierung im Kapillarsequencer zu vermeiden. Hierzu erfolgte zunächst die Fällung der DNA durch Hinzugeben von 2 μ l 3 M Natriumacetat und 50 μ l Ethanol (95%). Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lösung für 15 Minuten bei 15.000 rpm in einer Zentrifuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet erneut mit 250 μ l Ethanol (70%) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten bei 15.000 rpm, konnte das Pellets vom Überstand befreit werden und wurde bei Raumtemperatur getrocknet. Nach 30 Minuten wurde das Pellet mit 20 μ l ddH₂O resuspendiert und die Probe einem ABI Prism™ 310 Kapillarsequencer nach der oben beschriebenen Methode sequenziert.

5.8 Statistik

5.8.1 Berechnung der Allelfrequenzen

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (Statistical Package for Social Sciences) für Windows (Version 14.0) und dem Statistik-kalkulator EpiCalc 2000 (Version 1.02.). Die Ergebnisse wurden mittels Chi-Quadrat-Test auf Signifikanzen geprüft. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant betrachtet. Für ein bestimmtes Gen existieren jeweils zwei Allele: A und a. Die Allelfrequenz der untersuchten Polymorphismen und Mutationen gibt die relative Häufigkeit der Kopien eines Allels in dem untersuchten Kollektiv an. Des Weiteren wurde die Odds Ratio (OR) berechnet. Die OR gibt an, um welchen Faktor das Krankheitsrisiko einer Person steigt, wenn sie Träger eines bestimmten Allels oder Genotyps ist. Um die Signifikanz der OR beurteilen zu können, wurde das zugehörige Konfidenzintervall (CI) angegeben. Alle Ergebnisse wurden

auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht. Dazu wurde der Wert X^2 mit dem kritischen Wert für eine Signifikanz von $p = 0.05$ verglichen. Wurde der kritische Wert durch die gerechnete Testgröße nicht überschritten, waren die Beobachtungen nicht signifikant verschieden zu den Erwartungen und befanden sich somit im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

5.8.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und De Finetti-Dreieck

Das De Finetti-Dreieck ist nach dem italienischen Mathematiker De Finetti (1906-1985) benannt, der erstmals ein gleichseitiges Diagramm zur genetischen Veranschaulichung von Populationen erarbeitete. Die Berechnung für Populationszustände im De Finetti-Dreieck basieren auf dem „Exakten Test“ von Elston et al. Diese Populationszustände werden im Diagramm zur Visualisierung in Form von Punkten dargestellt. Jeder Populationszustand kann durch einen Punkt innerhalb dieses Dreiecks dargestellt werden. Die Grundlinie (Abszisse) gibt die Allelfrequenzen der Population wieder, die Seiten geben die Homozygotenfrequenzen und die Ordinate die Heterozygotenfrequenzen an. Das Lot des Populationspunktes auf die Grundlinie unterteilt diese in die beiden Allelfrequenzen Allel 1 und Allel 2.

Die in diesem Dreieck eingezeichnete Parabel markiert das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG). Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ist ein Gesetz in der Populationsgenetik, das Anfang des 19. Jahrhunderts von dem englischen Mathematiker G.H. Hardy und dem deutschen Arzt W. Weinberg formuliert wurde. Mit Hilfe des Hardy-Weinberg Gesetzes ist es möglich die Verteilung von Erbmerkmalen in einer Population zu beschreiben.

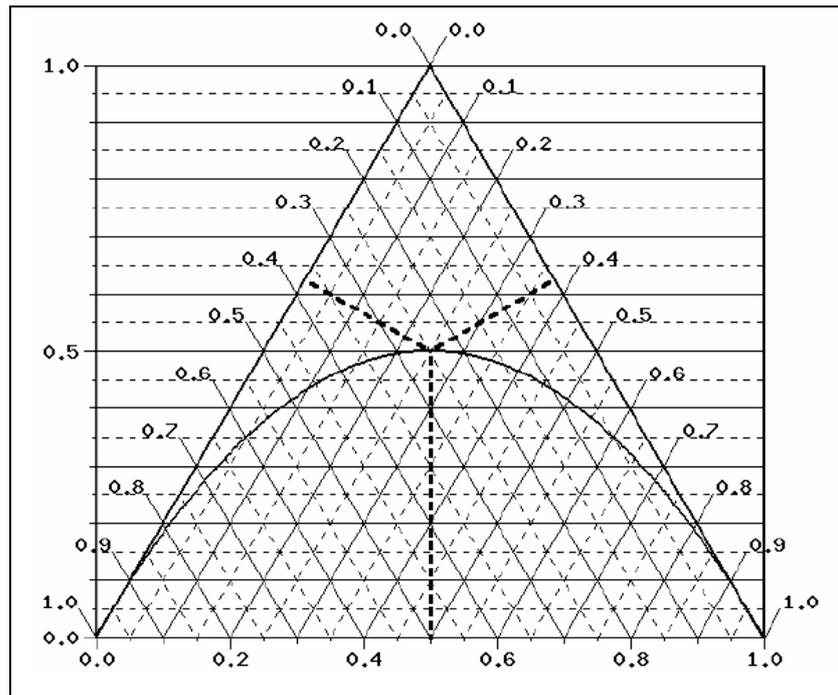


Abb. 5: De-Finetti-Dreieck. Vertikale Linie: Frequenz des Genotyps AB. Linke rechtwinklige Linie: Frequenz des Genotyps AA. Rechte rechtwinklige Linie: Frequenz des Genotyps BB. Parabolische und vertikale Linie: Frequenz des Genotyps AB im Fall des Hardy-Weinberg Gleichgewichts. (Institut für Humangenetik TU München, Quelle: <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>)

Man geht bei diesem mathematischen Modell jedoch von einer idealen Population aus, in der sich weder die Häufigkeiten der Allele noch die Häufigkeiten der Genotypen im Verlauf verändern, da diese sich im Gleichgewicht befinden. Trotz des modellhaften Charakters lässt sich dieses Gesetz realistisch auf eine Population anwenden, sofern sie nur groß genug ist. Man kann somit die erwartete Häufigkeit der Allele und der verschiedenen Genotypen berechnen und somit den Anteil heterozygoter Merkmalsträger bestimmen.

Für die Häufigkeit des Allels A (p) und des Allels B (q) gilt: $p+q=1$ (100%). Dies führt zu einer Genotypenverteilung mit einer definierten Häufigkeit in der darauffolgenden Generation:

Homozygot AA	$p \times p = p^2$
Heterozygot AB und BA	$p \times q + q \times p = 2pq$
Homozygot BB	$p^2 + 2pq + q^2 = 1$

6 Ergebnisse

6.1 5-UTR Promoterregion und Exon 1 im ABCC2 Gen

6.1.1 Detektion des Promotorpolymorphismus -24C>T (rs717620)

Mittels Sequenzanalyse des humanen *ABCC2* Gens konnte die natürlich vorkommende Genvariante -24C>T im Kontrollkollektiv gesunder kaukasischer Blutspender und im *HCC*-Kollektiv nachgewiesen werden. Hierbei kommt es an Position -24 der nicht-kodierenden 5'-flankierenden Region von Exon 1 zu einem Austausch der Basen Cytosin gegen Thymin.

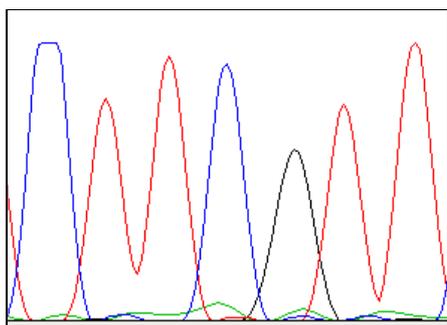


Abb. 6: Chromatogramm -24C-Allel

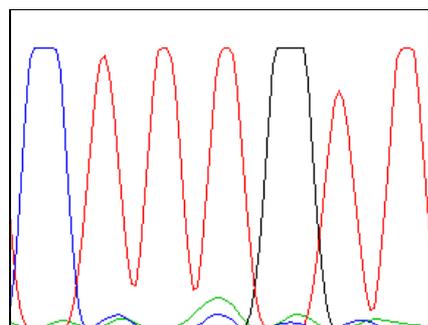


Abb. 7: Chromatogramm -24T-Allel

6.1.2 Genotypedistribution des Polymorphismus -24C>T

Genotyp		Erkrankungsstatus		Anzahl Gesamt(n)
		Kontrollen	HCC	
CC	Anzahl (n)	76	88	164
	Prozent (%)	59,8	61,1	60,5
CT	Anzahl (n)	40	47	87
	Prozent (%)	31,5	32,6	32,1
TT	Anzahl (n)	11	9	20
	Prozent (%)	8,7	10,6	7,4
Anzahl Gesamt(n)		127	144	271

Tabelle 18: Genotypenverteilung des -24C>T-Polymorphismus. n= Personen. Genotypen: p = 0.63121 (Armitage's Trend Test)

Tab. 18 zeigt die Genotypen des -24C>T Polymorphismus in der 5'-UTR des *ABCC2*-Gen. Der im Kollektiv gesunder kaukasischer Blutspender vorkommende Polymorphismus -24C>T weist die Wildtypsequenz in 59,8% (n=76) der untersuchten Fälle auf. 31,5% (n=40) der Kontrollen waren heterozygote Merkmalsträger und 8,7%(n=11) waren homozygot für den SNP c-24t. Mit 61,1% (n=88) homozygoter Träger des Wildtyp-Allels, 32,6% (n=47) heterozygoter Träger des T-Allel und 10,6%(n=9) homozygoter Träger des T-Allels zeigt sich im *HCC*-Kollektiv eine ähnliche Genotypenverteilung wie in der Kontrollgruppe. Der Vergleich der Genotypenverteilung in beiden Gruppen ergab keine signifikanten Verteilungsunterschiede ($p > 0,05$).

6.1.3 Allelfrequenzen des SNP -24C>T

SNP	Allele (n)	Kontrollen	<i>HCC</i> -Patienten	Odds Ratio [95% CI]	p-Wert
-24C	415	192 (0,76)	223 (0,77)	0,903 [0,606-1,344] $X^2=0.25$	0,6137
-24T	127	62 (0,24)	62 (0,27)		

Tabelle 19: Allelfrequenzen des Polymorphismus -24C>T bei Kontrollen und *HCC*. n= Allele.

Tab. 19 zeigt die Allelfrequenzen des Polymorphismus -24C>T. An Position -24 des humanen *ABCC2* Gens konnte eine Basensubstitution von C zu T nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, ob der bekannte Polymorphismus -24C>T mit einem erhöhten Risiko für die Erkrankung an einem hepatozellulären Leberzellkarzinom assoziiert ist, wurde die Prävalenz dieses SNP im Kontrollkollektiv und im *HCC*-Kollektiv verglichen. Im *HCC*-Kollektiv zeigte sich eine Prävalenz des Polymorphismus -24C>T bei 56 Patienten (43,2%). Im Kontrollkollektiv konnte der untersuchte SNP bei 51 Patienten (40,2%) detektiert werden. Die Verteilung unterscheidet sich nicht signifikant von der im *HCC*-Kollektiv. Dieser Polymorphismus lag sowohl für *HCC*-Patienten ($X^2 = 0.630$) als auch für die Kontrollen ($X^2 = 2.726$) im HWG (Abb.8).

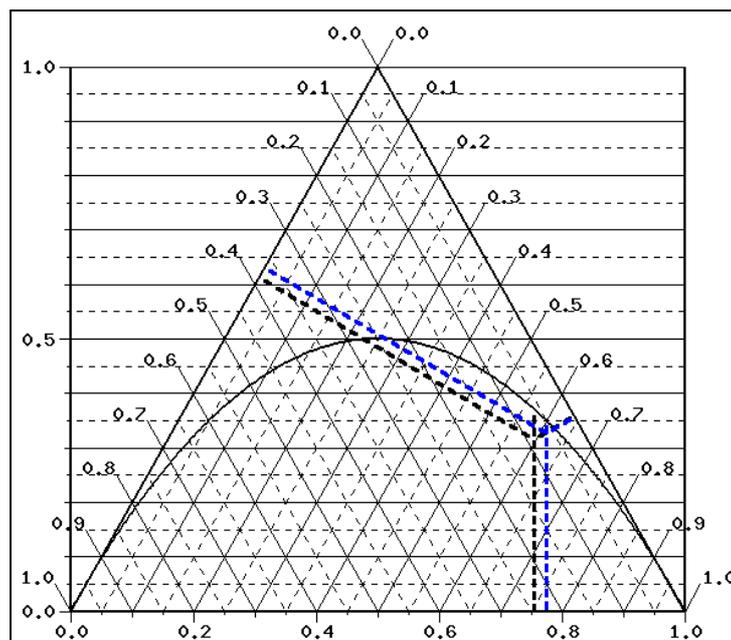


Abb.8: Darstellung der Genotypenverteilung im De Finetti-Dreieck: -24C>T Polymorphismus in der 5'-UTR des *ABCC2* Gen. Blau: *HCC*. Schwarz: Kontrollen

6.1.4 Allelfrequenzen und Genotypedistribution beim *HCC* viraler Genese

Gruppe	Total	MRP2 Genotyp			Allelfrequenz des -24T Allel
		CC (%)	CT (%)	TT(%)	
Kontrollen	127	76 (60)	40 (31)	11 (9)	0.24
<i>HCC</i> gesamt	144	88 (61)	47 (33)	9 (6)	0.27
<i>HCC</i> viral	64	35 (55)	25 (39)	4 (6)	0.26
<i>HCC</i> nicht-viral	78	53 (68)	21(27)	4 (5)	0.19

Tabelle 20: Allelfrequenz und Frequenz der Genotypen des Polymorphismus -24C>T im *HCC*-Kollektiv bei viraler vs. nicht-viraler Genese. Genotypen: $p = 0.31782$ (Armitage's Trend Test), Allelfrequenzen: $p = 0.31608$ (χ^2 -Test)

Tab. 20 zeigt die Verteilung der Genotypen und die Allelfrequenz des Polymorphismus -24C>T innerhalb des *HCC*-Kollektivs. Verglichen wurden insgesamt 142 *HCC* Patienten. Grundlage bildet die Einteilung der *HCC* Patienten in zwei Gruppen, Patienten die ein *HCC* auf dem Boden einer viralen posthepatitischen Leberzirrhose entwickelt haben und Patienten, deren Genese der Leberzirrhose nicht-viralen Ursprungs ist. Hinsichtlich der Genotypenverteilung zeigt der Vergleich der beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Träger des T-Allels kommen mit 45% vs 32% häufiger in der Gruppe der Patien-

ten mit einem *HCC* viraler Genese vor im Vergleich zum Patientenkollektiv mit *HCC* auf dem Boden einer nicht virus-bedingten Leberzirrhose.

