

4 Diskussion:

Wir fanden in unserer Studie keine signifikanten Unterschiede in der Genotypverteilung für die *KRT8* G62C-Variation bei Patienten mit alkoholisch bedingter, idiopathischer bzw. hereditärer chronischer Pankreatitis, bei Patienten mit akuter Pankreatitis oder bei Patienten mit einem Adenokarzinom bzw. anderen seltenen Neoplasien des Pankreas im Vergleich zu Kontrollpersonen aus den jeweiligen Ländern. Kein Patient aus einer der Studiengruppen war heterozygot für Y54H. Die Studie konnte somit keine Assoziation zwischen den *KRT8*-Variationen G62C bzw. Y54H und akuter bzw. chronischer Pankreatitis unterschiedlicher Ätiologie oder dem Pankreaskarzinom nachweisen.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den kürzlich publizierten von Cavestro *et al.* [Cavestro *et al.* 2003]. In dieser Studie waren 8,9% der Patienten mit chronischer Pankreatitis unterschiedlicher Ätiologie heterozygot für G62C, jedoch keiner der untersuchten 100 Kontrollen ($p < 0,003$). Y54H trat weder bei Patienten noch bei Kontrollpersonen auf. Die Diskrepanz der Ergebnisse aus der vorliegenden Studie und der von Cavestro *et al.* läßt sich am ehesten durch die unterschiedliche Fallzahl der Patienten- wie der Kontrollgruppen erklären. Während in unserer Studie über 1600 Patienten mit chronischer Pankreatitis und mehr als 5700 Kontrollen untersucht wurden, analysierten Cavestro *et al.* nur 67 Patienten und 100 Kontrollpersonen. Im Gegensatz zu der Studie von Cavestro und Mitarbeitern, in der alle Patienten und Kontrollen aus einer Region (Oberitalien) rekrutiert wurden, untersuchten wir die beiden *KRT8*-Polymorphismen in einer multinationalen Gruppe aus 15 verschiedenen Ländern. Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien verdeutlichen die enorme Bedeutung großer und multinationaler Patienten- und Kontrollkohorten für die Durchführung genetischer Assoziationsstudien.

Der direkte Vergleich der in der vorliegenden Studie untersuchten italienischen Kohorte mit der von Cavestro und Mitarbeitern untersuchten ist jedoch nur schwer möglich, da sich die Ätiologie der CP in diesen Kohorten zu sehr unterscheidet. Während Cavestro *et al.* norditalienische Patienten mit CP verschiedener Ätiologie untersuchten, analysierten wir in der vorliegenden Studie lediglich Patienten mit ICP bzw. HCP. Erwähnenswert ist ebenfalls der auffällig hohe Anteil an Patienten mit autoimmun bedingter Pankreatitis in der italienischen Studie. Der Vergleich wird

zusätzlich dadurch erschwert, daß Cavestro *et al.* 5 von 67 (7,5%) ihrer Patienten als „*CFTR*-bezogen“ klassifizierten [Cavestro *et al.* 2003]. Es bleibt jedoch unklar, ob diese Patienten ohne eine *CFTR*-Analyse in die Gruppe der ICP oder ACP einzuordnen wären. Ebenso bleibt in dieser Studie eine klare Definition der Subgruppen aus: Weder wurde der Terminus „obstruktive Pankreatitis“ noch die Menge des Alkoholkonsums pro Tag in der Gruppe der ACP spezifiziert. Mit Ausnahme eines Patienten, der höchstwahrscheinlich an einer alkoholischen Pankreatitis litt, ist es bei der Arbeit von Cavestro *et al.* nicht möglich, die *KRT8*-mutierten Patienten der entsprechenden Ätiologie zuzuordnen, was den Vergleich zu der vorliegenden Studie weiter erschwert.

Während der Abschlußphase dieser Studie wurde eine weitere Arbeit von einer US-amerikanischen Arbeitsgruppe veröffentlicht, die sich mit dem Einfluß derselben *KRT8*-Variationen auf die CP beschäftigt. In dieser Untersuchung wurde G62C bei 5/178 (2,8%) nicht verwandter ICP/HP-Patienten gefunden, bei einem der 61 (1,6%) ACP-Patienten und lediglich bei 2/271 (0,7%) der Kontrollpersonen [Schneider *et al.* 2006]. Patienten mit einer positiven Familienanamnese für CP und ohne *PRSS1*-Mutation wiesen mit 3,8% die *KRT8*-Variation G62C häufiger auf. Aufgrund der kleinen Patientengruppen erreichten die unterschiedlichen G62C-Frequenzen jedoch keine statistische Signifikanz ($P > 0,05$).

