

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Hepatologie und  
Gastroenterologie der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Genetische Variationen von *Keratin 8* bei  
Pankreatitis und Pankreasneoplasien**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin  
Berlin

von  
Matthias Treiber  
aus Stuttgart

Gutachter:       1. Priv. - Doz. Dr. med. Heiko Witt  
                      2. Prof. Dr. med. W. Schmidt  
                      3. Prof. Dr. K. Sperling

Datum der Promotion: 22.06.2007

## **Kurzzusammenfassung:**

Keratin 8 (KRT8) ist eines der am stärksten exprimierten Intermediärfilamente einschichtiger Epithelien des Verdauungstraktes. Transgene Mäuse, welche humanes *KRT8* überexprimieren, weisen im Pankreas mononukleäre Infiltrate, interstitielle Fibrose sowie eine Dysplasie der Azinuszellen auf und entwickeln im weiteren Verlauf eine exokrine Insuffizienz. Diese experimentellen Daten sowie eine kürzlich publizierte Studie, in der eine Assoziation von *KRT8*-Polymorphismen mit chronischer Pankreatitis beschrieben wurde, veranlaßten uns dazu, *KRT8*-Polymorphismen in Patienten mit Erkrankungen des Pankreas zu untersuchen. In diesem Ansatz analysierten wir eine Patientenkohorte mit (i) akuter Pankreatitis (n=192), (ii) chronischer Pankreatitis unterschiedlicher Genese (n=1682), (iii) duktalem Adenokarzinom des Pankreas (n=483) sowie (iv) seltener Pankreasneoplasien (n=79) auf die *KRT8*-Variationen G62C und Y54H. Die Patienten stammten aus Deutschland (n=1698), Großbritannien (n=36), Indien (n=60), Italien (n=143), den Niederlanden (n=128), Österreich (n=16), Rumänien (n=3), der Schweiz (n=129), Spanien (n=133) sowie Tschechien (n=90). Als Kontrollen wurden 4234 gesunde Personen aus diesen Ländern sowie weitere 1492 aus Äthiopien, Benin, Ecuador, Kamerun und der Türkei untersucht. Die Polymorphismen wurden mittels Schmelzkurvenanalyse unter Verwendung von „fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) – Sonden analysiert. Die Häufigkeit des G62C Polymorphismus unterschied sich nicht zwischen den Patienten mit akuter oder chronischer Pankreatitis, Pankreaskarzinom und Kontrollpersonen. G62C variierte innerhalb der gesunden Kontrollen aus Europa von 0,4% - 3,8% mit einem Frequenzabfall von Nordwest nach Südost. Y54H konnte bei keinem der 2436 Patienten gefunden werden und lediglich bei 3/4234 (0,07%) der europäischen oder indischen Kontrollpersonen. Im Gegensatz hierzu wiesen 34/951 (3,6%) Kontrollen afrikanischer Herkunft diesen Polymorphismus auf. Unsere Daten legen nahe, daß die *KRT8*-Polymorphismen G62C und Y54H nicht zur Entstehung einer Pankreatitis oder eines Pankreastumors prädisponieren.

**Schlagnworte:** akute Pankreatitis, chronische Pankreatitis, Pankreaskarzinom, hereditäre Pankreatitis, idiopathische Pankreatitis, genetisch, Keratin 8, Assoziationsstudie, Polymorphismus

## **Abstract:**

Keratin 8 (KRT8) is one of the major intermediate filament proteins expressed in single-layered epithelia of the gastrointestinal tract. Transgenic mice overexpressing human *KRT8* display pancreatic mononuclear infiltration, interstitial fibrosis, and dysplasia of acinar cells resulting in exocrine pancreatic insufficiency. These experimental data in conjunction with a recent report describing an association between *KRT8* variations and chronic pancreatitis prompted us to investigate *KRT8* polymorphisms in patients with pancreatic disorders. The Y54H and G62C polymorphisms in the *KRT8* gene were assessed in a cohort of patients with (i) acute (n=192) and (ii) chronic pancreatitis of various aetiologies (n=1682), (iii) pancreatic carcinoma (n=483) or (iv) uncommon forms of pancreatic neoplasias (n=79) originating from Austria (n=16), the Czech Republic (n=90), Germany (n=1698), Great Britain (n=36), India (n=60), Italy (n=143), the Netherlands (n=128), Romania (n=3), Spain (n=133), and Switzerland (n=129). We also studied 4234 control subjects from these countries and 1492 control subjects originating from Benin, Cameroon, Ethiopia, Ecuador, and Turkey. Polymorphisms were analysed by melting curve analysis with fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes and. The frequency of G62C did not differ between patients with acute or chronic pancreatitis, pancreatic adenocarcinoma and control individuals. The frequency of G62C varied in European populations from 0.4% to 3.8% showing a north-west to south-east decline. The Y54H alteration was not detected in any of the 2436 patients. Only 3/4234 (0.07%) European and Indian control subjects were heterozygous for Y54H in contrast to 34/951 (3.6%) control subjects of African descent. Our data suggest that the *KRT8* alterations, Y54H and G62C, do not predispose patients to the development of pancreatitis or pancreatic cancer.