6.1.5 Allelfrequenzen beim *HCC*: Diabetes mellitus, Tabak und Alkohol

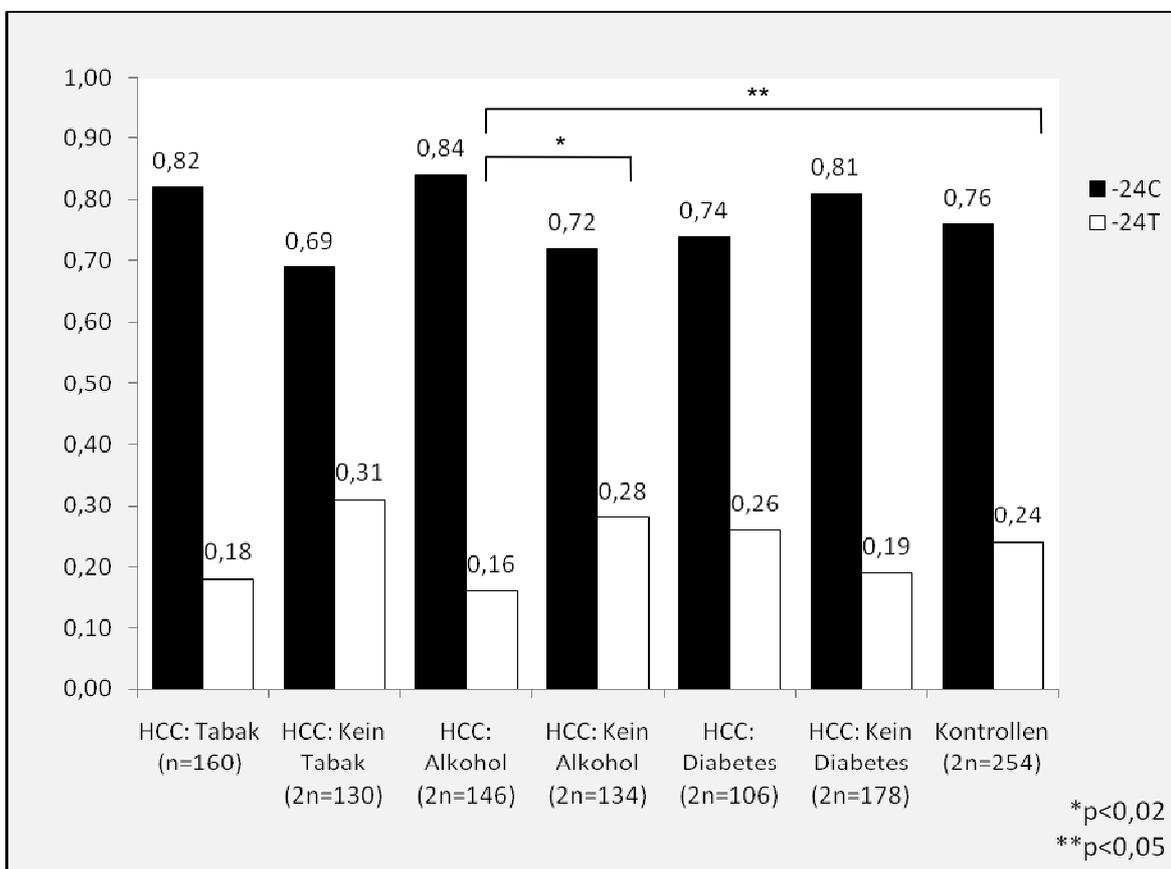


Diagramm 1: Darstellung der Allelfrequenzen in Prozent im Kontrollkollektiv und im *HCC*-Kollektiv gruppiert nach Tabakkonsum, Alkoholkonsum und Diabetes mellitus. 2n= Anzahl der Allele.

Die Allelfrequenzen des SNP -24C>T in Exon 1 des humanen *ABCC2*-Gen sollen im *HCC*-Kollektiv anhand unterschiedlicher Risikofaktoren für die Entwicklung eines *HCC* untersucht werden. Anhand der Krankenakten wurde der Tabakkonsum, Alkoholkonsum und das Vorliegen eines Diabetes mellitus bestimmt. Hinsichtlich dieser drei Risikofaktoren erfolgte jeweils die Analyse der Allelfrequenzen innerhalb des *HCC*-Kollektivs. Die Unterteilung anhand eines vorliegenden Tabakkonsum zeigte weder hinsichtlich der Allelfrequenzen noch hinsichtlich der Genotypenverteilung in dieser Gruppe einen signifikanten Unterschied. Die Analyse anhand des Risikofaktors Alkoholkonsum ergab jedoch ein häufigeres Vorkommen des -24T Allels mit einer Allelfrequenz von 0,28 in der Gruppe, die keinen Alkohol konsumiert im Vergleich zur Gruppe der *HCC*-Patienten, die regelmäßig Alkohol konsumieren (*p=0.0157). Hier fand sich das -24T Allel nur mit einer Frequenz von 0,16. Träger des CT-Genotyps oder des TT-Genotyps waren ebenfalls signifikant

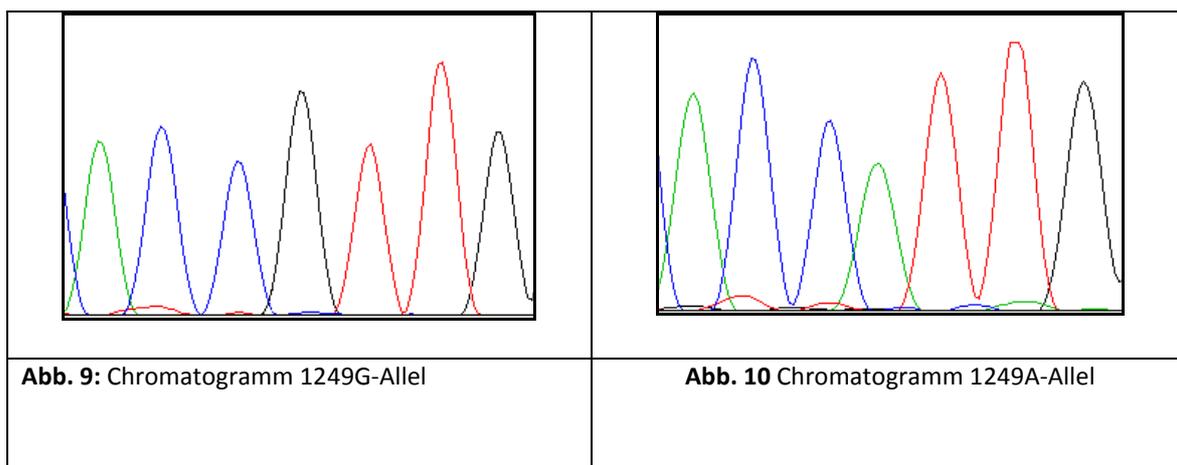
seltener in dieser Gruppe vertreten ($p=0.01274$ Odds Ratio=2.423 CI [1.199-4.894] $X^2=6.21$). Gleichzeitig kommt das T-Allel auch in der Kontrollgruppe signifikant häufiger vor als bei *HCC*-Patienten mit Alkoholkonsum (** $p=0.04161$). Pat. mit einem *HCC* und einem begleitenden Diabetes mellitus zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Allelfrequenz im Vergleich zu den *HCC* Patienten ohne begleitenden Diabetes, jedoch waren die Träger des TT-Genotyps häufiger bei Patienten mit Diabetes zu finden. ($p=0.02690$ Odds Ratio=0.181 CI=[0.035-0.952] $X^2=4.9$)(**Tab. 21**)

ABCC2 -24C>T Allele/Genotyp	Anzahl (Frequenz) der Allele und Genotypen	
	Diabetes (2n=106)	Kein Diabetes (2n=178)
C	78 (0.74)	144 (0.81)
T	28 (0.26)	34 (0.19)
CC	31 (0.59)	57 (0.64)
CT	16 (0.30)	30 (0.34)
TT	6 (0.11)	2 (0.02)
Test auf Assoziation	X^2	p
Allelfrequenz	2.08	0.14899
Armitage's Trend Test	4.90	0.02690
Odds Ratio Statistik	Odds Ratio	95% CI
[C]↔[T]	0.658	0.372-1.164
[CC]↔[TT]	0.181	0.035-0.952

Tabelle 21: Darstellung der Ergebnisse des Vergleichs der Allelfrequenzen und der Genotypfrequenzen innerhalb des *HCC*-Kollektivs anhand von Diabetes mellitus. 2n:Allele. CI:Konfidenzintervall

6.2 Exon 10 im *ABCC2*-Gen Detektion des Polymorphismus V417I (*rs2273697*)

Anhand der Sequenzdaten von 112 *HCC*-Patienten und 121 Kontrollen konnte an der Nukleotidposition 1249 des humanen *ABCC2* Gens eine A zu G Basentransition beobachtet werden. Das Kodon 417 in Exon 10 kodiert als Folge die Aminosäure Isoleucin statt Valin.



6.2.2 Genotypedistribution des Polymorphismus V417I

Genotyp		Erkrankungsstatus		Anzahl Gesamt(n)
		Kontrollen	<i>HCC</i>	
GG	Anzahl (n)	82	71	153
	Prozent (%)	67,8	63,4	65,7
GA	Anzahl (n)	35	33	68
	Prozent (%)	28,9	29,5	29,21
AA	Anzahl (n)	4	8	12
	Prozent (%)	3,3	7,1	5,2
Anzahl Gesamt(n)		121	112	233

Tabelle 22: Darstellung der Genotypenverteilung des Polymorphismus V417I im Kontrollkollektiv und im *HCC*-Kollektiv. n: Personen. Genotypen: $p = 0.28412$ (Armitage's Trend Test)

Tab. 22 zeigt die Genotypenverteilung des Polymorphismus V417I an. Der im Kollektiv gesunder kaukasischer Blutspender vorkommende Polymorphismus V417I weist die Wildtypsequenz in 67,8% (n=82) der untersuchten Fälle auf. 28,9% (n=35) der Kontrollen waren heterozygote Merkmalsträger und 3,3% (n=4) waren homozygot für den SNP V417I. Mit 63,4% (n=71) homozygoter Träger des Wildtyp-Allels, 29,5%(n=33) heterozygoter Träger des A-Allel und 7,1 %(n=8) homozygoter Träger des A-Allels konnten im *HCC*-Kollektiv doppelt so viele homozygote Träger des A-Allels wie in der Kontrollgruppe observiert werden. Der Vergleich der Genotypenverteilung in beiden Gruppen war jedoch nicht signifikant ($p>0,05$).

6.2.3 Allelfrequenzen des Polymorphismus V417I

SNP	Allele (n)	Kontrollen	<i>HCC</i> -Patienten	Odds Ratio [95% CI]	p-Wert
417Val	374	199 (0,82)	175 (0,78)	1,296 [0,820-2,047] $X^2=1.24$	0,26586
417Ile	92	43 (0,18)	49 (0,22)		

Tabelle 23: Darstellung der Allelfrequenzen des Polymorphismus V417I. CI: Konfidenzintervall

Tab. 23 zeigt die Allelfrequenzen des Polymorphismus V417I. An Position 1249 des humanen *ABCC2* Gens konnte eine Basensubstitution von G zu A nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, ob der bekannte Polymorphismus V417I mit einem erhöhten Risiko für die Erkrankung an einem hepatozellulären Leberzellkarzinom assoziiert ist, wurde die Prävalenz dieses SNP im Kontrollkollektiv und im *HCC*-Kollektiv verglichen. Im *HCC*-Kollektiv zeigte sich eine Präsenz des Polymorphismus V417I in 41 (36,3%) Fällen. Im Kontrollkollektiv konnte der untersuchte SNP in 39 (22,2%) Fällen detektiert werden. Die Verteilung unterscheidet sich nicht signifikant von der im *HCC*-Kollektiv. Dieser Polymorphismus lag sowohl für *HCC*-Patienten ($X^2 = 2.132$) als auch für die Kontrollen ($X^2 = 0.013$) im HWG (Abb.11).

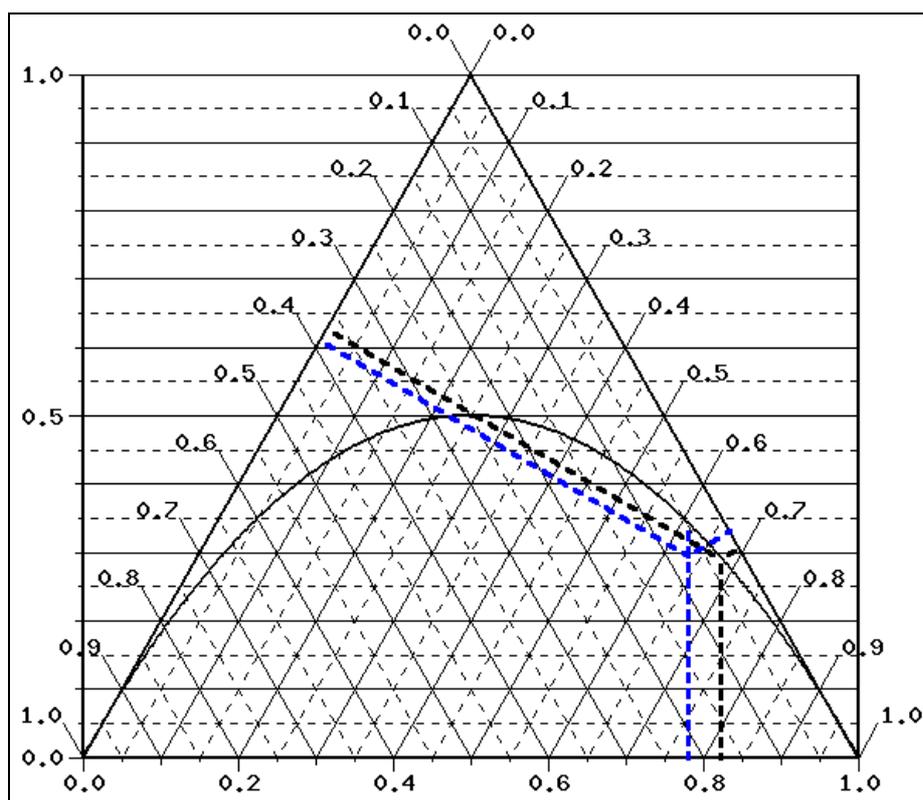


Abb. 11: Darstellung der Genotypenverteilung im De Finetti-Dreieck: V417I Polymorphismus in Exon 10 des *ABCC2* Gen. **Blau:** *HCC*, **Schwarz:** Kontrollen

6.2.4 Allelfrequenzen und Genotypedistribution beim *HCC* viraler Genese

Gruppe	Total	MRP2 Genotyp			Allelfrequenz des 1249A Allel
		GG (%)	GA (%)	AA(%)	
Kontrollen	121	82 (68)	35 (29)	4 (3)	0.18
<i>HCC</i> gesamt	112	71 (63)	33 (30)	8 (7)	0.22
<i>HCC</i> viral	47	30 (64)	15 (32)	2 (4)	0.20
<i>HCC</i> nicht-viral	64	40 (63)	18 (28)	6 (9)	0.23

Tabelle 24: Darstellung der Allelfrequenz und Frequenz der Genotypen des Polymorphismus V417I im *HCC*-Kollektiv bei viraler vs. nicht-viraler Genese. Genotypen: $p = 0.59118$ (Armitage's Trend Test). Allelfrequenzen: $p = 0.56703$ (χ^2 -Test)

Tab. 24 zeigt die Verteilung der Genotypen und die Allelfrequenz des Polymorphismus V417I innerhalb des *HCC*-Kollektivs. Verglichen wurden insgesamt 111 *HCC* Patienten. Hinsichtlich der Genotypenverteilung zeigt der Vergleich der beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

6.2.5 Allelfrequenzen beim *HCC*: Diabetes mellitus, Tabak und Alkohol

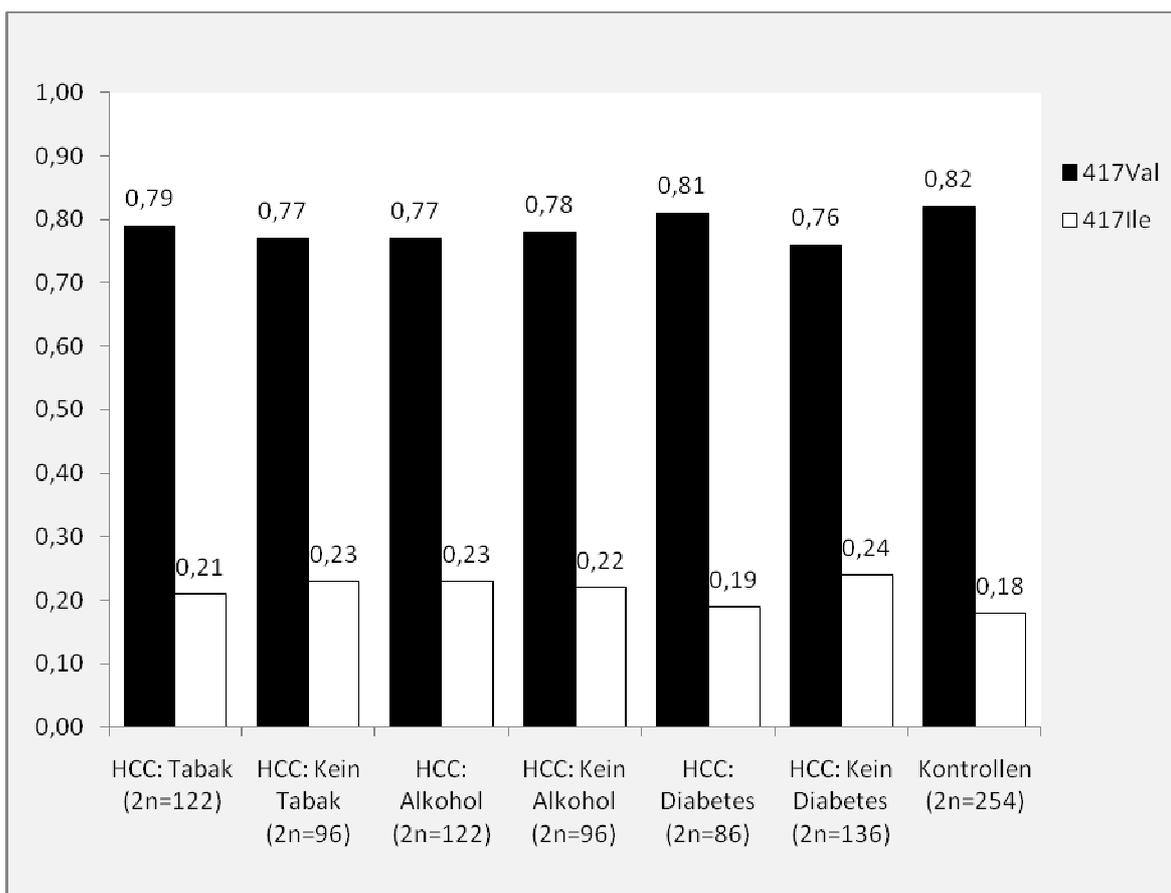


Diagramm 2: Darstellung der Allelfrequenzen des Polymorphismus V417I in Prozent im Kontrollkollektiv und im *HCC*-Kollektiv gruppiert nach Tabakkonsum, Alkoholkonsum und Diabetes mellitus. 2n= Anzahl der Allele

Die Subgruppen Analyse der Allelfrequenzen des Polymorphismus V417I ergab in allen Gruppen eine ähnliche Verteilung. Signifikante Unterschiede ergaben sich nicht.