Aufgrund der relativ geringen Fallzahl aller Patienten- und Kontrollgruppen außer der deutschen und italienischen, muß erwogen werden, ob die Aussagekraft unserer Studie in diesen Gruppen ausreichend ist. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, daß höhere Fallzahlen in diesen Populationen abweichende Ergebnisse erbringen würden. Dieselbe genetische Variation, welche in allen untersuchten europäischen Populationen auftritt, wird kaum in der einen ethnischen Gruppe ein Risikofaktor für eine Erkrankung des Pankreas darstellen und in der anderen nicht.

Obwohl diese Studie keine Assoziation zwischen den relativ häufigen genetischen Variationen G62C und Y54H und verschiedenen Formen der Pankreatitis oder Pankreasneoplasien nachweisen konnte, kann nicht endgültig ausgeschlossen werden, daß Keratin 8 eine in Pankreazellen protektive Rolle bei entzündlichen oder neoplastischen Prozessen zukommt. Zwar wurden in dieser Untersuchung die zwei häufigsten Variationen von *KRT8* untersucht, es ist jedoch auch denkbar, daß seltenere andere Mutationen von *KRT8* oder Mutationen in der Gensequenz von *KRT18* in der Pathogenese pankreatischer Erkrankungen von Bedeutung sind.

Studien an verschiedenen Tiermodellen gaben zumindest Hinweise auf eine zellprotektive Funktion von KRT8. Casanova *et al.* generierten ein transgenes Mausmodell, in dem humanes Zytokeratin 8 überexprimiert wurde. Diese Tiere entwickelten makroskopische und histologische Veränderungen des Pankreasgewebes ähnlich wie sie bei chronischer Pankreatitis oder bei den Vorstufen des Pankreaskarzinoms beobachtet werden [Casanova *et al.* 1999]. Die Pankreata zeigten eine Gewichts- und Größenreduktion sowie eine entzündliche Reaktion, die durch mononukleäre Infiltrate und eine intra- und interlobuläre Fibrose charakterisiert war. Im weiteren fand sich ein Verlust der typischen lobulären Architektur der Azinuszellen und eine Dysplasie der Azinuszellen mit vergrößerten, pleomorphen Zellkernen, Verlust der Zellpolarität sowie gesteigerter Apoptoserate. Die Langerhans'schen Inseln waren histologisch unauffällig. Diese transgenen Tiere entwickelten zudem eine exokrine Pankreasinsuffizienz. Dieses Mausmodell ließ vermuten, daß eine gestörte Keratinexpression oder -organisation möglicherweise eine Rolle bei der Pathogenese der chronischen Pankreatitis spiele. Unklar bleibt jedoch, ob die in diesem Tiermodell beobachteten pathologischen Veränderungen durch mangelnde Zytokeratinfunktion bedingt sind oder lediglich Folge des hohen Expressionsniveaus des transgenen Proteins bzw. der unterschiedlichen KRT8-Eigenschaften des menschlichen Proteins und des Mauskeratins. Die Hypothese, daß die Überexpression von Keratinen schädliche Auswirkungen auf Zellen des Pankreas haben kann wird durch ein weiteres Tiermodell bestätigt. Dabei entwickelten Mäuse mit einem KRT1-Transgen unter dem Insulin-Promotor einen Diabetes mellitus [Blessing *et al.* 1993].