**Key words:** acute pancreatitis, chronic pancreatitis, pancreatic carcinoma, hereditary pancreatitis, idiopathic pancreatitis, genetic, keratin 8, association study, polymorphism

## Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung:	9
1.1	Chronische Pankreatitis	9
1.1.1	Allgemeine und klinische Aspekte	9
1.1.2	Chronische Pankreatitis und assoziierte Genmutationen	12
1.1.2.1	Kationisches Trypsinogen (PRSS1)	12
1.1.2.2	Serinproteaseinhibitor Kazal Typ 1 (SPINK1)	13
1.1.2.3	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)	14
1.1.2.4	Anionisches Trypsinogen (PRSS2)	14
1.1.3	Krankheitsmodell der CP	15
1.2	Pankreaskarzinom	17
1.2.1	Allgemeine und klinische Aspekte	17
1.2.2	Genetische Veränderungen:	18
1.2.3	KRAS2	18
1.2.3.1	CDKN2A (INK4A)	19
1.2.3.2	TP53	19
1.2.3.3	MADH4 (SMAD4, DPC4)	19
1.2.3.4	Weitere Gene	20
1.3	Proteine des Zytoskeletts	20
1.3.1	Intermediärfilamente: Struktur und biochemische Eigenschaften	21
1.3.2	Funktion zytoskelettaler Proteine	22
1.3.3	IF und deren Assoziation mit Erkrankungen	23
1.4	Zytokeratine	23
1.4.1	Zytokeratine und Tiermodelle	24
1.4.2	Zytokeratin-Mutationen und Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes	24
1.5	Fragestellung	26
2	Materialien und Methoden	27
2.1	Patienten	27
2.2	Kontrollen	30
2.3	Verbrauchsmaterialien	32
2.4	Geräte	32
2.5	Methoden	32
2.5.1	DNA-Extraktion	32

2.5.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
2.5.3	Schmelzkurvenanalyse	33
2.5.4	DNA-Sequenzierung	36
2.5.5	Statistik	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Alkoholische chronische Pankreatitis	38
3.2	Hereditäre und idiopathische chronische Pankreatitis	38
3.3	Tropische kalzifizierende Pankreatitis	39
3.4	Akute Pankreatitis	39
3.5	Pankreaskarzinom	40
4	Diskussion:	43
5	Zusammenfassung:	50

## Abkürzungsverzeichnis:

ACP	alkoholisch bedingte chronische Pankreatitis
AP	akute Pankreatitis bzw. aktivierendes Peptid
CF	cystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CP	chronische Pankreatitis
DDC	Dihydrocollidin
ddNTP	Didesoxynukleosid-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-triphosphat
<i>et al.</i>	und Mitarbeiter
f	feminin
FL	Fluoreszein
FRET	fluorescence resonance energy transfer
HP	hereditäre Pankreatitis
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
ICP	idiopathische chronische Pankreatitis
IF	Intermediärfilamente
KCl	Kaliumchlorid
KRT	Keratin
L	Liter
LC	LightCycler
m	männlich
min.	Minute(n)
MF	Mikrofilamente
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mM	millimolar
MT	Mikrotubuli
PanIN	pancreatic intraepithelial neoplasia
PCa	Pankreaskarzinom
PCR	Polymerasekettenreaktion
PRSS1	Serinprotease 1 (kationisches Trypsinogen)

PRSS2	Serinprotease 2 (anionisches Trypsinogen)
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
rpm	Umdrehungen/Minute
s	Sekunde(n)
SD	Standardabweichung
SPINK1	Serinproteinaseinhibitor Kazal Typ 1
TCP	tropisch kalzifizierende Pankreatitis
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
TRIS-HCl	Tris-hydroxymethyl-aminomethan-Hydrochlorid
U	units
USA	United States of America
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	mikromolar

Ferner wurden im Text der international gültige Einbuchstaben-Code der Aminosäuren und die Abkürzungen der Fachzeitschriften verwendet.



**Lebenslauf:**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.



## **Danksagung:**

An dieser Stelle sei allen Personen herzlich gedankt, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Insbesondere möchte ich meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Heiko Witt danken, ohne den diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre und der mit viel wissenschaftlichem Scharfsinn, kritischen Fragen und seiner erfrischend offenen Art mein Interesse an experimentellen Forschungsarbeiten geweckt hat.

Mein ganzer Dank gilt auch den vielen Kooperationspartnern der vorliegenden internationalen Studie, welche die Blutproben der Probanden rekrutiert und zugesendet haben. Ebenso möchte ich den beteiligten Probanden für die Teilnahme an der Studie danken.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Vater, Herrn Dr. med. Dietrich Treiber sowie Frau Ingrid Hausmann danken, die mir durch ihre großzügige Unterstützung mein Hochschulstudium sowie diese Promotion ermöglicht haben.

Diese Promotion ist meinen Eltern gewidmet.

**Erklärung:**

„Ich, Matthias Treiber, erkläre an Eides statt, daß ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Genetische Variationen von *Keratin 8* bei Pankreatitis und Pankreasneoplasien“ selbst verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

18. August 2006