6.3 Exon 23 im *ABCC2* Gen Detektion der Mutation I1036T (*rs45441199*)

Anhand der Sequenzdaten von 108 *HCC*-Patienten und 79 Kontrollen konnte an der Nukleotidposition 3107 des humanen *ABCC2* Gens eine T zu C Basentransition beobachtet werden. Das Kodon 1036 in Exon 23 kodiert als Folge die Aminosäure Threonin statt Isoleucin.

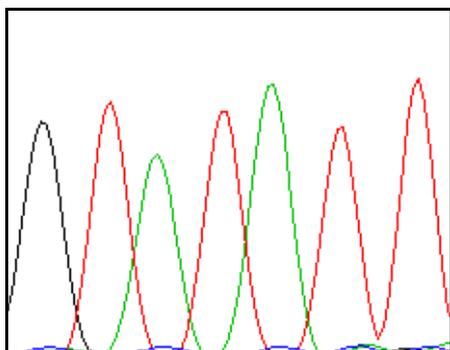


Abb. 12: Chromatogramm des T-Allels

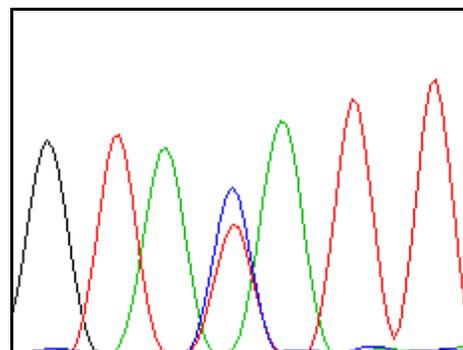


Abb. 13: Chromatogramm des C/T-Allels

6.3.2 Genotypedistribution der Mutation I1036T

Genotyp		Erkrankungsstatus		
		Kontrollen	<i>HCC</i>	Anzahl Gesamt(n)
TT	Anzahl (n)	78	106	184
	Prozent (%)	98,7	98,1	98,4
TC	Anzahl (n)	1	2	3
	Prozent (%)	1,3	1,9	1,6
CC	Anzahl (n)	0	0	0
	Prozent (%)	0	0	0
Anzahl Gesamt(n)		79	108	187

Tabelle 25: Darstellung der Genotypenverteilung der Mutation I1036T. n=Personen. Genotypen: $p = 0.472$ (Armitage's Trend Test)

Tab. 25 zeigt die Genotypenverteilung der Mutation I1036T. Im untersuchten Kontrollkollektiv von 79 gesunden Blutspendern kaukasischer Abstammung konnte in einem Fall (1,3%) ein heterozygoter Träger des C-Allels beobachtet werden. Homozygote Träger des Wildtypallels konnte in 78 Fällen (98,7%) beobachtet werden. Von 108 untersuchten *HCC*-Patienten zeigten 2 Patienten (1,9%) einen heterozygoten Genotyp. Weder im Kontrollkollektiv noch im *HCC*-Kollektiv konnten homozygote Träger des C-Allels beobachtet werden. In beiden Kollektiven findet sich somit eine identische Genotypenverteilung.

6.3.3 Allelfrequenzen der Mutation I1036T

SNP	Allele (n)	Kontrollen	HCC-Patienten	Odds Ratio [95% CI]	p-Wert
1036Ile	371	157 (0,99)	214 (0,99)	1,467 [0,132-16,325]	0,101544
1036Thr	3	1 (0,01)	2 (0,01)	$\chi^2=0.10$	

Tabelle 26. Darstellung der Allelfrequenzen der Mutation I1036T im Kontrollkollektiv und im HCC-Kollektiv. n= Allele. CI= Konfidenzintervall.

Tab. 26 zeigt die Allelfrequenzen der Mutation I1036T. Mit einer identischen Allelfrequenz von 0,01 konnte in beiden Kollektiven eine seltene bisher nicht funktionell charakterisierte Mutation detektiert werden. Diese Mutation weicht sowohl bei den Fällen ($\chi^2 = 0.009$) als auch bei den Kontrollen ($\chi^2 = 0.003$) nicht vom HWG ab (**Abb. 14**).

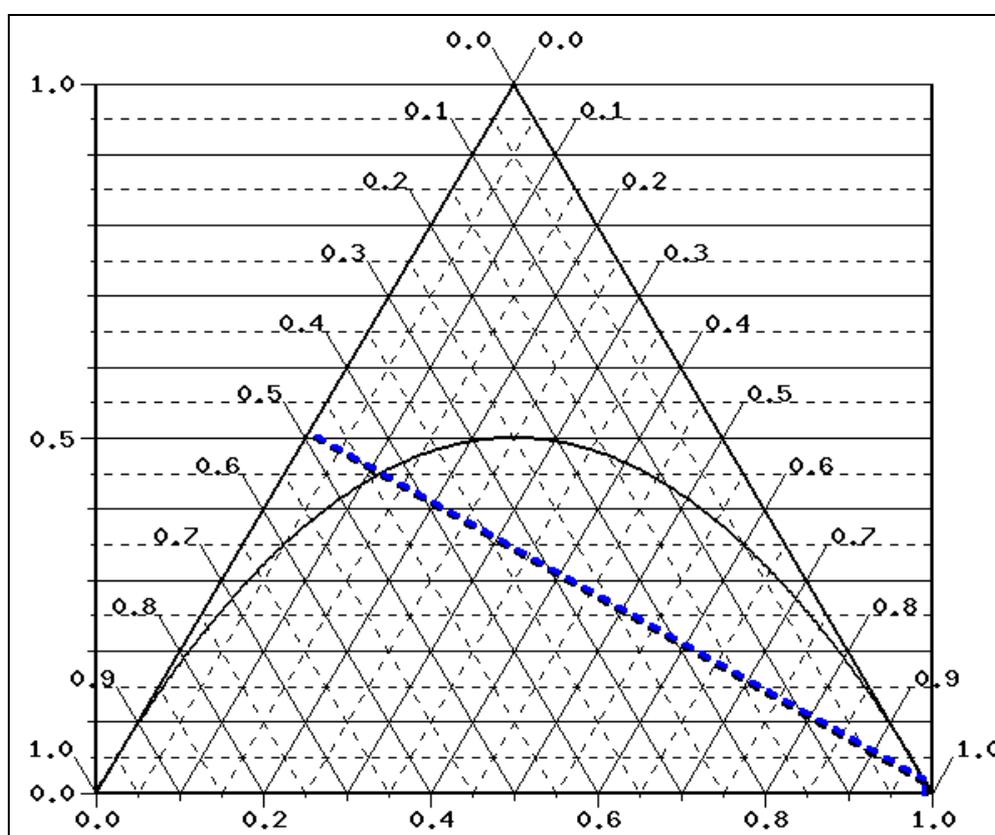


Abb. 14: Darstellung der Genotypenverteilung im De Finetti-Dreieck: I1036T Polymorphismus in Exon 23 des *ABCC2* Gen. Blau: HCC, Schwarz: Kontrollen

6.3.4 Subgruppenanalyse beim HCC: Virushepatitis, Diabetes mellitus, Tabak und Alkohol

Eine Analyse der Allelfrequenzen und der Genotypendistribution beim HCC viraler Genese wurde aufgrund der niedrigen Frequenz nicht durchgeführt. Auch die Analyse der Allelfrequenzen beim HCC anhand der Risikofaktoren Diabetes mellitus, Tabakkonsum

und Alkoholkonsum konnte aufgrund der niedrigen Allelfrequenz nicht durchgeführt werden.

6.3.5 Detektion des Polymorphismus IVS23+56C>T (*rs4148396*)

Anhand der Sequenzdaten von 78 gesunden Kontrollpersonen kaukasischer Abstammung und 88 *HCC*-Patienten konnte in der 3'flankierenden intronischen Sequenz von Exon 23 an Position 56 ein nicht-kodierender Polymorphismus detektiert werden. An dieser Position kommt es zu einem Austausch der Basen Cytosin gegen Thymin.

6.3.6 Genotypedistribution des Polymorphismus IVS23+56C>T

Genotyp		Erkrankungsstatus		Anzahl Gesamt(n)
		Kontrollen	<i>HCC</i>	
CC	Anzahl (n)	31	28	59
	Prozent (%)	39,7	31,8	35,5
CT	Anzahl (n)	31	44	75
	Prozent (%)	39,7	50	45,2
TT	Anzahl (n)	16	16	32
	Prozent (%)	20,5	18,2	19,3
Anzahl Gesamt(n)		78	88	166

Tabelle 27: Darstellung der Genotypenverteilung des Polymorphismus IVS23+56C>T im Kontrollkollektiv und im *HCC*-Kollektiv. n= Personen. Genotypen: p = 0.61846 (Armitage's Trend Test)

Tab. 27 zeigt die Genotypenverteilung des Polymorphismus IVS23+56C>T. Der im Kollektiv gesunder kaukasischer Blutspender vorkommende Polymorphismus IVS23+56 weist die Wildtypsequenz in 39,7% (n=31) der untersuchten Fälle auf. 39,7% (n=31) der Kontrollen waren heterozygote Merkmalsträger und 20,5% (n=16) waren homozygot für den SNP IVS23+56. Mit 31,8% (n=28) homozygoter Träger des Wildtyp-Allels, 50,0%(n=44) heterozygoter Träger des T-Allel und 18,2 %(n=16) homozygoter Träger des T-Allels konnten im *HCC*-Kollektiv mehr heterozygote Merkmalsträger beobachtet werden als im Kontrollkollektiv. Der Vergleich der Genotypenverteilung in beiden Gruppen war jedoch nicht signifikant ($p>0,05$).

6.3.7 Allelfrequenzen des Polymorphismus IVS23+56

SNP	Allele (n)	Kontrollen	<i>HCC</i> -Patienten	Odds Ratio [95% CI]	p-
IVS23 +56C	193	93 (0,60)	100 (0,57)	1,12 [0,72-1,74] $\chi^2=0.27$	0,61
IVS23 +56T	139	63 (0,40)	76 (0,43)		

Kontrollen	78	31 (40)	31 (40)	16 (20)	0.40
HCC gesamt	88	28 (32)	44 (50)	16 (18)	0.43
HCC viral	39	9 (23)	19 (49)	11(28)**	0.53*
HCC nicht-viral	48	19 (40)	25 (52)	4 (8)	0.34

Tabelle 29: Darstellung der Allelfrequenz und der Genotypenfrequenzen des Polymorphismus IVS23+56 im HCC-Kollektiv bei viraler vs. nicht-viraler Genese. n= Personen. Genotypen: **p = 0.00985 (Armitage's Trend Test). Allelfrequenzen: *p = 0.0158 (X2-Test)

Tab. 29 zeigt Genotypedistribution und Allelfrequenz des Polymorphismus IVS23+56 innerhalb des HCC-Kollektivs. Verglichen wurden 87 HCC Patienten. Homozygote Träger des T-Allels sind mit 28% vs. 8% häufiger in der Gruppe der HCC-Patienten mit einer Hepatitis ($p < 0.01$). Mit einer Frequenz von 0.53 ist das T-Allel signifikant häufiger bei HCC-Patienten mit einer chronischen Virushepatitis als bei nicht-viraler Genese ($p < 0,02$).

6.3.9 Allelfrequenzen beim HCC: Diabetes mellitus, Tabak und Alkohol

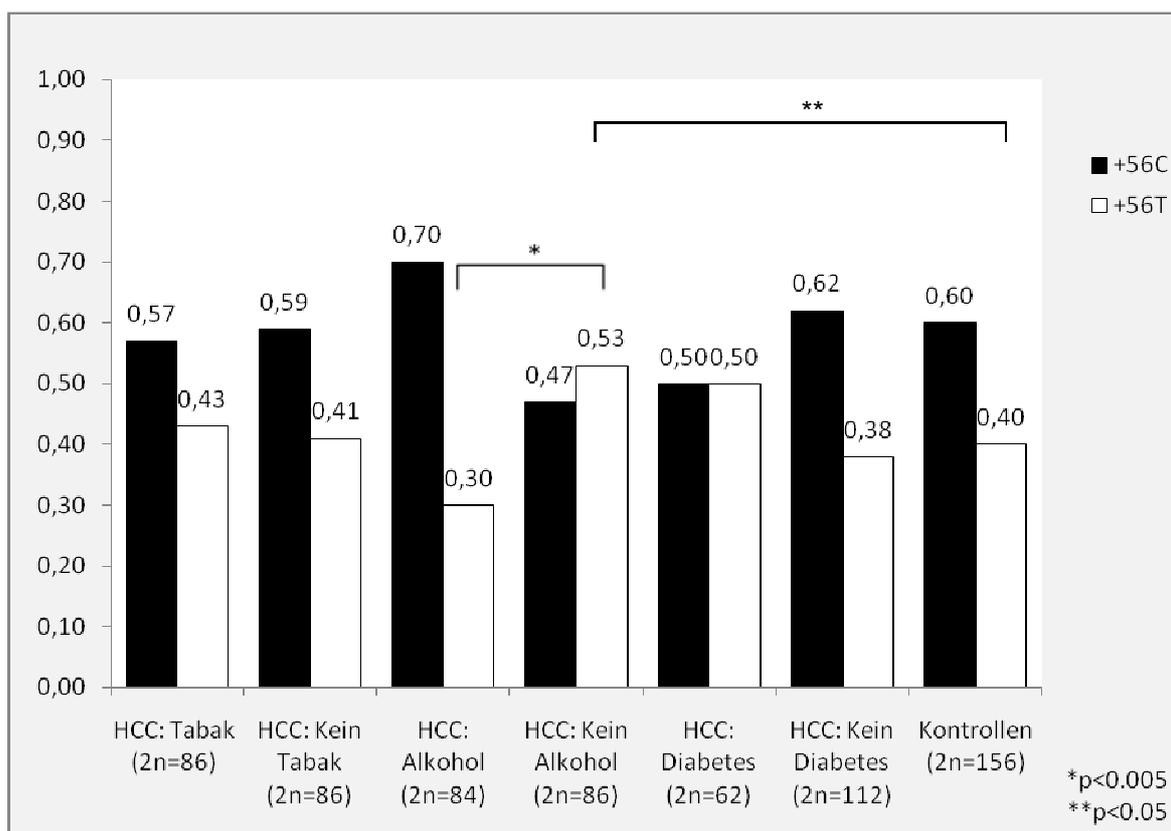


Diagramm 3: Darstellung der Allelfrequenzen des SNP IVS23+56C>T in Prozent im Kontrollkollektiv und im HCC-Kollektiv gruppiert nach Tabakkonsum, Alkoholkonsum und Diabetes mellitus. 2n= Anzahl der Allele. Beim Vergleich der Allelfrequenzen des intronischen Polymorphismus in den einzelnen HCC Subgruppen zeigen sich mehrere signifikante Unterschiede. Der Vergleich anhand des Risikofaktors Alkohol zeigt ein hochsignifikant häufigeres Vorkommen des T-Allel ($p < 0.005$) in der Gruppe, die keinen Alkohol konsumiert. Auch im Vergleich mit den Kon-

trollen ist der Unterschied signifikant ($p < 0.05$). Innerhalb der übrigen Gruppen lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Tabelle 30 zeigt detailliert die Analyse anhand des Risikofaktors Alkohol im *HCC* Subgruppenkollektiv. Neben der erhöhten Allelfrequenz in der Gruppe ohne Alkoholkonsum findet sich ein deutlich häufigeres Vorkommen von homozygoten Merkmalsträgern des T-Allels.