Untersuchungen über die Bedeutung von Keratinen im Gastrointestinaltrakt zeigten, daß Tiere mit knock-out des *Krt8* oder *Krt18* verschiedene Störungen bzw. Krankheiten aufwiesen. *Krt8*-defiziente Mäuse litten an Wachstumsretardierung, intrauterinen hepatischen Blutungen und erreichten nur selten das Erwachsenenalter [Baribault *et al.* 1993]. In einem anderen *Krt8*-knock-out-Modell entwickelten die Tiere gehäuft kolorektale Hyperplasien und eine Kolitis [Baribault *et al.* 1994]. Ebenso scheinen Hepatozyten *Krt8*-defizienter Mäuse fragiler zu sein als die der Wildtyp-Tiere. Die Applikation verschiedener Lebertoxine führte bei *Krt8*-knock-out-Mäusen zu intrahepatischen Blutungen, Vakuolenbildung, toxischem Zellschaden und Apoptose [Loranger *et al.* 1997, Toivola *et al.* 1998, Zatloukal *et al.* 2000, Gilbert *et al.* 2001]. In einer großen Studie von Ku *et al.* [Ku *et al.* 2003] an 467 Leberexplantaten, welche von Patienten mit Leberzirrhose stammten, wurde bei 12/467 (2,6%) Patienten eine der

folgenden *KRT8*-Variationen gefunden: G62C (6/467, 1,3%), Y54H (5/467, 1,1%), G53V (1/467, 0,2%). (Die Numerierung in dieser Publikation begann unüblicherweise mit dem dem Startcodon folgenden Codon). In der Kontrollgruppe fanden sich diese Polymorphismen nur bei 2/349 Proben. Bemerkenswerterweise war in der Subgruppe der Patienten mit kryptogener Zirrhose der Anteil der Keratinvarianten deutlich höher als bei Patienten mit alkoholischer, infektiöser oder anderweitig bedingter Leberzirrhose. In einer kürzlich publizierten Studie derselben Arbeitsgruppe wurden die verbleibenden Regionen der codierenden Sequenzen von *KRT8* dieser Kohorten untersucht; in diesem erweiterten Ansatz wurden 4 bisher unbekannte *KRT8*-Mutationen gefunden, so daß insgesamt 48/467 (10,3%) der Patienten aber nur 13/349 (3,7%) der Kontrollen eine dieser Mutation aufwiesen ($P < 0,5$) [Ku *et al.* 2005].

Aufgrund der oben geschilderten Studien an Tiermodellen sowie an den Leberexplantaten, kann vermutet werden, daß *KRT8* eine protektive Funktion bei der Bewältigung hepatozellulären Stresses zufällt. Da aber *KRT8*-Variationen nur bei einem kleinen Anteil von Patienten mit Leberzirrhose (2,6%) auftreten, scheinen sie, wenn überhaupt, nur in einzelnen Fällen die Pathogenese zu begünstigen.

Zusätzlich muß erwähnt werden, daß die Ethnizität in der Studie von Ku *et al.* in den verschiedenen Gruppen inhomogen verteilt war mit einem Übergewicht von Afroamerikanern in der Patientengruppe. Drei der fünf Patienten und die einzige Kontrollperson, bei denen Y54H detektiert wurde, waren Afroamerikaner. Wie in der vorliegenden Studie gezeigt wurde, ist Y54H jedoch fast ausschließlich bei Individuen afrikanischen Ursprungs zu finden, so daß die Assoziation zwischen kryptogener Leberzirrhose und *KRT8*-Variationen in einer Wiederholungsstudie möglicherweise geringer ausfällt oder sich nicht bestätigen läßt. Tatsächlich konnten zwei europäische Studien diese Ergebnisse nicht bestätigen [Hesse *et al.* 2004, Halangk *et al.* 2004], eine davon mit einer deutlich höheren Fallzahl. Halangk *et al.* untersuchten 1668 Patienten mit unterschiedlichen Lebererkrankungen und 679 Kontrollpersonen und fanden keinen signifikanten Unterschied für die *KRT8*-Variationen Y54H und G62C zwischen beiden Gruppen [Halangk *et al.* 2004]. Die zweite europäische Studie von Hesse *et al.* konnte ebenfalls keine Assoziation der *KRT8*-Variationen mit verschiedenen Lebererkrankungen finden, wurde aber wegen methodischer Probleme angezweifelt [Strnad *et al.* 2006].