<i>ABCC2</i> IVS23+56C>T	Anzahl (Frequenz) der Allele und Genotypen	
	Alkohol (2n=84)	Kein Alkohol (2n=86)
Allele/Genotyp		
C	59 (0.70)	40 (0.47)
T	25 (0.30)	46 (0.53)
CC	19 (0.45)	9 (0.21)
CT	21 (0.50)	22 (0.51)
TT	2 (0.05)	12 (0.28)
Test auf Assoziation	X ²	p
Allelfrequenz	9.84	0.00171
Armitage's Trend Test	10.71	0.00106
Odds Ratio Statistik	Odds Ratio	95% CI
[C]↔[T]	2.714	1.444-5.102
[CC]↔[TT]	12.667	2.328-68.926

Tabelle 30. Darstellung der Ergebnisse des Vergleichs der Allelfrequenzen und der Genotypfrequenzen innerhalb des *HCC*-Kollektivs anhand von Alkoholkonsum. 2n:Allele. CI:Konfidenzintervall

6.4 Exon 25 im *ABCC2* Gen

6.4.1 Detektion des Polymorphismus I1173F (rs72558201)

Anhand der Sequenzdaten von 116 *HCC*-Patienten und 113 Kontrollen konnte an der Nukleotidposition 3517 des humanen *ABCC2* Gens eine A zu T Basentransition beobach-

tet werden. Das Kodon 1173 in Exon 25 kodiert als Folge die Aminosäure Phenylalanin statt Isoleucin.

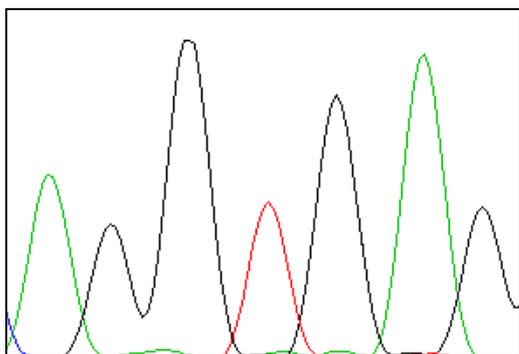


Abb. 16: Chromatogramm des A-Allels

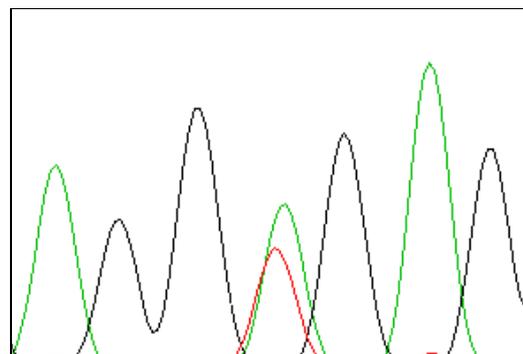


Abb. 17: Chromatogramm der A/T-Allels

6.4.2 Genotypedistribution der Mutation I1173F

Genotyp		Erkrankungsstatus		Anzahl Gesamt(n)
		Kontrollen	HCC	
AA	Anzahl (n)	102	108	210
	Prozent (%)	90,3	93,1	91,7
AT	Anzahl (n)	11	8	19
	Prozent (%)	9,7	6,9	8,3
TT	Anzahl (n)	0	0	0
	Prozent (%)	0	0	0
Anzahl Gesamt(n)		113	116	229

Tabelle 31: Darstellung der Genotypenverteilung der Mutation I1173F im Kontrollkollektiv und im HCC-Kollektiv. n=Personen. Genotypen: $p = 0.43633$ (Armitage's Trend Test)

Tab. 31 zeigt die Genotypenverteilung der Mutation I1173I in Exon 25. Im untersuchten Kontrollkollektiv von 113 gesunden Blutspendern kaukasischer Abstammung konnten 11 Probanden (9,7%) als heterozygote Träger des T-Allels identifiziert werden. Homozygote Träger des Wildtypallels konnte in 102 Fällen (98,7%) beobachtet werden. Von 116 untersuchten HCC-Patienten zeigten 8 Patienten (6,9%) einen heterozygoten Genotyp. Weder im Kontrollkollektiv noch im HCC-Kollektiv konnten homozygote Träger des T-Allels beobachtet werden. In beiden Kollektiven finden sich somit keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Prävalenz der Genotypen.

6.4.3 Allelfrequenzen der Mutation I1173F

SNP	Allele (n)	Kontrollen	HCC-Patienten	Odds Ratio [95% CI]	p-
-----	------------	------------	---------------	---------------------	----

1173Ile	439	215 (0,95)	224 (0,97)	0.698 [0,275-1,769] $\chi^2=0.58$	0,44
1173Ph	19	63 (0,05)	76 (0,03)		643

Tabelle 32: Darstellung der Allelfrequenzen der Mutation I1173F im Kontrollkollektiv und im *HCC*-Kollektiv. n= Allele. CI= Konfidenzintervall.

Tab. 32 zeigt die Allelfrequenzen der Mutation I1173F. An Position 3517 in Exon 25 des humanen *ABCC2* Gens konnte eine Basensubstitution von A zu T nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, ob der bekannte Polymorphismus zu einem erhöhten Risiko für die Erkrankung an einem hepatozellulären Leberzellkarzinom beiträgt, wurde die Prävalenz dieses SNP im Kontrollkollektiv und im *HCC*-Kollektiv verglichen. Im *HCC*-Kollektiv zeigte sich eine Präsenz des Polymorphismus in 8 (0,03%) Fällen. Im Kontrollkollektiv konnte der untersuchte SNP in 11 (0,05%) Fällen detektiert werden. Die Verteilung unterscheidet sich nicht signifikant von der im *HCC*-Kollektiv. Diese Mutation weicht sowohl bei den Fällen ($\chi^2 = 0.148$) als auch bei den Kontrollen ($\chi^2 = 0.296$) nicht vom HWG ab (**Abb. 18**).

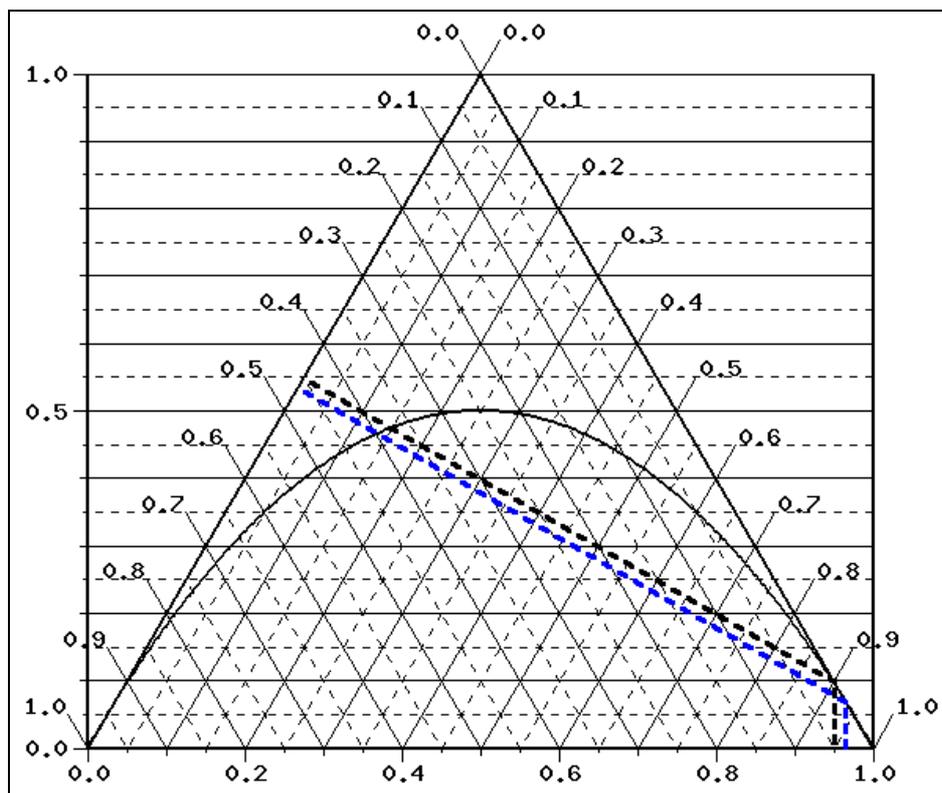


Abb. 18: Darstellung der Genotypenverteilung im De Finetti-Dreieck: I1173F Mutation in Exon 25 des *ABCC2* Gen. Blau: *HCC*. Schwarz: Kontrollen.

6.4.4 Subgruppenanalyse beim *HCC*: Virushepatitis, Diabetes mellitus, Tabak und Alkohol

Eine Analyse der Allelfrequenzen und der Genotypedistribution beim *HCC* viraler Genese wurde aufgrund der niedrigen Frequenz nicht durchgeführt. Auch die Analyse der

Allelfrequenzen beim *HCC* anhand der Risikofaktoren Diabetes mellitus, Tabakkonsum und Alkoholkonsum konnte aufgrund der niedrigen Allelfrequenz nicht durchgeführt werden.

6.5 Sequenzanalyse von Exon 28 des humanen *ABCC2* Gens

6.5.1 Detektion des Polymorphismus I1324I (*rs3740066*)

Anhand der Sequenzdaten von 104 *HCC*-Patienten und 113 Kontrollen konnte an der Nukleotidposition 3972 des humanen *ABCC2* Gens eine C zu T Basentransition beobachtet werden. Diese Basentransition führt nicht zur Translation einer anderen Aminosäure. Das Kodon 1324 in Exon 28 kodiert als Folge unverändert für die essentielle Aminosäure Isoleucin, sodass es sich um einen stummen Polymorphismus handelt.

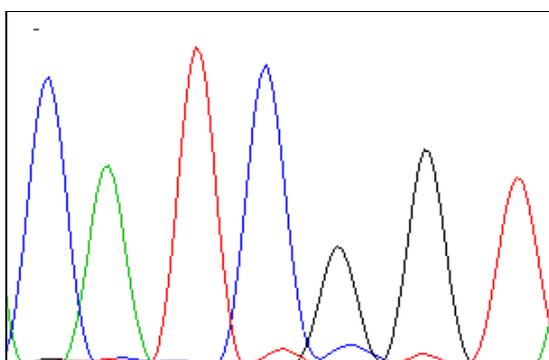


Abb. 19: Chromatogramm des C-Allels

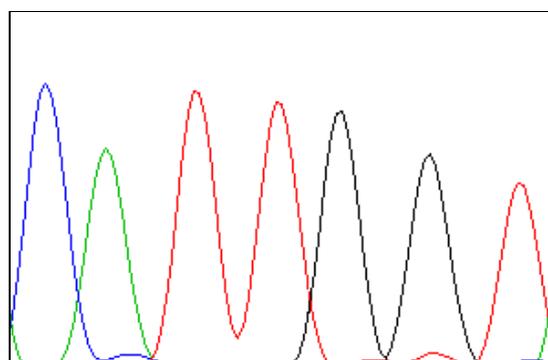


Abb. 20: Chromatogramm des T-Allels

6.5.2 Genotypedistribution des Polymorphismus I1324I

Genotyp		Erkrankungsstatus		Anzahl Gesamt(n)
		Kontrollen	<i>HCC</i>	
CC	Anzahl (n)	39	38	77
	Prozent (%)	34,5	36,5	35,5
CT	Anzahl (n)	50	52	102
	Prozent (%)	44,2	50,0	47,0
TT	Anzahl (n)	24	14	38
	Prozent (%)	21,2	13,5	17,5
Anzahl Gesamt(n)		113	104	217

Tabelle 33: Darstellung der Genotypenverteilung des Polymorphismus I1324I im Kontrollkollektiv und im *HCC*-Kollektiv. n=Personen. Genotypen: p = 0.30650 (Armitage's Trend Test)

Tab. 33 zeigt die Genotypenverteilung des Polymorphismus I1324I. Der im Kollektiv gesunder kaukasischer Blutspender vorkommende Polymorphismus I1324I weist die Wildtypsequenz in 34,5% (n=39) der untersuchten Fälle auf. 44,2% (n=50) der Kontrollen waren heterozygote Merkmalsträger und 21,2%(n=24) waren homozygot für den SNP I1324I. 36,5% (n=38) der *HCC*-Patienten sind homozygote Träger des Wildtyp-Allels, 50,0%(n=50) heterozygote Träger des T-Allel und 13,5 %(n=14) homozygote Träger des T-Allels. Homozygote Träger des T-Allels kommen in der Gruppe gesunder Blutspender häufiger vor als in der *HCC*-Gruppe. Der Unterschied der Genotypenverteilung in beiden Gruppen erreicht jedoch kein Signifikanzniveau ($p>0,05$).

6.5.3 Allelfrequenzen des Polymorphismus I1324I

SNP	Allele (n)	Kontrollen	<i>HCC</i> -Patienten	Odds Ratio [95% CI]	p-Wert
3972C	256	128 (0,57)	128 (0,62)	0,816 [0,556-1,198] $X^2=1.08$	0,29970
3972T	178	98 (0,43)	80 (0,38)		

Tabelle 34: Darstellung der Allelfrequenzen des Polymorphismus I1324I im Kontrollkollektiv und im *HCC* Kollektiv. n= Allele. CI= Konfidenzintervall.

Tab. 34 zeigt die Allelfrequenzen des Polymorphismus I1324I. An Position 3972 des humanen *ABCC2* Gens konnte eine Basensubstitution von C zu T nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, ob der bekannte Polymorphismus 3972C>T mit einem erhöhten Risiko für die Erkrankung an einem hepatozellulären Leberzellkarzinom assoziiert ist, wurde die Prävalenz dieses SNP im Kontrollkollektiv und im *HCC*-Kollektiv verglichen. Im *HCC*-Kollektiv zeigte sich eine Präsenz des Polymorphismus 3972C>T in 66 (63,5%) Fällen. Im Kontrollkollektiv konnte der untersuchte SNP in 74 (65,4%) Fällen detektiert werden. Die Verteilung unterscheidet sich nicht signifikant von der im *HCC*-Kollektiv. Dieser Polymorphismus lag sowohl für *HCC*-Patienten ($X^2 = 0.329$) als auch für die Kontrollen ($X^2 = 1.111$) im HWG (**Abb.21**)

6.5.5 Allelfrequenzen beim HCC: Diabetes mellitus, Tabak und Alkohol

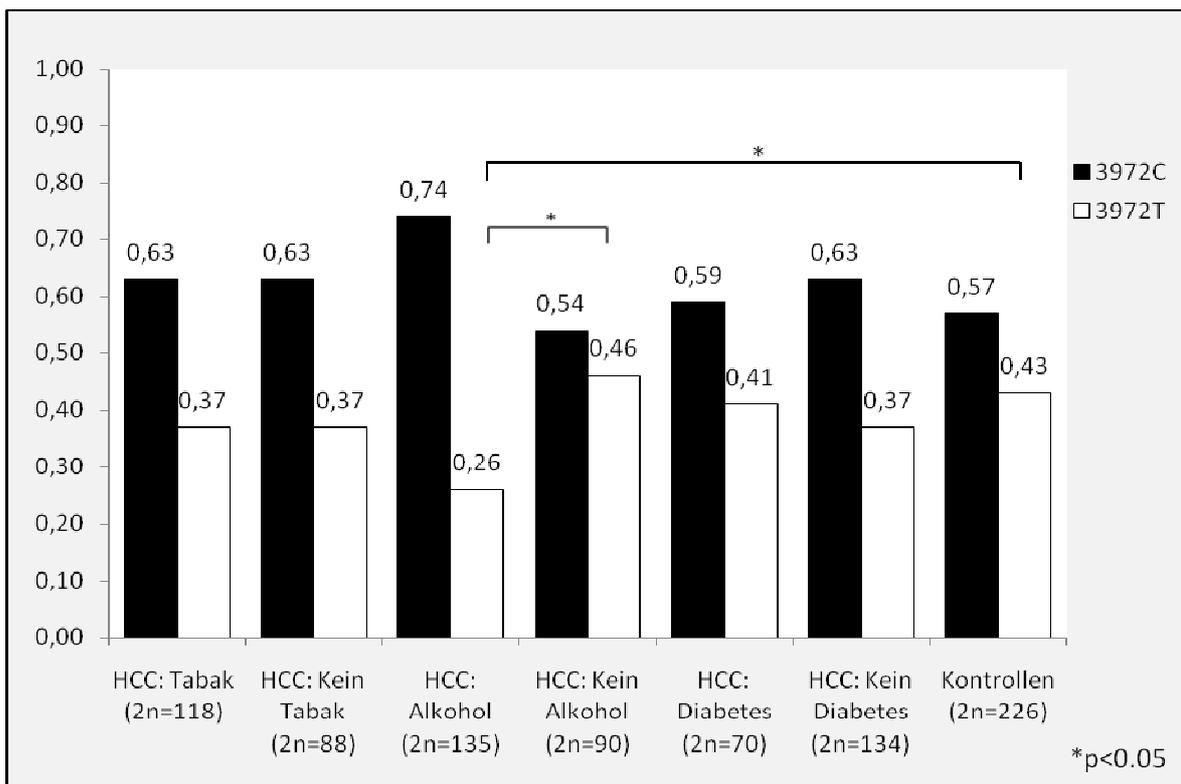


Diagramm 4: Darstellung der Allelfrequenzen des SNP I1324I in Prozent im Kontrollkollektiv und im HCC-Kollektiv gruppiert nach Tabakkonsum, Alkoholkonsum und Diabetes mellitus. 2n= Anzahl der Allele

Zuletzt wurden die Allelfrequenzen des Polymorphismus I1324I auf Unterschiede hin untersucht. Auch in dieser Analyse fällt ein häufigeres Vorkommen des 3972T Allel in der Gruppe der Patienten, die keinen Alkoholkonsum angeben, im Vergleich zur Gruppe, die angibt regelmäßig Alkohol zu konsumieren, auf. Mit 0,46 vs. 0,32 ist dieser Unterschied signifikant ($p < 0.05$). Auch im Vergleich mit dem Kontrollkollektiv zeigt sich eine signifikant unterschiedliche Allelfrequenz ($p < 0.05$) mit einem geringeren Vorkommen des T-Allels in der HCC-Gruppe, die regelmäßig Alkohol konsumiert. In den übrigen Gruppenanalysen lassen sich keine signifikanten Unterschiede aufweisen.

ABCC2 3972C>T Allele/Genotyp	Anzahl (Frequenz) der Allele und Genotypen	
	Alkohol (2n=110)	Kein Alkohol (2n=90)
C	75 (0.68)	49 (0.54)
T	35 (0.32)	41 (0.46)
CC	25 (0.45)	12 (0.27)
CT	25 (0.45)	25 (0.55)
TT	5 (0.10)	8 (0.18)
Test auf Assoziation	X ²	p
Allelfrequenz	3.96	0.04646
Armitage's Trend Test	3.75	0.05287
Odds Ratio Statistik	Odds Ratio	95% CI
[C]↔[T]	1.793	1.007-3.193
[CC]↔[CT+TT]	2.292	0.982-5.348

Tabelle 36. Darstellung der Ergebnisse des Vergleichs der Allelfrequenzen und der Genotypfrequenzen innerhalb des HCC-Kollektivs anhand von Alkoholkonsum. 2n:Allele. CI:Konfidenzintervall

6.5.6 Übersicht der Prävalenz homozygoter Genotypen

SNP	Kontrollen n=Pers.(%)	HCC gesamt	HCC: Diabetes		HCC: Alkohol		HCC: Tabak	
			+	-	+	-	+	-
C-24T	11(9)	9(11)	6(11)	2(2)	3(4)	5(8)	4(5)	4(7)
V417I	4(3)	8(7)	4(9)	4(6)	6(10)	2(4)	5(8)	3(6)
IVS23+56C>T	16(21)	16(18)	8(29)	7(13)	2(5)	12(28)	7(16)	7(16)
I1324I	24(21)	14(14)	6(17)	7(10)	5(9)	8(18)	7(11)	6(14)

Tabelle 37: Darstellung der Prävalenz homozygoter Genotypen im Kontrollkollektiv und im HCC-Kollektiv. n= Personen. Prozentangaben in Klammern.

Tab. 37 zeigt die homozygoten Genotypen der untersuchten Polymorphismen. Beim Vergleich der Kontrollen mit dem HCC-Kollektiv finden sich hinsichtlich der Homozygotenfrequenz keine signifikanten Unterschiede. Die SNPs I1036T und I1173F wurden nicht dargestellt, da in unserem Kollektiv keine Homozygoten detektiert wurden. Bei Betrachtung der Subgruppen innerhalb des HCC-Kollektivs ist der TT-Genotyp des Polymorphismus -24C>T signifikant mit einem Diabetes assoziiert ($p=0.02690$ Odds Ratio=0.181 CI=[0.035-0.952] $X^2=4.9$). Insgesamt zeigen die SNPs IVS23+56C>T und I1324I mit 21% ein häufiges Vorkommen homozygoter Genotypen. Der SNP IVS23+56C>T zeigt in der Subgruppenanalyse anhand des Riskofaktors Alkohol eine höhere Homozygotenfrequenz bei den Fällen, bei denen kein zusätzlicher Alkoholkonsum vorlag. ($p<0.005$)

7 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals genetische Varianten der Konjugatexportpumpe *ABCC2* (MRP2) beim hepatozellulären Karzinom untersucht. Die genetische Variante IVS23+56C>T in Intron 23 wurde signifikant häufiger im *HCC*-Kollektiv ohne Alkoholkonsum als in der Kontrollgruppe detektiert. Die risikofaktorspezifische Analyse anhand von Alkoholkonsum, Virushepatitis und Diabetes mellitus ergab innerhalb des *HCC*-Kollektivs einige signifikante Unterschiede. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen durch Detektion von Polymorphismen im *ABCC2* Gen bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom einen Beitrag leisten zur Identifikation genetischer Risikoprofile, die möglicherweise die Suszeptibilität für die Entwicklung eines *HCC* in verschiedenen ätiologischen Gruppen präzisieren. Denkbar wären z. B. weitere Untersuchungen der genetischen Variation in Form von Haplotypenanalysen.

7.1 Die physiologische Bedeutung hepatobiliärer Transportproteine

Transporter sind spezialisierte Transmembranproteine, die in einem komplexen Zusammenspiel auf zellulärer Ebene sowohl die Absorption als auch die Exkretion nicht-membrangängiger endogener Stoffwechselmetaboliten und exogener Substanzen regulieren. Sie beeinflussen durch eine breit gefächerte Substratspezifität und differentielle Expression in zahlreichen Körpergeweben die Gewebegängigkeit vieler Xenobiotika und limitieren durch die Aufrechterhaltung der intrazellulären Homöostase anfallender endogener Stoffwechselmetabolite und durch die Elimination von Pharmaka und Umwelttoxinen die zyto- und genotoxischen Auswirkungen potentiell schädlicher Substanzen.

Genetische Polymorphismen in diesen Transportproteinen können z. B. durch eine veränderte Proteinexpression oder Transportkapazität zu interindividuellen Unterschieden der Detoxifikationskapazitäten führen und die Disposition für Arzneimittel und potentielle Karzinogene grundlegend verändern.

Von besonderer klinischer Relevanz sind zwei hepatobiliäre Transporter mit einer hohen genetischen Heterogenität, die am häufigsten mit der Disposition für Pharmaka und endogene Substanzen wie zum Beispiel Gallensäuren oder Cholesterin in Verbindung gebracht werden: der organische Anionentransporter OATP1B1 und die Konjugatexportpumpe *ABCC2*.

OATP1B1 wird vor allem in der basolateralen Hepatozytenmembran exprimiert und reguliert unter anderem die hepatische Aufnahme von Statinen.^[121-123] Erst kürzlich konnte eine häufig vorkommende intronische Variante des *SLCO1B1*-Gens als starker genetischer Risikofaktor für die statin-induzierte Rhabdomyolyse identifiziert werden.^[124]

Die Konjugatexportpumpe *ABCC2* wird vor allem in der apikalen Hepatozytenmembran exprimiert und stellt durch ein sehr breites Substratspektrum und seine Funktion bei der terminalen hepatobiliären Elimination von in der Phase-II Biotransformation elaborierten Konjugaten einen entscheidenden zytoprotektiven Abwehrmechanismus gegen potentiell toxische Xenobiotika dar.^[53] Die kürzlich beschriebene hochsignifikante Assoziation der *ABCC2* -24C>T Variante mit einer erhöhten Suszeptibilität für eine idiosynkratische Arzneimittelreaktion am Beispiel schwerer Hepatotoxizität durch Einnahme von Diclofenac, einem weit gebräuchlichen nicht-steroidalen Antiphlogistikum, untermauert seine chemoprotektive Funktion.^[125]

7.2 Varianten von *ABCC2* und die Disposition für hepatobiliäre Erkrankungen

Gut 40 Jahre vor der Identifikation und molekularbiologischen Charakterisierung der apikalen Konjugateffluxpumpe *ABCC2*, beschrieben die Pathologen I.N. Dubin und F.B. Johnson 1954 erstmals eine neue klinische Entität, die sich durch eine intermittierende konjugierte Hyperbilirubinämie, Veränderungen im Koproporphyrinmetabolismus und der Ablagerung eines melanin-ähnlichen Pigments in den Hepatozyten manifestierte.^[104] Kartenbeck et al. gelang erst Jahrzehnte später an einem Leberresektat eines Patienten immunhistochemisch der Nachweis, daß der komplette Verlust von *ABCC2* in der apikalen Hepatozytenmembran als pathophysiologisches Korrelat dem Dubin-Johnson Syndrom zugrunde liegt.^[70]

Bis heute wurden etliche Sequenzvarianten des *ABCC2* Gen identifiziert, doch nur wenige verursachen den Phänotyp des Dubin-Johnson Syndroms. Die hereditäre Defizienz von *ABCC2* unterstreicht jedoch die Schlüsselfunktion bei der Elimination anionischer Konjugate, wie Bilirubinglukuroniden, aus dem Körper.

Dietrich et al. haben bereits vor Jahren die Rolle von *ABCC2* als Transporter für organische Anionen neu beleuchtet. Ihre Arbeit bewies, dass die Elimination des heterozyklischen aromatischen Amins PhIP (2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine), einem mit der Nahrung aufgenommenem karzinogenen Umwelttoxin, vor allem durch MRP2 erfolgt.^[49] Die Versuche an Wistar Ratten und MRP2-defizienten TR⁻ Ratten zum Einfluß von MRP2 auf die oralen Bioverfügbarkeit von PhIP zeigte zum einen eine gesteigerte Bioverfügbarkeit mit konsekutiver Akkumulation der karzinogenen Substrate in hoher Konzentration im Leberparenchym von TR⁻ Ratten, zum anderen eine reduzierte Resorption in den Organismus durch direkte MRP2-vermittelte Elimination aus den Enterozyten ins Intestinum der gesunden Wistar Ratten.^[50] Folglich könnten individuelle Unterschiede der Transporterexpression oder -aktivität die Suszeptibilität für andere Erkrankungen und Tumore beeinflussen.^[51]

In aktuellen translationalen Fall-Kontroll-Studien waren häufig vorkommende Varianten von MRP2 mit der intrahepatischen Schwangerschaftscholestase (ICP)^[126], der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD)^[118] und einer toxischen medikamenten-induzierten Hepatitis^[119] assoziiert.

Die Assoziation von Polymorphismen des *ABCC2*-Gen und der Prädisposition für gastrointestinalen oder hepatobiliären Tumorerkrankungen ist bislang nur unzureichend untersucht. Erstmals beobachteten Höblinger et al. eine Assoziation zwischen der bei Kaukasieren häufigen synonymen Variante 3972C>T mit der Suszeptibilität für ein cholangiozelluläres Karzinom.^[120]

7.3 Ergebnisse dieser Arbeit

Alle in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen wichen nicht vom Hardy-Weinberg Equilibrium ab, was für eine korrekte Sequenzierung der untersuchten Genabschnitte spricht.

7.3.1 Der Polymorphismus rs717620 beim hepatozellulären Karzinom

Der SNP -24C>T stellt einen häufigen Promotorpolymorphismus in der 5'-UTR des *ABCC2*-Gens dar. An 127 Kontrollen und 144 *HCC* Patienten wurde die Verteilung des SNP -24C>T untersucht. Die Genotypdistribution war in beiden Kollektiven ähnlich. Das Risikoallel -24T wurde bei 24% der Probanden in der Kontrollgruppe und bei 27% bei *HCC* Patienten detektiert. Ob bei den Patienten eine virale Leberzirrhose vorlag oder nicht hatte weder auf die Frequenz des Allels -24T (0.26 vs 0.19), noch auf die Genotypdistribution einen signifikanten Einfluß. Patienten mit fortgesetztem Alkoholkonsum waren seltener Träger des -24T Allels als abstinente Patienten ($p < 0.02$). Analog dazu war das -24T Allel im Vergleich mit der Kontrollgruppe deutlich seltener nachweisbar ($p < 0.05$). Der homozygote TT-Genotyp war jedoch beim *HCC* mit einem Diabetes assoziiert ($p < 0.05$).

Die Ergebnisse der Sequenzierung des SNP -24C>T sind vergleichbar mit den aus der Literatur bekannten Frequenzen für Kaukasier^[125, 127-130] und Asiaten.^[96, 119, 131, 132] Diese Variante kommt bei Kaukasieren mit einer relativ hohen Allelfrequenz (26%) vor und hat Auswirkungen auf Proteinexpression, Pharmakotoxizität und Pharmakokinetik. Homozygotie für diese Variante führt zu einer verminderten hepatobiliären Elimination von Erythromycin^[133], wird mit schweren gastrointestinalen Nebenwirkungen unter immunsuppressiver Therapie mit Mycophenolatmofetil bei pädiatrischen Patienten nach Herztransplantation^[134] und bei nierentransplantierten Patienten assoziiert.^[128] Bei weiblichen pädiatrischen Leukämiepatientinnen, die sich einer Methothrexattherapie unterzogen war diese Variante mit erhöhten Plasmaspiegeln assoziiert.^[135] Darüberhinaus scheint der

SNP -24C>T die Pharmakokinetik und -dynamik von Irinotecan, einem u.a. in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms eingesetzten Topoisomerase I Inhibitor, zu beeinflussen^[131]

Letztendlich zeigte die Arbeitsgruppe von Choi et al., das dieser Polymorphismus als Teil eines MRP2 Haplotyps mit einer erhöhten Suszeptibilität für einen toxischen Leberschaden assoziiert ist und korrelierten dies mit dem in vitro Nachweis einer um über 30% reduzierten Promotoraktivität.^[119] Haenisch et al. beobachteten ebenfalls eine reduzierte mRNA Expression im gesunden Nierenkortexgewebe nephrektomierter Nierenzellkarzinom Patienten und wiesen eine in vitro um 18,7% reduzierte Promotoraktivität des -24T-Allels nach.^[136]

7.3.2 Der Polymorphismus *rs2273697* beim hepatozellulären Karzinom

Anhand der Sequenzanalyse von 121 Kontrollen und 112 *HCC* Patienten konnte der nicht-synonyme Polymorphismus 1249G>A in Exon 10 detektiert werden. Das Kodon 417 kodiert als Folge die Aminosäure Isoleucin statt Valin. Auch das 1249A-Allel ist mit 18% im Kontrollkollektiv und 22% im *HCC*-Kollektiv ein häufiger Polymorphismus.