Die Tatsache, daß pankreatische Azinuszellen fast ausschließlich das Keratinpaar KRT8/KRT18 exprimieren [Ku *et al.* 1999], suggeriert eine wichtige Rolle dieser Keratine für das Pankreas. Untersuchungen des Pankreas an *krt8*-knock-out-Mäusen [Toivola *et al.* 2000] sprechen jedoch eher gegen diese Hypothese. Die Tiere zeigten keine histologischen Auffälligkeiten und die exokrine Pankreasfunktion wie auch die Serumspiegel von Amylase und Lipase blieben unbeeinträchtigt. Nach einer Provokation der Tiere mit einer cholin- und methioninarmen Diät bei gleichzeitiger Ethioningabe oder Applikation der Substanz Cärulein (zwei etablierte pankreatitisinduzierende Modelle) zeigten *krt8*-knock-out-Tiere durchschnittlich sogar geringere entzündliche Veränderungen als die Wildtyp-Tiere.

Wie kann nun die Rolle der Keratine in Zellen des Pankreas verstanden werden, wenn zum einen die zwei häufigsten *KRT8*-Polymorphismen bei Patienten mit entzündlichen und neoplastischen Krankheiten des Pankreas nicht gehäuft auftreten und zum anderen bei einem kompletten Ausfall der *krt8*-Expression im Tierversuch keine Auffälligkeiten beobachtet wurden? Sollten genetische Veränderungen tatsächlich zu einem verminderten Schutz vor Inflammation und Autodigestion führen, so würde man dies am ehesten bei einer „loss of function“-Mutation vermuten. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, daß eine "loss of function"-Mutation zu Pankreaserkrankungen prädisponiert, wenn ein kompletter Funktionsausfall des Proteins bei *krt8*-knock-out-Mäusen keinerlei Konsequenzen hat. Können aufgrund dieser Tatsachen KRT8 und KRT18 im Pankreas tatsächlich als „überflüssig“ [Toivola *et al.* 2000] bezeichnet werden?

An dieser Stelle stößt ein rein genetischer Erklärungsansatz an seine Grenzen. Es erscheint daher notwendig, das Protein KRT8 näher zu betrachten.

Zytokeratine sind nach der Proteinbiosynthese verschiedenen posttranslationalen Veränderungen unterworfen, im Falle von KRT8 und KRT18 sind dies Glykosylierung und Phosphorylierung an den globulären Domänen (Carboxy- und N-terminale Domänen) [Chou *et al.* 1992, Ku *et al.* 1994]. Die Mehrzahl der KRT8/KRT18-Komplexe sind entweder phosphoryliert oder glykosyliert, was auf verschiedene Funktionen dieser Veränderungen hindeutet. Phosphorylierungen von KRT8 und KRT18 finden an Serinresten statt [Ku *et al.* 1997] und wurden vermehrt bei verschiedenen Formen des Zellstressses wie Mitose [Liao *et al.* 1997], ocadaischer

Säure [Chou *et al.* 1994], Hyperthermie [Liao *et al.* 1995b], Virusinfektion [Liao *et al.* 1995b] und Apoptose [Liao *et al.* 1997] beobachtet. Die Phosphorylierung von KRT8 und KRT18 hat Einfluß auf die Filamentreorganisation [Ku *et al.* 1994], bewirkt eine gesteigerte Proteinlöslichkeit [Liao *et al.* 1996], legt möglicherweise die Lokalisation der Keratine in bestimmten Zellkompartimenten fest [Liao *et al.* 1995a] und reguliert die Assoziation mit den Proteinen der 14-3-3 Familie im Verlauf des Zellzyklus [Liao *et al.* 1996]. Es kann vermutet werden, daß diese posttranslationalen Phosphorylierungen zur Bewältigung des Zellstress beitragen. Allerdings betreffen beide *KRT8*-Variationen, G62C und Y54H, keine Serinreste, welche die wesentlichen reaktiven Partner für Protein-Phosphorylierung sind [Ku *et al.* 1997].

Ku *et al.* führten funktionelle Studien durch, bei denen die Auswirkung von Stress in Form von Hitze, dem Phosphataseinhibitor oocadinsäure und Wasserstoffperoxid auf die Reorganisationsfähigkeit von Zellen mit G62C-, Y54H- oder dem Wildtyp-Allel untersucht wurde [Ku *et al.* 2001]. Hitze und oocadinsäure führten bei vorhandenem Y54H-Allel vermehrt zu instabilen, kollabierten Filamenten, während Wasserstoffperoxid bei Zellen mit G62C-Allel zum Filamentzerfall führte. Unter Basisbedingungen hatten beide genetischen Variationen jedoch keinen Einfluß auf die Filamentorganisation.