Haenisch et al. beschreiben eine identische Frequenz von 21,1% in einem großen Kollektiv von 374 gesunden Kaukasiern.^[137] Die interethnische Varianz dieses SNP scheint groß zu sein. Ito et al. und Itoda et al. berichten in jeweils kleinen Kollektiven von knapp 50 gesunden Japanern eine Prävalenz des 1249T-Allels von 8%, respektive 12,5%.^[96, 97] Yamaguchi-Kabata et al. zeigten kürzlich in einem Kollektiv von 7000 gesunden Probanden, daß dieser SNP bei Japanern eine signifikante intraethnische Varianz aufweist^[138], sodaß die von Itoda und Ito beschriebene Prävalenz vor diesem Hintergrund nicht zwingend repräsentativ ist. Mit nur 3% kommt das 1249T-Allel in China scheinbar wesentlich seltener vor.^[139] Aufgrund der großen interethnischen Unterschiede, scheint es sinnvoll die Prävalenz dieses SNP beim *HCC* auch in anderen Ethnien zu untersuchen.

Dieser Polymorphismus ist in der ersten Transmembrandomäne lokalisiert, einer Region mit wesentlicher funktioneller Bedeutung für die Substrataffinität und Transportaktivität von *ABCC2*.^[140] Hirouchi et al. untersuchten erstmals den Einfluß der Variante V417I auf die zelluläre Lokalisation und Proteinexpression und studierten die Transportfunktion an isolierten Membranvesikeln aus MRP2 exprimierenden LLC-PK1 Zellen. Sie postulierten, daß die Variante V417I keinen Einfluß auf die in vivo Funktion des Proteins ausübt.^[141] In einer aktuellen Arbeit zeigen Vore et al. in Membranvesikeln aus Sf9-Insektenzellen eine deutlich reduzierte Substrataffinität der V417I Variante für Leukotrien C₄, Estradiol-3-glukuronid und Estradiol-17 β -glukuronid, einem endogenen Metabolit von Estradiol^[142] E(2)17G kann in hohen Dosen bei Ratten eine schwere Cholestase verursachen, die mit einer eingeschränkten Transportfunktion von MRP2 einhergeht.^[143] Gleichzeitig scheint

diese Substanz die Progression einer Leberfibrose in eine Zirrhose zu verlangsamen.^[144] Welchen Einfluß diese Variante von *ABCC2* in vivo auf den Metabolismus von E(2)17G hat, ist bislang noch nicht untersucht worden. Sookoian et al. beschreiben die Assoziation einer Variante von *ABCC2* mit der intrahepatischen Schwangerschaftscholestase.^[126]

Die funktionelle Bedeutung für die Pharmakotherapie und -toxizität wird jedoch mehrfach beschrieben. Haenisch et al. beobachteten bei Trägern der Variante 417I nach oraler Verabreichung eine signifikant reduzierte Bioverfügbarkeit und eine erhöhte hepatobiliäre Ausscheidung nach intravenöser Verabreichung des Betablockers Talinolol und schlußfolgern, daß diese Variante zu einer erhöhten Transportaktivität führt.^[137] Kim et al. machten eine gegensätzliche Beobachtung. Die Variante 417I führte in vitro zu einer reduzierten Transportkapazität von Carbamazepin und war bei Epilepsiepatienten hochsignifikant mit dem Auftreten neurologischer Nebenwirkungen unter Carbamazepintherapie assoziiert.^[145] Bei chinesischen Nierentransplantationsempfängern war die Variante mit einer höheren Plasmakonzentration von Mycophenolat assoziiert.^[146]

7.3.3 Der Polymorphismus rs45441199 beim hepatozellulären Karzinom

In Exon 23 wurde die nicht-synonyme *ABCC2*-Variante I1036T detektiert, die zum Austausch von Isoleucin gegen Threonin führt. Im untersuchten Kollektiv von 79 Kontrollen und 108 *HCC*-Patienten lag die Allelfrequenz bei 0.006, respektive 0.009. Ein homozygoter Genotyp für das 3107C Allel konnte nicht detektiert werden. Aufgrund der niedrigen Allelfrequenz kann keine Aussage über eine Assoziation mit dem hepatozellulären Karzinom getroffen werden. Diese Variante ist bisher nicht funktionell charakterisiert worden und die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals die Prävalenz dieser Variante bei Kaukasieren und beim *HCC*. Es gibt Gründe zu der Annahme, daß die Variante I1036T funktionell relevant ist. Zunächst befindet sich diese Variante direkt neben einer hoch konservierten Region in der Transmembranhelix 13, die Bestandteil der Transmembrandomäne 3 ist und führt dort zu einem Austausch der hydrophoben Aminosäure Isoleucin gegen die polare Aminosäure Threonin.^[147] Da sie sich somit im 5'-Ende der Erkennungssequenz (splice acceptor site) für die Enzyme des Spleißvorgangs befindet^[69, 103], ist es denkbar, daß dieser Prozeß durch diese Variante beeinflusst wird. Eine mögliche Auswirkung der Substitution einer Aminosäure kann mit dem Online Tool Polymorphism Phenotyping (PolyPhen, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>) abgeschätzt werden.^[148] Die Abfrage in der PolyPhen Datenbank klassifiziert diesen SNP als „possibly damaging“. Eine weitere funktionelle Charakterisierung dieses SNP könnte zu einem erweiterten Verständnis molekularer Krankheitsmechanismen und seltener schwerer Medikamentennebenwirkungen beitragen.

7.3.4 Der Polymorphismus rs4148396 beim hepatozellulären Karzinom

In der 3' flankierenden intronischen Sequenz von Exon 23 wurde anhand der Sequenzdaten von 78 Kontrollen und 88 *HCC* Patienten der Polymorphismus IVS23+56C>T detektiert. Mit einer Frequenz für das +56T Allel von 40%, respektive 43% handelt es sich um eine sehr häufige Variante von *ABCC2*. Es zeigte sich ein signifikant häufigeres Vorkommen des Risikoallels +56T in der *HCC* Gruppe, die keinen Alkohol konsumierte ($p < 0.05$). In einer kleinen Subgruppe wurden die Allelfrequenzen hinsichtlich einer viralen oder nicht-viralen Genese verglichen. Der Genotyp TT war bei viraler Leberzirrhose mit 28% vs. 8% deutlich häufiger vertreten ($p > 0.01$, Odds ratio=0.172 C.I.= [0.043-0.693], $X^2 = 6.66$), die Allelfrequenz unterschied sich ebenfalls signifikant ($p > 0.02$, Odds ratio=0.473 C.I.= [0.256-0.872], $X^2 = 5.83$).

7.3.5 Der Polymorphismus rs72558201 beim hepatozellulären Karzinom

Mor-Cohen et al. wiesen erstmals nach, dass die Mutation I1773F mit einer eingeschränkten Transportfunktion einhergeht und Homozygotie zum Phänotyp des Dubin-Johnson Syndroms führt.^[98] Die Mutation resultiert in einem inaktiven Protein und Retention im endoplasmatischen Retikulum.^[115] In der allgemeinen iranischen Bevölkerung waren 5,8% (14/243) heterozygote Allelträger. Seit der Erstbeschreibung gibt es unseres Wissens nach keine Arbeit, die die Allelfrequenz dieser Mutation in einem kaukasischen Kollektiv untersucht hat. In dem Kontrollkollektiv von 113 Probanden und 116 *HCC* Patienten konnte erwartungsgemäß kein homozygoter Genotyp detektiert werden. Mit einer Heterozygotenfrequenz von 9,7%, respektive 6,9% kommt diese Mutation relativ häufig in unserem Kollektiv vor. In der asiatischen Bevölkerung scheint diese *ABCC2* Variante wenn überhaupt nur sehr selten vorzukommen. Sai et al. untersuchten insgesamt 236 Japaner und haben diese Variante nicht detektieren können.^[132] Auch Ho et al. detektierte in einem asiatischen Kollektiv ($n=288$) singapurischer Abstammung diese Variante nicht. Eine Assoziation mit dem *HCC* konnte nicht gezeigt werden.

7.3.6 Der Polymorphismus rs3740066 beim hepatozellulären Karzinom

In Exon 28 konnte der synonyme Polymorphismus 3972C>T detektiert werden. Anhand der Sequenzanalyse von 113 gesunden Probanden kaukasischer Abstammung und 104 *HCC*-Patienten ergab sich eine Allelfrequenz des 3972T Allels von 43%, respektive 38% und stellt somit eine häufige genetische Variante dar. Ob eine chronische Virushepatitis als begleitender Risikofaktor vorlag oder nicht zeigte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Allelfrequenzen (0.44 vs 0.34) oder Genotypedistribution. Die weitere risikofaktorspezifische Analyse zeigte jedoch, eine signifikant höhere Prävalenz des Risikoallels in der Gruppe ohne Alkoholkonsum (0.46) im Vergleich zur Gruppe mit Alkohol

(0.26) als koexistierenden Risikofaktor ($p < 0.05$). Auch im Vergleich mit der Kontrollgruppe war dieser Unterschied nachweisbar ($p < 0.05$).

In unserem Kontrollkollektiv ist die Allelfrequenz des 3972T-Allel (0.43) identisch mit den bisher beschriebenen Frequenzen in kaukasischen Kollektiven. Haenisch et al berichten von einer Frequenz von 34,2% für das 3972T Allel in einem Kollektiv von 374 gesunden Kaukasiern.^[137] In einem wesentlich kleineren Kollektiv von 73 Kaukasiern fanden Hoeblinger et al. eine Allelfrequenz von 26%.^[120] Bei Asiaten scheint diese Variante seltener vorzukommen. Sai et al. detektierten bei 236 Japanern diesen SNP mit einer Frequenz von 21,6%.^[132] Dies steht im Einklang mit den vorangegangenen Untersuchungen bei gesunden Koreanern ($n=110$, 3972T= 23%)^[119] und gesunden Japanern ($n=48$, 3972T=21,9%). [96] Im Vergleich zur chinesischen Bevölkerung scheinen noch deutlichere interethnische Differenzen zu bestehen. Ho et al. untersuchten insgesamt 288 Probanden singapurischer Abstammung und konnten diesen SNP bei Chinesen nicht detektieren, bei Malaysiern und Indianer lag die Allelfrequenz bei unter 3%.^[139]

Die *ABCC2* Variante 3972C>T in Exon 28 ist ein nicht-kodierender SNP. Obwohl diese SNPs nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führen, können sie trotzdem in vivo zu einer veränderten Proteinfunktion führen z.B. durch veränderte Regulation des Splicing durch Alteration des Splicing Enhancers oder silencer binding Elements.^[149] Kürzlich zeigten Kimchi-Safarty et al., daß ein synonymes SNP im *MDR1* Gen die Proteinkonformation und Substratspezifität dieses Transportproteins veränderte und postulierten, dass die Entstehung eines selten vorkommenden Kodons durch einen Polymorphismus die Translationskinetik einer definierten mRNA verändern kann und bei der Translation derselben Polypeptidkette letztendlich zwei verschiedene Konformationen entstehen.^[150] Ein ähnlicher Mechanismus könnte bei der Variante I1324I eine Rolle spielen, da an Position 3972 durch den Basentausch C>T das Triplet Kodon AUU statt AUC für Isoleucin kodiert. Nackley et al. untersuchten den Einfluß von 3 Haplotypen der Catechol-O-methyltransferase (*COMT*) auf die Enzymaktivität und beobachteten die größten Unterschiede zwischen den Haplotypen, die sich in den synonymen SNPs unterscheiden und unterstreichen damit die Bedeutung von Haplotypenanalysen bei der Untersuchung von genetischen Variationen.^[151] Auch Capon et al. beobachteten, daß eine synonyme Variation des Corneodesmosingens, das eine Rolle bei der Prädisposition der Psoriasis zu spielen scheint, durch Veränderung der Stabilität und der Sekundärstruktur der mRNA die allelspezifische Genexpression beeinflusste.^[152]

In einer aktuellen Studie an 24 gesunden Probanden kaukasischer Abstammung untersuchten Laechelt et al. haplotypenspezifische Auswirkungen auf die Expression von

ABCC2 und beobachteten in vitro eine reduzierte Proteinexpression des Haplotyps, der das 3972T Allel beinhaltet.^[153]

7.4 Interpretation der beobachteten Ergebnisse

7.4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch direkte Sequenzierung der Exone 1, 10, 23, 25, 28 und deren jeweils flankierenden intronischen Abschnitte wurden in dieser als Fall-Kontrollstudie angelegten Arbeit die oben genannten Polymorphismen detektiert. Bis auf die in Exon 23 und 25 detektierten Polymorphismen, handelt es sich um häufige genetische Varianten im *ABCC2*-Gen, deren Auswirkungen auf die Funktionalität dieser Konjugatexportpumpe gerade im Bereich der Pharmakogenomik Gegenstand aktueller Untersuchungen ist mit dem Ziel, diejenigen spezifischen Varianten zu identifizieren, die im wesentlichen zu individuellen Unterschieden der Bioverfügbarkeit für bestimmte Pharmaka und deren Toxizität beitragen. In ähnlicher Weise impliziert die genetische Variabilität im *ABCC2*-Gen interindividuelle Unterschiede im Metabolismus für Karzinogene und könnte die Suszeptibilität für das hepatozelluläre modifizieren. Beim Vergleich der in dieser Arbeit untersuchten SNPs in der Kontrollgruppe und dem gesamten unstratifizierten *HCC*-Kollektiv zeigt sich keine Assoziation mit dem *HCC*. Wie bei vielen anderen Tumorentitäten, geht man beim *HCC* davon aus, dass es sich um eine ätiologisch komplexe Erkrankung handelt, die in der Folge aus einer Interaktion von verschiedenen genetischen Merkmalen, Erkrankungsentitäten und Umweltfaktoren resultiert. Vor diesem Hintergrund wurde das *HCC*-Kollektiv zusätzlich anhand der Risikofaktoren Tabakkonsum, Alkoholkonsum, Virushepatitis und Diabetes mellitus stratifiziert. Bei dieser Analyse zeigten sich dann signifikante Unterschiede der Genotypisierungsmarker. Der SNP -24C>T (26% vs. 9%), IVS23+56C>T (53% vs. 34%, $p<0.01$) und 3972C>T (44% vs. 34%) wurden jeweils häufiger bei *HCC* Patienten mit chronischer Virushepatitis beobachtet als bei nicht-viraler Genese. Der Genotyp IVS23+56TT wurde signifikant häufiger in diesem Kollektiv detektiert ($p<0.02$). Ein beinahe umgekehrter Unterschied kann bei der Analyse anhand von Alkoholkonsum beobachtet werden: Die Allele -24T (16% vs. 28%, $p>0.02$), IVS23+56T (30% vs. 53%, $p<0.005$) und 3972T (26% vs. 46%, $p<0.05$) finden sich signifikant seltener bei *HCC* Patienten mit Alkoholkonsum als bei Patienten ohne Alkoholkonsum. Für den SNP -24C>T und 3972C>T ist dieser Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls signifikant ($p<0.05$). Das IVS23+56T Allel wiederum wurde signifikant häufiger bei *HCC* Patienten ohne Alkoholkonsum als in der Kontrollgruppe detektiert ($p<0.05$).

Diese inverse Beobachtung ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass in dem Kollektiv ohne Alkoholkonsum der Anteil von Patienten mit einer chronischen Virushepatitis größer ist als bei den Patienten mit ethyltoxischer Leberzirrhose.

Insgesamt belegen die Ergebnisse der Genotypisierungsanalyse, dass genetische Disposition differentiell auf die neoplastische Transformation wirkt und vom nosologischen Hintergrund der Zirrhoseentwicklung (Alkohol, Tabakkonsum, Virusinfektion) abhängig ist. Basierend auf diesen Ergebnissen ist die genetische Disposition ein Risikofaktor, der in einem bestimmten physiologischen Kontext wirksam ist.

7.4.2 Methodische Aspekte

Obwohl sich in dieser Arbeit einige signifikante Unterschiede und eine Assoziation des IVS+56T Allels mit der Suszeptibilität für ein *HCC* zeigen, können aufgrund der Vielzahl der analysierten Zusammenhänge die Größe einzelner Gruppen und der retrospektive Charakter der Erhebung der Risikofaktoren aus Akten einen Einfluss ausüben. Beim *HCC* handelt es sich um eine komplexe multifaktorielle Erkrankung, die außer in Regionen mit hoher HBV-Rate selten vor dem vierzigsten Lebensjahr auftritt und die höchste Inzidenz zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr aufweist.^[5] Das mittlere Alter in der Kontrollgruppe beträgt 38,44 Jahre und in unserem *HCC*-Kollektiv 61,47 Jahre, sodaß auch nicht ausgeschlossen werden kann, daß Probanden aus der Kontrollgruppe Träger von Suszeptibilitätsfaktoren für die Entwicklung eines *HCCs* sind.

Die Prädisposition für das hepatozelluläre Karzinom wird neben den vermuteten genetischen Faktoren durch individuelle Einflußgrößen wie beispielsweise Typ II Diabetes und Umwelteinflüsse wie u.a. Alkohol oder eine chronische Hepatitis B modifiziert. Dies spiegelt sich auch in unserem untersuchten Kollektiv wieder und resultiert in einem heterogenen Patientenkollektiv. Häufig liegen aber auch mehrere Risikofaktoren gleichzeitig vor. Daher erfordert die Aufdeckung von Genotyp-Phänotyp-Assoziationen die Untersuchung anhand großer Fallzahlen in hinsichtlich zusätzlich bestehender Risikofaktoren genau definierten Kollektiven, was die Durchführung multivariater Verfahren erlaubt, da bei der Analyse schnell sehr kleine Subgruppen entstehen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Probanden kaukasischer Abstammung hinsichtlich der genetischen Variabilität im *ABCC2*-Gen analysiert. Der Vergleich unseres Kollektivs mit Kollektiven anderer Ethnien zeigt, daß Varianten von *ABCC2* eine große interethnische Variabilität aufweisen und vergleichende Untersuchungen in anderen Bevölkerungsgruppen notwendig sind.

7.4.3 Notwendigkeit von Haplotypenanalysen

Reine Assoziationsstudien auf der Basis der Analyse einzelner Polymorphismen können leicht zu widersprüchlichen Ergebnissen führen, zumal aus einer beobachteten Assoziation nicht unbedingt eine Kausalität abgeleitet werden kann. Es ist durchaus denkbar, daß ein beobachteter SNP im Kopplungsungleichgewicht mit einem anderen Polymorphismus liegt, der eigentlich für funktionelle Unterschiede im untersuchten Gen verantwortlich ist. Itoda et al. fanden z.B. eine hohe allelische Assoziation des SNP -24C>T und 3972C>T in

einem Kollektiv gesunder Japaner.^[97] Hieraus ergibt sich zum einen die Notwendigkeit die gesamte Sequenz von *ABCC2* einschließlich der regulierenden, exonischen und intronischen Abschnitte zu analysieren und zum anderen weiterführende Assoziationsstudien von *ABCC2* beim hepatozellulären Karzinom auf der Basis von Haplotypenanalysen durchzuführen. Dies wird in einer aktuellen Arbeit von Choi et al. an 50 koreanischen Patienten mit einer toxischen Hepatitis deutlich.^[119] Sie beobachteten eine Assoziation eines Haplotyps von *ABCC2* der das Allel 3972T beinhaltet mit der Suszeptibilität für eine toxische Hepatitis vom hepatozellulären Typ. ($p=0.02$) Die funktionelle Analyse des SNP 3972C>T konnte weder einen Einfluß auf die Proteinexpression noch auf die Transportaktivität zeigen, jedoch wies dieser Haplotyp eine um $39.0\pm 11.4\%$ reduzierte Promotoraktivität auf. Dies erklärt zum einen die teils widersprüchlichen Ergebnisse von Assoziationsstudien und verdeutlicht, dass eine eindeutige Aussage über die Funktionalität der Konjugatexportpumpe *ABCC2* nur anhand von Haplotypenanalysen möglich ist.

7.4.4 Klinische Relevanz und Ausblick

Varianten der Konjugatexportpumpe *ABCC2* sind beim hepatozellulären Karzinom häufig. Bei *HCC* Patienten mit einer chronischen Virushepatitis konnten die Varianten -24C>T, IVS23+56T und 3972C>T häufiger detektiert werden. Die Variante IVS23+56T ist in Abwesenheit von Alkoholkonsum als zusätzlichem Risikofaktor in unserem Kollektiv mit dem *HCC* assoziiert. In dieser Arbeit beschreiben wir erstmals die Prävalenz der seltenen bisher funktionell nicht charakterisierten nicht-synonymen *ABCC2* Variante I1036T in Exon 23 und der Dubin-Johnson Syndrom Variante I1173F bei Kaukasiern und beim hepatozellulären Karzinom und leisten somit einen Beitrag zur weiteren Charakterisierung der genetischen Variabilität von *ABCC2*.

Bisher sind die meisten komplexen genetischen Faktoren, die die Suszeptibilität für die Entwicklung eines *HCCs* modifizieren noch nicht oder nicht ausreichend identifiziert. Varianten von *ABCC2* könnten die Suszeptibilität für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms zusätzlich modifizieren und Risikogruppen identifizieren, bei denen die *HCC*-Entwicklung wahrscheinlicher ist. Weiterführende Assoziationsstudien an größeren Kollektiven und anderen Bevölkerungsgruppen in Form von Haplotypenanalysen könnten in Zukunft dazu beitragen, die Rolle der komplexen Genetik bei dieser Tumorerkrankung besser zu verstehen. Ein genaueres Verständnis der genetischen Mechanismen, die die individuelle Prädisposition und Suszeptibilität für das *HCC* modifizieren, kann helfen, Surveillancestrategien zu optimieren, eine frühzeitige Diagnosestellung zu ermöglichen und gezieltere Therapien einzuleiten.

8 Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (*HCC*) ist der häufigste maligne primäre Lebertumor und zählt zu den häufigsten Krebserkrankungen weltweit. Auch in den westlichen Industrienationen ist eine steigende Inzidenz der Neuerkrankungen bei gleichzeitig schlechter Prognose zu verzeichnen. Zu den wichtigsten ätiologischen Faktoren gehören die Leberzirrhose, chronische Hepatitis B und C Virusinfektionen, sowie chronischer Alkoholabusus und die sogenannte nicht-alkoholische Steatohepatitis, die im Rahmen eines metabolischen Syndroms auftreten kann.

9 Hier fehlt irgendwie was??

10 Literaturverzeichnis

1. El-Serag, H.B. and K.L. Rudolph, *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(7): p. 2557-76.
2. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. *Int J Cancer*. **127**(12): p. 2893-917.
3. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. *CA Cancer J Clin*, 2005. **55**(2): p. 74-108.
4. Llovet, J.M., A. Burroughs, and J. Bruix, *Hepatocellular carcinoma*. *Lancet*, 2003. **362**(9399): p. 1907-17.
5. El-Serag, H.B. and A.C. Mason, *Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(10): p. 745-50.
6. Benvegnu, L., et al., *Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications*. *Gut*, 2004. **53**(5): p. 744-9.
7. Sangiovanni, A., et al., *The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients*. *Hepatology*, 2006. **43**(6): p. 1303-10.
8. Deuffic, S., et al., *Trends in primary liver cancer*. *Lancet*, 1998. **351**(9097): p. 214-5.
9. Stroffolini, T., et al., *Characteristics of hepatocellular carcinoma in Italy*. *J Hepatol*, 1998. **29**(6): p. 944-52.
10. Taylor-Robinson, S.D., et al., *Increase in primary liver cancer in the UK, 1979-94*. *Lancet*, 1997. **350**(9085): p. 1142-3.
11. Bosch, F.X., et al., *Primary liver cancer: worldwide incidence and trends*. *Gastroenterology*, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S5-S16.
12. McGlynn, K.A., et al., *International trends and patterns of primary liver cancer*. *Int J Cancer*, 2001. **94**(2): p. 290-6.
13. Altekruse, S.F., K.A. McGlynn, and M.E. Reichman, *Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(9): p. 1485-91.
14. Parkin, D.M., et al., *Estimating the world cancer burden: Globocan 2000*. *Int J Cancer*, 2001. **94**(2): p. 153-6.
15. Gomaa, A.I., et al., *Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(27): p. 4300-8.
16. Beasley, R.P., *Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma*. *Cancer*, 1988. **61**(10): p. 1942-56.
17. Di Bisceglie, A.M., *Hepatitis C and hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 1997. **26**(3 Suppl 1): p. 34S-38S.

18. Donato, F., et al., *Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women*. Am J Epidemiol, 2002. **155**(4): p. 323-31.
19. Fattovich, G., et al., *Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors*. Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S35-50.
20. Corrao, G., et al., *A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 diseases*. Prev Med, 2004. **38**(5): p. 613-9.
21. Hassan, M.M., et al., *Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus*. Hepatology, 2002. **36**(5): p. 1206-13.
22. Mizoue, T., et al., *Prospective study on the relation of cigarette smoking with cancer of the liver and stomach in an endemic region*. Int J Epidemiol, 2000. **29**(2): p. 232-7.
23. Yun, Y.H., et al., *Cigarette smoking and cancer incidence risk in adult men: National Health Insurance Corporation Study*. Cancer Detect Prev, 2005. **29**(1): p. 15-24.
24. Zhu, K., et al., *Cigarette smoking and primary liver cancer: a population-based case-control study in US men*. Cancer Causes Control, 2007. **18**(3): p. 315-21.
25. Jee, S.H., et al., *Cigarette smoking, alcohol drinking, hepatitis B, and risk for hepatocellular carcinoma in Korea*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(24): p. 1851-6.
26. Elzouki, A.N. and S. Eriksson, *Risk of hepatobiliary disease in adults with severe alpha 1-antitrypsin deficiency (PiZZ): is chronic viral hepatitis B or C an additional risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma?* Eur J Gastroenterol Hepatol, 1996. **8**(10): p. 989-94.
27. Alexander, J. and K.V. Kowdley, *HFE-associated hereditary hemochromatosis*. Genet Med, 2009. **11**(5): p. 307-13.
28. Fracanzani, A.L., et al., *Liver cancer risk is increased in patients with porphyria cutanea tarda in comparison to matched control patients with chronic liver disease*. J Hepatol, 2001. **35**(4): p. 498-503.
29. Scott, C.R., *The genetic tyrosinemias*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2006. **142C**(2): p. 121-6.
30. Werner, M., et al., *Hepatic and extrahepatic malignancies in autoimmune hepatitis. A long-term follow-up in 473 Swedish patients*. J Hepatol, 2009. **50**(2): p. 388-93.
31. Edwards, C.Q., et al., *Prevalence of hemochromatosis among 11,065 presumably healthy blood donors*. N Engl J Med, 1988. **318**(21): p. 1355-62.
32. ElMBERG, M., et al., *Cancer risk in patients with hereditary hemochromatosis and in their first-degree relatives*. Gastroenterology, 2003. **125**(6): p. 1733-41.
33. Calle, E.E., et al., *Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults*. N Engl J Med, 2003. **348**(17): p. 1625-38.

-
34. Wolk, A., et al., *A prospective study of obesity and cancer risk (Sweden)*. *Cancer Causes Control*, 2001. **12**(1): p. 13-21.
 35. Moller, H., et al., *Obesity and cancer risk: a Danish record-linkage study*. *Eur J Cancer*, 1994. **30A**(3): p. 344-50.
 36. El-Serag, H.B., T. Tran, and J.E. Everhart, *Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(2): p. 460-8.
 37. Ong, J.P. and Z.M. Younossi, *Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH*. *Clin Liver Dis*, 2007. **11**(1): p. 1-16, vii.
 38. Sass, D.A., P. Chang, and K.B. Chopra, *Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review*. *Dig Dis Sci*, 2005. **50**(1): p. 171-80.
 39. Clark, J.M., F.L. Brancati, and A.M. Diehl, *The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States*. *Am J Gastroenterol*, 2003. **98**(5): p. 960-7.
 40. Browning, J.D., et al., *Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity*. *Hepatology*, 2004. **40**(6): p. 1387-95.
 41. Starley, B.Q., C.J. Calcagno, and S.A. Harrison, *Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection*. *Hepatology*. **51**(5): p. 1820-32.
 42. Bugianesi, E., *Non-alcoholic steatohepatitis and cancer*. *Clin Liver Dis*, 2007. **11**(1): p. 191-207, x-xi.
 43. Qian, G.S., et al., *A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1994. **3**(1): p. 3-10.
 44. Guengerich, F.P., et al., *Activation and detoxication of aflatoxin B1*. *Mutat Res*, 1998. **402**(1-2): p. 121-8.
 45. Ross, R.K., et al., *Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma*. *Lancet*, 1992. **339**(8799): p. 943-6.
 46. Lunn, R.M., et al., *p53 mutations, chronic hepatitis B virus infection, and aflatoxin exposure in hepatocellular carcinoma in Taiwan*. *Cancer Res*, 1997. **57**(16): p. 3471-7.
 47. Hsu, I.C., et al., *Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas*. *Nature*, 1991. **350**(6317): p. 427-8.
 48. Bressac, B., et al., *Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa*. *Nature*, 1991. **350**(6317): p. 429-31.
 49. Dietrich, C.G., et al., *Mrp2-deficiency in the rat impairs biliary and intestinal excretion and influences metabolism and disposition of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo*. *Carcinogenesis*, 2001. **22**(5): p. 805-11.

-
50. Dietrich, C.G., et al., *Increased bioavailability of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in MRP2-deficient rats*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(5): p. 974-80.
 51. Dietrich, C.G., A. Geier, and R.P. Oude Elferink, *ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut*. Gut, 2003. **52**(12): p. 1788-95.
 52. Borst, P., et al., *The multidrug resistance protein family*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1461**(2): p. 347-57.
 53. König, J., et al., *Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1461**(2): p. 377-94.
 54. Gerk, P.M. and M. Vore, *Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **302**(2): p. 407-15.
 55. Kool, M., et al., *Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines*. Cancer Res, 1997. **57**(16): p. 3537-47.
 56. Taniguchi, K., et al., *A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation*. Cancer Res, 1996. **56**(18): p. 4124-9.
 57. Minemura, M., H. Tanimura, and E. Tabor, *Overexpression of multidrug resistance genes MDR1 and cMOAT in human hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma cell lines*. Int J Oncol, 1999. **15**(3): p. 559-63.
 58. Cole, S.P., et al., *Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line*. Science, 1992. **258**(5088): p. 1650-4.
 59. Jansen, P.L., et al., *Preserved organic anion transport in mutant TR- rats with a hepatobiliary secretion defect*. Am J Physiol, 1993. **265**(3 Pt 1): p. G445-52.
 60. Buchler, M., et al., *cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats*. J Biol Chem, 1996. **271**(25): p. 15091-8.
 61. Paulusma, C.C., et al., *Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene*. Science, 1996. **271**(5252): p. 1126-8.
 62. Jedlitschky, G., et al., *ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein*. Cancer Res, 1994. **54**(18): p. 4833-6.
 63. Leier, I., et al., *The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates*. J Biol Chem, 1994. **269**(45): p. 27807-10.

64. Muller, M., et al., *Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(26): p. 13033-7.
65. Jedlitschky, G., et al., *Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump*. Cancer Res, 1996. **56**(5): p. 988-94.
66. Leier, I., et al., *ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump*. Biochem J, 1996. **314 (Pt 2)**: p. 433-7.
67. Ito, K., et al., *Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR*. Am J Physiol, 1997. **272**(1 Pt 1): p. G16-22.
68. Paulusma, C.C., et al., *A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome*. Hepatology, 1997. **25**(6): p. 1539-42.
69. Toh, S., et al., *Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding-cassette region in Dubin-Johnson syndrome*. Am J Hum Genet, 1999. **64**(3): p. 739-46.
70. Kartenbeck, J., et al., *Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome*. Hepatology, 1996. **23**(5): p. 1061-6.
71. Allikmets, R., et al., *Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(10): p. 1649-55.
72. van Kuijk, M.A., et al., *Assignment of the canalicular multispecific organic anion transporter gene (CMOAT) to human chromosome 10q24 and mouse chromosome 19D2 by fluorescent in situ hybridization*. Cytogenet Cell Genet, 1997. **77**(3-4): p. 285-7.
73. Keppler, D. and J. Kartenbeck, *The canalicular conjugate export pump encoded by the cmrp/cmoat gene*. Prog Liver Dis, 1996. **14**: p. 55-67.
74. Rost, D., et al., *Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelia*. Gastroenterology, 2001. **121**(5): p. 1203-8.
75. Kusahara, H. and Y. Sugiyama, *Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney*. J Control Release, 2002. **78**(1-3): p. 43-54.
76. St-Pierre, M.V., et al., *Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **279**(4): p. R1495-503.