Da wie oben erwähnt G62C und Y54H die potentielle Proteinphosphorylierung wahrscheinlich nicht beeinträchtigt, scheinen noch andere Modifikationen für die Filamentfunktion von Bedeutung zu sein.

Die Tatsache, daß G62C und Y54H nicht mit entzündlichen oder neoplastischen Erkrankungen des Pankreas assoziiert sind legt nahe, daß entweder eine gestörte Filamentreorganisation keinen Einfluß auf die Pathogenese dieser Erkrankungen hat oder daß *in vivo* andere zelluläre Schutzmechanismen die Folgen der beeinträchtigten KRT8-Funktion kompensieren können. Denkbar wäre auch, daß es sich bei den von Ku *et al.* beobachteten funktionellen Auswirkungen dieser beiden *KRT8*-Variationen um *in vitro*-Phänomene handelt.

Bezüglich der geographischen Verteilung der untersuchten Polymorphismen fällt auf, daß beim G62C Polymorphismus eine Abnahme der Frequenz von den nordöstlichen zu den südwestlichen Staaten Europas zu finden ist. Dabei scheint es sich nicht um eine zufällige Verteilung zu handeln, sondern viel mehr um einen

Gradienten, der bei mehreren Polymorphismen bzw. Mutationen zu beobachten ist wie z. B. bei α 1-Antitrypsin-Polymorphismen oder bei HFE- und *CFTR*-Mutationen. Möglicherweise entstand dieser Gradient im Rahmen der neolithischen Besiedlung Europas deren Route von der Türkei über den Balkan und schließlich Donau aufwärts nach Mittel- und Nordeuropa verlief.

Interessanterweise trat in unserer Untersuchung Y54H im Wesentlichen bei Kontrollen westafrikanischer Herkunft und bei Afroamerikanern (Ecuador) auf, während die Variante nur bei einer der 153 Kontrollen aus Ostafrika (Äthiopien) zu finden war. Ebenso wurde Y54H nicht bei Indios aus Ecuador gefunden. Diese ethnische Verteilung von Y54H begründet sich wahrscheinlich auf die vorwiegend westafrikanische Herkunft der Afroamerikaner im Zuge der Sklaverei. Schließlich waren die Stämme Westafrikas von Übersee geographisch einfacher erreichbar und somit gegenüber dem barbarischen Menschenfang stärker exponiert. Es darf also vermutet werden, daß im Zusammenhang mit der unfreiwilligen Völkerverschiebung von Teilen der afrikanischen Bevölkerung auch der Y54H-Polymorphismus in den amerikanischen Genpool importiert wurde.

5 Zusammenfassung:

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.

Wir untersuchten Patienten mit akuter Pankreatitis (n=192), chronischer Pankreatitis unterschiedlicher Genese (n=1682), duktalem Adenokarzinom des Pankreas (n=483) sowie 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 sowie bidirektionaler Sequenzierung analysiert.

Die Häufigkeit des G62C Polymorphismus unterschied sich nicht zwischen den Patienten mit akuter oder chronischer Pankreatitis, Pankreaskarzinom und Kontrollpersonen. G62C war unserer Studie fast ausschließlich bei Kaukasiern nachweisbar und variierte innerhalb der europäischen Kontrollen von 0,4% - 3,8% mit einem Frequenzabfall von Nordwest nach Südost. Dieser Nordwest-Südost-Gradient ist wahrscheinlich durch die Route der Kolonisation Europas während der Jungsteinzeit bedingt und wurde bereits in epidemiologischen Studien für einige weitere Polymorphismen beschrieben. 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. Diese

Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen von einer italienischen Arbeitsgruppe erhobenen Daten. Wir untersuchten 1682 Patienten mit chronischer Pankreatitis, während in der vorangegangenen Studie von Cavestro *et al.* lediglich 67 Patienten analysiert worden sind, so daß unserer Ansicht nach die beschriebene Assoziation auf einen Typ I-Fehler bedingt durch die niedrige Fallzahl der Studiengruppe beruht. Die von uns erhobenen Befunde legen nahe, daß es sich bei beiden Veränderungen um harmlose genetische Sequenzalterationen handelt. Dies ist in Einklang zu früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zu *KRT8*-Varianten bei Hepatopathien und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.