-
77. Cherrington, N.J., et al., *Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2, and 3 (Mrp1, 2, and 3) mRNA and hepatic induction of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **300**(1): p. 97-104.
78. Keppler, D. and J. König, *Hepatic canalicular membrane 5: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver*. FASEB J, 1997. **11**(7): p. 509-16.
79. Cui, Y., et al., *Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells*. Mol Pharmacol, 1999. **55**(5): p. 929-37.
80. Evers, R., et al., *Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA*. J Clin Invest, 1998. **101**(7): p. 1310-9.
81. van Aabel, R.A., et al., *Adenosine triphosphate-dependent transport of anionic conjugates by the rabbit multidrug resistance-associated protein Mrp2 expressed in insect cells*. Mol Pharmacol, 1998. **53**(6): p. 1062-7.
82. Fromm, M.F., et al., *The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters*. Am J Pathol, 2000. **157**(5): p. 1575-80.
83. Mottino, A.D., et al., *Expression and localization of multidrug resistant protein mrp2 in rat small intestine*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **293**(3): p. 717-23.
84. Suzuki, H. and Y. Sugiyama, *Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(10): p. 1311-31.
85. Jedlitschky, G. and D. Keppler, *Transport of leukotriene C4 and structurally related conjugates*. Vitam Horm, 2002. **64**: p. 153-84.
86. Kamisako, T., et al., *Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2*. Hepatology, 1999. **30**(2): p. 485-90.
87. Letschert, K., et al., *Vectorial transport of the peptide CCK-8 by double-transfected MDCKII cells stably expressing the organic anion transporter OATP1B3 (OATP8) and the export pump ABCC2*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **313**(2): p. 549-56.
88. Smitherman, P.K., et al., *Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2, ABCC2) in alkylating agent detoxification: MRP2 potentiates glutathione S-transferase A1-1-mediated resistance to chlorambucil cytotoxicity*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **308**(1): p. 260-7.
89. Cui, Y., J. König, and D. Keppler, *Vectorial transport by double-transfected cells expressing the human uptake transporter SLC21A8 and the apical export pump ABCC2*. Mol Pharmacol, 2001. **60**(5): p. 934-43.
-

-
90. Chu, X.Y., et al., *Transport of ethinylestradiol glucuronide and ethinylestradiol sulfate by the multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, and MRP3*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **309**(1): p. 156-64.
 91. Leier, I., et al., *ATP-dependent para-aminohippurate transport by apical multidrug resistance protein MRP2*. Kidney Int, 2000. **57**(4): p. 1636-42.
 92. Smeets, P.H., et al., *Contribution of multidrug resistance protein 2 (MRP2/ABCC2) to the renal excretion of p-aminohippurate (PAH) and identification of MRP4 (ABCC4) as a novel PAH transporter*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(11): p. 2828-35.
 93. Hooijberg, J.H., et al., *Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2*. Cancer Res, 1999. **59**(11): p. 2532-5.
 94. Kopplow, K., et al., *Human hepatobiliary transport of organic anions analyzed by quadruple-transfected cells*. Mol Pharmacol, 2005. **68**(4): p. 1031-8.
 95. Nies, A.T. and D. Keppler, *The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2)*. Pflugers Arch, 2007. **453**(5): p. 643-59.
 96. Ito, S., et al., *Polymorphism of the ABC transporter genes, MDR1, MRP1 and MRP2/cMOAT, in healthy Japanese subjects*. Pharmacogenetics, 2001. **11**(2): p. 175-84.
 97. Itoda, M., et al., *Polymorphisms in the ABCC2 (cMOAT/MRP2) gene found in 72 established cell lines derived from Japanese individuals: an association between single nucleotide polymorphisms in the 5'-untranslated region and exon 28*. Drug Metab Dispos, 2002. **30**(4): p. 363-4.
 98. Mor-Cohen, R., et al., *Identification and functional analysis of two novel mutations in the multidrug resistance protein 2 gene in Israeli patients with Dubin-Johnson syndrome*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 36923-30.
 99. Saito, S., et al., *Identification of 779 genetic variations in eight genes encoding members of the ATP-binding cassette, subfamily C (ABCC/MRP/CFTR)*. J Hum Genet, 2002. **47**(4): p. 147-71.
 100. Wada, M., *Single nucleotide polymorphisms in ABCC2 and ABCB1 genes and their clinical impact in physiology and drug response*. Cancer Lett, 2006. **234**(1): p. 40-50.
 101. Wada, M., et al., *Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(2): p. 203-7.
 102. Kajihara, S., et al., *A splice mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes Dubin-Johnson syndrome*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **253**(2): p. 454-7.
-

-
103. Tsujii, H., et al., *Exon-intron organization of the human multidrug-resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome*. Gastroenterology, 1999. **117**(3): p. 653-60.
 104. Dubin, I.N. and F.B. Johnson, *Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells; a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases*. Medicine (Baltimore), 1954. **33**(3): p. 155-97.
 105. Sprinz, H. and R.S. Nelson, *Persistent non-hemolytic hyperbilirubinemia associated with lipochrome-like pigment in liver cells: report of four cases*. Ann Intern Med, 1954. **41**(5): p. 952-62.
 106. Mor-Cohen, R., et al., *A novel ancestral splicing mutation in the multidrug resistance protein 2 gene causes Dubin-Johnson syndrome in Ashkenazi Jewish patients*. Hepatol Res, 2005. **31**(2): p. 104-11.
 107. Hashimoto, K., et al., *Trafficking and functional defects by mutations of the ATP-binding domains in MRP2 in patients with Dubin-Johnson syndrome*. Hepatology, 2002. **36**(5): p. 1236-45.
 108. Machida, I., et al., *Mutation analysis of the multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome*. Hepatol Res, 2004. **30**(2): p. 86-90.
 109. Machida, I., et al., *Mutational analysis of the MRP2 gene and long-term follow-up of Dubin-Johnson syndrome in Japan*. J Gastroenterol, 2005. **40**(4): p. 366-70.
 110. Tate, G., et al., *A new mutation of the ATP-binding cassette, sub-family C, member 2 (ABCC2) gene in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome*. Genes Genet Syst, 2002. **77**(2): p. 117-21.
 111. Wakusawa, S., et al., *Identification of a novel 2026G-->C mutation of the MRP2 gene in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome*. J Hum Genet, 2003. **48**(8): p. 425-9.
 112. Cebecauerova, D., et al., *Dual hereditary jaundice: simultaneous occurrence of mutations causing Gilbert's and Dubin-Johnson syndrome*. Gastroenterology, 2005. **129**(1): p. 315-20.
 113. Shoda, J., et al., *Novel mutations identified in the human multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2) gene in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome*. Hepatol Res, 2003. **27**(4): p. 323-326.
 114. Lee, J.H., et al., *Neonatal Dubin-Johnson syndrome: long-term follow-up and MRP2 mutations study*. Pediatr Res, 2006. **59**(4 Pt 1): p. 584-9.
 115. Keitel, V., et al., *A common Dubin-Johnson syndrome mutation impairs protein maturation and transport activity of MRP2 (ABCC2)*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **284**(1): p. G165-74.
-

-
116. Keitel, V., et al., *Impaired protein maturation of the conjugate export pump multidrug resistance protein 2 as a consequence of a deletion mutation in Dubin-Johnson syndrome*. Hepatology, 2000. **32**(6): p. 1317-28.
117. Leslie, E.M., et al., *Biotransformation and transport of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in bile duct-cannulated wild-type and Mrp2/ABCC2-deficient (TR) Wistar rats*. Carcinogenesis, 2007. **28**(12): p. 2650-6.
118. Sookoian, S., et al., *Polymorphisms of MRP2 (ABCC2) are associated with susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease*. J Nutr Biochem, 2009. **20**(10): p. 765-70.
119. Choi, J.H., et al., *MRP2 haplotypes confer differential susceptibility to toxic liver injury*. Pharmacogenet Genomics, 2007. **17**(6): p. 403-15.
120. Hoblinger, A., et al., *Association of the c.3972C>T variant of the multidrug resistance-associated protein 2 Gene (MRP2/ABCC2) with susceptibility to bile duct cancer*. Digestion, 2009. **80**(1): p. 36-9.
121. Abe, T., et al., *Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1*. J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 17159-63.
122. Konig, J., et al., *A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **278**(1): p. G156-64.
123. Niemi, M., *Role of OATP transporters in the disposition of drugs*. Pharmacogenomics, 2007. **8**(7): p. 787-802.
124. Link, E., et al., *SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study*. N Engl J Med, 2008. **359**(8): p. 789-99.
125. Daly, A.K., et al., *Genetic susceptibility to diclofenac-induced hepatotoxicity: contribution of UGT2B7, CYP2C8, and ABCC2 genotypes*. Gastroenterology, 2007. **132**(1): p. 272-81.
126. Sookoian, S., et al., *Association of the multidrug-resistance-associated protein gene (ABCC2) variants with intrahepatic cholestasis of pregnancy*. J Hepatol, 2008. **48**(1): p. 125-32.
127. de Jong, F.A., et al., *Irinotecan-induced diarrhea: functional significance of the polymorphic ABCC2 transporter protein*. Clin Pharmacol Ther, 2007. **81**(1): p. 42-9.
128. Naesens, M., et al., *Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients*. Transplantation, 2006. **82**(8): p. 1074-84.
129. Rau, T., et al., *High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia: impact of ABCC2 polymorphisms on plasma concentrations*. Clin Pharmacol Ther, 2006. **80**(5): p. 468-76.
-

-
130. Bosch, T.M., et al., *Pharmacogenetic screening for polymorphisms in drug-metabolizing enzymes and drug transporters in a Dutch population*. *Mol Diagn Ther*, 2006. **10**(3): p. 175-85.
 131. Han, J.Y., et al., *Associations of ABCB1, ABCC2, and ABCG2 polymorphisms with irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer*. *Cancer*, 2007. **110**(1): p. 138-47.
 132. Sai, K., et al., *Genetic variations and haplotypes of ABCC2 encoding MRP2 in a Japanese population*. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2008. **23**(2): p. 139-47.
 133. Franke, R.M., et al., *Effect of ABCC2 (MRP2) transport function on erythromycin metabolism*. *Clin Pharmacol Ther*. **89**(5): p. 693-701.
 134. Ohmann, E.L., et al., *Genetic polymorphisms influence mycophenolate mofetil-related adverse events in pediatric heart transplant patients*. *J Heart Lung Transplant*. **29**(5): p. 509-16.
 135. Gradhand, U. and R.B. Kim, *Pharmacogenomics of MRP transporters (ABCC1-5) and BCRP (ABCG2)*. *Drug Metab Rev*, 2008. **40**(2): p. 317-54.
 136. Haenisch, S., et al., *Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex*. *Pharmacogenomics J*, 2007. **7**(1): p. 56-65.
 137. Haenisch, S., et al., *Influence of genetic polymorphisms on intestinal expression and rifampicin-type induction of ABCC2 and on bioavailability of talinolol*. *Pharmacogenet Genomics*, 2008. **18**(4): p. 357-65.
 138. Yamaguchi-Kabata, Y., et al., *Japanese population structure, based on SNP genotypes from 7003 individuals compared to other ethnic groups: effects on population-based association studies*. *Am J Hum Genet*, 2008. **83**(4): p. 445-56.
 139. Ho, W.F., et al., *Genetic variations of the ABCC2 gene in the Chinese, Malay, and Indian populations of Singapore*. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2008. **23**(5): p. 385-91.
 140. Ryu, S., et al., *Identification of basic residues involved in drug export function of human multidrug resistance-associated protein 2*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(50): p. 39617-24.
 141. Hirouchi, M., et al., *Characterization of the cellular localization, expression level, and function of SNP variants of MRP2/ABCC2*. *Pharm Res*, 2004. **21**(5): p. 742-8.
 142. Megaraj, V., et al., *Functional analysis of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2)*. *Pharmacogenet Genomics*. **21**(8): p. 506-15.
 143. Mottino, A.D., et al., *Altered localization and activity of canalicular Mrp2 in estradiol-17beta-D-glucuronide-induced cholestasis*. *Hepatology*, 2002. **35**(6): p. 1409-19.

144. Shimizu, I., et al., *Inhibitory effect of oestradiol on activation of rat hepatic stellate cells in vivo and in vitro*. Gut, 1999. **44**(1): p. 127-36.
145. Kim, W.J., et al., *A nonsynonymous variation in MRP2/ABCC2 is associated with neurological adverse drug reactions of carbamazepine in patients with epilepsy*. Pharmacogenet Genomics. **20**(4): p. 249-56.
146. Zhang, W.X., et al., *Influence of uridine diphosphate (UDP)-glucuronosyltransferases and ABCC2 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of mycophenolic acid and its metabolites in Chinese renal transplant recipients*. Xenobiotica, 2008. **38**(11): p. 1422-36.
147. Ito, K., H. Suzuki, and Y. Sugiyama, *Single amino acid substitution of rat MRP2 results in acquired transport activity for taurocholate*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(4): p. G1034-43.
148. Ramensky, V., P. Bork, and S. Sunyaev, *Human non-synonymous SNPs: server and survey*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(17): p. 3894-900.
149. Cartegni, L. and A.R. Krainer, *Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1*. Nat Genet, 2002. **30**(4): p. 377-84.
150. Kimchi-Sarfaty, C., et al., *A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity*. Science, 2007. **315**(5811): p. 525-8.
151. Nackley, A.G., et al., *Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure*. Science, 2006. **314**(5807): p. 1930-3.
152. Capon, F., et al., *A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(20): p. 2361-8.
153. Laechelt, S., et al., *Impact of ABCC2 haplotypes on transcriptional and posttranscriptional gene regulation and function*. Pharmacogenomics J. **11**(1): p. 25-34.

11 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Christoph Meyer-Heithuis
Geburtstag: 13.03.1978
Geburtsort: Hannover
Name der Eltern: Elfriede Meyer-Heithuis, geb. Heithuis
Joachim Meyer-Heithuis, geb. Meyer

Schulbildung

19.06.1997 Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Wilhelm-Raabe Schule Hannover

Zivildienst

1997-1998 Altenpflege im Altenwohncentrum Eilenriedestift Hannover
1998-1999 Vollzeitbeschäftigung im Empfangs- und Informationsdienst im Altenwohncentrum Eilenriedestift Hannover

Hochschulstudium

1999-2001 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover: Vorklinischer Abschnitt
09/2001 Ärztliche Vorprüfung mit der Note 1,66
2001-2002 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover: Erster Klinischer Abschnitt
08/2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note 3,0
2002-2005 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover: Zweiter Klinischer Abschnitt
10/2002 Vorarbeiten für die Dissertation in der AG Prof. Dr. med. C. P. Straßburg für Hepatozelluläre Autoantigene, hepatische und extra-hepatische Metabolisierungsenzyme
02/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note 2,0
2005-2006 Praktisches Jahr
Mai 2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note 2,0

Beruflicher Werdegang

seit 06/2006 Assistenzarzt in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der MHH. Klinikdirektor: Prof. Dr. med. M.P. Manns

Hannover, den 27.09.2011

12 Wissenschaftliche Arbeiten & Publikationen

Poster

- 04/2004 DGVS – Analyse von Polymorphismen des cMRP2-Gens (*ABCC2*) von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom.
- 10/2004 AASLD – Analysis of genetic polymorphisms of cMRP (*ABCC2*) in hepatocellular carcinoma.
- 10/2010 DGVS – Prävalenz von Thrombozytopenie bei Patienten mit chronischer Hepatitis C –Virusinfektion in Deutschland

Abstracts

- 10/2004 Analysis of genetic polymorphisms of cMRP (*ABCC2*) in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* Volume 40, Number 4, Suppl.1 – October 2004

13 Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 6 und 7 der Promotionsordnung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Varianten der Konjugatexportpumpe *ABCC2* beim hepatozellulären Karzinom

in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie

unter Betreuung von Prof. Dr. med. C. P. Straßburg

mit der Unterstützung durch Prof. Dr. med. M.P. Manns

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden in folgendem Publikationsorgan
Hepatology Volume 40, Number 4, Suppl.1 – October 2004 veröffentlicht.

Hannover, den 27.09.2011

(Unterschrift)

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am _____

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident:

Betreuer der Arbeit:

Referent:

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung

Prüfungsausschussmitglieder: