

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie
und Gastroenterologie, Campus Virchow-Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

In Zusammenarbeit mit
Stanford University, School of Medicine, Stanford, CA, USA
Division of Gastroenterology and Hepatology
Digestive Disease Center and VA Palo Alto Medical Center

DISSERTATION

**Einfluß von Keratinmutationen (*KRT8/18*) auf den Verlauf
bzw. Schweregrad der Lebererkrankung bei
chronischer Hepatitis C-Virusinfektion und
hereditärer Hämochromatose**

Untersuchung von *KRT8/18* unter optimierten DHPLC-Analysebedingungen
in deutschen und österreichischen Populationen

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tim-Christian Lienau

aus Berlin

Gutachter: 1.: Prof. Dr. med. Th. Berg
2.: Prof. Dr. med. R. Somasundaram
3.: Prof. Dr. U. Spengler

Datum der Promotion: 12.12.2008

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. *Einleitung*

1.1. Das Zytoskelett	1
1.2. Intermediärfilamente	2
1.3. Keratine	4
1.3.1. Aufbau und Genlocus	4
1.3.2. Aufbau, Organisation und Anpassungsmechanismen des Keratinnetzwerks	4
1.3.3. Posttranslationale Modifikationen und assoziierte Proteine	5
1.3.4. Aufgabe und Funktion der Keratine	6
1.3.5. Keratinexpressionsmuster in verschiedenen Geweben	7
1.3.6. Keratine als Tumormarker und Substrat serologischer Tests	8
1.4. Rolle von Keratinmutationen in der Pathogenese von Hauterkrankungen und Erkrankungen des Verdauungstrakts	8
1.4.1. Genetische Assoziation von Keratinmutationen und Hauterkrankungen	8
1.4.2. Vermutete genetische Assoziation von Keratinmutationen und Erkrankungen der Verdauungstraktorgane im Tiermodell	10
1.4.3. Vermutete genetische Assoziation von K8/18-Varianten und Erkrankungen von Leber, Pankreas und Darm beim Menschen	12
1.4.4. Vermutete Pathomechanismen von Keratinmutationen in der Entwicklung von Hauterkrankungen und inneren Erkrankungen	14
1.5. Methoden zur Detektion von DNA-Sequenzvarianten	16
1.6. Chronische Hepatitis C-Virusinfektion	18
1.6.1. Allgemein	18
1.6.2. Pathophysiologie	19
1.6.3. Natürlicher Verlauf	19
1.6.4. Bedeutung von Umwelt- und Wirtsfaktoren und genetischen Varianten für den Krankheitsverlauf und die Therapie	20
1.7. Hereditäre Hämochromatose	21
1.7.1. Allgemein	21
1.7.2. Natürlicher Verlauf und Pathophysiologie	21
1.7.3. Bedeutung von genetischen, Umwelt- und Wirtsfaktoren für den Krankheitsverlauf	23
1.8. Pathophysiologie der Leberfibrose	24

2. *Zielsetzung der Doktorarbeit*

3. *Patienten, Material und Methode*

3.1. DNA von Mensch und Maus	26
3.1.1. DNA zur Optimierung und Validierung der DHPLC-Analysebedingungen	26
3.1.1.1. DNA amerikanischer Patienten mit chronischer Lebererkrankung	26
3.1.1.2. DNA transgener Mäuse	26
3.1.1.3. DNA deutscher Patienten mit chronischer Lebererkrankung	28
3.1.2. Analyse von <i>KRT8/18</i> -Mutationen in einer deutschen Population	28
3.1.2.1. DNA deutscher Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion	28
3.1.2.2. Histologisches Grading und Staging	29
3.1.3. Analyse von <i>KRT8/18</i> -Mutationen in einer österreichischen Population	30
3.1.3.1. DNA österreichischer Patienten mit hereditärer Hämochromatose	30
3.2. Methoden der Molekularbiologie	31

3.2.1. DNA-Isolierung	31
3.2.2. DNA-Konzentrationsbestimmung und DNA-Reinheit	31
3.2.3. Oligonukleotide („Primer“)	31
3.2.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
3.2.5. DNA-Aufreinigung	35
3.2.6. Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)	35
3.2.7. DNA-Sequenzierung	37
3.3. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	39
3.4. Geräte, Instrumente und Software	40
3.5. Statistische Auswertung	42
4. Ergebnisse	
4.1. Optimierung der DHPLC-Analyse	43
4.1.1. Überprüfung der softwaregenerierten Analysetemperaturen und Optimierung für die Detektion von <i>KRT8</i> - und <i>KRT18</i> -Varianten	43
4.1.2. Validierung der optimierten DHPLC-Analysebedingungen durch Re-Analyse einer Subkohorte deutscher Patienten mit Lebererkrankungen	48
4.2. Analyse deutscher Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion	51
4.2.1. Charakteristika der Patientenkohorte	51
4.2.2. Charakterisierung der exonischen <i>KRT8/18</i> -Varianten	52
4.2.3. Charakterisierung der nicht kodierenden <i>KRT8/18</i> -Varianten	56
4.2.4. Statistische Auswertung	58
4.3. Analyse österreichischer Patienten mit hereditärer Hämochromatose	61
4.3.1. Charakteristika und Leberhistologie der Patientenkohorte	61
4.3.2. Charakterisierung der identifizierten exonischen Keratinvarianten	63
4.3.3. Charakterisierung der identifizierten nicht kodierenden Keratinvarianten	65
4.3.4. Statistische Auswertung	65
5. Diskussion	
5.1. Optimierung der DHPLC-Analysebedingungen	67
5.1.1. Modifizierung der DNA-Schmelztemperaturen und Einsatz von bekannten <i>KRT8/18</i> -Varianten zur Optimierung der DHPLC-Sensitivität	67
5.1.2. Validierung der optimierten Analysebedingungen anhand einer deutschen Patientenkohorte mit chronischen Lebererkrankungen (Hesse <i>et al.</i> , 2004)	69
5.2. Analyse der Kohorte deutscher Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion	72
5.2.1. Häufigkeit und Verteilung von <i>KRT8/18</i> -Varianten bei Patienten mit chronischer Lebererkrankung	72
5.2.2. Biologische Konsequenzen der identifizierten <i>KRT8/18</i> -Varianten	78
5.3. Analyse der Kohorte österreichischer Patienten mit C282Y-homozygoter hereditärer Hämochromatose	81
5.3.1. Häufigkeit und Verteilung von <i>KRT8/18</i> -Varianten in der österreichischen Kohorte	81
5.3.2. Biologische Bedeutung von <i>KRT8/18</i> -Varianten bei C282Y-homozygoter hereditärer Hämochromatose	83
5.3.3. Problematik der statistischen Auswertung	85
6. Zusammenfassung	86
7. Literaturverzeichnis	88

Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
ALT (GPT)	Alaninaminotransferase (Glutamatpyruvattransaminase)
AST (GOT)	Aspartataminotransferase (Glutamatoxalacetattransaminase)

B

BMI	body mass index, Körpermasseindex
bp	Basenpaare
BPAG	Bullöses-Pemphigoid-Antigen

C

cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CHC	Chronische Hepatitis C-Virusinfektion

D

Del	Deletion
DHPLC	denaturing high-performance liquid chromatography, denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat

E

EBS	<i>Epidermolysis bullosa simplex</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N',-tetraessigsäure

G

GSTP1	Glutathion-S-Transferase P1
-------	-----------------------------

H

HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus
HE	Hämatoxylin-Eosin
<i>HFE</i>	Hämochromatose-Gen
HHC	Hereditäre Hämochromatose
HIC	hepatic iron concentration, Lebereisenkonzentration
HII	hepatic iron index, Lebereisenindex
hK	humanes Keratin
HLA	human leukocyte antigen, humanes-Leukozyten-Antigen

I

IF(s)	Intermediärfilament(e)
IFAP(s)	Intermediärfilamentassoziierte(s) Protein(e)
IL	Interleukin
IVS	intervening sequence, Zwischensequenz (Intron)

K

K	Keratin-Protein
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilo-Dalton
KI	Konfidenzintervall

<i>KRT</i>	Keratin-Gen
M	
MMP	Matrixmetalloproteinase
MnSOD	Mangansuperoxiddismutase
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
N	
nt	Nukleotid
O	
OD	Optische Dichte
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OR	Odds Ratio
P	
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor, Plättchenwachstumsfaktor
R	
RNA	Ribonukleinsäure
S	
SMA	α -smooth muscle actin
SSCP	single-strand conformation polymorphism, Einzelstrangkonnformationspolymorphismus
SNP	single-nucleotide polymorphism
s	Standardabweichung
T	
Tab.	Tabelle
TfR	Transferrinrezeptor
TGF	transforming growth factor, transformierender Wachstumsfaktor
TIMP	tissue inhibitor of MMP, Gewebeinhibitor der MMP
TNF	Tumornekrosefaktor
U	
UTR	untranslated region, nicht translatierte Region
V	
vs.	<i>versus</i>
W	
WT	Wildtyp
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

Alle Maßeinheiten wurden in SI-Einheiten angegeben. Es wurden die gebräuchlichen Präfixe für dezimale Teile der genannten Einheiten benutzt. Ausnahmen bildeten: die Temperatur, die in Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$) angegeben wurde; die Zeit, die neben Sekunden (s) auch in Minuten (min) und Stunden (h) angegeben wurde; das Volumen, das in Litern (l) angegeben wurde.

1. Einleitung

1.1 Das Zytoskelett

Als Zytoskelett werden die fibrillären Elemente der Zelle bezeichnet, die nach dem Entfernen des löslichen Zytoplasmas und der Zellorganellen übrig bleiben. Es dient dem mechanischen Schutz der zellwandlosen eukaryotischen Zellen vor Belastungen der Umwelt und ist auch an vielen nicht mechanischen Aufgaben beteiligt, wie z.B. der Muskelkontraktion, Zellteilung, Verankerung der Zelle und der Zellorganellen, Genregulation, Zellbewegung, Differenzierung, Wundheilung, Stressreaktion und Signalübermittlung (Ku *et al.*, 1999; Herrmann *et al.*, 2003; Toivola *et al.*, 2005). Darüber hinaus nimmt das Zytoskelett an vielen spezialisierten Funktionen der einzelnen Epithelien teil. Im Gastrointestinaltrakt ist es z.B. für Sekretion, Verdauung und Absorption sowie die Aufrechterhaltung der zellulären Polarität und des intrazellulären Transports notwendig (Ku *et al.*, 1999). Das Zytoskelett der eukaryotischen Zelle besteht aus einem ausgedehnten dreidimensionalen Netzwerk aus drei unterschiedlichen Filamenttypen. Nach ihrem Durchmesser werden sie in Mikrofilamente (5-8 nm), Intermediärfilamente (IFs, 10-12 nm) und Mikrotubuli (25 nm) unterteilt (Albers, 1996; Fuchs und Cleveland, 1998).

Tabelle 1.1: Elemente des epithelialen Zytoskeletts und ihre Eigenschaften

Eigenschaften	Mikrofilamente	Mikrotubuli	Intermediärfilamente
Proteinprototyp	Aktin	Tubulin	Viele (gewebsspezifisch)
Durchmesser (nm)	5-8	25	10-12
Struktur	Konserviert	Konserviert	Diverse (mit konservierten Subdomänen)
Expression	Eukaryoten	Eukaryoten	Höhere Eukaryoten
Löslichkeit	Hoch	Hoch	Gering
Polarität	Ja	Ja	Nein
Intrazelluläre Lokalisation	Zytoplasma	Zytoplasma	Zytoplasma, Nukleus (Lamine)
Bindungsproteine	Viele	Viele	Wenige
Assoziierte Proteine	Viele	Viele	Wenige bekannt
Phosphorylierung	Begrenzt	Begrenzt	Ausgedehnt
Assoziierte Krankheiten	Wenige	Keine	Viele (v.a. Haut)
Funktionen	Viele	Viele	Wenige bekannt
Stabilisierer	Phalloidin	Taxol	Keine
Destabilisierer	Cytochalasine	Colchicin u.a.	Keine

Modifiziert nach Ku *et al.*, 1999; Omary *et al.*, 2006.

1.2 Intermediärfilamente

Die Familie der Intermediärfilamente (IFs) besteht aus über 70 verschiedenen, translatierten Genprodukten, so dass die IFs zu den 100 größten Genfamilien des Menschen zählen (Hesse *et al.*, 2001; Coulombe und Wong, 2004). Die IFs stellen die größte, aber auch die am wenigsten untersuchte der drei Filamentfamilien dar. Sie sind durch eine apolare Architektur und schwere Löslichkeit gekennzeichnet (Herrmann *et al.*, 2003; Omary *et al.*, 2004, 2006). Sie übernehmen primär stützende Funktion und wurden auch als „Knochen“ der menschlichen Zelle bezeichnet, während Mikrofilamente und Mikrotubuli mit „Muskeln“ verglichen wurden, da sie vor allem der Bewegung und dem intrazellulären Transport dienen. Aufgrund ihrer genomischen Struktur und Sequenzhomologie werden die IFs in fünf Typen und Orphans (speziellen in der Linse vorkommenden IF-Proteinen) eingeteilt (Herrmann und Aebi, 2000; Omary *et al.*, 2004; Coulombe und Wong, 2004). Die Intermediärfilamentproteine Typ I bis IV sind im Zytoplasma und Typ V (Lamine) im Nukleus lokalisiert (Tab. 1.2).

Tabelle 1.2: Klassifikation der Intermediärfilamentproteine

Typ	Name	Anzahl der Gene	Chromosom	Hauptsächliches Vorkommen
I	Keratin (sauer)	28	17	Epithel (K9-K24), Haar (Ha1-Ha8)
II	Keratin (basisch)	26	12	Epithel (K1-K8), Haar (Hb1-Hb6)
III	Vimentin	1	10	Mesenchym, Endothel, Leukozyten
	Desmin	1	2	Alle Muskelzellen
	GFAP	1	17	Astrozyten, Gliazellen
	Peripherin	1	12	Periphere Neurone
	Syncoilin	1	1	Muskelzellen (v.a. Skelett-, Herzmuskel)
IV	NF-L (light)	1	8	Zentrale und periphere Neurone
	NF-M (medium)	1	8	Zentrale und periphere Neurone
	NF-H (heavy)	1	22	Zentrale und periphere Neurone
	α -Internexin	1	10	Zentrale und periphere Neurone
	Nestin	1	1	Heterogen
	Synemin	1	15	Alle Muskelzellen
	Desmuslin	1	15	Muskelzellen
V	Lamine A/C	1	1	Zellkern, nukleäre Lamina
	Lamin B1	1	5	Zellkern, nukleäre Lamina
	Lamin B2	1	19	Zellkern, nukleäre Lamina
Orphan	Phakinin (CP49)	1	3	Linse
	Filensin (CP115)	1	20	Linse

GFAP, glial fibrillary acidic protein; NF, Neurofilament. Modifiziert nach Coulombe und Wong, 2004; Omary *et al.*, 2004, 2006; Schweizer *et al.*, 2006.

Alle Mitglieder der IF-Familie sind durch einen prototypischen Grundaufbau gekennzeichnet (Fuchs und Weber, 1994; Coulombe *et al.*, 2001; Herrmann und Aebi, 2004). Er besteht aus einer zentralen, konservierten, α -helikalen Stammdomäne, die aus zwei ineinander verwundenen α -helikalen Polypeptidketten („coiled coil“) von ca. 310 Aminosäuren (bei Laminen ca. 352 Aminosäuren) gebildet wird. Die Stammdomäne wird von drei nicht helikalen Linkern in vier Subdomänen unterteilt und zu beiden Seiten von nicht helikalen Enddomänen flankiert (Abb. 5.1). Die aminoterminalen Kopfdomäne und carboxyterminale Schwanzdomäne variieren stark in der Länge und Sequenz. Die zentrale Domäne ist für die Ausbildung stabiler Wechselwirkungen in den Polymeren („coiled coil“) verantwortlich und die treibende Kraft der spontanen Polymerisation der IF-Untereinheiten (Ku *et al.*, 1999; Coulombe *et al.*, 2001). Die Enddomänen modulieren die IF-Polymerisation, vermitteln Proteininteraktionen und sind für die strukturelle Heterogenität und der dadurch bedingten gewebsspezifischen Expression, Funktion und Regulation der verschiedenen IFs verantwortlich (Fuchs und Cleveland, 1998; Coulombe und Omary, 2002; Herrmann *et al.*, 2003; Omary *et al.*, 1998, 2006). Die löslichen IF-Untereinheiten aus Tetrameren stellen lediglich eine Minderheit innerhalb der Zelle dar (Chou *et al.*, 1993), da sie aufgrund der starken Tendenz zur Polymerisierung überwiegend die unlösliche filamentöse Form innerhalb der Zelle annehmen (Windoffer und Leube, 2001). Obwohl der genaue Aufbau der Filamente noch nicht vollkommen aufgeklärt worden ist, wird angenommen, dass das komplette 10-12 nm dicke Filament im Querschnitt 32 Monomere enthält, die in vier Protofibrillen aus jeweils 2 Protofilamenten organisiert sind (Fuchs und Weber, 1994; Fuchs und Cleveland, 1998; Parry und Steinert, 1999; Herrmann und Aebi, 2004). Die IFs werden allgemein als feste Strukturen angesehen, allerdings wurde den einzelnen Filamenten ebenfalls eine hohe Mobilität nachgewiesen. Die stabilen Netzwerke weisen einen kontinuierlichen Umbau und dynamischen Austausch von Untereinheiten auf, wodurch sich die Zelle optimal an die sich verändernden Zellzustände anpassen kann (Windoffer und Leube, 1999; Herrmann und Aebi, 2000; Windoffer *et al.*, 2004). Durch ihre ausgezeichneten viskoelastischen Eigenschaften (Wagner *et al.*, 2007) eignen sie sich sehr gut zur Stabilisierung der Zelle. Mutationen in der Proteinstruktur können die Zell- und Gewebeintegrität beeinträchtigen. Dies spiegelt sich in mehr als 30 humanen Erkrankungen wider, die bis *dato* auf Mutationen der IFs zurückgeführt werden konnten, und sich in Form von Gewebe-, Zell- oder Zellkernfragilität in Haut, Kornea, Muskeln und inneren Organen oder als Laminopathien manifestieren (Omary *et al.*, 2004).

1.3 Keratine

1.3.1 Einteilung und Genlocus

Die Keratine stellen mit über 50 zurzeit bekannten Mitgliedern (Coulombe und Omary, 2002; Schweizer *et al.*, 2006) die größte Untergruppe der IF-Proteine dar. Sie werden primär in Epithelzellen und epidermalen Anhangsgebilden exprimiert. Entsprechend wird die Familie der klassischen epithelialen Keratine, die als „weiche“ Keratine oder Zytokeratine bezeichnet werden, von der Familie der „harten“ Keratine, die in den Zellen der epithelialen Anhangsgebilden (Haare, Nägel) exprimiert werden, unterschieden (Tab. 1.2). Eine weitere Unterteilung erfolgt nach Molekulargewicht, isoelektrischen Punkt und Sequenzhomologie der α -helikalen Stammdomäne in die kleineren, sauren Keratine Typ I (K9-K20, K23, K24 und Haarkeratine Ha1-Ha8) und die größeren, eher basischen Keratine Typ II (K1-K8 und Haarkeratine Hb1-Hb6) (Moll *et al.*, 1982; Herrmann und Aebi, 2000; Coulombe und Omary, 2002; Coulombe und Wong, 2004; Schweizer *et al.*, 2006). 54 funktionale Keratingene (*KRT*) sind derzeit bekannt, von denen mindestens 28 Gene für Typ I und 26 für Typ II-Keratine kodieren (Schweizer *et al.*, 2006). Alle Keratingene des Typ I (außer *KRT18*) sind auf Chromosom 17q12-q21 und des Typ II (und *KRT18*) auf Chromosom 12q13 lokalisiert. Die Nähe von *KRT8* und *KRT18* auf Chromosom 12 wird auf einen frühen gemeinsamen Ursprung zurückgeführt (Owens und Lane, 2003). Außerdem existiert eine hohe Anzahl an Pseudogenen für K8 und K18 (Hesse *et al.*, 2001).

1.3.2 Aufbau, Organisation und Anpassungsmechanismen des Keratinnetzwerks

Epithelzellen exprimieren mindestens ein Typ I- und ein Typ II-Keratin, die obligate, nicht kovalente Heterodimere in einem gewebespezifischen Muster ausbilden in Abhängigkeit vom Epithelzelltyp und Differenzierungsgrad (Abs. 1.3.5; Fuchs und Weber, 1994; McLean und Lane, 1995; Herrmann und Aebi, 2000). Antiparallele Tetramere bilden die kleinste Baueinheit der Filamente, die schließlich einen Durchmesser von ca. 10 nm erreichen. Diese formen ein filamentöses Netzwerk, das das Zytoplasma vom Nucleus bis zur Zellmembran durchspannt und dort über Desmosomen bzw. Hemidesmosomen verankert ist (Herrmann *et al.*, 2003). Desmosomen dienen der Zell-Zell-Verbindung, während Hemidesmosomen den Kontakt zur Basalmembran bzw. zur Matrix herstellen (Fuchs und Weber, 1994; Fuchs und Cleveland, 1998; Ku *et al.*, 1999). Sie halten so den Zellverband der verschiedenen Epithelien zusammen. Der lösliche Pool von Keratinoligomeren wird häufig als Reservoir angesehen. Es soll durch ständigen Austausch der Untereinheiten zur Aufrechterhaltung und Erneuerung des Filamentnetzwerks beitragen

(Franke *et al.*, 1987; Chou *et al.*, 1993). Dadurch wird das Keratinnetzwerk zu einer dynamischen Struktur, die fähig ist, sich optimal an die funktionellen Anforderungen der Zelle anzupassen. So kann sich das Keratinnetzwerk während der Mitose und Meiose komplett auflösen (Windoffer und Leube, 2001), während es z.B. bei Bewegung der Organellen oder Vesikeltransport nur lokal depolymerisiert. Dennoch zählen Keratine zu den unlöslichsten Zellproteinen, die *in vitro* schnell und fast vollständig polymerisieren und nur durch hohe Harnstoffkonzentrationen im depolymerisierten Zustand gehalten werden können (Fuchs und Weber, 1994; Herrmann *et al.*, 2003). Das äußerst flexible Keratinzytoskelett kann größeren Deformationen widerstehen (Wagner *et al.*, 2007). Ein fehlendes oder defektes Keratinnetzwerk führt hingegen zu einer deutlich gesteigerten Fragilität der Zelle (Tab. 1.5; Ku *et al.*, 2007).

1.3.3 Posttranslationale Modifikationen und assoziierte Proteine

Um die Komponenten des Zytoskeletts an die funktionellen Bedürfnisse anzupassen, haben die Zellen verschiedene Strategien entwickelt. Dazu zählen posttranslationale Modifikationen der Strukturproteine und die Assoziation und Interaktion mit vielen verschiedenen IF-assoziierten Proteinen (IFAPs). Eine Reihe von posttranslationalen Modifikationen wurden beschrieben, darunter Phosphorylierung, Glykosylierung, Transglutaminierung, Acetylierung, Caspase-vermittelte Proteolyse, Ubiquitinierung und Quervernetzung des Keratinmoleküls, deren genaue Wirkung auf die Regulation der Keratinfunktion jedoch größtenteils unklar ist (Coulombe und Omary, 2002; Omary *et al.*, 1998, 2006; Ku *et al.*, 2007). Die Regulation der Keratinfunktion *via* Phosphorylierung wurde bisher am besten untersucht. Phosphorylierungsstellen sind v.a. Serin- und Threoninreste in der Kopf- und Schwanzdomäne (Omary *et al.*, 1998, 2006). Wahrscheinlich können Keratinmutationen durch Ablation oder Einführen einer Phosphorylierungsstelle im Molekül direkten oder indirekten Einfluß auf Erkrankungen nehmen (Ku und Omary, 2006; Omary *et al.*, 2006; Ku *et al.*, 2007). Die Phosphorylierung bewirkt eine erhöhte Löslichkeit der Keratine *in vitro* und *in vivo*. Sie tritt als Folge von Belastungssituationen der Zelle wie z.B. Hitze, virale Infektion, Apoptose und toxisch induzierte Zellverletzung auf (Ku *et al.*, 1996, 1998b; Toivola *et al.*, 1998, 2002; Ku und Omary, 2006). Die K8/18-Phosphorylierung korreliert auch mit der Krankheitsprogression und -regression bei Patienten mit chronischer Lebererkrankung (Toivola *et al.*, 2004; Zatloukal *et al.*, 2004). Sie wird als eine allgemeine Reaktion der Zelle auf Stresssituationen angesehen (Omary *et al.*, 1998, 2006; Coulombe und Omary, 2002; Porter und Lane, 2003). Die Phosphorylierung ist ebenfalls essentiell für viele physiologische Prozesse wie der Organisation und Restrukturierung des Keratinfilamentnetzwerks (Ku *et al.*, 1996; Omary *et al.*, 1998; Coulombe und Omary, 2002; Toivola *et al.*, 2002). Weitere Effekte

sind z.B. die Regulation von Bindungsproteinen sowie Schutz vor Caspase-Verdauung oder vor Ubiquitinierung (Coulombe und Omary, 2002; Omary *et al.*, 2006). Außerdem sind die K8/18-Hyperphosphorylierung und Quervernetzung durch Transglutaminierung wichtige Prozesse bei der Bildung von Mallory bodies in den Hepatozyten (Ku *et al.*, 2007). In der Gruppe der IFAPs sind v.a. Desmoplakin und BPAG1e von Bedeutung, die die Verankerung der Keratinfilamente an Desmosomen bzw. Hemidesmosomen vermitteln und maßgeblich an der Stabilisierung des epithelialen Zellverbandes beteiligt sind; Filagrin und Trichohyalin, die eine Bündelung der Keratine bewirken; die Adapter- und Signalmoleküle TNF-Rezeptor Typ 2 und 14-3-3-Protein, das als Kofaktor die Löslichkeit der Keratine moduliert und an der Keratinfilamentorganisation beteiligt ist; Chaperones wie z.B. Hitzeschockproteine (Hsp70), die die Filamentsynthese in verschiedenen Stresssituationen und während der Zellteilung beeinflussen; Plectin, das Keratine mit anderen Strukturproteinen der Zelle und Hemidesmosomen vernetzt (Herrmann und Aebi, 2000; Coulombe und Omary, 2002). Mutationen der IFAPs spielen bei der Pathogenese verschiedener Haut-, Haar- und Muskelerkrankungen eine wichtige Rolle (Omary *et al.*, 2004).

1.3.4 Aufgabe und Funktion der Keratine

Die Hauptaufgabe der Keratinnetzwerks als widerstandsfähiges, aber dennoch anpassungsfähiges Gerüst, wird im Schutz der Epithelzellen gegenüber Belastungen mechanischer und nicht mechanischer Art und der Aufrechterhaltung der Zell- und Gewebeintegrität gesehen (Fuchs und Cleveland, 1998; Herrmann und Aebi, 2000, 2004; Coulombe und Omary, 2002; Omary *et al.*, 2004). Keratine sind an wichtigen Funktionen beteiligt, z.B. schützen ihre phosphatbindenden Eigenschaften die Zelle vor Apoptose durch Proteinkinasen (Ku und Omary, 2006). Gesteigerte Keratinexpression kann als Marker für Zellbelastung dienen (Omary *et al.*, 2003). Sie sind ferner an der Steuerung des Zellzyklus und von Signalkaskaden, am „targeting“ zellulärer Proteine, der Erhaltung der Mitochondrienfunktion, Regulation von Genexpression, Polarisierung von Epithelien und Entstehung von Multiresistenzen gegenüber Pharmaka beteiligt (Abs. 1.4.4; Loranger *et al.*, 1997; Caulin *et al.*, 2000; Gilbert *et al.*, 2001; Toivola *et al.*, 2001, 2005; Ku *et al.*, 1999, 2003b, 2007; Coulombe und Omary, 2002; Owens und Lane, 2003). Weitere Anhaltspunkte über die Funktion der Keratine *in vivo* lieferten eine Anzahl an keratinassoziierten Genodermatosen des Menschen und bei genetisch manipulierten Mäusen (Tab. 1.4; Abs. 1.4.1). Verschiedene Arbeiten haben die Bedeutung der Keratine für die Integrität und Funktionen der einschichtigen Epithelzellen der Verdauungstraktorgane untersucht und deutliche Unterschiede in Abhängigkeit vom Gewebe festgestellt (Abs. 1.4.2, 1.4.3).

1.3.5 Keratinexpressionsmuster in verschiedenen Geweben

Keratine werden in allen Epithelzellen des Körpers exprimiert. Das Expressionsmuster variiert entsprechend der physikalischen Anforderungen an die Epithelzelle, dessen Differenzierung und Lokalisation im Körper (Moll *et al.*, 1982; McLean und Lane, 1995). Das spiegelt die komplexe Expression unterschiedlicher Typ I/II-Keratinheterodimere in den mehrschichtigen, stratifizierten Epithelien der Haut wider (Tab. 1.3). Die undifferenzierten Keratinozyten der Basalzellschicht exprimieren überwiegend K5/K14-Heterodimere, während die stärker differenzierten, suprabasalen Epithelzellen hauptsächlich K1/K10-Heteropolymere ausbilden. In Stresssituationen wurde aber auch die paarweise Expression von K6 und K16 bzw. K17 (die normalerweise in Haarfollikeln zu finden sind) beschrieben (McLean und Lane, 1995). Zudem können regional zusätzliche, suprabasale Keratine auftreten, z.B. K2e und K9 in der palmoplantaren Haut (Albers, 1996). Im Gegensatz dazu werden in den einfachen einschichtigen, glandulären Epithelien der inneren Organe (z.B. Leber, Pankreas und Darm) K8/18-Heterodimere als hauptsächlich zelluläres IF-Protein exprimiert, die gewebspezifisch durch variable Expression von K7, K19 und K20 ergänzt werden (Tab.1.3; Moll *et al.*, 1982; Fuchs und Weber, 1994; Ku *et al.*, 1999; Omary *et al.*, 2002, Owens und Lane, 2003).

Tabelle 1.3: Verteilung der Keratine in Epithelien des Verdauungstrakts und der Haut

Epithel	Gewebe bzw. Zelltyp	Keratine
Einfache, einschichtige Epithelien der inneren Organe	Adulte Hepatozyten	K8/18
	Embryonale Hepatoblasten	K8/18 + K19
	Ovale Stammzellen	K8, K18, K7, K19
	Gallengang	K8/19 + (K7/18)
	Gallenblase	K8/18 + (K7/19)
	Duktaler Pankreas	K8/19 + (K7/18)
	Azinärer Pankreas	K8/18 + K19*
	Dünndarm	K8/20 + K19 + K18
	Dickdarm	K8/18 + K19 + K20
	Ösophagus	K4/13 + (K6)
	Magen	K8/18 + K19 + K20 + (K7)
Stratifizierte, mehrschichtige Epithelien der Haut	Basale Keratinozyten	K5/14
	Suprabasale Keratinozyten	K1/10
	Palmoplantare Keratinozyten	K1/K2e/K9/K10
	Hyperproliferative Keratinozyten	K6/16/17

Keratine und ihre Verteilung in verschiedenen Geweben des Verdauungstrakts und der Haut, modifiziert nach Albers, 1996; Ku *et al.*, 1999; Omary *et al.*, 2002. In Klammern sind die schwächer exprimierten Keratine angegeben. *K19 wird nur im apikalen, aber nicht im zytoplasmatischen Kompartiment der azinären Pankreaszellen gefunden.

1.3.6 Keratine als Tumormarker und Substrat serologischer Tests

Proliferative Gewebe wie die Epithelzellen sind anfällig für maligne Transformation und stellen den Ursprung von mehr als 90% der malignen Tumoren des Menschen dar (Owens und Lane, 2003). Karzinome der inneren Organe sind jedoch schwer zu diagnostizieren und zu behandeln. Da das Expressionsmuster der verschiedenen Keratine gut auf das Ursprungsgewebe zurück-schließen lässt, kann es in der Tumor- und Gewebediagnostik zur Typisierung des vorliegenden Zelltyps und Identifikation des histologischen Ursprungs von Tumoren und ihren Metastasen herangezogen werden (Moll *et al.*, 1982; Lane und Alexander, 1990; Owens und Lane, 2003; Barak *et al.*, 2004). K8, K18 und K19 bzw. ihre Fragmente, die von Karzinomzellen ins Blut abgegeben werden, sind etablierte Marker von Tumoren epithelialen Ursprungs (Owens und Lane, 2003; Ku *et al.*, 2007); TPA (tissue polypeptide antigen) stammt von K8/K18/K19, TPS (tissue polypeptide specific antigen) von K18 und CYFRA 21-1 von K19. Ihr klinischer Nutzen liegt v.a. in der Kontrolle der Therapie, als Indikator eines Tumorrezidivs und für prognostische Informationen (Barak *et al.*, 2004). Allerdings ist die diagnostische Spezifität begrenzt, da die Serumkeratinspiegel auch bei nicht malignen Erkrankungen erhöht sein können, z.B. TPS und CYFRA 21-1 bei alkoholischer Lebererkrankung und TPS bei nicht alkoholischer Steatohepatitis (Ku *et al.*, 2007). Auch K18 und K19 kommen als serologische Marker der Apoptose epithelialer Leberzellen in Betracht, da sie selektive Caspase-Substrate darstellen. Neue serologische Tests können apoptotische K18- oder K19-Fragmente mittels spezifischer Antikörper erkennen (Ku *et al.*, 2007). Dadurch könnte es in Zukunft möglich sein, Progression und Schweregrad von Lebererkrankungen, z.B. bei chronischer HCV-Infektion, und das Ansprechen auf Therapie besser abzuschätzen. Auch Keratin-Autoantikörper kommen als potentielle serologische Marker in Frage, da sie beispielsweise oft bei autoimmuner Hepatitis oder hepatozellulärem Karzinom erhöht sind (Ku *et al.*, 2007).

1.4. Rolle von Keratinmutationen in der Pathogenese von Hauterkrankungen und Erkrankungen des Verdauungstrakts

1.4.1 Genetische Assoziation von Keratinmutationen und Hauterkrankungen

Die Bedeutung der Keratine für die Aufrechterhaltung der epithelialen Homöostase spiegelt sich in der Anzahl verschiedener oraler, ösophagealer, okulärer, Haar- und Hauterkrankungen (Tab. 1.4) wider, die das gewebsspezifische Expressionsmuster der Keratine reflektieren und mit Mutationen von mindestens 18 verschiedenen Keratinen assoziiert sind (Fuchs und Cleveland,

1998; Omary *et al.*, 2004). *Epidermolysis bullosa simplex* war die erste humane Erkrankung, deren Ursache auf eine Mutation der Keratingene zurückgeführt werden konnte (Vassar *et al.*, 1991; Coulombe *et al.*, 1991). Diese blasenbildende Hauterkrankung wird durch Mutationen von K5 oder K14 in der epidermalen Basalzellschicht verursacht. Keratinmutationen in den stärker differenzierten Suprabasalzellen lösen hingegen eine epidermolytische Hyperkeratose (K1/10-Mutation) oder *Ichthyosis bullosa* Siemens (K2e-Mutation) aus. Viele weitere humane Hauterkrankungen konnten seither auf Keratinmutationen zurückgeführt werden (Tab. 1.4). Sie sind durch Destabilisierung des epithelialen Zellverbands, Blasenbildung und Ablösung der betroffenen Hautschichten bereits unter leichter physikalischer Belastung gekennzeichnet (McLean und Lane, 1995; Fuchs und Cleveland, 1998; Irvine und McLean, 1999; Porter und Lane, 2003; Herrmann *et al.*, 2003; Omary *et al.*, 2004). Ähnliche blasenbildende Hauterkrankungen konnten bei Knockout-Mäusen und solchen mit mutierten Keratingenen im Tiermodell induziert werden (Magin, 1998; Porter und Lane, 2003; Magin *et al.*, 2004; Omary *et al.*, 2004).

Tabelle 1.4: Studien zur Assoziation von Keratinmutationen mit verschiedenen Erkrankungen der Haut, Schleimhäute und Hautanhangsgebilden

Keratin-Protein	Erkrankung	Klinische Symptome	Referenzen
K1, K10	Epidermolytische Hyperkeratose, BCIE	Hyperkeratose, gesteigerte Hautverletzlichkeit, Blasenbildung, Erythrodermie	Rothnagel <i>et al.</i> , 1992; Cheng <i>et al.</i> , 1992
K1, K9, K16	Palmoplantare Keratoderma	Verschiedene Formen von Hyperkeratose von Hand und Fuß	Reis <i>et al.</i> , 1994; Kimonis <i>et al.</i> , 1994
K2e	<i>Ichthyosis bullosa</i> (Siemens)	Blasenbildende Ichthyose, Erytheme	Kremer <i>et al.</i> , 1994; McLean <i>et al.</i> , 1994
K3, K12	Meesmann-Korneadystrophie	Feine, punktförmige Eintrübungen der Kornea	Irvine <i>et al.</i> , 1997; Nishida <i>et al.</i> , 1997
K4, K13	Oraler weißer Schwammnävus	Weißlich verdickte Mukosa in Mund (evtl. auch Nase, Rektum, Vagina)	Richard <i>et al.</i> , 1995; Rugg <i>et al.</i> , 1995
K5, K14	<i>Epidermolysis bullosa simplex</i>	Generalisierte oder loklisierte, flüssigkeitsgefüllte Hautblasen	Vassar <i>et al.</i> , 1991; Coulombe <i>et al.</i> , 1991
K6a, 16, K6b, 17	<i>Pachyonychia congenita Typ 1/2</i>	Schwere Nageldystrophie, andere Hautanhangsgebilde evtl. betroffen	McLean <i>et al.</i> , 1995
K17	<i>Steatocystoma multiplex</i>	Multiple zystische Tumore an Oberschenkel, Stamm, Armen, Genitale	Smith <i>et al.</i> , 1997
K6hf	<i>Pseudofollikulitis barbae</i>	Einwachsende Barthaare und Pustelbildung	Winter <i>et al.</i> , 2004
Hb1-Hb6, Ha1-Ha9	<i>Monilethrix</i>	Haarausfall, deformierter und fragiler Haarschaft	Winter <i>et al.</i> , 1997

BCIE, bullöse congenitale ichthyosiforme Erythrodermie. Modifiziert nach Porter und Lane, 2003

1.4.2 Vermutete genetische Assoziation von Keratinmutationen und Erkrankungen der Verdauungstraktorgane im Tiermodell

Die phänotypischen Ausprägungen bei *KRT8*- und *KRT18*-defizienten Mäusen (Tab 1.5) lenkten die Aufmerksamkeit auch auf Leber, Pankreas und Darm als potentielle Manifestationsorgane von keratinassoziierten Erkrankungen der einschichtigen inneren Epithelien (Baribault *et al.*, 1993, 1994; Ku *et al.*, 1995, 1996, 1998b, 2007; Toivola *et al.*, 1998, 2000a/b, 2001; Magin, 1998; Magin *et al.*, 1998, 2004; Zatloukal *et al.*, 2000, 2004; Omary *et al.*, 2002, 2004; Tao *et al.*, 2007). Hepatozyten sind einzigartig unter den einfachen, einschichtigen Epithelzellen, da sie ausschließlich K8/18-Heteropolymere als zytoplasmatische IF-Proteine ausbilden, während die übrigen Zellen ein komplexeres Keratinexpressionsmuster aufweisen (Tab. 1.3; Moll *et al.*, 1982; Omary *et al.*, 2002). Sie eignen sich daher hervorragend zum Studium der Funktion von Keratinen in einschichtigen Epithelien der inneren Organe, da keine funktionale Kompensation durch andere Keratine desselben Typs möglich ist, wie es z.B. beim knockout von *KRT8* durch K7 (Baribault *et al.*, 1993) und von *KRT18* durch K19 (Magin *et al.*, 1998) beschrieben wurde.

Tabelle 1.5: Tiermodelle mit keratinassoziiertem Phänotyp der Verdauungstraktorgane

Genotyp	Keratin-filamente	Phänotyp	Referenz
K8 -/- (C57B1/6)	fehlen	Embryoletal durch ausgeprägte Leberhämorrhagie	Baribault <i>et al.</i> , 1993
K8 -/- (FVB/N)	fehlen	Kolorektale Hyperplasie, Kolitis, milde Hepatitis, Leberzellfragilität ↑	Baribault <i>et al.</i> , 1994
hK8 G62C	normal	Leberhämorrhagie, Apoptose und Leberverletzlichkeit ↑	Ku und Omary, 2006
hK8 S73A	normal	Leberverletzlichkeit ↑	Ku und Omary, 2006
K8 -/- K19 -/-	fehlen	Embryoletal durch Plazentainsuffizienz	Tamai <i>et al.</i> , 2000
K18 -/-	fehlen	Milde Hepatitis, Mallory bodies, Leberzellfragilität ↑	Magin <i>et al.</i> , 1998
hK18 R89C	unterbrochen	Milde Hepatitis, Leberzellfragilität ↑, Apoptose ↑, Risiko für Leberfibrose ↑	Omary <i>et al.</i> , 2002, 2006; Ku <i>et al.</i> , 1995, 2007
hK18 S52A	normal	Anfälligkeit für Leberverletzung ↑	Ku <i>et al.</i> , 1998b; Omary <i>et al.</i> , 2006
hK18 S33A	normal	Blockade von 14-3-3-Protein, Akkumulation anormaler mitotischer Körperchen	Ku <i>et al.</i> , 2002; Omary <i>et al.</i> , 2006
K18 -/- K19 -/-	fehlen	Embryoletal durch trophoblastäre Zytolyse	Hesse <i>et al.</i> , 2000
hK14	unterbrochen	Ektope Expression in Hepatozyten: Keratinfilamentabbruch, Hepatitis, Gallensäuresekretion ↓	Albers <i>et al.</i> , 1995

hK, humanes Keratin. Modifiziert nach Omary *et al.*, 2002; Porter und Lane, 2003; Ku *et al.* 2007

In verschiedenen *KRT8/18*-defizienten oder -mutierten Mausmodellen tritt regelmäßig ein Leberzelldefekt auf (Tab. 1.5; Omary *et al.*, 2002), während andere K8/18-exprimierende epitheliale innere Organe wie Pankreas und Darm seltener betroffen sind. Das gab Anlass zur Suche phänotypisch ähnlicher Keratinopathien beim Menschen. *KRT8*-knockout-Mäuse entwickelten einen Phänotyp, der abhängig ist von dem genetischen Hintergrund der Mäuse. *KRT8*-Ablation im C57B1/6-Mausstamm wirkt durch massive Leberhämorrhagie embryonal (Baribault *et al.*, 1993), während *KRT8*-knockout-Mäuse des FVB/N-Stammes zu 55% mit normaler Lebenserwartung überlebten. Letztere zeigten jedoch Rektalprolaps, kolorektale Hyperplasie und Entzündung, milde Hepatitis, weibliche Infertilität (Baribault *et al.*, 1994; Toivola *et al.*, 2001) sowie erhöhte Anfälligkeit für toxisch- und mechanisch-induzierte Leberverletzung (Loranger *et al.*, 1997; Toivola *et al.*, 1998; Zatloukal *et al.*, 2000) und Apoptose (Caulin *et al.*, 2000, Gilbert *et al.*, 2001). Diese Differenz deutet auf die Existenz zusätzlicher, bisher unbekannter genmodulierender Faktoren hin, die den Phänotyp beeinflussen. Andererseits bildeten *KRT18*-null-Mäuse normale Formationen von Keratinfilamenten aus, was darauf schließen lässt, dass K18 funktionell durch andere Typ I-Keratine wie K19 und/oder K20 ersetzt werden kann. Diese Tiere blieben lebens- und fortpflanzungsfähig und zeigten nur milde Leberpathologie (Magin *et al.*, 1998). Allerdings wurde eine vermehrte Anfälligkeit für Leberverletzung und Apoptose (Magin *et al.*, 1998; Caulin *et al.*, 2000) im Vergleich zum *KRT18*-Wildtyp festgestellt. Darüber hinaus entwickelten sie mit zunehmendem Alter spontan Mallory bodies (Magin *et al.*, 1998). Für die Diskrepanz zwischen *KRT8*- und *KRT18*-null-Phänotypen wird die Hypothese vertreten, dass K8 durch das nahverwandte K7 substituiert wird, jedoch K7 in manchen Mausstämmen nicht frühzeitig genug exprimiert wird, um den *KRT8*-null-Phänotyp zu unterbinden (Owens und Lane, 2003). Der Doppel-knockout von *KRT18/19* (Hesse *et al.*, 2000) und von *KRT8/19* (Tamai *et al.*, 2000) wirkte sich durch Plazentainsuffizienz embryonal aus, was auf eine essentielle Funktion der Keratine für die Integrität embryonaler Epithelien hindeutet. Die moderate Überexpression von humanem Wildtyp-K8, -K18 oder -K19 in transgene Mäusen hatte keinen wahrnehmbaren pathologischen Phänotyp zur Konsequenz (Omary und Ku, 1997). Im Gegensatz dazu resultierte die ektopische Expression von hK14 in Maushepatozyten, die natürlicherweise nur K8/18 exprimieren, in Keratinfilamentabbrüchen, Hepatitis und verminderter Gallensäuresekretion nach Leberperfusion (Albers *et al.*, 1995). Eine in transgenen Mäusen generierte K18-Arginin90→Zystein-Mutation (K18 R90C) (Ku *et al.*, 1995) ist homolog zu einem hoch konservierten Argininrest in humanem K14 bzw. K10, der häufigsten und wichtigsten Mutationsstelle bei humanen Keratinopathien wie EBS (K14 R125C) oder epidermolytischer Hyperkeratose (K10) (Fuchs und Cleveland, 1998; Omary *et al.*, 2002; Porter und Lane, 2003). Circa 40% aller Patienten mit

epidermalen Keratinopathien haben diese Arginin→Zystein/Histidin-Mutation (Omary *et al.*, 2004). Die Überexpression der K18 R90C-Mutation in transgenen Mäusen führte zu K8/18-Filamentabbrüchen in Leber- und azinären Pankreaszellen, gesteigerter Hepatozytenfragilität, milder chronischer Hepatitis unter Zellbelastung sowie deutlich gesteigerter Anfälligkeit für mechanische und toxische Leberzellverletzung, Apoptose und Thioacetamid-induzierter Leberfibrose (Ku *et al.*, 1995, 1996, 2003b; 2007; Omary und Ku, 1997; Toivola *et al.*, 1998; Omary *et al.*, 2002). Ku und Omary (2006) untersuchten ferner die beim Menschen natürlich vorkommende und bei Lebererkrankung häufig identifizierte K8 G62C-Mutation im Tiermodell. Sie stellten fest, dass die Überexpression der K8 G62C-Mutation in transgenen Mäusen des FVB/N-Stamms Hepatotoxizität und Apoptose begünstigt. Diese Ergebnisse lieferten weitere Hinweise auf eine direkte Verbindung von Keratinmutationen und der Prädisposition zu Lebererkrankung beim Menschen auf molekularer Ebene (Abs. 1.4.4).

1.4.3 Vermutete genetische Assoziation von K8/18-Varianten und Erkrankungen von Leber, Pankreas und Darm beim Menschen

Erste Hinweise auf eine potentielle genetische Assoziation von *KRT8/18*-Mutationen und der Entwicklung von Lebererkrankung lieferten Studien von Ku *et al.*, in denen die Rolle heterozygoter *KRT8*- und *KRT18*-Varianten bei amerikanischen Patienten mit kryptogener Leberzirrhose (Ku *et al.*, 1997, 2001) und solchen mit weit fortgeschrittenen Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologie untersucht wurden (Ku *et al.*, 2003a, 2005). Mutationen von K8/18 wurden bei 58/467 (12,4%) der Patienten vs. 13/349 (3,7%) der Kontrollen identifiziert und assoziierten stark mit dem Endstadium der Lebererkrankung ($p < 0,0001$). Träger einer K8/18-Mutation hatten ein 3,8-fach erhöhtes Risiko (OR = 3,8; 95%-KI = 2,1-7,1) für Leberzirrhose (Ku *et al.*, 2005). Diese Assoziation wurde in Kohorten deutscher (Halangk *et al.*, 2004; Hesse *et al.*, 2004) und österreichischer (Schöniger-Hekele *et al.*, 2006) Patienten mit Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologie hingegen nicht bestätigt (Tab. 1.6). Ferner wurde ein Zusammenhang von *KRT8*-Mutationen mit chronischer Pankreatitis bei italienischen Patienten (Cavestro *et al.*, 2003) festgestellt, der aber nicht in einer großen europäisch-westasiatischen Kohorte (Treiber *et al.*, 2006) oder bei US-amerikanischen Patienten (Schneider *et al.*, 2006) beobachtet wurde. Owens *et al.* (2004) fanden Hinweise auf eine Assoziation von *KRT8*-Varianten mit entzündlichen Darmerkrankungen bei englischen Patienten, die jedoch weder bei deutschen (Büning *et al.*, 2004) noch US-amerikanischen (Tao *et al.*, 2007) Patienten bestätigt wurde. Tao *et al.* wiesen jedoch auf ein erhöhtes Risiko von schwerer, ausgedehnter *Colitis ulcerosa* bei Trägern von K8 G62C- und K8 R341H/C-Mutationen hin. In einer anderen Studie identifizierten Lee *et al.*

(2002) die K8 R341H-Mutation bei 3 von 13 (23%) Leberzirrhosepatienten mit C282Y-homozygoter Hämochromatose und bei weiteren 9 von 119 (7,6%) Hämochromatosepatienten vs. 0% in 116 Kontrollen ($p < 0,004$). Tabelle 1.6 gibt einen Überblick über die Studien, die eine potentielle genetische Assoziation von *KRT8/18*-Mutationen mit Erkrankungen des Verdauungstrakts untersucht haben.

Tabelle 1.6: Studien zur genetischen Assoziation von *KRT8/18*-Varianten und Erkrankungen von Leber, Pankreas und Darm

Analysierte Genregionen/ Varianten	Analyse- methode	Erkrankung	Mutationsträger / alle Personen (%)		p-Wert	Referenz	
			Patienten	Kontrollen			
Alle <i>KRT8/18</i> - Exone	DS	CED	9/97 (9,3%)	2/97 (2,1%)	0,04	Owens <i>et al.</i> , 2004	Europa
	DHPLC	Leber (□, ■, #, †, ◇, §, ¶, ‡, ?)	0/256 (0%)	0/100 (0%)	-	Hesse <i>et al.</i> , 2004	
K8 Y54H K8 G62C	MCA, FRET	CED	8/348 (2,3%)	9/560 (1,6%)	0,46	Büning <i>et al.</i> , 2004	
	RFLP	Pankreatitis	6/67 (8,9%)	0/100 (0%)	<0,003	Cavestro <i>et al.</i> , 2003	
	MCA, FRET	Pankreatitis, Pankreas-Ca	35/2436 (1,4%)	68/4580 (1,5%)	0,87	Treiber <i>et al.</i> , 2006	
	MCA, FRET	Leber (□, ■, †, #, †, ◇, §, ¶, ‡, ♪, †, €, £, \$, F)	29/1668 (1,7%)	13/679 (1,9%)	0,77	Halangk <i>et al.</i> , 2004	
K8 Y54H K8 G62C <i>KRT18</i> Exon 1	DS	Leber (‡, ■, †, F)	3/107 (2,8%)	1/45 (2,2%)	>0,8	Schöniger- Hekele <i>et al.</i> , 2006	
Alle <i>KRT8/18</i> - Exone	DHPLC, MDEG	Leber (□, ■, †, #, †, ◇, §, ‡, ♦, ♪, *, €, £, \$, F)	58/467 (12,4%)	13/349 (3,7%)	<0,0001	Ku <i>et al.</i> , 2001, 2003a, 2005	USA
K8 R341H	DS	Leber (♦)	9/119 (7,6%)	0/116 (0%)	<0,004	Lee <i>et al.</i> , 2002	
K8 G62C K8 I63V	DS	Pankreatitis	9/288 (3,1%)	4/271 (1,5%)	0,21	Schneider <i>et al.</i> , 2006	
K8 G62C K8 R341H/C	DHPLC, PS	CED	49/866 (5,7%)	21/343 (6,1%)	0,77	Tao <i>et al.</i> , 2007	

CED, Chronische entzündliche Darmerkrankung; DS, Direkte Sequenzierung; DHPLC, denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie; MCA, Melting curve analysis, Schmelzkurven-Analyse; FRET, Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer; RFLP, Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus; MDEG, Mutation detection enhancement gels; PS, Pyrosequenzierung; □ Hepatitis B-Virusinfektion; ■ Hepatitis C-Virusinfektion; # Primär biliäre Zirrhose; † Primär sklerosierende Cholangitis; ◇ Autoimmunhepatitis; § Akutes fulminantes Leberversagen; ¶ Nicht alkoholbedingte Steatohepatitis; ‡ Alkoholische Lebererkrankung; ‡ Kryptogene Lebererkrankung; * Neonatale Hepatitis; € Medikamentös induzierte Hepatitis; £ Primäres Leberzellkarzinom; \$ Metabolische/Genetische Ätiologie; ♪ Billiäre Atresie; † Budd Chiari's Syndrom; ♦ Hereditäre Hämochromatose (*HFE* C282Y); F Andere/Verschiedene Ätiologien; ? Unbekannte Ätiologie

1.4.4 Vermutete Pathomechanismen von Keratinmutationen in der Entwicklung von Hauterkrankungen und inneren Erkrankungen

Die Lokalisation der Mutation innerhalb des Keratinmoleküls hat eine relevante Bedeutung für die Schwere des Phänotyps epidermaler Erkrankungen. DNA-Sequenzvarianten innerhalb der hochkonservierten Helixbegrenzungsmotive am Anfang und Ende der Stammdomäne (Abb. 5.1) lösen prinzipiell einen schwereren Phänotyp mit hoher Penetranz aus als solche in den Enddomänen, da sie gravierendere Konsequenzen für Synthese und Organisation der Keratinfilamente haben (Fuchs und Cleveland, 1998; Irvine und McLean, 1999; Coulombe und Omary, 2002; Porter und Lane, 2003; Omary *et al.*, 2004). Porter und Lane (2003) demonstrierten die Genotyp-Phänotyp-Korrelation anhand der unterschiedlichen Formen der *Epidermolysis bullosa simplex*; Mutationen in den Helixbegrenzungsmotiven der Stammdomäne von *KRT5/14* waren mit der schweren Variante EBS Dowling-Meara assoziiert, während Sequenzvarianten in den übrigen Regionen eher die klinisch milderen Phänotypen EBS Köbner oder EBS Weber-Cockayne nach sich zogen. Im Gegensatz zu den Erkrankungen der Epidermis, die vornehmlich auf Mutationen in den beiden Helixbegrenzungsmotiven der α -Helix zurückgeführt werden (Porter und Lane, 2003), wurde bis *dato* in den einfachen Epithelien der inneren Organe keine K8/18-Mutation in diesen Mutationsschwerpunkten identifiziert (Abb. 5.1; Ku *et al.*, 1997, 2001, 2003a, 2005, 2007; Omary *et al.*, 2002, 2004). In Analogie zu den schweren Auswirkungen bei epidermalen Hauterkrankungen wird die Hypothese vertreten, dass entsprechende Mutationen in *KRT8* und *KRT18* embryonale Wirkung entfalten könnten (Coulombe und Omary, 2002; Porter und Lane, 2003), denn diese Keratine werden als erste in der Embryonalentwicklung exprimiert und sind für die Plazentafunktion essentiell (Baribault *et al.*, 1993; Hesse *et al.*, 2000). Beim Menschen sind bisher auch keine *KRT8/18*-Mutationen gefunden worden, die ein Fehlen oder Abbrüche der Keratinfilamente induzieren (Ku *et al.*, 2007). Anders als Keratinmutationen bei Hauterkrankungen (Tab. 1.4), beeinträchtigen die bis *dato* bekannten *KRT8/18*-Mutationen die Filamentbildung unter physiologischen Bedingungen nicht, sondern lediglich unter Stressbedingungen. *In vitro* führte die K8 Y54H-Mutation zu Filamentinstabilität unter Zellbelastung (Ku *et al.*, 2001). Die Substitutionen K8 G62C (Ku *et al.*, 2001; Owens *et al.*, 2004) und K8 R454C (Ku *et al.*, 2005) führen einen Zysteinrest ein und ermöglichen so die Ausbildung kovalenter Zystein-Zystein-Querverbindungen unter oxidativer Belastung *in vitro*. Dadurch kommt es zu reduzierter Keratinlöslichkeit, steifen Keratinpolymeren und Störung der Filamentreorganisation (Ku *et al.*, 2001, 2005). Zudem können die K8 G62C- und K8 G434S-Mutation benachbarte Bindungsstellen modifizieren und die Serin-Phosphorylierung von K8 einschränken (Ku *et al.*, 2005; Ku und Omary, 2006). In transgenen Mäusen führte die K8 G62C-Mutation zu

einer deutlich gesteigerten Anfälligkeit gegenüber Leberzellverletzung und richtet die normale K8-Phosphorylierung auf andere Nicht-Keratin-Substrate mit apoptoseinduzierender Wirkung aus (Ku und Omary, 2006). Auch die K18 Arginin90→Zystein-Mutation erhöht in transgenen Mäusen das Risiko FAS-induzierte Apoptose (Ku *et al.*, 2003b) und oxidativer Schädigung der Hepatozyten (Zhou *et al.*, 2005). Allerdings haben K18 R90C und K8 G62C deutlich unterschiedliche Effekte auf die Zellstabilität, obwohl beide Mutationen einen Zysteinrest einführen, der Filamentquervernetzungen und verminderte Keratinlöslichkeit bewirkt (Ku und Omary, 2006). Ferner wirken Keratin 8/18 durch Bindung an den TNF- α -, TRADD- und FAS-Rezeptor zellprotektiv (Owens und Lane, 2003) und *KRT8*- und *KRT18*-defiziente Zellen weisen erhöhte Anfälligkeit für TNF- α - und FAS-induzierte apoptotische Leberzellschädigung auf (Caulin *et al.*, 2000, Gilbert *et al.*, 2001). Es gibt Hinweise, dass Keratinmutationen auch das „targeting“ zellulärer Proteine und die Organellenfunktion stören, wie es in K8-defiziente Leberzellen für die Verteilung von Gallengangs-ATPase, FAS-Rezeptor und Desmoplakin gezeigt wurde (Ku *et al.*, 2007). Zudem veränderte die Expression von K18 R90C in Zellkultur die Verteilung von Golgi-Komplexen, peripheren Membranproteinen und zytosolischen Proteinen. Auch sind Mitochondrien in K8-defizienten Hepatozyten kleiner, zeigen gestörte zytoplasmatische Verteilung und veränderte mitochondriale Proteine (Ku *et al.*, 2007). Die Mechanismen, die zur Entwicklung der Lebererkrankung durch Keratinmutationen führen, sind wahrscheinlich komplex und schließen Genmodifikatoren, die Lokalisation der Mutation und den Effekt der Mutation auf Keratinregulation und Interaktion mit den Genmodifikatoren ein. Im Gegensatz zu epidermalen Keratinmutationen, die als direkte Krankheitsursache angesehen werden, gibt es Hinweise darauf, daß Mutationen der einschichtigen inneren Epithelien prädisponierende Risikofaktoren sind, die erst in Kombination mit zusätzlichen Umweltfaktoren und/oder genetischen Faktoren zur Krankheitsmanifestation führen (Coulombe und Omary, 2002; Omary *et al.*, 2002, 2004; Porter und Lane, 2003; Owens und Lane, 2003; Owens *et al.*, 2004; Ku *et al.*, 2005, 2007).

1.5 Methoden zur Detektion von DNA-Sequenzvarianten

Zahlreiche Methoden haben sich zur Detektion genetischer Alterationen etabliert (Cotton, 1997; Kristensen *et al.*, 2001). Dazu gehören physikalische Verfahren wie z.B. denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE), Einzelstrangkonnformationspolymorphismus (SSCP), Heteroduplexanalyse und chromatographische Verfahren (DHPLC). Diese Methoden basieren auf physikalischen Veränderungen im Vergleich zur Wildtyp-DNA, die durch den mutationsbedingten Basenaustausch entstehen und i. d. R. durch veränderte elektrophoretische Mobilität sichtbar werden. Ferner werden Spaltungsmethoden wie z.B. Ribonuklease, chemische und enzymatische Spaltung der Fehlpaarung angewendet. Hierbei entstehen durch Hybridisierung von Wildtyp-DNA und mutierter DNA, die sich in einem Basenpaar unterscheiden, Heteroduplexe mit komplementären Fehlpaarungen. An dieser Stelle werden die DNA-Stränge gespalten. Weitere Verfahren sind u.a. direkte Sequenzierung, DNA-Chips oder Schmelzkurvenanalyse mit Fluoreszenzresonanzenergietransfer. Die ideale Mutationsdetektionsmethode sollte einfach, mit hohem Durchsatz und ohne chemische oder radioaktive Reagenzien durchführbar sein, hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen und mit niedrigen Kosten verbunden sein (Cotton, 1997; Choy *et al.*, 1999). Keine derzeitige Methode erfüllt diese Kriterien. Die denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC) ermöglicht jedoch eine einfache, schnelle und zuverlässige DNA-Analyse und Detektion von DNA-Sequenzvarianten (O'Donovan *et al.*, 1998; Xiao und Oeffner, 2001). Sie ist eine relativ junge Methode, die Mitte der 1990er-Jahre erstmals zur Mutationsdetektion eingesetzt wurde (Oeffner und Underhill, 1995) und rasche Verbreitung bei der Suche und Analyse genetischer Varianten fand. Sie wurde bereits erfolgreich zur Mutationsdetektion bei unterschiedlichsten genetischen Erkrankungen eingesetzt, u.a. bei Brust- und Ovarialkrebs, Multipler Sklerose, Marfan-Syndrom und Schizophrenie (Wolford *et al.*, 2000; Xiao und Oeffner, 2001). Die DHPLC ist den klassischen Methoden SSCP, DGGE und direkte Sequenzierung bei der Detektion von SNPs überlegen in Bezug auf Sensitivität, Effizienz und Kosten (Choy *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 1999; Gross *et al.*, 1999; Xiao und Oeffner, 2001). Zwar kann die DHPLC keine großen Deletionen oder Duplikationen detektieren, ist aber eine sehr sensitive Methode zur Detektion von SNPs, kleinen Insertionen und Deletionen mit Detektionsraten von nahezu 100% (Donohoe, 2005; Xiao und Oeffner, 2001). Klassische Verfahren wie Einzelstrangkonnformationspolymorphismus (SSCP) und denaturierende Gradientengelelektrophorese weisen hingegen geringere Detektionsraten im Bereich von 70-85% auf (Donohoe,

2005). Allerdings kann weder mit SSCP, DGGE oder DHPLC die genaue Position der Sequenzvariation bestimmt werden. Dazu sind die direkte Sequenzierung oder Spaltungsmethoden notwendig, die die Lokalisierung und Charakterisierung einer Mutation ermöglichen (Cotton, 1997). Das Prinzip der Mutationsdetektion mittels DHPLC basiert auf der Beobachtung, dass die partielle Denaturierung eines DNA-Duplexes zu einer signifikanten Verminderung der Retention im Vergleich zu nicht denaturierter, doppelsträngiger DNA führt (Oefner and Underhill, 1995; Xiao und Oefner, 2001). Heterozygote Sequenzvarianten können so identifiziert werden, da die Hybridisierung zweier nicht identischer DNA-Stränge zur Bildung von Heteroduplexen führt (Abb. 3.2), die als zusätzlicher Peak im Chromatogramm erscheinen (Abb. 3.3 A, B). Single nucleotide polymorphisms, kurze Insertionen und Deletionen können innerhalb von 2-3 Minuten in Amplifikaten von bis zu 1,5 kb Größe ermittelt werden (Xiao und Oefner, 2001). Die Vorteile der DHPLC bestehen vor allem in der Automatisierung des Verfahrens, die ein DNA-Screening zahlreicher Proben in einem kurzen Zeitraum ohne weitere Vorbehandlung der PCR-Produkte erlaubt. Darüber hinaus ist die DHPLC durch konstant hohe Sensitivität und Spezifität von über 96% gekennzeichnet wie mehrere Studien im Vergleich mit alternativen Detektionsmethoden bestätigten (O'Donovan *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1999; Xiao und Oefner, 2001). Die Sensitivität der Methode ist jedoch stark von der gewählten Denaturierungstemperatur abhängig (Jones *et al.*, 1999; Ravnik-Glavac *et al.*, 2002). Manche Mutationen können z.B. über eine Temperaturspanne von bis zu 8°C erkannt werden (Jones *et al.*, 1999), andere sind nur bei einer spezifischen Temperatur (z.B. *BCRA-1/-2-Gen*) zu entdecken (Xiao und Oefner, 2001). Die optimale Analysetemperatur kann sowohl empirisch als auch durch Berechnung mit Hilfe spezieller Analysesoftware ermittelt werden (Rudolph *et al.*, 2002). Allerdings haben sich die softwareberechneten Temperaturen in manchen Fällen als ungenau erwiesen (Jones *et al.*, 1999; Ravnik-Glavac *et al.*, 2002).

1.6 Chronische Hepatitis C-Virusinfektion

1.6.1 Allgemein

Das Hepatitis C-Virus (HCV) ist ein umhülltes Einzelstrang-RNA-Virus der Familie der *flaviviridae* und wurde 1989 entdeckt (WHO, 2002). Weltweit sind über 170 Millionen Menschen mit dem Hepatitis C-Virus infiziert (Poynard *et al.*, 2003) mit stark schwankender Prävalenz zwischen 0,6% in Deutschland, 1,8% in den USA, 3,2% in China, etwa 5% in Zentralafrika und bis zu 22% in Ägypten (Shepard *et al.*, 2005). Weltweit werden mehr als 280.000 Todesfälle/Jahr durch Leberzirrhose und hepatozelluläres Karzinom – mit ansteigender Inzidenz – auf eine chronische HCV-Infektion zurückgeführt (WHO, 2002; Poynard *et al.*, 2003). Sie stellt die Hauptursache für eine Lebertransplantation in der westlichen Welt dar und ist die häufigste durch Blut übertragene chronische Infektion in den USA (Shepard *et al.*, 2005). Die HCV-Übertragung erfolgt hauptsächlich durch intravenösen Drogenabusus, Bluttransfusion oder medizinische Eingriffe (Poynard *et al.*, 2003; Shepard *et al.*, 2005). Insgesamt sind sechs HCV-Genotypen und verschiedene Subtypen mit unterschiedlicher geographischer Verbreitung bekannt. Weltweit sind Genotyp 1 bis 3 prävalent. Die Genotypen 1a und 1b dominieren mit 60% der globalen HCV-Infektionen und sind v.a. in Europa, Nordamerika und Japan prävalent. In Deutschland ist überwiegend Genotyp 1b verbreitet. Die Prävalenz bestimmter Genotypen wird auch vom Übertragungsweg der Infektion bestimmt (Berg *et al.*, 1997). Derzeit wird eine antivirale Kombinationstherapie aus pegyliertem Interferon und Ribavirin zur Behandlung empfohlen (Shepard *et al.*, 2005), auf die 42-88% der Patienten mit CHC (abhängig vom HCV-Genotyp) ansprechen (Poynard *et al.*, 2003; Shepard *et al.*, 2005). Trotz Therapie entwickeln jedoch etwa 25% der Patienten eine fortgeschrittene Leberfibrose innerhalb von 20 Jahren (Friedman, 2003). Außerdem ist die Behandlung oft mit schweren Nebenwirkungen verbunden. Bedingt durch die hohen Kosten ist sie zudem in vielen Teilen der Welt nicht verfügbar (WHO, 2002; Schuppan *et al.*, 2003). Ferner ist aufgrund der genetischen Variabilität des Virus bis heute keine Impfung gegen die Hepatitis C-Virusinfektion möglich, so dass der Infektionsprävention besondere Bedeutung zukommt (WHO, 2002; Poynard *et al.*, 2003; Shepard *et al.*, 2005).

1.6.2. Pathophysiologie

Charakteristisches Merkmal der CHC ist eine Erhöhung des Serum-ALT-Spiegels. Die Höhe des ALT-Wertes korreliert jedoch nicht immer mit dem histopathologischen Grading/Staging oder serologischen Status (Schulze-Krebs *et al.*, 2005). HCV infiziert Hepatozyten und stört den Lipidmetabolismus und die Signaltransmission (Schuppan *et al.*, 2003). Dadurch wird die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen und profibrogenen Mediatoren (v.a. TGF- β 1) angeregt, welche die Transformation von Lebersternzellen zu Myofibroblasten aktivieren. In der Folge kommt es zu vermehrter Kollagenbildung und -ablagerung (Marcellin *et al.*, 2002; Schuppan *et al.*, 2003; Abs. 1.8). Zusätzlich stimulieren HCV-Proteine direkt die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen durch Leberzellen und Kollagenbildung durch Sternzellen (Bataller und Brenner, 2005). Die Leberhistologie ermöglicht die genauesten Aussagen über den Status, die Progressionsgeschwindigkeit, Prognose und Ansprechen auf antivirale Therapie bei chronischer HCV-Infektion (Knodell *et al.*, 1981; Ludwig *et al.*, 1993; Ishak *et al.*, 1995; Poynard *et al.*, 1997).

1.6.3 Natürlicher Verlauf

Die akute HCV-Infektion geht bei 50-85% der Infizierten in eine chronische Virusinfektion über. Der Verlauf der chronischen Hepatitis C-Virusinfektion ist individuell sehr unterschiedlich. 10-20% der Patienten entwickeln eine Leberzirrhose und 1-5% ein hepatozelluläres Karzinom über einen Zeitraum von 20-30 Jahren (WHO, 2002; Friedman, 2003; Schuppan *et al.*, 2003; Shepard *et al.*, 2005). In 60-80% der Fälle verläuft die chronische Infektion klinisch inapparent (WHO, 2002). Follow-up-Studien über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 45 Jahren haben ferner ein moderates Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko der Lebererkrankungen festgestellt (Seeff *et al.*, 2000; Freeman *et al.*, 2001). Bei einigen chronisch infizierten Patienten variiert die Progression der Leberfibrose deutlich, sog. „rapid fibrosers“ *versus* „slow fibrosers“ (Bataller *et al.*, 2003), während andere Patienten keine oder nur milde Leberfibrose aufweisen (Poynard *et al.*, 1997; Seeff *et al.*, 2000; Freeman *et al.*, 2001). Es gibt Hinweise darauf, dass Unterschiede in Verlauf und Schweregrad der Erkrankung auf die Interaktion verschiedener genetischer Faktoren mit Umwelt- und Wirtsfaktoren zurückzuführen sind (Abs. 1.6.4).

1.6.4 Bedeutung von Umwelt- und Wirtsfaktoren und genetischen Varianten für den Krankheitsverlauf und die Therapie

Verschiedene Umwelt- und Wirtsfaktoren, die sich negativ auf den Krankheitsverlauf auswirken, sind identifiziert worden; dazu gehören männliches Geschlecht, höheres Alter bei Infektion, erhöhter Alkoholkonsum ≥ 50 g/d, CD4-Zellzahl < 200 /ml, Infektionsdauer, Fibroestadium, zusätzliche HBV-/HIV-Infektion, erhöhter ALT-Level, Adipositas, Diabetes, u. a. (Poynard *et al.*, 1997, 2003; Freeman *et al.*, 2001; Marcellin *et al.*, 2002; Bataller *et al.*, 2003). Darüber hinaus wird vermutet, dass sich Genvarianten von immunoregulatorischen Proteinen, Zytokinen und fibrogenen Faktoren zusammen mit Umweltfaktoren modifizierend auf die Krankheitsprogression auswirken und für das breite Spektrum der Krankheitsverläufe verantwortlich sein können (Powell *et al.*, 2000; Schuppan *et al.*, 2003; Bataller *et al.*, 2003; Bataller und Brenner, 2005). Genvarianten von immunoregulatorischen Zytokinen wie IL-10 (Yee *et al.*, 2001) und IL12B (Müller *et al.*, 2004) oder Rezeptoren wie TLR7 (Schott *et al.*, 2008) und CTLA4 (Yee *et al.*, 2003) sowie MxA, ein Interferon-induziertes Protein (Hijikata *et al.*, 2000), können das Ansprechen auf antivirale Therapie beeinflussen. Auch Haptoglobin-Polymorphismen haben eventuell Einfluß auf den Krankheitsverlauf (Louagie *et al.*, 1996). Genvarianten von Mannose-bindendem Lectin (Sasaki *et al.*, 2000) und verschiedener HLA II-Allele (Aikawa *et al.*, 1996; Kuzushita *et al.*, 1998), die in der Immunabwehr involviert sind, können ebenso die Zirrhoseentwicklung beeinflussen. Auch Varianten des Angiotensinogen- (Powell *et al.*, 2000) und TGF β 1-Gens (Wang *et al.*, 2005) haben signifikanten Einfluß auf die Fibroprogression bei CHC-Patienten. Hillebrandt *et al.* (2005) zeigten, daß Polymorphismen des Komplementfaktor C5-Gens mit fortgeschrittener Leberfibrose assoziieren. Ferner führten Polymorphismen des monozytären chemotaktischen Proteins MCP-1 (Mühlbauer *et al.*, 2003) und der mikrosomalen Epoxidhydrolase (Sonzogni *et al.*, 2002), die am Abbau reaktiver Zwischenprodukte beteiligt ist, zu einer schwereren HCV-assoziierten Lebererkrankung. Studien, die den Einfluß von HFE C282Y-Varianten des Hämochromatose-Gens auf den Verlauf der CHC untersuchten, lieferten widersprüchliche Ergebnisse (Bataller *et al.*, 2003). Es wird vermutet, daß der HCV-Genotyp den Verlauf der Erkrankung und das Ansprechen auf antivirale Therapie beeinflusst, allerdings sind die Ergebnisse hierzu ebenfalls nicht einheitlich (Berg *et al.*, 1997; Poynard *et al.*, 1997, 2003; Marcellin *et al.*, 2002). Darüber hinaus weisen Studien von Ku *et al.* (2001; 2003a; 2005; 2007) darauf hin, dass Varianten der Keratin 8/18-Gene den Schweregrad chronischer Lebererkrankungen entscheidend beeinflussen. Die Identifikation genetischer Einflussfaktoren könnte durch bessere prognostische Einteilung und gezieltere Behandlung der Patienten zur Optimierung der Therapiestrategie beitragen.

1.7 Hereditäre Hämochromatose

1.7.1 Allgemein

Die hereditäre Hämochromatose (HHC) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Störung des Eisenmetabolismus. Die erhöhte intestinale Eisenabsorption und fortschreitende parenchymatöse Eisenablagerung in Herz, Leber und anderen endokrinen Organen sowie in Haut und Gelenken kann zu Funktionsstörungen bis zur Organinsuffizienz führen (Bacon, 2001; Pietrangelo, 2004; Ramm und Ruddell, 2005; Beutler, 2006). Mutationen verschiedener Gene, die in den Eisenmetabolismus involviert sind, können das Krankheitsbild der hereditären Hämochromatose auslösen und sind für große Variationen des Phänotyps verantwortlich (Pietrangelo, 2004; Lee *et al.*, 2002). In der OMIM-Datenbank (OMIM Nr. 235200) werden vier Typen der HHC auf Grundlage des assoziierten Gendefekts und Manifestationsalters unterschieden: HHC Typ 1, 3 und 4 (adulte Form) und HHC Typ 2A/B (juvenile Form). 1996 wurde das Hämochromatose-Gen (*HFE*) auf Chromosom 6 lokalisiert. Es löst die häufigste Form der HHC (Typ 1, klassische HHC) aus. Die homozygote *HFE*-845G→A-Mutation (Zystein282→Tyrosin) kommt am häufigsten vor und ist wahrscheinlich nordeuropäischen Ursprungs. Sie ist bei 80-100% der HHC-Patienten nordeuropäischer Herkunft (Beutler *et al.*, 2002) und 64-100% der Patienten mit HHC Typ 1 weltweit vorhanden (Bacon, 2001). Die Mutationsfrequenz wird mit circa 1:200 bei nordeuropäischen Kaukasiern angegeben (Ajioka und Kushner, 2002; Beutler, 2003). Seltener ist die homozygote *HFE*-Histidin63→Aspartat- oder *HFE*-Serin65→Zystein-Mutation (Bacon, 2001; Pietrangelo, 2004). Mutationen des *HFE*-Proteins können zu einer unkontrolliert gesteigerten intestinalen Eisenabsorption und Eisenausschüttung aus Makrophagen und Darmzellen führen (Bacon, 2001; Pietrangelo, 2004; Abs. 1.7.2). Ziel der Therapie ist die Reduktion des Körpereisengehalts durch regelmäßige Phlebotomie („Aderlaß“) zur Normalisierung der Plasma- und Gewebeeisenkonzentration (Pietrangelo, 2004).

1.7.2 Natürlicher Verlauf und Pathophysiologie

Der Verlauf der klassischen HHC ist sehr variable und unterliegt zahlreichen Einflußfaktoren (Abs. 1.7.3). Kennzeichnend sind eine langsam zunehmende Eisenbeladung und spät auftretende Eisenablagerung im Gewebe. Eine Erhöhung der Serumtransferrinsättigung $\geq 45\%$ zeigt einen Überschuss von Plasmaeisen an und ist der früheste Indikator einer HHC. Zusätzlich erhöhtes Serumferritin (>300 ng/ml) weist auf einen Eisenüberschuss im Gewebe hin (Bacon, 2001). Das *HFE*-Gen kodiert für ein MHC-Klasse-1-ähnliches Molekül. Das *HFE*-Genprodukt wird in den

Kryptenzellen des Duodenums synthetisiert und moduliert den Eisenstoffwechsel in Verbindung mit dem Transferrinrezeptor 1 (TfR-1) und Heparin. Die C282Y-Mutation stört eine Disulfidverbindung des *HFE*-Proteins, die notwendig ist für die Präsentation an der Zelloberfläche und Interaktion mit TfR-1. In der Folge kommt es zu einem unkontrollierten Eisentransfer vom Darmlumen ins Blutssystem ohne Zwischenspeicherung in Form von Ferritin in den Enterozyten (Pietrangelo, 2004). Ferner gibt es Hinweise, dass Heparin als „Eisen-regulierendes Hormon“ und sein Rezeptor Ferroportin eine wichtige Rolle in der Pathogenese der HHC spielt (Pietrangelo, 2004; Beutler, 2006). Beutler *et al.* (2002) fanden in einer umfangreichen Studie erhöhte Serumtransferrin- und Serumferritinwerte bei 75% bzw. 76% der männlichen und 40% bzw. 54% der weiblichen C282Y-homozygoten amerikanischen Genträgern. Allerdings ist die Erkrankung durch inkomplette Penetranz charakterisiert, denn nur wenige C282Y-homozygote Genträger entwickeln den voll ausgeprägten klinischen Phänotyp mit den klassischen Zeichen von Diabetes, Bronzepigmentation der Haut und Leberzirrhose (Ajioka und Kushner, 2002, 2003; Beutler, 2006). Auch die homozygote *HFE*-Histidin63→Aspartat- oder *HFE*-Serin65→Zystein-Mutation werden nur selten klinisch manifest (Bacon, 2001). Nur etwa 1-2% der compound-heterozygoten Träger eine C282Y- und H63D-Variante entwickeln klinische Zeichen einer HHC (Pietrangelo, 2004). Das Ausmaß der Penetranz ist umstritten und verschiedene Studien berichteten von weniger als 1% bis zu 95% (Ajioka und Kushner, 2003; Beutler, 2003). Wenn jedoch Leberfibrose bzw. -zirrhose als einziges Kriterium für HHC-assoziierte Morbidität zugrunde gelegt wird, so variiert die klinische Penetranz zwischen 4% (Phatak *et al.*, 1998) und 25% (Olynyk *et al.*, 1999) bei C282Y-homozygoten Genträgern (Ajioka und Kushner, 2002). Eine Manifestation der klassischen HHC zeigt sich überwiegend im mittleren Erwachsenenalter mit unspezifischen Symptomen. Die Lebererkrankung dominiert oft den klinischen Befund und kann von gering erhöhten Aminotransferasespiegeln bis hin zu Leberzirrhose und Leberzellkarzinom variieren. Auch endokrine Störungen, kardialen Beschwerden und Gelenkerkrankungen treten auf. Die Hämatopoese ist in der Regel nicht gestört. Prinzipiell wird derzeit angenommen, dass die *HFE*-Mutation häufig vorkommt, die klinische Manifestation der HHC jedoch selten ist (Beutler, 2003). Ungeklärt ist jedoch die Frage, weshalb wenige C282Y-homozygote Menschen eine schwere Eisenspeicherkrankheit entwickeln, während die Mehrheit mit diesem Genotyp beschwerdefrei bleibt. Verschiedene Faktoren, die in den Eisenmetabolismus involviert sind, kommen dafür in Betracht (Abs. 1.7.3).

1.7.3 Bedeutung von genetischen, Umwelt- und Wirtsfaktoren für den Krankheitsverlauf .

Die phänotypische Ausprägung der HHC variiert stark. Zahlreiche modifizierende Effekte durch verschiedene Gene, Träger- und Umweltfaktoren werden dafür verantwortlich gemacht (Beutler, 2003; Pietrangelo, 2004). Es gibt Anzeichen dafür, dass erhöhter Alkoholkonsum als wichtiger, aber nicht alleiniger Risikofaktor einer manifesten HHC in Frage kommt (Beutler, 2003). Ebenso wird vermutet, dass eine HCV-Infektion eine klinische HHC auslösen kann (Diwakaran *et al.*, 2002). Darüber hinaus spielen Wirtsfaktoren wie Geschlecht, Alter und Adipositas (Poynard *et al.*, 2003; Bataller und Brenner, 2005) eine Rolle. Es existieren mehrere Studien, die das männliche Geschlecht als Risikofaktor für die Ausbildung einer HHC bei C282Y-Genträgern dokumentieren (Asberg *et al.*, 2001; Beutler *et al.*, 2002; Ajioka und Kushner, 2002; Adams *et al.*, 2005). Beutler *et al.* (2003) zogen auch den Einfluss von Retrotransposons auf die Expression nahe gelegener Gene als epigenetischen Mechanismus in Betracht, der möglicherweise Einfluß auf Gene des Eisenstoffwechsels ausüben könnte. Diese Gene stellen in erster Linie genetische Modifikatoren des Verlaufs und Schweregrads der Erkrankung dar (Beutler, 2003, 2006; Poynard *et al.*, 2003; Bataller und Brenner, 2005). Beim Menschen assoziieren Genmutationen von Transferrin (Beutler *et al.*, 2000), Transferrinrezeptor 2 (Camaschella *et al.*, 2000), Ferroportin (Montosi *et al.*, 2001), Ceruloplasmin (Morita *et al.*, 1995) und Hepcidin (Roetto *et al.*, 2003) mit erhöhter Eisenspeicherung. Ferner wurde bei β 2-Mikroglobulin-defizienten Mäusen eine exzessive Eisenablagerung nachgewiesen (Rothenberg und Voland, 1996). Auch ein Haptoglobin-Polymorphismus assoziiert mit erhöhtem Serumferritin, aber nicht mit dem Schweregrad der Leberfibrose bei C282Y-homozygoten Trägern (Van Vlierberghe *et al.*, 2001). Lee *et al.* (2002) analysierten ein breites Spektrum von Kandidatengenien bei *HFE* C282Y-homozygoten Patienten, darunter Keratin 8/18. Die K8 R341H-Mutation wurde bei 3/13 (23%) C282Y-homozygoten Patienten mit Leberzirrhose entdeckt und trat bei insgesamt 9/119 (7,6%) Patienten vs. 0/116 gesunden Kontrollpatienten auf (Lee *et al.*, 2002). Keratinmutation kämen angesichts der Bedeutung von Eisenbelastung bei oxidativer Zellschädigung (Ramm und Ruddell, 2005) und der erhöhten Anfälligkeit von *KRT18*-defizienten Mäusen gegenüber oxidativer Zellschädigung (Zhou *et al.*, 2005) als modifizierende Faktoren der HHC in Betracht und könnten ihre Träger zu einem aggressiven Verlaufstyp der Lebererkrankung prädisponieren.

1.8 Pathophysiologie der Leberfibrose

Die Leberfibrose resultiert aus der Wundheilungsreaktion bei chronischen Leberschädigungen (z.B. durch Toxine, Viren, Cholestase, Hypoxie). Sie ist durch eine übermäßige Ablagerung und Umstrukturierung der extrazellulären Matrix, „downregulation“ fibrolytischer Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und Hochregulation der Gewebeinhibitoren der MMPs (TIMPs) gekennzeichnet (Schuppan *et al.*, 2003; Bataller und Brenner, 2005). Kollagene, MMPs und TIMPs werden hauptsächlich von myofibroblastischen Zellen, die von aktivierten Lebersternzellen, portalen oder perivaskulären Fibroblasten abstammen, produziert. Die Transformation der Zellen wird durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β 1, TNF- α , PDGF, IFN- γ , IL-6, Angiotensin II) und reaktive Sauerstoffradikale aus Hepatozyten, T-Zellen, Gallengangsepithelzellen, Kupffer-Zellen, u. a. mononukleären Zellen stimuliert (Friedman, 2000; Schuppan *et al.*, 2003; Bataller und Brenner, 2005; Schulze-Krebs *et al.*, 2005). Insgesamt beruht die Fibrogenese auf komplexen, sich verstärkenden Wechselwirkungen zwischen fibrogenen und inflammatorischen Zellen (Bataller und Brenner, 2005). Der Prozess der Leberfibrosierung ist reversibel, während das Spätstadium der Leberzirrhose als irreversibel gilt (Friedman, 2000; Arthur, 2000). Der stärkste profibrogene Wachstumsfaktor ist TGF- β 1. Er bewirkt eine vermehrte Produktion und Ablagerung von Matrixmolekülen und „downregulation“ von MMPs (Schuppan *et al.*, 2003; Bataller und Brenner, 2005). Die Hauptmatrixmoleküle sind fibrillenbildende Kollagene Typ I und III und das membranbildende Kollagen Typ IV, die bei Leberzirrhose bis zu 10-fach erhöht sein können (Schuppan *et al.*, 2003). MMPs sind essentiell für die Degradation der extrazellulären Matrix und fähig, alle strukturellen Matrixproteine abzubauen (Sternlicht und Werb, 2001). MMP-2 degradiert primär Basalmembran-Kollagen (Typ IV) und denaturierte Kollagene, während MMP-1, -8 und -13 für den Abbau von fibrillären Kollagenen Typ I und III verantwortlich sind (Sternlicht und Werb, 2001; Schuppan *et al.*, 2003; Bataller und Brenner, 2005). Die MMP-Aktivität wird von den vier bekannten TIMPs gehemmt (Arthur, 2000), von denen der universelle MMP-Inhibitor TIMP-1 am wichtigsten ist (Friedman, 2000).

Verschiedene Serummarker sind mit der Progression der Leberfibrose assoziiert, u.a. PDGF, SMA, TGF- β und TNF- α , die mit der Aktivierung, Proliferation und Transformation von Lebersternzellen in den myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp assoziiert sind; α -Hydroxyprolin und Kollagen α 1, das eine vermehrte Produktion von Kollagenen anzeigt; MMP-1, -2, -8, -9, -13 und TIMP-1 und -2, die im Umsatz der extrazellulären Matrix involviert sind (Arthur, 2000; Friedman, 2000; Marcellin *et al.*, 2002; Bataller und Brenner, 2005).

2. Zielsetzung der Doktorarbeit

Keratin 8 und 18 schützen die Leber vor mechanischen und nicht mechanischen Formen von Belastung. Es gibt Hinweise darauf, daß Keratin 8/18-Mutationen den Schweregrad und Verlauf chronischer Lebererkrankungen beeinflussen können. Allerdings weisen frühere genetische Assoziationsstudien deutliche Unterschiede u. a. in Umfang und ethnischer Zusammensetzung der Kohorten, Spektrum der untersuchten Lebererkrankungen, Schweregrad der Leberhistologie, angewandter Methodik zur Mutationsdetektion und Umfang der analysierten Gensequenzen auf. Die Ergebnisse dieser Studien sind widersprüchlich und lassen die Bedeutung von Keratin 8/18-Mutationen für die Pathogenese chronischer Lebererkrankungen weiterhin im Unklaren. Ziel dieser Doktorarbeit ist es, die Bedeutung von Keratin 8/18-Mutationen für den Verlauf und Schweregrad der Lebererkrankung bei zwei spezifischen Krankheitsentitäten in einer deutschen und einer österreichischen Population zu klären. Darüber hinaus wurde eine Optimierung der DHPLC-Analysemethodik vorgenommen und anhand einer unabhängigen deutschen Kohorte überprüft, in der zuvor keine aminosäuresubstituierenden Mutationen durch DHPLC-Analyse detektiert worden waren.

Im Einzelnen sollten folgende Ziele angegangen werden:

1. Optimierung der DHPLC-Analyse von *KRT8/18*
2. Überprüfung und Validierung der optimierten DHPLC-Analyse durch Re-Analyse einer unabhängigen Kohorte deutscher Patienten mit chronischen Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologie von Hesse *et al.*, 2004
3. Untersuchung der Häufigkeit und Verteilung von Keratin 8/18-Mutationen bei 329 deutschen Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion und der potentiellen Assoziation mit dem Schweregrad und Verlauf der Leberfibrose
4. Untersuchung der Häufigkeit und Verteilung von Keratin 8/18-Mutationen bei 162 österreichischen Patienten mit C282Y-homozygoter Hämochromatose und der potentiellen Assoziation mit der Präsenz von Leberzirrhose

3. Patienten, Material und Methode

3.1 DNA von Mensch und Maus

3.1.1 DNA zur Optimierung und Validierung der DHPLC-Analysebedingungen

3.1.1.1 DNA amerikanischer Patienten mit chronischer Lebererkrankung

Als Kontrollen zur Überprüfung und Optimierung der DHPLC-Analysebedingungen dienten u.a. bereits charakterisierte *KRT8*- und *KRT18*-Varianten aus einer Kohorte amerikanischer Patienten mit chronischen Lebererkrankungen unterschiedlicher Genese (Ku *et al.*, 2003a, 2005). Die genomische DNA der Patienten wurde aus Leberexplantaten isoliert, die an der Lebertransplantationseinheit der Stanford University, der University of California/San Francisco und dem California Pacific Medical Center (CA, USA) entnommen wurden. Die DNA wurde von Ku *et al.* mittels DHPLC und „mutation detection enhancement gels“ analysiert und K8/18-Varianten durch Vorwärts- und Rückwärts-Sequenzierung charakterisiert (Ku *et al.*, 2003a, 2005). Zusätzlich wurde eine neue, heterozygote *KRT18* 1057C→G-Variante (K18 Arginin353→Glyzin) verwendet, die von einem unabhängigen *HFE* H63D-homozygoten Patienten stammte. Sie ist in einer hoch konservierten Sequenz von *KRT18* Exon 6 lokalisiert und bewirkt einen Aminosäureaustausch in der Subdomäne IIB der α -helikalen Stammdomäne. Insgesamt wurden neun bekannte K8-Mutationen und vier bekannte K18-Mutationen (Abb. 3.1) aus der Kohorte von Ku *et al.* (2005) verwendet, die bei Patienten mit chronischer Lebererkrankung natürlicherweise vorkommen. Sie schließen die am häufigsten bei chronischer Lebererkrankung vorkommenden Mutationen ein und repräsentieren die jeweils fünf wichtigsten *KRT8/18*-Exone, die als Mutationsschwerpunkte bei humanen Erkrankungen bisher beschrieben worden sind.

3.1.1.2 DNA transgener Mäuse

Die DNA-Kontrollen wurden durch drei humane *KRT18*-Varianten ergänzt, die in Mäusen des FVB/N-Stamms generiert worden waren, welche die korrespondierenden humanen Transgene exprimieren (Ku *et al.*, 1995, 1998a/b, 2002). *KRT18* 100A>G;101G>C (Serin34→Alanin), *KRT18* 157A>G;158G>C (Serin53→Alanin) und *KRT18* 268C>T (Arginin90→Zystein) wurden zur Analyse von *KRT18* Exon 1 verwendet (Abb. 3.1), da hierfür keine natürlichen humanen Kontrollvarianten verfügbar waren. Die Serinreste stellen konservierte Phosphorylierungsstellen dar, während die K18 R90C-Mutation mit einem wichtigen Mutationsschwerpunkt bei humanen Genodermatosen korrespondiert (Abs. 1.4.2).

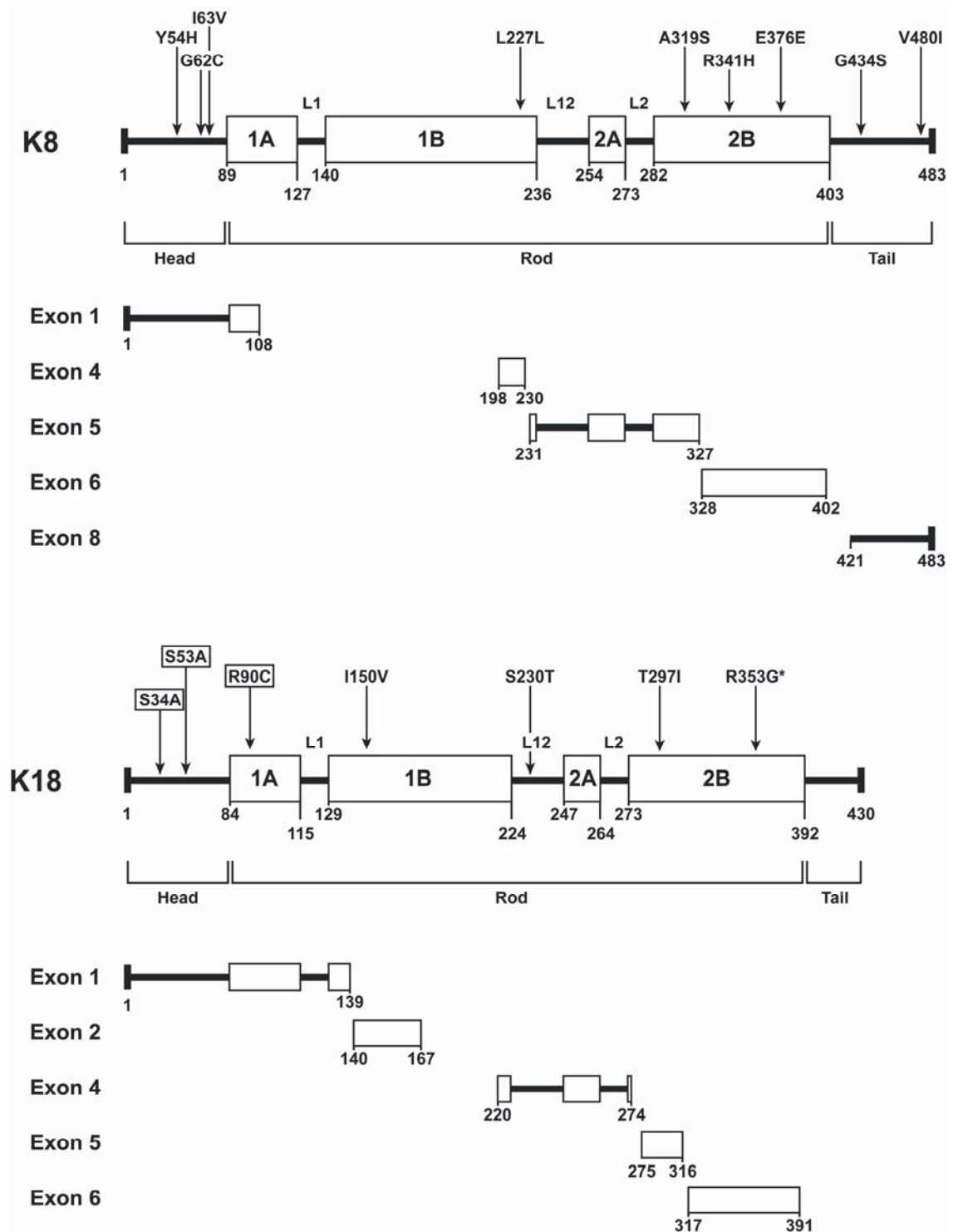


Abb. 3.1: Darstellung der K8/18-Domänen und Verteilung der bekannten K8/18-Varianten innerhalb der Exone, die für die Optimierung der DHPLC-Analyse ausgewählt wurden. Die Stammdomäne ist in 4 Unterdomänen (1A, 1B, 2A, 2B) unterteilt, die durch kurze nicht helikale Linker-Sequenzen (L1, L1-2, L2) verbunden sind. Die Anzahl der kodierten Aminosäuren pro Exon sind angegeben. Die Positionierung der K8/18-Varianten erfolgte nach der Sequenz NM 002273.2 bzw. NM 000224.2 beginnend mit +1 als A des ATG-Startkodons. Die eingerahmten Keratinvarianten (K18 S34A, S53A und R90C) stammten von transgenen Mäusen, die die korrespondierenden humanen K18-Varianten exprimieren (Ku *et al.*, 1995, 1998a/b, 2002). *Neue K18-Variante eines *HFE*-H63D-homozygoten Patienten. Die genomische DNA wurde freundlicherweise von Frau Dr. Ku (Stanford University, CA, USA) zur Verfügung gestellt.

3.1.1.3 DNA deutscher Patienten mit chronischer Lebererkrankung (Hesse *et al.*, 2004)

Die Validierung der DHPLC-Analyse unter optimierten Bedingungen erfolgte anhand einer Kohorte deutscher Patienten mit Lebererkrankungen unterschiedlicher Genese von Hesse *et al.* (2004), in der zuvor keine aminosäuresubstituierenden K8/18-Varianten unter Verwendung eines identischen WAVE DNA Fragment Analysis Systems (Transgenomic, USA) gefunden worden war. Genomische DNA von 151 der 256 Patienten umfassenden Kohorte wurde von Prof. Dr. Thomas Magin der Universität Bonn freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Patientenproben wurden anonymisiert und nummeriert übergeben. Detaillierte klinische Informationen und Ergebnisse der Leberhistologie der einzelnen Patienten lagen nicht vor. Die genomische DNA wurde aus Leukozyten des peripheren Blutes und Leberbiopsien unter Anwendung von Standardmethoden (Hesse *et al.*, 2004) gewonnen. Das Spektrum der chronischen Lebererkrankungen umfasste Infektionen mit Hepatitis B- und Hepatitis C-Virus, nichtalkoholische Steatohepatitis, primär biliäre Leberzirrhose, primär sklerosierende Cholangitis, Autoimmunhepatitis, fulminantes Leberversagen und kryptogene Leberzirrhose (Hesse *et al.*, 2004).

3.1.2 Analyse von *KRT8/18*-Mutationen in einer deutschen Population

3.1.2.1 DNA deutscher Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion

Zur Untersuchung der Verteilung und Häufigkeit von K8/18-Mutationen und der potentiellen Assoziation mit dem Schweregrad der Lebererkrankung bei deutschen Patienten mit chronischer HCV-Infektion wurden alle Exone von *KRT8/18* (OMIM Nr. 148060 bzw. 148070) einschließlich angrenzender nicht kodierender Regionen analysiert. Die Kohorte umfasste n = 336 deutsche Patienten mit CHC, bei denen in den Jahren 2001 bis 2004 an der Universität Erlangen-Nürnberg eine Leberbiopsie durchgeführt worden war. Insgesamt wurden n = 329 Patienten ausgewertet, da n = 7 Patienten aufgrund unzureichender PCR-Amplifikation der DNA ausgeschlossen wurden. Die Blutproben bzw. isolierte genomische DNA und umfassende klinische Daten der Patienten wurden anonymisiert von PD Dr. Felix Stickel und Prof. Dr. Detlef Schuppan freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die meisten Patienten waren Teil einer früheren genetischen Assoziationsstudie, welche die Auswirkungen von Enzym polymorphismen auf die Lebererkrankung untersuchte (Stickel *et al.*, 2005). Die Diagnose der Hepatitis C-Virusinfektion wurde durch positiven HCV-RNA-Befund (Cobas Amplicor; Roche, Basel, Schweiz) festgestellt. Der HCV-Genotyp wurde unter Verwendung des Inno-LipQA HCV II Tests (Innogenetics, Gent, Belgien) bestimmt. Die Dauer der HCV-Infektion wurde nach dem Eintritt eines qualifizierenden Ereignisses (z.B. Bluttransfusion, intravenöser Drogenabusus, medizinischer Eingriff) bzw. nach dem Auftreten der ersten klinischen Anzeichen einer Hepatitis abgeschätzt und war bei 300/329

(91%) Patienten dokumentiert. Als Grenzwerte für signifikant erhöhten Alkoholkonsum wurden mehr als 20 g Alkohol/Tag (>140 g/Woche) für Frauen und mehr als 60 g/Tag (>420 g/Woche) für Männer gemäß den WHO-Richtlinien gewählt. Weitere Ursachen chronischer Lebererkrankungen wie beispielsweise chronische HBV-Infektion, hereditäre Hämochromatose, autoimmune Lebererkrankung und chronische cholestatische Lebererkrankungen wurden im Rahmen der klinischen Diagnostik ausgeschlossen. Die Proben der Patienten-DNA wurden anonymisiert übergeben, der Reihenfolge nach durchnummeriert und die klinischen Daten der Patienten bis zum Abschluss der genetischen Analyse unter Verschluss gehalten.

3.1.2.2 Histologisches Grading und Staging

Die Lebergewebsproben wurden in 4 µm dicke Scheiben geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin-, Masson-Trichrom- und Perls Preussischblau-Färbung präpariert. Die Histologie wurde von zwei Pathologen des pathologischen Instituts der Universität Erlangen-Nürnberg (Prof. Dr. Hartmann) und der Universität Wien, Österreich (Prof. Dr. Wrba) unabhängig voneinander begutachtet. Beide Pathologen hatten keine Kenntnis der klinischen Patientendaten außer der Krankheit „Chronische Hepatitis C-Virusinfektion“. Die Klassifikation des Entzündungsaktivität (Grading) und des Stadiums der Leberfibrose (Staging) erfolgte nach der Nomenklatur von Ludwig (1993), die weitgehend mit dem Metavir Scoring System (Poynard *et al.*, 1997) korrespondiert. Die Entzündungsaktivität wurde auf einer Skala von 0 bis 4, das Stadium der Leberfibrose auf einer Skala von 1 bis 4 bewertet (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Histologische Klassifikation von Entzündungsaktivität und Fibrorestadium

Entzündungsaktivität (Grading)			Leberfibrose (Staging)	
Grad	Portal	Lobulär	Stadium	Leberfibrose
0	Keine oder minimal	Keine		
1	Portale Entzündung (chron. persistierend)	Entzündung, aber keine Nekrose	1	Keine oder begrenzt auf vergrößerten Portaltrakt
2	Milde begrenzte Plattennekrose	Fokale Nekrose oder azidophile Körperchen	2	Periportale Fibrose oder interportale Septen, aber intakte Architektur
3	Moderate begrenzte Plattennekrose	Schwere fokale Zellschäden	3	Septale Fibrose mit gestörter Architektur
4	Schwere begrenzte Plattennekrose	Schäden mit Brückennekrose	4	Leberzirrhose

Modifiziert nach Ludwig, 1993

3.1.3 Analyse von *KRT8/18*-Mutationen in einer österreichischen Population

3.1.3.1 DNA österreichischer Patienten mit hereditärer Hämochromatose

In einer weiteren Untersuchung wurde die Verteilung und Häufigkeit von K8/18-Mutationen und mögliche Assoziation mit einer Leberzirrhose bei österreichischen Patienten mit klassischer hereditärer Hämochromatose analysiert. Die Kohorte umfasste n = 199 österreichische Patienten mit homozygoter *HFE* C282Y-Mutation und stammte größtenteils aus der Studie von Stickel *et al.* (2005). Die Proben genomischer DNA wurden von Dr. Christoph Österreicher der Universität Wien bereitgestellt. Insgesamt konnten n = 162 DNA-Proben ausgewertet werden. Die Kohorte bestand aus 120 (74%) männlichen und 41 (25%) weiblichen Patienten (das Geschlecht einer Person war unbekannt) von ausschließlich kaukasischer Ethnizität (Dr. Österreicher, persönliche Kommunikation). Bei >90% der Patienten wurde aufgrund erhöhter Serumeisenwerte und Lebertransaminasen eine perkutane Leberbiopsie durchgeführt. Bei jüngeren Patienten wurde die Diagnose einer Leberzirrhose oft aufgrund klinisch eindeutiger Befunde einer dekompensierten Lebererkrankung und sonographischer Zirrhosekriterien gestellt. Die uneinheitliche histologische Befunderhebung beruht darauf, dass die Leberbiopsie zur Diagnosestellung der HHC aufgrund genetischer Tests nicht mehr obligat ist (Bacon, 2001). Die histologische Untersuchung erfolgte nach der o. g. Methode (Abs. 3.1.2.2) und Klassifikation nach der Nomenklatur von Ludwig, 1993 (Tab. 3.1). Leberfibrose Stadium 4 und hepatozelluläres Karzinom (2 Patienten) wurden als Leberzirrhose gewertet. Weitere, jedoch unvollständige Daten zu histologischen und biochemischen Parametern wie dem Anteil eisenüberladener Hepatozyten, Lebereisenkonzentration (HIC), Lebereisenindex (HII), Konzentration von Serumeisen, Serumferritin, Serumtransferrin und Serumtransferrinsättigung der Patienten lagen vor (Abs. 5.3.1). Ursachen anderer chronischer Lebererkrankungen wurde im Rahmen der klinischen Diagnostik ausgeschlossen. Entsprechend den WHO-Richtlinien wurde der Grenzwert für signifikant erhöhten Alkoholkonsum auf >20g Alkohol/Tag (>140g/Woche) für Frauen und >60 g/Tag (>420g/Woche) für Männer festgesetzt. Die Patientenproben wurden anonymisiert übergeben, durchnummeriert und die klinischen Daten der Patienten nach Abschluss der Analyse offenbart.

Das Studienprotokoll der jeweiligen Projekte wurde von den Ethikkommissionen der involvierten Zentren (Universität Bonn, Universität Erlangen-Nürnberg, Universität Wien / Österreich und Stanford University / USA) genehmigt und das Einverständnis der Patienten eingeholt.

3.2 Methoden der Molekularbiologie

3.2.1 DNA-Isolierung

Die genomische (chromosomale) DNA der Patienten wurde aus peripherem Blut isoliert. Die DNA befindet sich größtenteils in den Nuklei der Leukozyten. Die Blutproben wurden bis zur Extraktion der DNA bei -20°C gelagert. Beim Auftauen des Blutes kommt es zum Platzen der Leukozyten, wodurch die DNA für die Isolierung leichter zugänglich wird. Die Extraktion der DNA erfolgte unter Verwendung des DNeasy Tissue Kits (Qiagen, Valencia, CA, USA). Dabei wurde nach Protokoll des Herstellers vorgegangen. Das Prinzip beruht auf einem Proteinase K-Verdau des Gewebes bzw. der Blutzellkörperchen. Dadurch werden die Zellmembran und Zellkernmembran zerstört und die DNA freigelegt. Das Lysat wird über Silica-Gel-Membranen abzentrifugiert, wobei die DNA an die Membranen bindet. Anschließend erfolgt die Aufreinigung der DNA durch aufeinander folgende Wasch- und Zentrifugationsschritte. Die Elution der aufgereinigten DNA schließt die Prozedur ab.

3.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung und DNA-Reinheit

Zur erfolgreichen Durchführung der PCR war eine DNA-Menge von ca. 50 ng erforderlich. Die DNA-Konzentration wurde mit einem Spektrophotometer (Eppendorf, Westbury, NY, USA) bestimmt. Gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz besteht eine lineare Beziehung zwischen der gemessenen Lichtabsorption und der DNA-Konzentration. Das DNA-Absorptionsmaximum des UV-Lichts beruht auf der Präsenz von aromatischen Heterozyklen und ist für DNA und RNA gleich, so daß Kontamination mit Nukleinsäuren zu höheren Werten führt. Das Absorptionsmaximum für DNA liegt bei 260 nm und für Proteine bei 280 nm. Der Absorptionskoeffizient A_{260}/A_{280} gilt daher als Reinheitskriterium für die DNA und sollte zwischen 1,8-2,0 liegen. Vor jeder Messreihe wurde das Gerät mit *Aqua dest.* bzw. dem entsprechenden Elutionsmedium geeicht.

3.2.3 Oligonukleotide („Primer“)

Im Folgenden sind alle verwendeten synthetischen Oligonukleotide für die Polymerasekettenreaktion sowie Länge und GC-Basenanteil der amplifizierten DNA-Fragmente aufgeführt. Alle Primer wurden von der Firma Sigma Genosys, The Woodlands, TX, USA hergestellt.

Tabelle 3.2: Primer zur Amplifikation von *KRT8*

Gen	Exon	Primersequenz (5' → 3')	T _M (°C)	Länge (bp)	GC (%)
<i>KRT8</i>	1 F	TGCCTCTACCATGTCCATCA	64,2	392	63,8
	1 R	CGGGACTACCAGGAGAAAGG	64,7		
	2 F	TAGACCTTTTTGCTCTCTCCT	58,7	282	55,3
	2 R	GAGCAGGTGACTTCAGTTGGG	66,0		
	3 F	CTCATATCCTCATCTCTGTGA	67,3	279	46,2
	3 R	ACTTAGGAATATTTAGGGACA	66,4		
	4 F	TGGCAACTAGAAAGTCCTGTG	61,8	279	57,7
	4 R	AGCCTCTGGTTGAGTCTCAGG	64,8		
	5 F	CACTTGCCCTCTTCCCCACAG	70,1	333	58,3
	5 R	CACCCCAACCCGGCCCATAC	76,6		
	6 F	CATACCAACCTGACCTACTTACC	63,3	369	63,7
	6 R	AGAACAACAGGACCCCAAGTC	64,2		
	6 F *	GAAGAGAAGGCATACCCAACC	63,5	333	64,9
	6 R *	ACAGGACCCCAAGTCCAAG	64,0		
	7 F	TGACCGGACCTGCTTCCCTAT	68,8	293	63,1
	7 R	AGGTCACCTGTGAGCGACTGAG	64,7		
	8 F	TACCTCTGTCCCTCACCAGG	64,1	300	64,7
	8 R	CTCCTGTTCCAGTGCTACC	63,6		

F, Forward (Plusstrang); R, Reverse (Minusstrang); T_M, Schmelztemperatur; bp, Basenpaare. *Diese Primer wurden nach Angaben von Hesse *et al.* (2004) synthetisiert und zur Re-Analyse von *KRT8* Exon 6 (Abs. 3.1.1.3) verwendet. Die Primer wurden nach der genomischen Referenzsequenz M 34482.1 entworfen.

Tabelle 3.3: Primer zur Amplifikation von *KRT18*

Gen	Exon	Primersequenz (5' → 3')	T _M (°C)	Länge (bp)	GC (%)
<i>KRT18</i>	1 F	CAAAGCCTGAGTCCTGTCCTTT	65,5	481	63,6
	1 R	AGTTGAGGTCCCTCCTACCCCTTAC	68,0		
	2 F	CTGGCTTTCTATTCATGGAAC	60,1	201	51,9
	2 R	AACTACCCAGCCTGGGGAGCA	70,9		
	3 F	CCTCTGATCACCTCCACTCCT	64,5	202	55,4
	3 R	GGCCAGTGGCCCCTGCTTGC	77,2		
	4 F	CACTTTTGCCCCTGTCACCTTTAG	68,3	237	57,8
	4 R	GTCTGCCTCCCTCCCACACCTT	71,6		
	5 F	CTGCCAAGGTGTGGGAGGGAG	68,5	211	57,3
	5 R	AGGTGATGTGAAGGCACTCAC	68,7		
	6 F	CAGAAGGCCAGCTTGGAGAAC	67,2	270	61,9
	6 R	ATCTCCTGATCCCAGCACGTG	68,6		
	7 F	GGGCTTGGTCTTCTGTTACAG	62,5	163	63,1
	7 R	GGGTACCCTGCTTCTGCTGG	71,0		

F, Forward (Plusstrang); R, Reverse (Minusstrang); T_M, Schmelztemperatur; bp, Basenpaare. Die Primer wurden auf der Grundlage der genomischen Referenzsequenz AF 179904.1 entworfen.

3.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) eignet sich dazu, bereits kleinste Mengen an DNA-Fragmenten gezielt zu vervielfältigen. Der Ablauf der Polymerasekettenreaktion beruht auf einem von Kleppe *et al.* (1971) erstmals beschriebenen und von Mullis (Saiki *et al.*, 1985, 1988) modifizierten Prinzips eines sich vielfach wiederholendem Zyklus von Denaturierungs-, Annealings- und Extensionsschritt, der zu einer exponentiellen Vermehrung der Ziel-DNA (Template-DNA) führt. Zu Beginn der Reaktion wird der DNA-Originalstrang durch Hitze denaturiert und in zwei komplementäre Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend wird die Temperatur reduziert und somit die Annealingphase eingeleitet. Mit „Annealing“ bezeichnet man das Hybridisieren von spezifischen, komplementär zum Originalstrang zusammengesetzten Oligonukleotiden („Primern“). Durch Auswahl eines geeigneten 5'- und 3'- Primers (Abs. 3.2.3) wird das zu amplifizierende DNA-Fragment eingerahmt und dessen Länge bestimmt. Die Länge der DNA-Primer beträgt in der Regel ca. 20 Nukleotide (Tab. 3.2, 3.3). Im darauf folgenden Extensionsschritt wird die einzelsträngige DNA-Matrize ausgehend von den Primern durch eine thermostabile DNA-Polymerase zu Doppelsträngen verlängert. Erneute Hitzeeinwirkung sorgt für die Trennung der neu synthetisierten DNA-Doppelstränge und leitet damit den nächsten Replikationszyklus ein. Nach der folgenden Abkühlung des Ansatzes steht nun die doppelte Anzahl an DNA-Strängen als Matrize für den nächsten Zyklus zur Verfügung. Somit kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung der gewünschten Fragmente, d.h. bei n Zyklen kann die ursprünglich vorhandene Anzahl an DNA-Fragmenten theoretisch auf 2^n Kopien vervielfacht werden. Die tatsächliche Amplifikationseffizienz ist jedoch niedriger aufgrund verschiedener limitierender Faktoren. Im Laufe der PCR geht die Amplifikation schließlich auf Null zurück und die Gesamtmenge an PCR-Produkt erreicht einen Plateauwert („Plateau-Effekt“). Die einzelnen Phasen der Polymerasekettenreaktion haben verschiedene Temperaturoptima, die während der PCR vielfach hintereinander durchlaufen werden. Die Annealingtemperatur für das Binden der Primer an die Template-DNA ist je nach Primern unterschiedlich und richtet sich u.a. nach der Schmelztemperatur T_M und dem GC-Gehalt der Oligonukleotide. Die effizienteste Annealingtemperatur muß jedoch empirisch ermittelt werden. Das Temperaturoptimum der Extensionsphase richtet sich nach der verwendeten DNA-Polymerase. Diese sogenannte *Taq*-Polymerase wird aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert und übersteht den Denaturierungsprozess der DNA unbeschadet. Das Temperaturoptimum dieser Polymerase liegt bei 72°C (Saiki *et al.*, 1988). Durch „Hot-start-Aktivierung“ (94°C, 5 min) des Enzyms wird der Amplifikation von unspezifischen PCR-Produkten (z.B. Primerdimeren) vorgebeugt (Wilhelm, 2003). Die Dauer der Extensionsphase wurde nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments

gewählt (~10 s/100 bp). Die finale Extension schließt die DNA-Amplifikation ab und dient der Vervollständigung noch inkompletter Produkte. Zur Amplifikation von GC-reichen Fragmenten (GC >60%) wurde dem Reaktionsansatz 5%iges DMSO hinzugefügt, ein Detergenz, das die Spaltung der Disulfidbrücken erleichtert. Die PCR wurde nach dem „Touchdown-Prinzip“ durchgeführt, welches die Spezifität der PCR-Amplifikation optimiert. Die anfangs erhöhte Annealingtemperatur bewirkt eine hochspezifische Bindung der Primer an die Ziel-DNA, wodurch die Bildung von Primerdimeren und Artefakten verringert wird (Wilhelm, 2003). Der gesamte Reaktionsansatz wurde auf Eis gemischt, um unerwünschte Nebenreaktionen, v.a. die Bildung von Primärhybriden, zu vermeiden. Um mögliche Kontamination der Ansätze mit Fremd-DNA und deren Amplifizierung zu erkennen, wurde stets der gleiche Ansatz ohne Template-DNA als Negativkontrolle mitgeführt. Das Ausmaß der Amplifikation des PCR-Produktes wurde anschließend mittels DHPLC gemessen.

Tabelle 3.4: Schema der Polymerasekettenreaktion

Temperatur	Phase	Dauer	Anzahl der Zyklen
94°C	Initiale Denaturierung, Enzymaktivierung	5 min	1
94°C	Denaturierung	30 sek	10
67°C-51°C (-0,5°C/Zyklus)	Annealing	30 sek	
72°C	Extension	30-40 sek	
94°C	Denaturierung	30 sek	35
62-51°C	Annealing	30 sek	
72°C	Extension	30-40 sek	
72°C	Finale Extension	15 min	1

Tabelle 3.5: PCR-Reaktionsansatz pro 8-Tube-Streifen

Reagenz	Stock-Konzentration	Volumen	Endkonzentration
PCR-Puffer	10x	12 µl	1x
MgCl ₂ -Lösung	25 mM	8 µl	1,5-2,0 mM (~1,7 mM)
PCR Nucleotide Mix	je 25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	2,5 µl	500 µM
5'- Primer	100 µmol/l	0,7 µl	0,6 µM
3'- Primer	100 µmol/l	0,7 µl	0,6 µM
Taq-Polymerase	5 U/µl	1,0 µl	5 Units
Template-DNA	5-10 ng/µl	1,5 µl/Tube	0,5-1 ng/µl
5% DMSO (GC >60%)	1 mol/l	6,0 µl	50 mM
Aqua dest.		Ad 120 µl	
Endvolumen/Tube		15 µl	

3.2.5 DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Es wurde nach Protokoll des Herstellers unter Verwendung einer Tischzentrifuge vorgegangen. Die DNA wurde zunächst mit einem Bindungspuffer hoher Salzkonzentration gemischt, wodurch ein pH-Wert von $\leq 7,5$ eingestellt wurde, um ein optimales Milieu für die DNA-Bindung zu erreichen. Das Gemisch wurde auf Silica-Gel-Membranen aufgetragen. Durch die hohe Salzkonzentration adsorbierte die DNA an die Membranen, während unerwünschte PCR-Nebenprodukte abzentrifugiert wurden. Nachfolgend wurden die Salze mit einem ethanolhaltigen Puffer ausgewaschen und die aufgereinigte DNA mit 30 μ l Tris-Puffer für 1 Minute inkubiert und anschließend eluiert.

3.2.6 Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)

Die Analyse der DNA-Sequenzvarianten wurde mit dem WAVE DNA Fragment Analysis System (Transgenomic, San Jose, CA, USA) basierend auf der DHPLC-Technologie durchgeführt. Das Prinzip der DNA-Fragmentauftrennung beruht auf der Adsorption von negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA-Moleküle an die porenfreie Polystyren-Divinylbenzen-Matrix (apolare stationäre Phase) der DNASepHT-Trennsäule (Transgenomic). Das geschieht über ionenpaarende Brückenmoleküle aus positiv geladenem Triethylammoniumacetat (TEAA). Längere DNA-Fragmente besitzen eine höhere negative Ladung als kurze Fragmente, interagieren mit mehr brückenbildenden TEAA-Ionen und werden daher stärker an die stationäre Phase adsorbiert. Durch lineare Konzentrationserhöhung des organischen Lösungsmittels Acetonitril in der mobilen Phase werden die hydrophoben Interaktionen zwischen den TEAA-Brückenmolekülen und der Matrix zunehmend reduziert, so daß die DNA-Fragmente der Länge entsprechend früher (kurze Fragmente) oder später (lange Fragmente) ausgewaschen werden (Xiao und Oefner, 2001). Die Elution von gebundener DNA wurde bei einer Durchflussrate von 0,9 ml/min und einer Erhöhung des B-Puffer-Gradienten von 2% pro Minute durchgeführt. Für das Screening der DNA-Proben wurde der „quick time detection mode“ mit einer Elutionsdauer von 2 Minuten gewählt. Die Elution mit einem langen Gradienten von 4 bis 6 Minuten Dauer wurde für die Charakterisierung des Fragmentelutionsmusters bei verschiedenen Temperaturen und zum Erstellen der experimentellen Schmelzprofile benutzt. Die DNA-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 256 nm gemessen. Die korrekte Ofenkalibrierung für die Schmelztemperaturen wurde regelmäßig mit Mutationsstandards des Herstellers (Transgenomic, USA) durchgeführt. Diese Mutationsstandards bestätigten die korrekte Ofeneinstellung in den Temperaturbereichen von 56°C und 70°C.

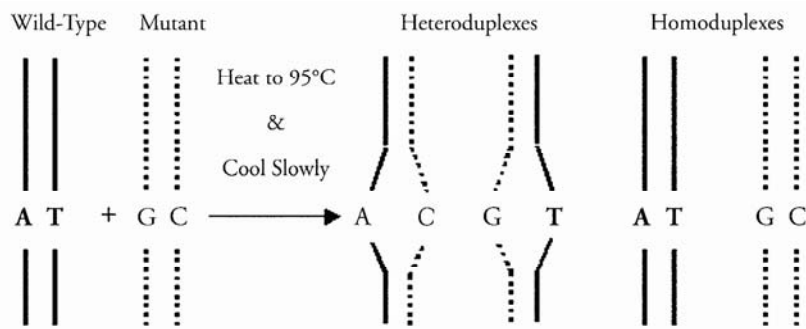


Abb. 3.2: Bildung von Heteroduplexen durch Hybridisierung von mutiertem und nicht mutiertem Allel nach Denaturierung des DNA-Doppelstrangs. Nach Donohoe, 2005.

Das Prinzip der Mutationsdetektion mittels DHPLC beruht auf der Beobachtung, dass die partielle Denaturierung eines DNA-Duplexes zu einer signifikanten Verminderung der Retention im Vergleich zu nicht denaturierter doppelsträngiger DNA führt (Xiao und Oeffner, 2001). Dadurch können heterozygoten Varianten identifiziert werden. Diese bilden beim Hybridisieren Heteroduplexe aus, die aus zwei nicht identischen DNA-Strängen zusammengesetzt sind (Abb. 3.2). Solche Heteroduplexe denaturieren früher als Homoduplexe und werden früher durch einen linear ansteigenden Acetonitrilgradienten ausgewaschen. Im Chromatogramm zeichnet sich dieser Vorgang als zusätzlicher Peak ab, der dem Homoduplex-Peak vorausgeht (Abb. 3.3 B). Es entsteht das charakteristische Doppel-Peak-Muster (Abb. 3.3 A, B), welches die Präsenz einer DNA-Sequenzvariante nahe legt (Xiao und Oefner, 2001; Früh und Noyer-Weidner, 2003). Die zufällige Rekombination der DNA-Stränge wurde erreicht, indem die DNA-Amplifikate auf 95°C erhitzt und über 25 Minuten schrittweise auf 55°C abgekühlt wurden (Donohoe, 2005).

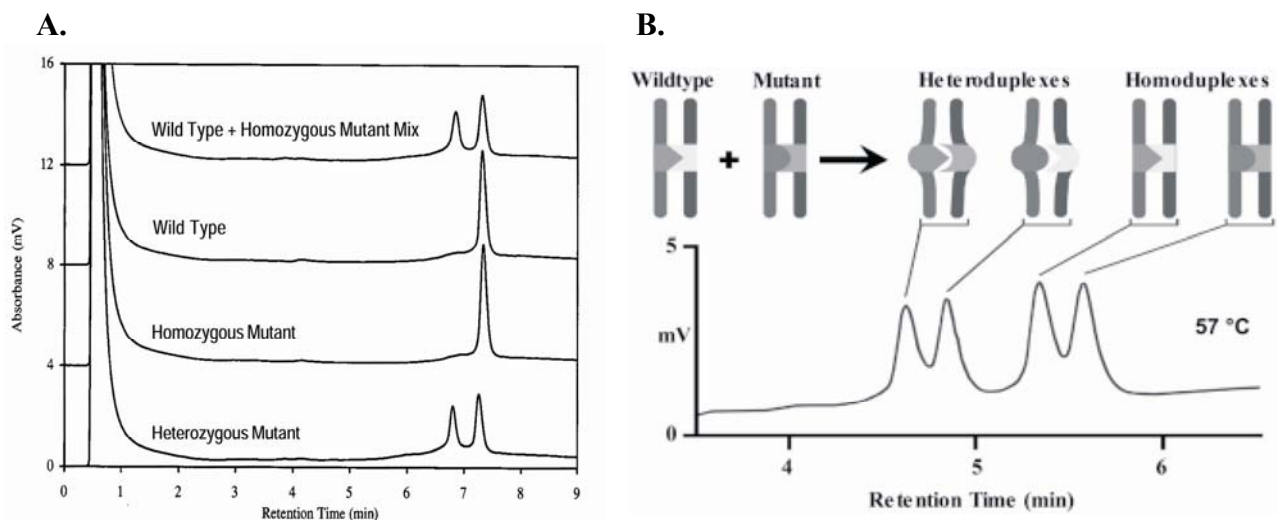


Abb. 3.3 A: Ausbildung eines Doppel-Peak-Musters durch Heteroduplexbildung bei heterozygoten Sequenzvarianten und nach äquimolarer Mischung von homozygot mutierter und Wildtyp-DNA-Probe. Reine homozygote Sequenzvarianten sind anhand des Chromatogramms nicht von Wildtyp-DNA-Proben zu unterscheiden. Nach Schmitt *et al.*, 2000. **B:** Durch Hybridisierung von mutiertem und nicht mutiertem Allel entstehen Heteroduplexe, die als Doppel-Peak im Chromatogramm erscheinen. Nach Früh und Noyer-Weidner, 2003.

Auch homozygote Sequenzvarianten können identifiziert werden, indem DNA-Proben mit bekannten Wildtyp-Proben in äquimolarem Verhältnis gemischt, bei 95°C denaturiert und langsam abgekühlt werden (Schmitt *et al.*, 2000). Durch das Hybridisieren von mutiertem Allel der DNA-Probe und nicht mutiertem Allel des Wildtyps werden Heteroduplexe ausgebildet (Abb. 3.3 B), welche zu einem verschobenen Doppel-Peak-Muster in der DHPLC-Analyse führen (Abb. 3.3 A). DNA-Fragmente mit einem auffälligen Muster wurden abermals durch PCR amplifiziert, aufgereinigt und mittels DHPLC re-analysiert, um die Validität des Ergebnisses zu bestätigen. Das WAVE DNA Fragment Analysis System war mit der Software Wavemaker, (Transgenomic, San Jose, CA, USA) ausgestattet, die eine näherungsweise Kalkulation der am besten geeigneten Analysetemperatur erlaubte (Rudolph *et al.*, 2002). Zum Vergleich wurden ebenfalls einzelne Schmelzprofile von *KRT8/18* mit der neueren Software Navigator (Transgenomic, USA) erstellt, die jedoch vergleichbare Temperaturvorhersagen errechnete. Aus Gründen der Einheitlichkeit wurden daher alle Untersuchungen mit der Software Wavemaker, Version 4.1.44 durchgeführt. Das Programm stellt den geschätzten helikalen Anteil eines DNA-Amplifikats über ein Temperaturspektrum oder bei spezifischen Temperaturen dar (Abb. 4.1, 4.2, 4.3). Die optimale Auflösung heterozygoter DNA-Sequenzvarianten in der DHPLC wird erfahrungsgemäß bei denaturierenden Analysetemperaturen erreicht, bei denen ca. 75% helikale DNA vorliegt. Jedoch ist die Identifikation von DNA-Varianten oft über ein Temperaturspektrum möglich, bei dem ein helikaler Anteil zwischen 40-90% besteht (Xiao und Oeffner, 2001). Die Software liefert damit eine theoretische Grundlage für die Mutationsanalyse, allerdings können die Kalkulationen ungenau sein (Jones *et al.*, 1999; Xiao und Oeffner, 2001).

3.2.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Feststellung der genauen Basenabfolge eines DNA-Strangs. Die automatisierte Sequenzierung des aufgereinigten PCR-Produktes wurde extern (Sequetech, Mountain View, CA, USA) durchgeführt. Die DNA-Fragmente wurden mit den beschriebenen Primern (Tab. 3.2, 3.3) in beiden Richtungen unter Verwendung eines ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) analysiert. Beim Vorliegen einer DNA-Sequenzvariante wird ein Kettenabbruch induziert, der zur Ausbildung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge führt. Die fluoreszenzfarbstoffmarkierten DNA-Fragmente werden kombiniert in eine Spur eines Polyacrylamidgels geladen. Nach dem Anlegen der Spannung werden die Fragmente entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Kürzere Fragmente wandern schneller und erreichen früher den „Leserahmen“, in dem das Gel kontinuierlich von einem Laserstrahl gescannt wird. Der angeregte Fluoreszenzfarbstoff emittiert

Licht einer spezifischen Wellenlänge. Das Spektrum des emittierten Lichts wird von einem Spektrographen nach Wellenlänge getrennt und auf eine CCD-Kamera projiziert. Dadurch können während eines Scanvorgangs die Emissionen aller Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig erfasst werden. Die Daten der Lichtintensität bei bestimmten Wellenlängen werden anschließend mit der DNA-Sequenzanalyse-Software interpretiert und den einzelnen Basen des DNA-Fragmentes zugeordnet, wodurch die Abfolge der einzelnen Basen des DNA-Fragmentes dargestellt werden kann. Die Sequenzierungsergebnisse wurden visuell ausgewertet.

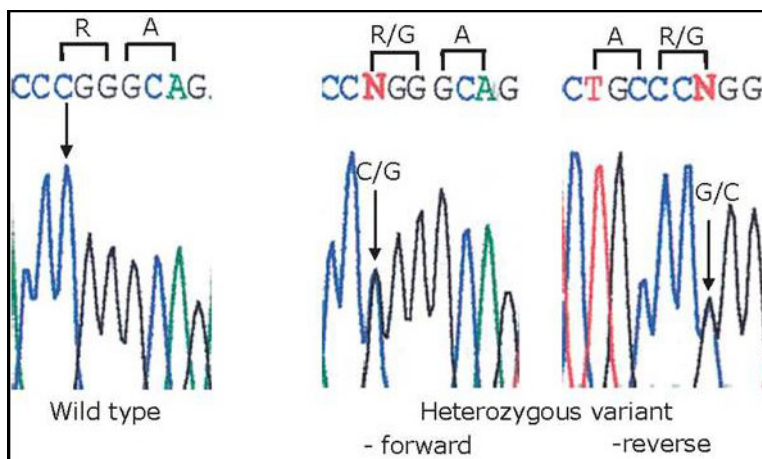


Abb. 3.4: K18 R353G-Variante in Vorwärts- und Rückwärtssequenzierung. Die Überlagerung zweier verschiedenfarbig dargestellter Peaks markiert den Basenaustausch. Die Mutation des Basentriplets CGG zu GGG verursacht einen Austausch der Aminosäuren Arginin (R) zu Glyzin (G) an Position 353 des Keratin 18-Proteins.

Heterozygote DNA-Sequenzvarianten führen zu einem Überlappen von Basenpeaks in der Basenabfolge. Alle DNA-Amplifikate, die in der DHPLC ein mutationsverdächtiges Muster aufwiesen, wurden anschließend sequenziert. Die Lokalisation der identifizierten Varianten erfolgte auf der Grundlage der mRNA-Referenzsequenzen (NM 002273.2 für *KRT8* und NM 000224.2 für *KRT18*) der Entrez-Nukleotide-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>). Die genomischen DNA-Referenzsequenzen waren M34482.1 für *KRT8* und AF179904.1 für *KRT18*, die auch dem Design der Primer und der Analyse der Schmelzprofile und amplifizierten Fragmente zugrunde lagen. Die identifizierten Varianten wurden nach der Nomenklatur von Antonarakis *et al.* (1998) gekennzeichnet. Die Aminosäuren wurden nach der Einzelbuchstaben nomenklatur abgekürzt (Jones, 1999).

3.3 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Substanzen hatten Analysequalität. Für die Enzyme wurde der optimale Reaktionspuffer von dem Hersteller bereits mitgeliefert.

Tabelle 3.6: Chemikalien, Enzyme und Reagenzien

Substanz	Hersteller
Aceton, CH ₃ COCH ₃	Baker, Phillipsburg, NJ, USA
Acetonitril 99,93%, HPLC grade	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumpersulfat, (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
AmpliTag Gold DNA Polymerase (5 U/μl)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<i>Aqua dest.</i> , DEPC treated	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dinatriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol, C ₂ H ₅ OH	Gold Shield Chemical, Hayward, CA, USA
GeneAmp10x PCR Gold Puffer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Isopropanol, (CH ₃) ₂ CHOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaliumchlorid, KCl	Fisher Chemicals, Fair Lawn, NJ, USA
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Magnesiumchlorid, MgCl ₂ (25 mM)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Natriumchlorid, NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PCR Nucleotide Mix, dNTPs (10 mM)	Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA
Triethylammoniumacetat, TEAA (2 M)	Transgenomic, Omaha, NE, USA
Trishydroxymethylethylendiamin, Tris	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
WAVE High-Range Mutation Control Standard (70°C)	Transgenomic, Omaha, NE, USA
WAVE Low-Range Mutation Control Standard (56°C)	Transgenomic, Omaha, NE, USA

Tabelle 3.7: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Dneasy Tissue Kit	Qiagen, Valencia, CA, USA
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Valencia, CA, USA
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Valencia, CA, USA

Tabelle 3.8: Puffer und Lösungen für die PCR

dNTP-Lösung	10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
10x PCR-Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM KCl
MgCl ₂ -Lösung	25 mM
5'-Primer-Lösung	100 pmol/μl
3'-Primer-Lösung	100 pmol/μl

Tabelle 3.9: Puffer für die DHPLC

DHPLC-Puffer A	0.1 M TEAA
DHPLC-Puffer B	0.1 M TEAA / 25% Acetonitril
DHPLC-Puffer C	8% Acetonitril
DHPLC-Puffer D	75% Acetonitril

DHPLC, denaturing high-performance liquid chromatography; TEAA, Triethylammoniumacetat.

Tabelle 3.10: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Beschwerungspapier (3 x 3 inches)	Schleicher&Schuell, San Francisco, CA, USA
DNA Sep HT Säule (Polystyren/divinylbenzen) für WAVE System	Transgenomic, Omaha, NE, USA
Filter-Pipettenspitzen (10 XL, 20 µl, 200 µl)	Denville Scientific, Metuchen, NJ, USA
Filter-Pipettenspitzen (1000 µl)	Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA
Flüssigstickstoff, N ₂	Praxair, Danbury, CT, USA
Kanülen (19 G, 1.10 x 38 mm)	Terumo, Tokyo, Japan
Klarsichtfolie	Polyvenyl Films, Sutton, MA, USA
Konische Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Latex-Handschuhe	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
PCR-Caps	Denville Scientific, Metuchen, NJ, USA
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml), transparent	Denville Scientific, Metuchen, NJ, USA
Rasierklingen	Garvey Products, Cincinnati, OH, USA
Reagenzgläser (15 x 85 mm)	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Reaktionsgefäße (1,5 ml), transparent	Denville Scientific, Metuchen, NJ, USA
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Spritzen (1 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes NJ, USA
Spritzen (3 ml)	Terumo, Tokyo, Japan
Trockeneis	Praxair, Danbury, CT, USA

3.4 Geräte, Instrumente und Software

Tabelle 3.11: Verwendete Software

Software	Hersteller
ABI PRISM Basecaller, Version 1.3.0.0.	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ABI PRISM SDS, Version 2.2	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Adobe Acrobat Professional, Version 7.0.5	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
Adobe Illustrator CS, Version 11.0.0	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
Adobe Photoshop CS, Version 8.0.1	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
Chromas Lite, Version 2.01	Technelysium Pty Ltd, CA, USA
EndNote, Version 7.0	Thomson ISI ResearchSoft, Carlsbad, CA, USA
Microsoft Office Excel 2003	Microsoft, Redmond, WA, USA
Microsoft Office Word 2003	Microsoft, Redmond, WA, USA
SPSS für Windows, Version 14.0	SPSS Inc., Chicago, IL, USA
Wavemaker, Version 4.1.44	Transgenomic, Omaha, NE, USA

Tabelle 3.12: Verwendete Geräte, Instrumente und Speichermedien

Gerät	Hersteller
80er- und 96er-Reaktionsgefäßhalter	Phenix, Hayward, CA, USA
ABI PRISM 377 DNA Sequencer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Beckman Φ 32 pH Meter	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Biophotometer eppendorf	Eppendorf, Westbury, NY, USA
Blockthermostat Isotemp 125 D	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
CD-R 700 MB, CD-RW 700 MB	Imation, Oakdale, MN, USA
Drucker/Kopierer Xerox Work Centre Pro 65	Xerox, Stamford, CO, USA
Flüssigstickstofftank (-120°C)	Praxair, Danbury, CT, USA
Kühlschrank (+4°C)	General Electric, Fairfield, CT, USA
Kühlschrank Admiral (-20°C)	Maytag, Cleveland, TN, USA
Kühlschrank Revco Ultima II (-80° C)	Kendro, Asheville, NC, USA
Kühlraum (+4°C)	Environmental Growth Chambers, Chagrin Falls, OH, USA
Lichtmikroskop Nikon Eclipse E1000	Nikon Instruments, Melville, NY, USA
Magnetrührer	Corning Inc., Corning, NY, USA
Messbecher (250 ml, 1000 ml, 2000 ml)	Kartell, Noviglio, Italien
Nalgene Messzylinder (100 ml, 250 ml, 500 ml)	United States Plastic Corporation, Lima, OH, USA
Notebook Samsung X20	Samsung, Schwalbach/Taunus
PC mpc clientpro	MPC Computers, Nampa, ID, USA
PC Sony Vaio	Sony, Fort Myers, FL, USA
Pipetten (2 μ l, 20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettierhilfe "pipet-aid"	Drummond Scientific, Broomall, PA, USA
Präzisionswaage sartorius 1204 MP	Sartorius, Göttingen
Präzisionswaage sartorius research	Sartorius, Göttingen
Präzisionswaage XP-3000	Denver Instrument, Arvada, CO, USA
Quarzglasküvette	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Schüttler VSOS-4 Orbital Shaker	PRO Scientific, Oxford, CT, USA
Spektrophotometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech
Stoppuhr	Control Company, Friendswood, TX, USA
Taschenrechner Casio SL-300ER	Casio, Tokyo, Japan
Thermocycler GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Thermomixer	Eppendorf, Westbury, NY, USA
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Westbury, NY, USA
Vortexer "DELUXE MIXER"	Scientific Products, McGaw Park, IL, USA
Wasserbad Isotemp 210	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Wasserfiltersystem Milli-Q Plus PF	Millipore, Billerica, MA, USA
WAVE DNA Fragment Analysis System	Transgenomic, Omaha, NE, USA
Zip 100 MB Disks	Iomega, San Diego, CA, USA

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms SPSS für Windows, Version 14.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Es wurden die absoluten und relativen Häufigkeiten der Variablen in den untersuchten Kollektiven erfasst. Ein Vergleich der Häufigkeiten zwischen den Gruppen wurde mittels 2x2-Kontingenztafeln und Chi-Quadrat-Tests durchgeführt. Für die Berechnung der Stärke eines ermittelten Einflusses wurde das Odds Ratio (OR) mit einem 95%-Konfidenzintervall kalkuliert. Als Signifikanz einer Assoziation wurde $p \leq 0,05$ mit einem Signifikanzniveau von 5% zugrunde gelegt. Alle p-Werte basieren auf standardisierten Wald-Tests. Für den Vergleich der verschiedenen Einflüsse wurde das Verfahren der univariaten und multivariaten logistischen Regressionsanalyse verwendet. Die logistische Regressionsanalyse ist eine spezielle Form der multiplen, nichtlinearen Regression, welche die Möglichkeit bietet, den Einfluß einer (univariat) oder mehrerer (multivariat) unabhängiger Variablen auf eine dichotome Zielgröße zu untersuchen. Bei der multivariaten Analyse wird das Zusammenwirken mehrerer Variablen, d.h. ihre Abhängigkeitsstruktur, berücksichtigt. Das Odds Ratio drückt die Stärke des Einflusses der unabhängigen Variablen auf die abhängige Variable aus. Das OR stellt somit den Faktor dar, um den sich pro Einheit der unabhängigen Variablen die Wahrscheinlichkeit der abhängigen Variablen erhöht oder reduziert. Univariante Analysen ergaben nicht angepasste Odds Ratios für die Beziehung zwischen unabhängiger und abhängiger Variablen. Multivariate Analysen ergaben Odds Ratios, die an die simultanen Effekte der anderen Variablen angepasst sind. Die Kohorte deutscher Patienten mit chronischer HCV-Infektion und die Kohorte österreichischer Hämochromatosepatienten wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Justus Welke, Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie, Charité Campus Mitte, Berlin statistisch ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Optimierung der DHPLC-Analyse

4.1.1 Überprüfung der softwaregenerierten Analysetemperaturen und Optimierung für die Detektion von *KRT8*- und *KRT18*-Varianten

Die Software Wavemaker (Version 4.1.44, Transgenomic) ermöglicht eine näherungsweise Kalkulation der am besten geeigneten Analysetemperatur. In der folgenden Untersuchung wurde die Präzision der Berechnungen anhand bereits bekannter heterozygoter oder compound-heterozygoter humaner *KRT8/18*-Varianten und drei zusätzlicher, im Mausmodell erzeugter *KRT18*-Varianten (für die keine homologen humanen Varianten vorlagen) bei verschiedenen Temperaturen überprüft (Abb. 3.1; Abs. 3.2.6). Die gewählten Varianten repräsentierten jeweils fünf verschiedene *KRT8*- und *KRT18*-Exone, die als Schwerpunkte heterozygoter Mutationen in vergangenen Untersuchungen (Owens *et al.*, 2004; Ku *et al.*, 2001, 2003a; 2005) in Erscheinung getreten waren: *KRT8* Exon 1, 4, 5, 6, 8 und *KRT18* Exon 1, 2, 4, 5, 6 (Abb. 3.1). Bei der Analyse der Sequenzvarianten wurde neben dem generellen Schmelzprofil des gesamten DNA-Amplikons auch das Schmelzverhalten der einzelnen DNA-Domänen berücksichtigt. Beispielsweise stimmte die softwareberechnete Temperatur für den 75%-helikalen DNA-Anteil von *KRT8* Exon 1 (Abb. 4.1 A) und Exon 5 (Abb. 4.2 A) mit 62,6°C überein. Allerdings zeigte das Schmelzverhalten temperaturabhängig zwischen verschiedenen Regionen der Amplifikate von *KRT8* Exon 1 (Abb. 4.1 B) und Exon 5 (Abb. 4.2 B) Unterschiede. So trat bei *KRT8* Exon 1 ein protrahierter Schmelzprozeß im Bereich von 59-67°C ein (Abb. 4.1 A) mit deutlicher Heterogenität innerhalb des DNA-Segmentes (Abb. 4.1 B). Hingegen deutete das Schmelzprofil von *KRT8* Exon 5 ein gleichmäßiges Schmelzen der helikalen DNA über die gesamte Länge des Amplifikats an (Abb. 4.2 B) mit schneller Denaturierung der DNA im Bereich von 61-64°C (Abb. 4.2 A). Um der Heterogenität des Schmelzprofils von *KRT8* Exon 1 gerecht zu werden und eine adäquate helikale Fraktion zu generieren, empfahl die Software Schmelztemperaturen von 62,5°C zur Analyse der Basenpositionen 280-370 und 64,6°C für bp 180-280 und 65,7°C für bp 50-210 (Abb. 4.1 B). Für das DNA-Segment um K8 Isoleuzin63→Valin (bp 197) wurde eine optimale 75%-helikale Auflösung bei 64,6°C (Abb. 4.1 D) errechnet. Die optimale Analysetemperatur des Segments um K8 Tyrosin54→Histidin (bp 170) wurde mit 65,7°C (Abb. 4.1 C) und für die *KRT8* 955G>T-Variante (K8 A319S, bp 286) mit 62,5°C (Abb. 4.2 C) prognostiziert.

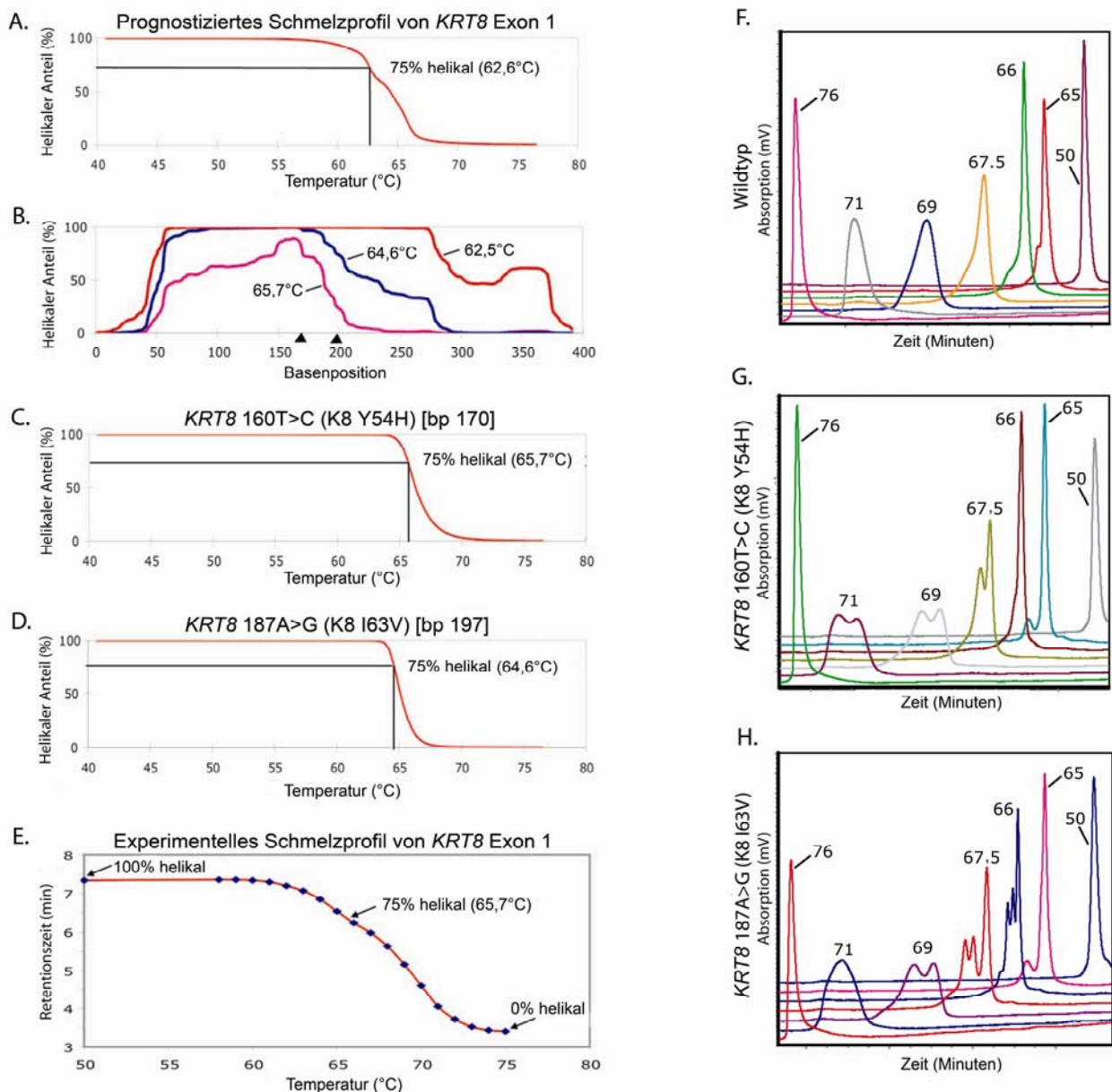


Abb. 4.1: Analyse der Varianten von Keratin 8 Exon 1. **A, B:** Dargestellt ist der von der Software berechnete helikale Anteil von *KRT8* Exon 1 über ein Temperaturspektrum (A) und bei drei ausgewählten Temperaturen (B). Dreiecke in Grafik B markieren die Position der Varianten K8 Y54H (linkes Dreieck an Basenposition 170) und K8 I63V (rechtes Dreieck an Basenposition 197). **C, D:** Prozentualer Anteil der helikalen Fraktion in unmittelbarer Nähe der Varianten K8 Y54H (C) und K8 I63V (D) über ein Temperaturspektrum entsprechend der Kalkulation der Software. **E:** Die experimentelle Schmelzkurve wurde nach DHPLC-Analyse des amplifizierten Exon 1 von humanem Wildtyp-K8 erstellt. Bei 50°C liegt die DNA zu 100% helikal vor. Mit dem Anstieg von Temperatur und Denaturierungsgrad sinkt der helikale DNA-Anteil stetig ab, so dass bei 75°C komplett denaturierte DNA vorliegt (0% helikal). Die Elutionszeit (Retentionszeit) verkürzt sich entsprechend. Im Bereich von 58-75°C sind 1°C-Abstufungen der Schmelzkurve angegeben. Dieses experimentell ermittelte Profil prognostiziert eine um circa 3°C höhere Schmelzkurve als die von der Software generierte Schmelzkurve (A). **F-H:** Chromatogramme von humanem K8-Wildtyp (F) und heterozygoten Varianten K8-Y54H (G) und K8-I63V (H) nach DHPLC-Analyse von amplifiziertem genomischen Material über eine Temperaturspanne von 50 bis 76°C. Die Identifikation von K8 Y54H und K8 I63V war erst bei höheren als den softwareberechneten Temperaturen möglich: 67,5-71°C (G) statt 65,7°C (C) bzw. 66-69°C (H) statt 64,6°C (D). Die Positionierung der Keratin-8-Varianten basiert auf der Referenzsequenz NM 002273.2.

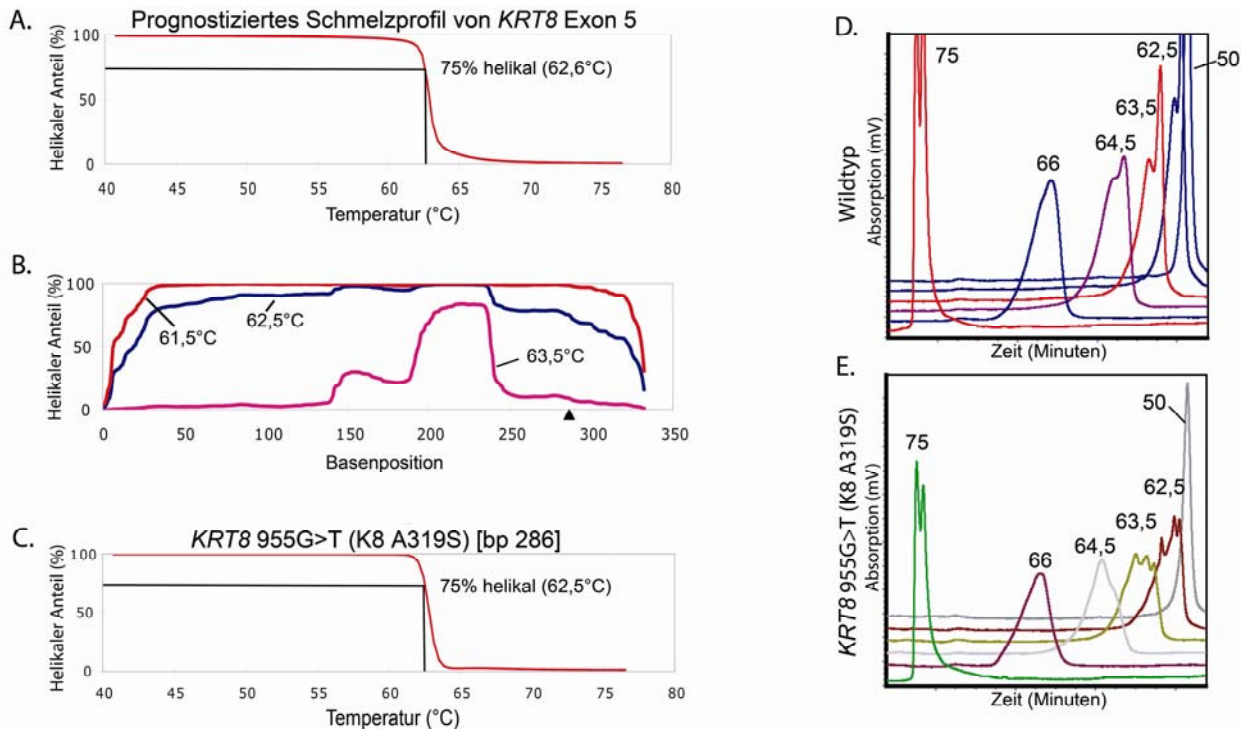


Abb. 4.2: Analyse der Varianten von Keratin 8 Exon 5. **A, B:** Die helikale Fraktion von K8 Exon 5 ist über ein Temperaturspektrum (A) und bei drei spezifischen Temperaturen (B) auf der Grundlage der Softwareberechnungen (Wavemaker 4.1.44; Transgenomic, San Jose, CA, USA) dargestellt. Das Dreieck an Basenposition 286 (B) markiert die Lokalisation von K8 A319S. **C:** Die Grafik zeigt die softwaregenerierte Funktion von helikaler Fraktion gegenüber der Analysetemperatur für die DNA-Sequenz um *KRT8* 955G>T (K8 A319S, Referenzsequenz NM 002273.2). **D, E:** Genomische DNA wurde aus Leberexplantaten isoliert, die Wildtyp-K8 oder K8 A319S exprimieren. K8 Exon 5 wurde PCR-amplifiziert und anschließend mittels DHPLC bei den angegebenen Temperaturen zwischen 50-75°C analysiert. Im Chromatogramm zeigte die K8-A319S-Variante einen charakteristischen double peak bei 62,5 und 63,5°C (E) im Vergleich zum Wildtyp (D). Sie konnte daher bei der von der Software kalkulierten Temperatur von 62,5°C (C) identifiziert werden.

Die Softwareberechnungen können durch das Erstellen einer empirischen Schmelzkurve überprüft werden. Sie basiert auf den Beobachtungen, dass sich die Elutionszeit der DNA (entspricht der Retentionszeit von Hetero- und Homoduplexen in der Trennsäule) linear mit dem steigenden Denaturierungsgrad verkürzt. Die DNA liegt bei 50°C gar nicht (100% helikale DNA) und bei 75°C vollständig (0% helikale DNA) denaturiert vor. Abb. 4.1 E demonstriert ein experimentelles Schmelzprofil für *KRT8* Exon 1. Es entsteht durch Messungen des helikalen Anteils über ein Temperaturspektrum von 50-75°C mit 1°C-Diskriminierung im kritischen Bereich. Für *KRT8* Exon 1 ergab es eine optimale 75%-helikale Auflösung bei einer ca. 3°C höheren Analysetemperatur als von der Software berechnet: 65,7°C (Abb. 4.1 E) *versus* 62,2°C (Abb. 4.1 A). Um die Präzision der berechneten und empirisch ermittelten Schmelztemperaturen zu überprüfen, wurden die einzelnen Varianten über ein Temperaturspektrum analysiert (Abb. 4.1 G, H; 4.2 E).

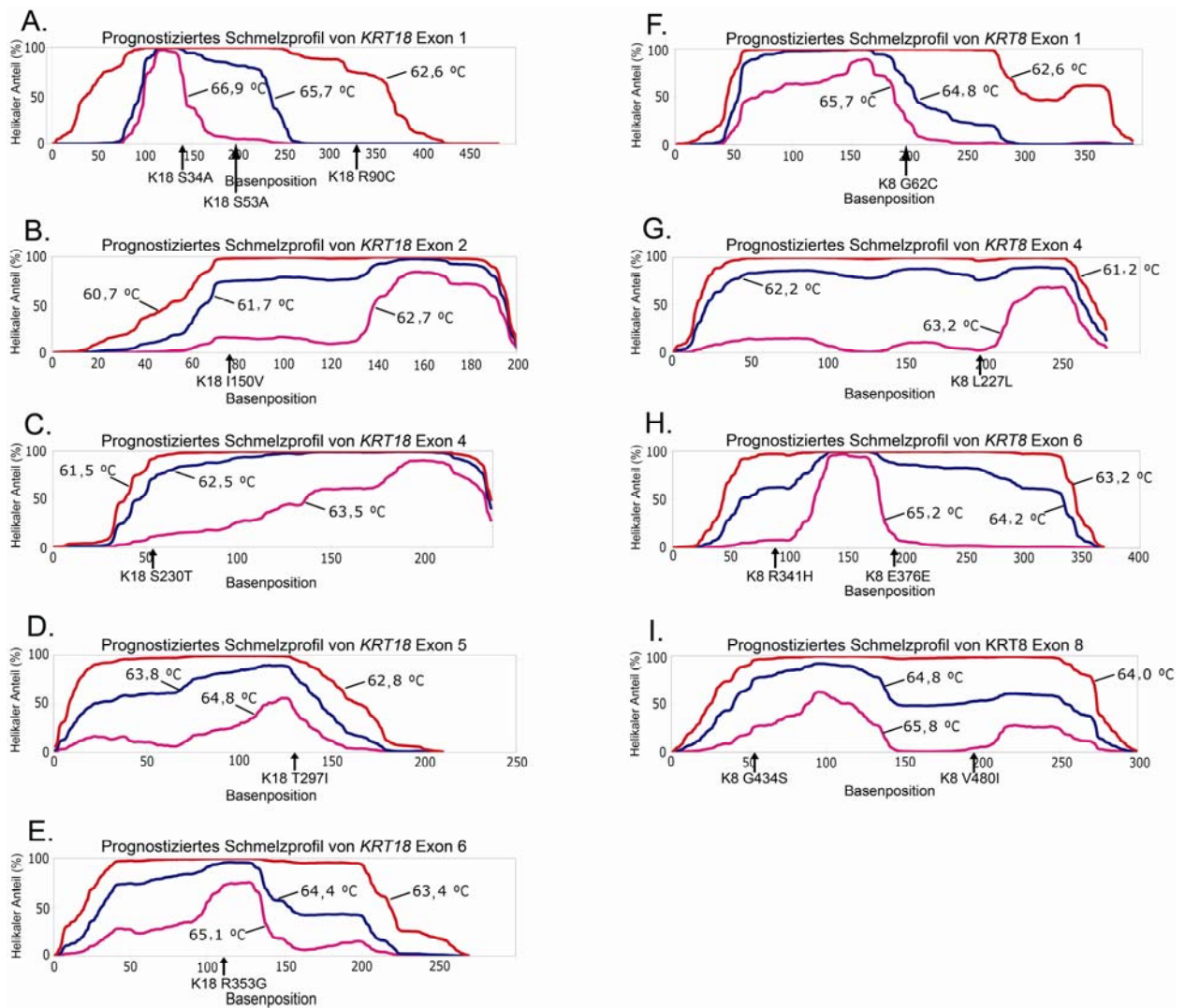


Abb. 4.3: Prognostizierte Schmelzprofile analysierter *KRT8/18*-Exone. Insgesamt wurden 16 heterozygote Varianten in je 5 Exonen von *KRT8* und *KRT18* analysiert, davon sieben Varianten in *KRT18* und neun in *KRT8*. **A-I:** Dargestellt ist die helikale Fraktion bei drei spezifischen Temperaturen der Amplifikate von *KRT18* Exon 1, 2, 4, 5, 6 (**A-E**) und *KRT8* Exon 1, 4, 6 und 8 (**F-I**) inklusive der Position getesteter Varianten (NM 002273.2 [*KRT8*] und NM 000224.2 [*KRT18*]). Siehe Abb. 5.1 A, B und 5.2 A, B für die fehlenden Varianten K8 Y54H, I63V und K8 A319S und Schmelzkurven von *KRT8* Exon 5. Die Schmelzprofile wurden mit der Software Wavemaker 4.1.44 (Transgenomic) berechnet.

Die *KRT8* 955Guanin→Thymin-Substitution (K8 Alanin319→Serin) imponierte als gespaltener Doppel-Peak bei 62,5 und 63,5°C (Abb. 4.2 E), der sich deutlich von dem einfachen Peak mit Absatz („Schulter“) des K8-Wildtyps bei 62,5 bis 64,5°C (Abb. 4.2 D) unterschied. In diesem Fall war die von der Software vorgeschlagene Temperatur (62,5°C; Abb. 4.2 C) für die Detektion dieser Variante gut geeignet. Je nach Analysetemperatur und spezifischen Eigenschaften der einzelnen Varianten können sie aber auch andere Formen außer einem Doppel-Peak präsentieren (Xiao und Oefner, 2001). Bei höheren Temperaturen fallen z.B. viele Varianten in Form „verschobener“ Einzel-Peaks im Vergleich zum Wildtyp auf (Abb. 4.7 A). Für die Identifikation

von Sequenzvarianten ist daher insbesondere auf die Kontinuität von Peak-Muster und Elutionszeit der Amplifikate eines Exons zu achten. Im Gegensatz zu der K8 A319S-Variante in Exon 5 wichen die zur Analyse der K8-Varianten Y54H und I63V notwendigen Temperaturen deutlich von den vorgeschlagenen Analysetemperaturen ab (Tab. 4.1). Die *KRT8* 160T>C (K8 Y54H)-Mutation trat unverkennbar im Bereich 67,5-69°C in Erscheinung und war bis 71°C zu identifizieren (Abb. 4.1 G) vs. der prognostizierten 65,7°C (Abb. 4.1 C). Die optimale Auflösung der *KRT8* 187A>G-Substitution (K8 I63V) wurde im Bereich 66-67,5°C erzielt (Abb. 4.1 H) vs. der vorhergesagten 64,6°C (Abb. 4.1 D). Sowohl die K8 Y54H- als auch die K8 I63V-Variante konnten also nicht zuverlässig bei den softwaregenerierten 65,7°C bzw. 64,6°C erkannt werden, jedoch bildeten sie bei 2-4°C höheren Temperaturen einen charakteristischen Doppel-Peak (Abb. 4.1 G, H) aus. Tabelle 4.1 fasst die Ergebnisse der Analyse von insgesamt 16 verschiedenen *KRT8/18*-Sequenzvarianten zusammen. Die Varianten schlossen die bei humanen Lebererkrankungen am häufigsten vorkommenden und potentiell biologisch relevanten Mutationen in zehn verschiedenen Exonen, die als Mutationsschwerpunkte beschrieben wurden, ein (Abb. 3.1).

Tabelle 4.1: Vergleich der softwaregenerierten und empirisch ermittelten optimalen Analysetemperaturen in ausgewählten *KRT8/18*-Exonen

Gen	Exon	Varianten		Prognostizierte Temperatur (°C) ^a	Optimale Temperatur(°C) ^b
		Nukleotide	Aminosäure		
<i>KRT8</i>	E1	160T→C	Y54H	65,7*	68
		184G→T	G62C	64,8*	68
		187A→G	I63V	64,6*	68
	E4	681A→G	L227L	62,2	61,5
	E5	955G→T	A319S	62,5	63,5
	E6	1022G→A	R341H	64*	65,7
		1128G→A	E376E	64,3	65,7
		1300G→A	G434S	64,8	64,8
	E8	1438G→A	V480I	64,6	64,8
<i>KRT18</i>	E1	100A→G; 101G→C	S34A	66,9	69
		157A→G; 158G→C	S53A	65,7*	69
		268C→T	R90C	62,6*	64
	E2	448A→G	I150V	61,7	61,5
	E4	689G→C	S230T	62,5	62,5
	E5	890C→T	T297I	63,8	62,6
	E6	1057C→G	R353G	65,1	66

^aDie prognostizierten Temperaturen wurden von der Software Wavemaker, Version 4.1.44 (Transgenomic, San Jose, CA, USA) kalkuliert. ^bAls optimale Analysetemperaturen wurden die Temperaturen bezeichnet, die eine eindeutige Diskriminierung zwischen Wildtyp und Variante zuließen. *Diese Varianten konnten nicht zuverlässig erkannt werden bei der prognostizierten Temperatur. Insgesamt wurden 16 kodierende Varianten in fünf Exonen von *KRT8* (Abb. 3.2) und von *KRT18* (Abb. 3.3) untersucht. Die Positionierung erfolgte auf der Grundlage der Sequenzen NM 002273.2 (*KRT8*) und NM 000224.2 (*KRT18*), beginnend mit +1 als A des ATG-Startkodons.

KRT8 Exon 1, 6 und *KRT18* Exon 1 zeigten die größte Diskrepanz zwischen den vom Programm vorhergesagten und den für die Identifikation tatsächlich notwendigen Temperaturen (Tab. 4.1). Die optimalen Detektionstemperaturen von K8 R341H in Exon 6 (Abb. 4.3 H), von K8 G62C (Abb. 4.3 F), Y54H und I63V (Abb. 4.1 B) in Exon 1 und von K18 S53A und R90C (Abb. 4.3 A) wichen um bis zu 3,4°C von den Softwarekalkulationen ab (Tab. 4.1). Alle diese Varianten konnten bei den softwareberechneten Analysetemperaturen nicht sicher identifiziert werden. Die übrigen sieben Exone wiesen eine weitestgehende Übereinstimmung der prognostizierten und empirisch festgestellten Temperaturen auf und waren zuverlässig bei den berechneten Temperaturen zu erkennen. (Tab. 4.1; Abb. 4.3).

4.1.2 Validierung der optimierten DHPLC-Analysebedingungen durch Re-Analyse einer Subkohorte deutscher Patienten mit Lebererkrankungen

Drei der zehn analysierten Exone ließen eine große Diskrepanz zwischen den prognostizierten und den tatsächlich notwendigen Schmelztemperaturen erkennen (Tab. 4.1) mit potentiell schwerwiegenden Konsequenzen für die Sensitivität der DHPLC zur Identifikation von K8/18-Varianten. Um diese Beobachtung zu überprüfen, wurde die genomische DNA von 151 der 256 deutschen Patienten mit Lebererkrankung unterschiedlicher Genese (Hesse *et al.*, 2004) erneut auf das Vorliegen von Keratinvarianten analysiert. Bei diesen Patienten waren zuvor – ebenso wie bei 100 Kontrollpatienten – keine aminosäuresubstituierenden K8/18-Varianten unter Anwendung eines identischen DHPLC-Analysesystems gefunden worden. Aufgrund der begrenzten Menge verfügbarer genomischer DNA konzentrierte sich unsere Analyse auf die Exone 1 und 6 von *KRT8*, da in diesen die drei häufigsten Varianten (K8 R341H, G62C, Y54H) lokalisiert sind, die potentielle pathophysiologische Relevanz bei Patienten mit Lebererkrankungen besitzen (Ku *et al.*, 2005). Eine Analyse der potentiellen genetischen Assoziation mit dem Schweregrad der Lebererkrankung konnte nicht durchgeführt werden, da keine Angaben zu der Leberhistologie der Patienten vorlagen. Ziel dieser Untersuchung war in erster Linie die Validierung der modifizierten DHPLC-Methodik. Unter Anwendung der optimierten Analysebedingungen und Temperaturen wurden 12 exonische und zwei intronische heterozygote K8-Varianten in den re-analysierten Patienten entdeckt: eine K8 G62C, zwei K8 I63V, sieben K8 R341H, eine stille K8 E376E und eine neue K8 V380I, sowie zwei intronische *KRT8* IVS6+46A→T (Tab.4.2). Alle Varianten wurden durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Die bisher nicht beschriebene heterozygote Variante *KRT8* 1138G→A (K8 Valin380→Isoleuzin) wurde durch Bildung eines Doppel-Peaks im Chromatogramm (Abb. 4.4 C) und anschließende DNA-Sequenzierung (Abb. 4.4 D) identifiziert.

Tabelle 4.2: Ergebnisse der Re-Analyse und ursprüngliche Daten von Hesse *et al.*, 2004

Gen	Abschnitt	Varianten		Anzahl der Varianten (%)	
		Nukleotide	Aminosäure	Eigene Analyse	Hesse <i>et al.</i> , 2004
KRT8	Exon 1	184G→T	G62C	1 (0,7%)	0
		187A→G	I63V	2 (1,3%)	0
	Exon 4	740A→G	L227L	nicht analysiert	138 (54%)
	Exon 6	1022G→A	R341H	7 (4,6%)	0
		1128G→A	E376E	1 (0,7%)	0
		1138G→A	V380I \diamond	1 (0,7%)	0
IVS 6	1202+46A→T	intronisch	2 (1,3%)	0	
KRT18	IVS 1	418-4C→G	intronisch	nicht analysiert	1 (0,4%)
Aminosäuresubstituierende Varianten (%)				11 (7,3%)	0
Stille exonische Varianten (%)				1 (0,7%)	138 (54%)
Intronische Varianten (%)				2 (1,3%)	1 (0,4%)
Analysierte Exone				KRT8 Exon 1, 6	KRT8/18 komplett
Anzahl der Patienten				151	256

Zusammenfassung der identifizierten exonischen und intronischen *KRT8/18*-Varianten in einer Kohorte deutscher Patienten mit chronischen Lebererkrankungen. Die ursprüngliche Studie von Hesse *et al.* (2004) umfasste 256 Patienten mit kompletter Analyse von *KRT8/18*. Für die eigene Re-Analyse lag genomische DNA von 151 Patienten vor. Amplifiziert und analysiert wurden *KRT8* Exon 1 und 6 mit angrenzenden intronischen Regionen. \diamond Neue, bislang nicht charakterisierte Variante.

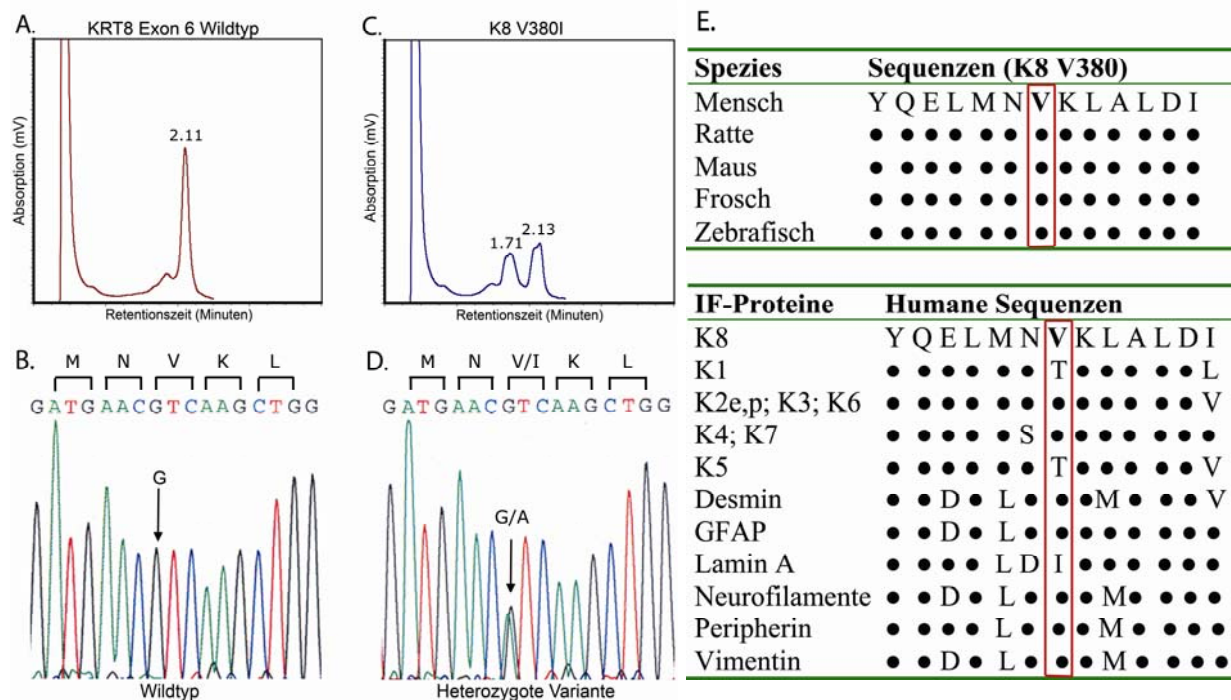


Abb. 4.4: Analyse von *KRT8* 1138G→A (K8 V380I). A, C: Das DHPLC-Elutionsmuster zeigt die für Präsenz einer Sequenzvariante charakteristische Doppel-Peak-Formation (C) im Vergleich zum Wildtyp (A). B, D: Die DNA-Sequenzierung offenbarte das Vorliegen einer heterozygoten K8-V380I-Variante (D) durch Mutation des Kodons GTC (Valin) zu ATC (Isoleuzin) im Vergleich zum Wildtyp (B). E: Die Aminosäure K8 V380 ist hoch konserviert in verschiedenen Spezies und weitestgehend konserviert in verschiedenen Typ-II-Keratinen und zyttoplasmatischen IF-Proteinen.

Der biologische Einfluss der K8 V380I-Variante ist unbekannt, jedoch ist Valin an Position 380 in K8 über Speziesgrenzen hinweg und in allen Typ II-Keratinen (außer K1 und K5) und in anderen zytoplasmatischen IF-Proteinen (Abb. 4.4 E) hoch konserviert. In der ursprünglichen Untersuchung von Hesse *et al.* wurden keine aminosäureverändernden Varianten identifiziert. Allerdings wurde ein bekannter, stiller und häufig vorkommender *KRT8* 740A→G (K8 L227L)-Polymorphismus in Exon 4 detektiert. 54% der Patienten waren heterozygot, 26% homozygot für CTG und 20% homozygot für CTA (Hesse *et al.*, 2004). Dieser stille Polymorphismus wurde ebenfalls regelmäßig und häufig in den weiteren Untersuchungen dieser Arbeit gefunden (Abs. 4.2.2), allerdings ist eine biologische Signifikanz unwahrscheinlich. Um zu eruieren, ob die Auswahl der Primer die Erkennung der Varianten beeinträchtigte, haben wir Primer für *KRT8* Exon 6 nach den Angaben von Hesse *et al.* (2004) entworfen (Tab. 3.2). Sie amplifizierten ein etwa 5-10 bp kürzeres Fragment als die eigenen Primer, jedoch waren auch Varianten innerhalb dieser Amplifikate gut zu identifizieren. Um zu prüfen, ob weitere Unterschiede in der experimentellen Anwendung zu den diskrepanten Ergebnissen beigetragen haben könnten, haben wir nach Beschreibung von Hesse *et al.* heterozygote Varianten mit Wildtyp-Proben gemischt und die Hybridisierung der Allele ermöglicht. Auch unter diesen Analysebedingungen konnten die K8-Varianten zuverlässig identifiziert werden. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass zuvor nicht detektierte Keratinvarianten in der Kohorte von Hesse *et al.* (2004) vorhanden sind und bei deutschen Patienten in ähnlicher Häufigkeit vorkommen wie bei amerikanischen Patienten mit Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologie (Ku *et al.*, 2005). Die DHPLC stellt eine zuverlässige Methode zur Mutationsdetektion dar, allerdings hat die Auswahl der Analysetemperaturen entscheidenden Einfluss auf die Fähigkeit der DHPLC, *KRT8/18*-Sequenzvarianten zu erkennen. Der Einsatz von bekannten heterozygoten Keratinvarianten als Positivkontrollen bietet eine effektive Möglichkeit zur Überprüfung softwareberechneter Schmelzprofile und zur Generierung experimenteller Schmelzprofile.

4.2 Analyse deutscher Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion

4.2.1 Charakteristika der Patientenkohorte

Insgesamt wurden 329 Patienten mit CHC in die Auswertung aufgenommen (Abs. 3.1.2.1). Etwa 97% (319/329) der Patienten waren Kaukasier, davon 87% (278/319) deutscher Abstammung. Zwei Patienten (0,6%) waren afroamerikanischer und acht Patienten (2,4%) asiatischer Herkunft (Tab. 4.5). Die Kohorte bestand zu 62% aus Männern, das Durchschnittsalter betrug 46,8 (\pm 13,0) Jahre und die mittlere Erkrankungsdauer 13,7 (\pm 9,1) Jahre. Signifikant erhöhter Alkoholkonsum (Frauen >20 g/d, Männer >60 g/d) wurde bei 21% der Patienten festgestellt (Tab. 4.3).

Tabelle 4.3: Charakteristika von 329 Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion

Charakteristika	Gesamt
Patienten, n (%)	329 (100%)
Geschlecht, m/w, n (%)	205 (62%)/124 (38%)
Alter, $x_m \pm s$ (Jahre)	46,8 \pm 13,0
BMI, $x_m \pm s$	25,3 \pm 4,2
Alkoholkonsum, ja/nein*	69/260 (21%)
Erkrankungsdauer, $x_m \pm s$ (Jahre)**	13,7 \pm 9,1

BMI, body mass index = Körpergewicht (kg)/Länge (m)² [normal 20-25 kg/m²]; m, männlich; w, weiblich; n, Fallzahl; x_m , arithmetischer Mittelwert; s, Standardabweichung. * Erhöhter Alkoholkonsum ist >20 g/d für Frauen und >60 g/d für Männer. ** Dauer der Erkrankung war nicht bekannt bei 30 Patienten.

Tabelle 4.4: HCV-Genotypen und Leberhistologie von 329 CHC-Patienten

Charakteristika	Patienten, n (%) [N = 329]
Viraler Genotyp	
1	243 (74%)
2	9 (3%)
3	67 (20%)
1 + 3	2 (1%)
Unbekannt	8 (2%)
Fibrorestadium (Staging)	
1	108 (33%)
2	98 (30%)
3	45 (14%)
4	78 (23%)
Entzündungsaktivität (Grading)	
0	21 (7%)
1	131 (40%)
2	135 (41%)
3	30 (9%)
4	4 (1%)
Unbekannt	8 (2%)

Die Klassifizierung der Leberhistologie erfolgte nach der Methode von Ludwig, 1993 (Tab. 3.1)

Die Mehrheit der Patienten war mit dem in Europa am häufigsten auftretenden HCV-Genotyp 1 (74%) infiziert, gefolgt von einer Infektion mit HCV-Genotyp 3 bei 20% der Patienten (Tab. 4.4). Die Mehrheit der Patienten (88%) zeigte milde bis moderate Entzündungsaktivität (Grad 0-2). Bei 37% der Patienten wurde eine fortgeschrittene Leberfibrose bzw. Leberzirrhose (Fibrosestadium 3-4) diagnostiziert (Tab. 4.4).

4.2.2 Charakterisierung der exonischen *KRT8/18*-Varianten

Die 329 Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion wurden mittels optimierter DHPLC-Analyse (Abs. 4.1) auf K8/18-Varianten untersucht. In dieser Population konnten insgesamt acht heterozygote *KRT8*-Varianten und eine heterozygote *KRT18*-Variante nachgewiesen werden (Tab. 4.6, 4.7; Abb. 5.1), die zu einem Aminosäureaustausch bei insgesamt 24 von 329 Patienten (7,3%) führten. Der häufige, stille K8 L227L-Polymorphismus in Exon 4, der aus früheren Studien (Hesse *et al.*, 2004; Ku *et al.*, 2005) bekannt ist, wurde bei 168/329 (51%) der Patienten beobachtet. Er wurde nicht weiter analysiert, da er zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz führt und frühere Studienergebnisse keine biologische Signifikanz erkennen ließen. Unter den 9 aminosäuresubstituierenden Varianten waren drei neue, bisher nicht beschriebene *KRT8*-Polymorphismen: Threonin26→Arginin (Abb. 4.5), Glyzin55→Alanin und Alanin359→Threonin. Der Grad der Konservierung der Mutationsstelle in verschiedenen Spezies und innerhalb der humanen Typ II-Keratine weist auf die potentielle biologische Relevanz der neuen Keratinvarianten hin. Zum Vergleich sind die bereits bekannten Varianten K8 Y54H, G62C und I63V in unmittelbarer Umgebung ebenfalls aufgeführt (Abb. 4.6).

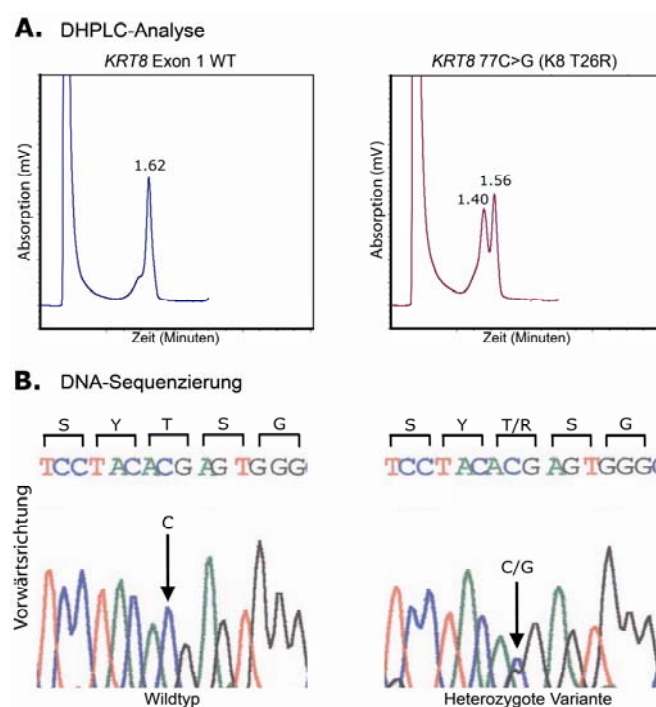


Abb. 4.5: Identifikation der exonischen, heterozygoten K8 T26R-Mutation. **A:** Im Chromatogramm führte der Basenaustausch zu einem Doppel-Peak-Muster mit Verkürzung der Retentionszeit im Vergleich zum K8-Wildtyp. **B:** Die Ergebnisse der anschließenden DNA-Sequenzierung veranschaulichen die heterozygote Natur der Mutation durch Überlagerung von Wildtyp- und mutierter Allelsequenz. Der Basenaustausch des Kodons ACG zu AGG bewirkte die Substitution von Threonin durch Arginin. WT, Wildtyp.

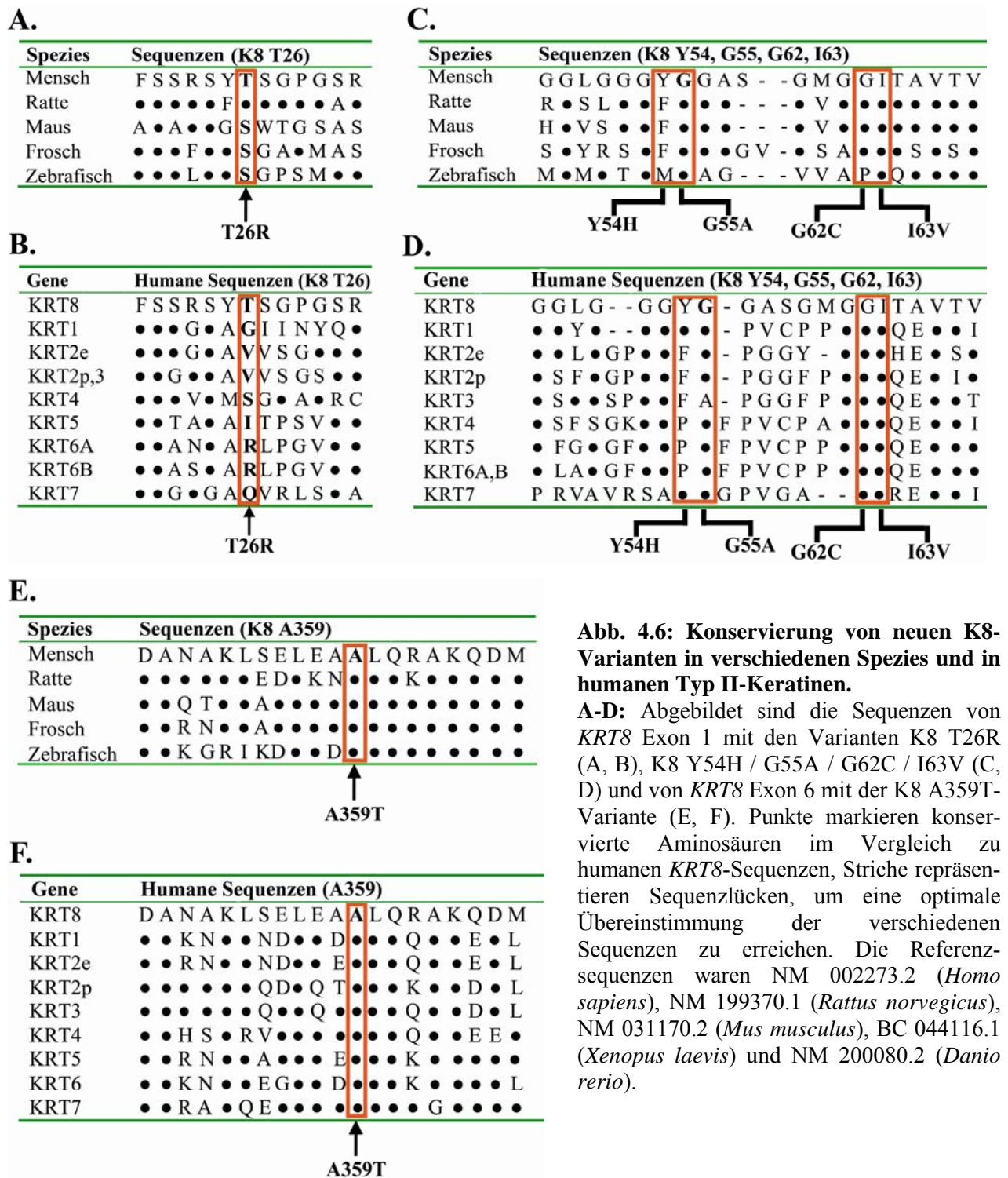


Abb. 4.6: Konservierung von neuen K8-Varianten in verschiedenen Spezies und in humanen Typ II-Keratinen.

A-D: Abgebildet sind die Sequenzen von *KRT8* Exon 1 mit den Varianten K8 T26R (A, B), K8 Y54H / G55A / G62C / I63V (C, D) und von *KRT8* Exon 6 mit der K8 A359T-Variante (E, F). Punkte markieren konservierte Aminosäuren im Vergleich zu humanen *KRT8*-Sequenzen, Striche repräsentieren Sequenzlücken, um eine optimale Übereinstimmung der verschiedenen Sequenzen zu erreichen. Die Referenzsequenzen waren NM 002273.2 (*Homo sapiens*), NM 199370.1 (*Rattus norvegicus*), NM 031170.2 (*Mus musculus*), BC 044116.1 (*Xenopus laevis*) und NM 200080.2 (*Danio rerio*).

Der Grad der Konservierung wurde in den Spezies Ratte (*Rattus norvegicus*, NM 199370.1), Maus (*Mus musculus*, NM 031170.2), Frosch (*Xenopus laevis*, BC 044116.1) und Zebrafisch (*Danio rerio*, NM 200080.2) verglichen. Insbesondere die Aminosäuren G55, G62, I63 (Abb. 4.6 C, D) und A359 (Abb. 4.6 E, F) weisen einen hohen Konservierungsgrad zwischen den verschiedenen Spezies und humanen Keratinen Typ II auf, während die Sequenzen um K8 T26 und Y54 stärkerer Variabilität unterliegen (Abb. 4.6 A-D). Die häufigsten heterozygoten, kodierenden

Keratinvarianten in dieser Patientenkohorte waren die K8 Arginin341→Histidin-Mutation (K8 R341H), die bei zehn Patienten identifiziert worden war, gefolgt von K8 Glyzin62→Zystein (K8 G62C) bei sechs Patienten und K8 Isoleuzin63→Valin (K8 I63V) bei vier Patienten (Tab 4.6, 4.7). Die einzige identifizierte Tyrosin54→Histidin-Mutation von Keratin 8 (K8 Y54H) trat bei einem in Deutschland stationierten Angehörigen der US-Armee afroamerikanischen Ursprungs auf (Tab. 4.5). Die neue Variante K8 G55A wurde bei einem von drei Kaukasiern griechischer Herkunft entdeckt. Mit 85% (278/329) der Patienten stellten Kaukasier deutscher Abstammung die große ethnische Mehrheit dar, in der auch die meisten Varianten entdeckt wurden (Tab. 4.5).

Tabelle 4.5: Ethnizität der Patienten und Verteilung exonischer Keratinvarianten

Ethnizität	#	Anzahl der Varianten n (%)								
		K8								K18
		T26R	Y54H	G55A	G62C	I63V	A319S	R341H	A359T	S230T
Afroamerikaner	2		1 (50)		1 (50)					
Amerikanischer Kaukasier	5									1 (20)
Arabischer Asiate	3									
Kroatischer Kaukasier	1									
Tschechischer Kaukasier	1						1 [1]* (100)	1 [1]* (100)		
Englischer Kaukasier	1									
Deutscher Kaukasier	278	1 (0,4)			5 (1,8)	4 [1] (1,4)	1 [1] (0,4)	8 [2] (2,9)	1 [1] (0,4)	1 [1] (0,4)
Griechischer Kaukasier	3			1 (33,3)						
Indischer Asiate	1									
Italienischer Kaukasier	1									
Portugiesischer Kaukasier	1									
Rumänischer Kaukasier	1									
Russischer Kaukasier	15									
Spanischer Kaukasier	2									
Türkischer Kaukasier	10							1 (0,1)		
Vietnamesischer Asiate	4									
Insgesamt	329	1 (0,3)	1 (0,3)	1 (0,3)	6 (1,8)	4 [1] (1,2)	2 [2] (0,6)	10 [3] (3,0)	1 [1] (0,3)	2 [1] (0,6)

Anzahl der Patienten; * Eckige Klammern geben die Anzahl der Compound-Varianten an. Die Abkürzung der Aminosäuren erfolgte nach der Einzelbuchstaben-Nomenklatur (Jones, 1999).

Tabelle 4.6: Verteilung exonischer Keratinvarianten in Abhängigkeit vom Leberfibrosestadium (Staging 1-4)

Gen	Varianten		Fibrose (Anzahl der Patienten)				Varianten insgesamt
	Nukleotide	Aminosäure	1 (108)	2 (98)	3 (45)	4 (78)	
KRT8	77C→G	T26R†	0	0	0	1	1
	160T→C	Y54H	0	0	1	0	1
	164G→C	G55A†	0	0	1	0	1
	184G→T	G62C	1	2	0	3	6
	187A→G	I63V	0	0	0	4 [1]*	4 [1]
	955G→T	A319S	1 [1]	0	0	1 [1]	2 [2]
	1022G→A	R341H	3 [1]	2 [1]	1	4 [1]	10 [3]
	1075G→A	A359T†	0	1 [1]	0	0	1 [1]
KRT18	689G→C	S230T	0	0	0	2 [1]	2 [1]
Anzahl der Patienten mit exonischen Varianten (%)			4 (3,7%)	4 (4,1%)	3 (6,7%)	13 (16,7%)	24 (7,3%)

Die Tabelle fasst die Anzahl der Patienten für jede aminosäuresubstituierende, exonische Keratinvariante in Abhängigkeit vom Leberfibrosestadium zusammen. Die Lokalisation der K8- und K18-Varianten basiert auf den mRNA-Sequenzen NM 002273.2 bzw. NM 000224.2. Die Nummerierung der Aminosäuren schließt das Startkodon ein. *Eckige Klammern geben die Anzahl der Compound-Varianten an. †Neue, bisher nicht beschriebene Varianten.

Tabelle 4.7: Verteilung exonischer Keratinvarianten in Abhängigkeit vom Grad der Entzündungsaktivität (Grading 0-4)

Gen	Varianten		Entzündung (Anzahl der Patienten)					Varianten insgesamt
	Nukleotide	Aminosäure	0 (21)	1 (131)	2 (135)	3 (30)	4 (4)	
KRT8	77C→G	T26R†	0	1	0	0	0	1
	160T→C	Y54H	0	0	1	0	0	1
	164G→C	G55A†	0	0	1	0	0	1
	184G→T	G62C	0	2	3	1	0	6
	187A→G	I63V	0	1	3 [1]*	0	0	4 [1]
	955G→T	A319S	0	1 [1]	0	0	0	1 [1]
	1022G→A	R341H	0	3 [1]	3	2	1 [1]	9 [2]‡
	1075G→A	A359T†	0	0	0	0	1 [1]	1 [1]
KRT18	689G→C	S230T	0	1	1 [1]	0	0	2 [1]
Anzahl der Patienten mit exonischen Varianten (%)			0 (0%)	8 (6,1%)	11 (8,1%)	3 (10%)	1 (25%)	23 (7,2%)

Die Tabelle fasst die Anzahl der Patienten für jede aminosäuresubstituierende, exonische Keratinvariante in Abhängigkeit von der Entzündungsaktivität zusammen. Die Lokalisation der K8- und K18-Varianten basiert auf den mRNA-Sequenzen NM 002273.2 bzw. NM 000224. Die Nummerierung der Aminosäuren schließt das Startkodon ein. *Eckige Klammern geben die Anzahl der Compound-Varianten an. †Neue, bisher nicht beschriebene Variante. ‡Bei einem Patienten mit K8 R341H-Mutation existierten keine Angaben zu dem Entzündungsgrad. Er wurde daher nicht in die Tabelle aufgenommen.

Insgesamt waren 20 Patienten Träger einer singulären Mutation und vier Patienten Träger von compound-heterozygoten Varianten, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führten. Der einzige tschechische Kaukasier der Kohorte trug eine K8 A319S+R341H-Compound-Variante. Eine weitere K8 A319S+R341H- sowie eine K8 R341H+A359T- und eine K8 I63V+K18 S230T-Variante wurden bei deutschen Kaukasiern identifiziert (Tab 4.5). In Tabelle 4.6 und 4.7 ist die Verteilung der aminosäuresubstituierenden exonischen K8/18-Varianten in Abhängigkeit von den Ergebnissen der Leberhistologie der 329 deutschen Patienten mit CHC aufgeführt.

4.2.3 Charakterisierung der nicht kodierenden *KRT8/18*-Varianten

Zusätzlich zu den beschriebenen exonischen Keratinvarianten wurden neun heterozygote Polymorphismen in nicht kodierenden Sequenzen bei insgesamt 26 Patienten (7,9%) identifiziert. Diese wurden in der intronischen Sequenz, Promoter oder 3'- nicht translatierten Region von *KRT8/18* erfasst (Tab. 4.8, 4.9; Abb. 5.1). Zwei dieser nicht kodierenden Varianten sind bereits früher beschrieben worden: *KRT8* IVS7+10delC, eine nicht kodierende Deletion, die zehn Nukleotide „downstream“ vom 3'-Ende von Exon 7 in der intronischen Zwischensequenz („intervening sequence“, IVS) 7 liegt (Lee *et al.*, 2002) und *KRT18* IVS1-4C→G, ein nicht kodierender Basenaustausch, der vier Nukleotide „upstream“ vom 5'-Ende von *KRT18* Exon 2 in der intronischen Zwischensequenz 1 lokalisiert ist (Hesse *et al.*, 2004). Die übrigen nicht kodierenden Varianten sind als Teil dieser Untersuchung erstmals beschrieben worden bzw. bei der Re-Analyse der Kohorte von Hesse *et al.* (2004) entdeckt worden (Tab. 4.2). Die Identifikation der nicht kodierenden Varianten in der DHPLC-Analyse und anschließenden DNA-Sequenzierung wird am Beispiel der häufigsten nicht kodierenden Keratinvariante *KRT8* IVS7+10delC (Abb. 4.7) demonstriert. Elf der Patienten waren compound-heterozygot innerhalb der exonischen und nicht kodierenden K8/18-Sequenzen: Zehn Patienten mit K8 R341H plus *KRT8* IVS7+10delC und ein Patient mit K8 G62C plus *KRT18* nt-15C→T. Die häufigste nicht kodierende Keratinvariante *KRT8* IVS7+10delC (Abb. 4.7) trat ausschließlich in Form eines compound-heterozygoten Polymorphismus mit der exonischen Keratinvariante K8 R341H bei insgesamt zehn Patienten auf (Tab. 4.8, 4.9). Nachfolgende Tabellen fassen die Verteilung nicht kodierender Varianten in Abhängigkeit von dem Fibrorestadium (Tab. 4.8) und dem Grad der Entzündungsaktivität (Tab. 4.9) zusammen.

Tabelle 4.8: Verteilung nicht kodierender Keratinvarianten in Abhängigkeit vom Leberfibrosestadium (Staging 1-4)

Gen	Varianten Nukleotide	Fibrose (Anzahl der Patienten)				Genabschnitt	Varianten insgesamt
		1 (108)	2 (98)	3 (45)	4 (78)		
KRT8	IVS6+46A→T	2	1	2	1	Intron	6
	IVS7+10delC	3 [3]*	2 [2]	1 [1]	4 [4]	Intron	10 [10]*
	IVS7+20G→A†	0	1	0	0	Intron	1
	IVS8+8C→T†	1	1	0	0	3'-UTR	2
	IVS8+31C→T†	1	0	0	0	3'-UTR	1
	IVS8+38G→A†	0	0	1	0	3'-UTR	1
KRT18	nt-15C→T†	0	0	0	1 [1]	Promoter	1 [1]
	IVS1-4C→G	2	0	0	0	Intron	2
	IVS2+38G→A†	0	1	0	1	Intron	2
Varianten insgesamt (%)		9 [3] (8,3%)	6 [2] (6,1%)	4 [1] (8,9%)	7 [5] (9,0%)		26 [11] (7,9%)

IVS, intervening sequence (intronsische Zwischensequenz); del, Deletion; UTR, untranslated region; nt, Nukleotid. Die Lokalisierung der *KRT8/18*-Varianten erfolgte entsprechend der genomischen Sequenzen M34482.1 bzw. AF179904.1. *Eckige Klammern geben die Anzahl der Compound-Varianten an. †Neue, bisher nicht beschriebene Varianten.

Tabelle 4.9: Verteilung nicht kodierender Keratinvarianten in Abhängigkeit vom Grad der Entzündungsaktivität (Grading 0-4)

Gen	Varianten Nukleotide	Entzündung (Anzahl der Patienten)					Varianten insgesamt
		0 (21)	1 (131)	2 (135)	3 (30)	4 (4)	
KRT8	IVS6+46A→T	1	2	3	0	0	6
	IVS7+10delC	0	4 [4]*	3 [3]	2 [2]	1 [1]	10 [10]*
	IVS7+20G→A†	0	1	0	0	0	1
	IVS8+8C→T†	0	2	0	0	0	2
	IVS8+31C→T†	0	1	0	0	0	1
	IVS8+38G→A†	0	0	1	0	0	1
KRT18	nt-15C→T†	0	0	1 [1]	0	0	1 [1]
	IVS1-4C→G	1	0	1	0	0	2
	IVS2+38G→A†	0	1	0	1	0	2
Varianten insgesamt (%)		2 (9,5%)	11 [4] (8,4%)	9 [4] (6,7%)	3 [2] (10%)	1 [1] (25%)	26 [11] (7,9%)

IVS, intervening sequence; del, Deletion; UTR, untranslated region; nt, Nukleotid. Die Lokalisierung der *KRT8/18*-Varianten erfolgte entsprechend der genomischen Sequenzen M34482.1 bzw. AF179904.1. *Eckige Klammern geben die Anzahl der Compound-Varianten an. †Neue, bisher nicht beschriebene Varianten.

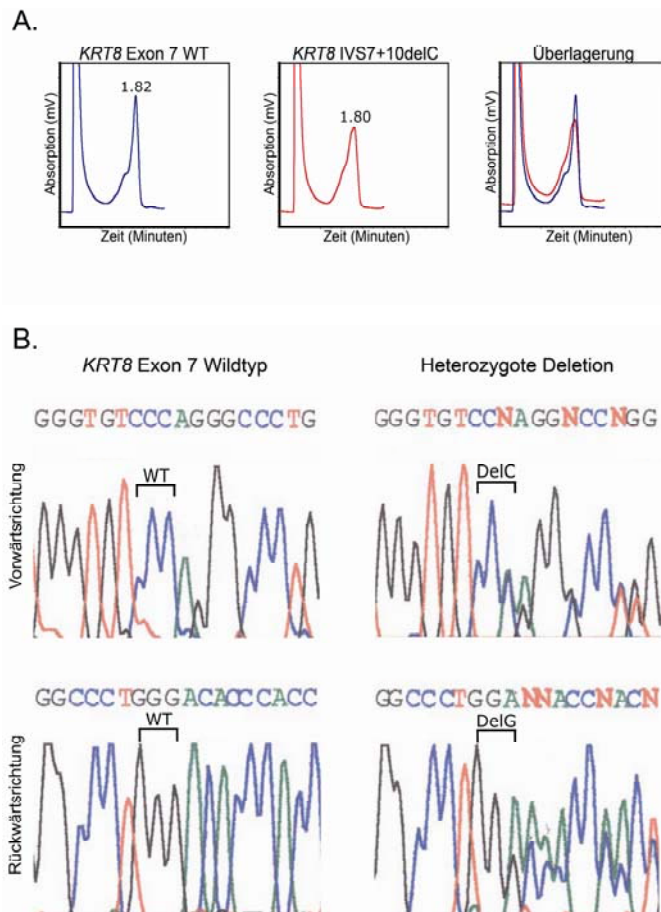


Abb. 4.7: Identifikation der intronischen heterozygoten *KRT8* IVS7+10delC-Variante.

A: In der DHPLC-Analyse präsentierte sich die Variante als zeitlich leicht versetzte Peakformation ohne „Schulter“, die den Wildtyp kennzeichnet. Dadurch hebt sie sich in der Überlagerung beider Chromatogramme deutlich vom Wildtyp ab.

B: Die Vorwärts- und Rückwärtssequenzierung der DNA-Sequenz zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine Deletion, die zehn Nukleotide downstream vom 3'-Ende von Exon 7 in der intronischen Zwischensequenz 7 von *KRT8* liegt. WT, Wildtyp; Del, Deletion.

4.2.4 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mittels univariater und multivariater logistischer Regressionsanalyse mit vorwärts und rückwärts stufenweiser Variablenauswahl nach dem Kriterium der „likelihood-ratio“ ausgewertet. Es wurde einerseits ein Modell für das „outcome“ fortgeschrittene Leberfibrose Stadium 3 oder 4 (Tab. 4.10) und andererseits ein Modell für das Endstadium der Leberfibrose bzw. Leberzirrhose (Tab. 4.11) berechnet. Die Modelle wurden jeweils für Patienten aller Ethnizitäten und für die Subkohorte der deutschen Kaukasier erstellt. Von den unabhängigen Variablen Geschlecht, Alter, Body Mass Index, Alkoholkonsum, Erkrankungsdauer (Tab. 4.3), HCV-Genotyp, Entzündungsaktivität (Tab. 4.4) und Präsenz einer K8/18-Variante (Tab. 4.5) wurden nur solche für die multivariate Modellentwicklung herangezogen, bei denen sich eine Assoziation mit dem Fibroestadium ($p < 0,2$) in der univariaten Regressionsanalyse andeutete. Die univariaten und multivariaten logistischen Regressionsanalysen zeigten, dass die Faktoren Patientenalter, Dauer der Hepatitis C-Erkrankung, gesteigerter Alkoholkonsum und das Vorhandensein einer Keratin 8/18-Variante mit schweren Formen der Leberfibrose (Stadium 3 oder 4) assoziieren (Tab. 4.10; Abb. 4.8 A).

Tabelle 4.10: Ergebnisse der multivariaten logistischen Regressionsanalyse für das „outcome“ fortgeschrittene Leberfibrose (Stadium 3 oder 4)

Variable (Inkrementelle Vergleichseinheit)	Fortgeschrittene Leberfibrose (Stadium 3 oder 4)		
	OR	95%-KI	p-Wert
Alle Ethnizitäten:			
Alter (1 Jahr)	1,06	1,03-1,09	<0,001
Erkrankungsdauer (1 Jahr)	1,1	1,06-1,13	<0,001
Erhöhter Alkoholkonsum (ja:nein)	1,91	0,96-3,8	0,06
K8/18-Variante (ja:nein)	5,7	2,02-16,08	0,001
Deutsche Kaukasier:			
Alter (1 Jahr)	1,05	1,02-1,08	<0,001
Erkrankungsdauer (1 Jahr)	1,08	1,05-1,12	<0,001
Erhöhter Alkoholkonsum (ja:nein)	2,13	1,04-4,36	0,04
K8/18-Variante (ja:nein)	4,39	1,42-13,55	0,01

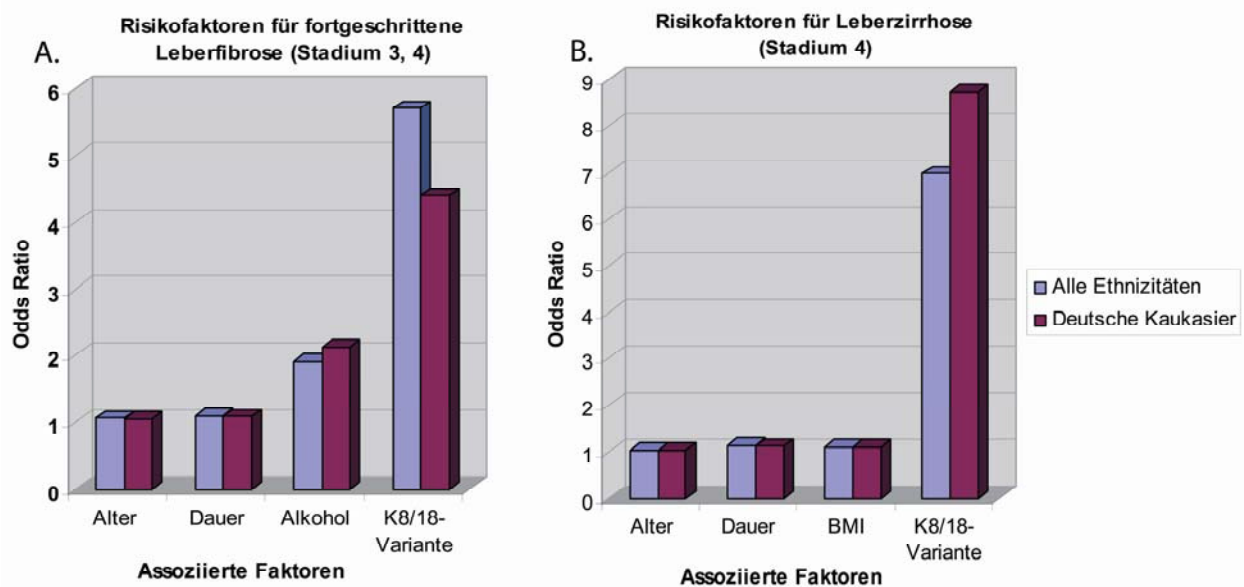
OR, Odds Ratio; KI, Konfidenzintervall. Die Odds Ratios gelten jeweils für die Änderung um eine Einheit in den unabhängigen Variablen (Inkrementelle Vergleichseinheit).

Zunehmendes Alter und Dauer der HCV-Infektion stellen signifikante Risikofaktoren ($p < 0,001$) dar, die mit einem moderat erhöhten Risiko für die Entwicklung eines fortgeschrittenen Leberfibrosestadiums einhergehen (Tab. 4.10; Abb. 4.8 A). Gesteigerter Alkoholkonsum ist mit einem etwa 2-fach erhöhten Risiko für ein fortgeschrittenes Leberfibrosestadium verbunden, allerdings ist das Ergebnis bei Patienten aller Ethnizitäten als Trend zu werten ($p = 0,06$), während es bei den deutschen Kaukasiern signifikant ($p = 0,04$) war (Tab. 4.10). Die multivariate Analyse zeigte darüber hinaus eine hochsignifikante Assoziation von exonischen aminosäuresubstituierenden K8/18-Varianten mit den schwereren Formen der Leberfibrose bei chronischer Hepatitis C-Virusinfektion, die unabhängig vom Einfluß der übrigen Variablen ist: $p = 0,001$ bei Patienten aller Ethnizitäten; $p = 0,01$ bei deutschen Kaukasiern (Tab. 4.10). Demnach unterliegen Patienten mit CHC, die Träger einer Keratin 8/18-Variante sind, einem etwa 5-fach gesteigerten Risiko für die Entwicklung einer fortgeschrittenen Leberfibrose (Alle Ethnizitäten: OR = 5,7; KI = 2,02-16,08. Deutsche Kaukasier: OR = 4,39; KI = 1,42-13,55. Tab. 4.10; Abb. 4.8 A). Die Fokussierung der multivariaten Analyse auf das „outcome“ Endstadium der Leberfibrose bzw. Leberzirrhose (Stadium 4) lieferte ähnliche Ergebnisse (Tab. 4.11; Abb. 4.8 B). In diesem Modell verlor der Faktor Alkoholkonsum allerdings an Signifikanz und der „Body Mass Index“ (BMI) stellte sich als signifikanter Risikofaktor bei Zirrhosepatienten dar (Alle Ethnizitäten: OR = 1,09; KI = 1,01-1,18; $p = 0,03$. Deutsche Kaukasier: OR = 1,1; KI = 1,02-1,2; $p = 0,02$). Die Zunahme von Patientenalter und Dauer der Hepatitis C-Infektion war auch in diesem Modell mit einem signifikant erhöhten Risiko ($p = 0,01/0,03$ bzw. $p < 0,001$) für die Entwicklung einer schweren Leberfibrose bzw. Zirrhose verbunden (Tab. 4.11; Abb. 4.8 B).

Tabelle 4.11: Ergebnisse der multivariaten logistischen Regressionsanalyse für das „outcome“ Endstadium der Leberfibrose bzw. Leberzirrhose (Stadium 4)

Variable (Inkrementelle Vergleichseinheit)	Leberzirrhose (Stadium 4)		
	OR	95%-KI	p-Wert
Alle Ethnizitäten:			
Alter (1 Jahr)	1,04	1,01-1,07	0,01
Erkrankungsdauer (1 Jahr)	1,13	1,09-1,18	<0,001
BMI	1,09	1,01-1,18	0,03
K8/18-Variante (ja:nein)	6,98	2,37-20,6	<0,001
Deutsche Kaukasier:			
Alter (1 Jahr)	1,04	1,01-1,07	0,03
Erkrankungsdauer (1 Jahr)	1,11	1,07-1,16	<0,001
BMI	1,1	1,02-1,2	0,02
K8/18-Variante (ja:nein)	8,74	2,63-29,07	<0,001

OR, Odds Ratio; KI, Konfidenzintervall; BMI, body mass index. Die Odds Ratios gelten jeweils für die Änderung um eine Einheit in den unabhängigen Variablen (Inkrementelle Vergleichseinheit).

Abb. 4.8: Odds Ratio der Risikofaktoren für fortgeschrittene Leberfibrose bzw. Zirrhose

Darüber hinaus untermauerten die Ergebnisse die starke Assoziation von exonischen K8/18-Varianten mit dem Schweregrad der Leberfibrose, die sowohl bei der Analyse aller Patienten jeglicher Ethnizität ($p < 0,001$) als auch in der Subkohorte deutscher Kaukasier ($p < 0,001$) beobachtet wurde (Tab. 4.11). Das Vorliegen einer K8/18-Mutation bei chronischer Hepatitis C-Virusinfektion erhöht das Risiko für die Entwicklung einer Leberzirrhose um den Faktor 7 (OR = 6,98; KI = 2,37-20,6). Ferner zeigte die Analyse der Subkohorte deutscher Patienten kaukasischer Ethnizität, dass Träger einer exonischen K8/18-Mutation ein bis zu 8,7-fach höheres Risiko (OR = 8,74; KI = 2,63-29,07) haben, im Rahmen einer chronischen Hepatitis C-Virusinfektion eine Leberzirrhose zu entwickeln (Tab. 4.11; Abb. 4.8 B).

4.3 Analyse österreichischer Patienten mit hereditärer Hämochromatose

4.3.1 Charakteristika und Leberhistologie der Patientenkohorte

Die Analyse umfasste 199 Patienten mehrerer österreichischer Kliniken (Wien, Salzburg, Kärnten, Innsbruck), die im Rahmen einer früheren genetischen Assoziationsstudie (Stickel *et al.*, 2005) rekrutiert worden waren. Alle Patienten waren Träger einer homozygoten C282Y-Mutation im *HFE*-Gen und hatten pathologische Serum- und Lebereisenparameter und/oder erhöhte Lebertransaminasen. Bei allen Patienten wurde eine Leberbiopsie durchgeführt. Patienten mit zusätzlichen chronischen Lebererkrankungen wie α 1-Antitrypsinmangel, Autoimmunhepatitis, HBV- oder HCV-Infektionen wurden nicht in die Studie aufgenommen (Stickel *et al.*, 2005). 37 Patienten wurden von der Analyse ausgeschlossen aufgrund unzureichender DNA-Amplifikation ($n = 27$) bzw. fehlenden Angaben zur Leberhistologie ($n = 10$). Die Charakteristika der ausgewerteten 162 Patienten mit hereditärer Hämochromatose sind in Tab. 4.12 dargestellt. Der Anteil eisengefärbter Hepatozyten in der Leberbiopsie betrug etwa 87% bei männlichen und 79% bei weiblichen Patienten, der aber nur bei ca. der Hälfte der Patienten dokumentiert war (Tab. 4.13). Die Lebereisenkonzentration (HIC) überschritt bei 71/74 (96%) der männlichen und 25/29 (86%) der weiblichen Patienten den Normbereich (300-1400 $\mu\text{g/g}$ Lebertrockengewicht). Dieser Anstieg spiegelte sich auch in einem erhöhten Lebereisenindex (HII $>1,9$) bei 63/77 (82%) der männlichen und 14/30 (47%) weiblichen Patienten wider. Die Serumeisenkonzentration lag bei 132/146 (90%) der Patienten über dem Referenzbereich. Die Serumferritinkonzentration korreliert mit dem Gesamtspeichereisengehalt des Körpers und war bei 104/111 (94%) der Männer und 26/33 (79%) der Frauen erhöht. Serumtransferrin war bei 49/64 (77%) der Männer und 16/19 (84%) der Frauen erniedrigt (Tab. 4.13). Die Transferrinsättigung errechnet sich aus der Serumeisen- und Serumtransferrinkonzentration und ist ein Indikator für das Eisenangebot an die erythrozytären Vorstufen und gebräuchlicher Marker von pathologischer Eisenüberladung. Sie war bei 99/102 (97%) der Männer und 30/31 (97%) der Frauen erhöht (Tab. 4.13).

Tabelle 4.12: Charakteristika von 162 Patienten mit hereditärer Hämochromatose

Charakteristika	Gesamt	Keine Daten, n (%)
Patienten, n (%)	162 (100%)	0
Geschlecht, m/w, n (%)	120 (74%)/41 (25%)	1 (0,6%)
Alter, $x_m \pm s$ (Jahre)	50,4 \pm 13,3	24 (14,8%)
Alkoholkonsum, ja/nein (%)*	10/133 (7%)	19 (11,7%)

n, Fallzahl; x_m , arithmetischer Mittelwert; s, Standardabweichung. *Der Grenzwert für signifikant erhöhten Alkoholkonsum betrug >20 g/d für Frauen und >60 g/d für Männer nach WHO-Empfehlung.

Tabelle 4.13: Biochemische und histologische Parameter des Eisenstoffwechsels

Parameter	Männlich	Weiblich	Keine Daten, n (%)
Anteil eisengefärbter Hepatozyten, x_m (95%-KI) [%]	88,5 (82,4-94,6)	78,8 (68,8-88,7)	87 (53,7%)
HIC, $Q_u/Me/Q_o$ ($\mu\text{g/g}$)	6546/13354/19437,5	2514/4700/9850	59 (36,4%)
HII, $Q_u/Me/Q_o$	2,662/4,44/6,745	1,075/1,834/2,895	55 (34%)
Serumeisen, $x_m \pm s$ ($\mu\text{g/dl}$)	$213,5 \pm 44,3$	$191,0 \pm 43,1$	15 (9,3%)
Serumtransferrin, $x_m \pm s$ (mg/dl)	$173,5 \pm 50,4$	$170,2 \pm 27,6$	79 (48,8%)
Transferrinsättigung, $x_m \pm s$ (%)	$87,1 \pm 16,6$	$73,8 \pm 19,1$	29 (17,9%)
Serumferritin, $Q_u/Me/Q_o$ ($\mu\text{g/l}$)	1018,5/1938/3338,5	251/566/1075	17 (10,5%)

KI, Konfidenzintervall ; n, Fallzahl; x_m , arithmetischer Mittelwert; s, Standardabweichung; Q_u , 25%-Quartil; Me, Median; Q_o , 75%-Quartil; HII, Lebereisenindex; HIC, Lebereisenkonzentration. Die Transferrinsättigung entspricht Serumeisen ($\mu\text{g/dl}$) \times 70,9 / Serumtransferrin (mg/dl). Referenzwerte: HIC 300-1400 $\mu\text{g/g}$, Serumeisen 40-150 $\mu\text{g/dl}$, Serumtransferrin 200-360 mg/dl, Transferrinsättigung 16-45%, Serumferritin 18-440 $\mu\text{g/l}$ (Männer) und 8-120 $\mu\text{g/l}$ (prämenopausale Frauen) / 30-300 $\mu\text{g/l}$ (postmenopausale Frauen).

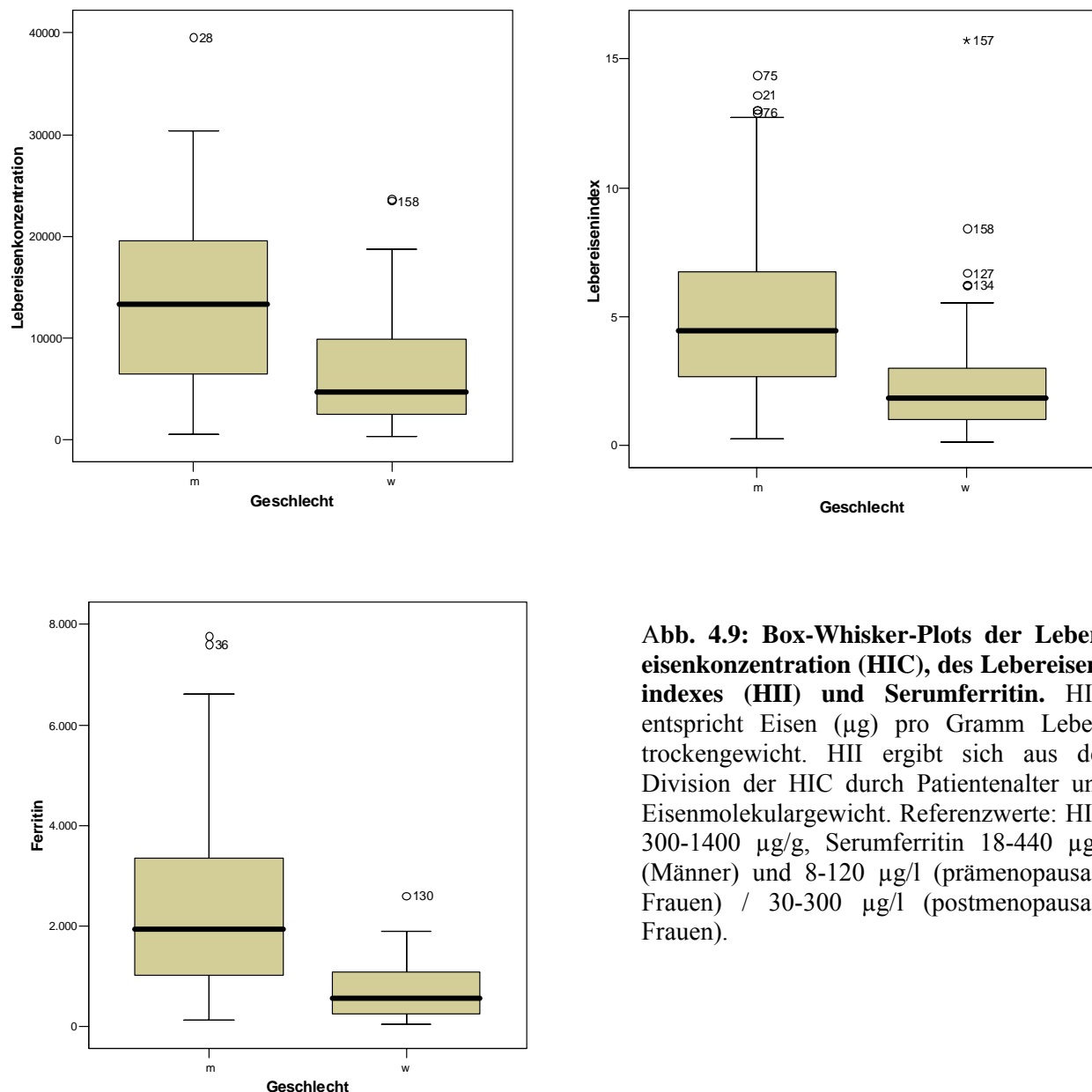


Abb. 4.9: Box-Whisker-Plots der Lebereisenkonzentration (HIC), des Lebereisenindex (HII) und Serumferritin. HIC entspricht Eisen (μg) pro Gramm Lebertrockengewicht. HII ergibt sich aus der Division der HIC durch Patientenalter und Eisenmolekulargewicht. Referenzwerte: HIC 300-1400 $\mu\text{g/g}$, Serumferritin 18-440 $\mu\text{g/l}$ (Männer) und 8-120 $\mu\text{g/l}$ (prämenopausale Frauen) / 30-300 $\mu\text{g/l}$ (postmenopausale Frauen).

4.3.2 Charakterisierung der identifizierten exonischen Keratinvarianten

Nach Analyse aller Exone von *KRT8/18* wurden insgesamt 11 heterozygote *KRT8*-Varianten entdeckt (Tab. 4.14), die einen Aminosäureaustausch bei 10 von 162 Patienten (6,2%) zur Folge hatten. In den sieben Exonen von *KRT18* wurde keine Variante entdeckt. Der bekannte (Hesse *et al.*, 2004; Ku *et al.*, 2005), stille K8 L227L-Polymorphismus kam bei 74/162 (45,7%) Patienten vor, jeweils bei 28/63 (44,4%) Patienten mit und 41/99 (41,4%) Patienten ohne Leberzirrhose. Dieser Polymorphismus wurde nicht weiter analysiert, da eine biologische Relevanz unwahrscheinlich ist. Unter den in *KRT8* identifizierten Polymorphismen waren auch zwei neue, erstmals beschriebene Varianten: *KRT8* 505C→G bewirkte einen Austausch von Glutamin169 zu Glutaminsäure (Q169E), ist in der Subdomäne I B von K8 lokalisiert und wurde bei zwei Patienten gefunden (Tab. 4.14). K8 R275W führte zu der Substitution von Arginin an Position 275 durch Tryptophan bei einem Patienten und ist in der nicht helikalen Linkersequenz L-2 des Keratinmoleküls lokalisiert. Die häufigsten kodierenden Keratinvarianten in dieser Patientenkohorte waren die K8 Arginin341→Histidin-Mutation (K8 R341H), die bei vier Patienten identifiziert worden war, und die K8 Glyzin62→Zystein-Mutation (K8 G62C), die bei drei Patienten vorlag (Tab. 4.14). Neun Patienten waren Träger singulärer exonischer Varianten und einer Träger eines exonischen compound-heterozygoten Polymorphismus K8 A319S + R341H. Ein Patient mit exonisch-intronischer Compound-Variante K8 R341H plus IVS7+10delC ist in den nachfolgenden Tabellen nicht aufgeführt, da er zu den zehn Patienten gehörte, bei denen keine Angaben zum histologischen Staging vorlagen (Abs. 3.1.3).

Tabelle 4.14: Verteilung exonischer Keratinvarianten bei Patienten mit hereditärer Hämochromatose mit bzw. ohne Leberzirrhose

Gen	Varianten		Präsenz von Leberzirrhose (n/%)		Varianten insgesamt
	Nukleotide	Aminosäuren	Ja (63/38,9%) ^a	Nein (99/61,1%)	
<i>KRT8</i>	1022G→A	R341H \diamond	2	2[1]*	4 [1]
	184G→T	G62C	3	0	3
	955G→T	A319S	0	1 [1]*	1 [1]
	505C→G	Q169E \dagger	0	2	2
	823C→T	R275W \dagger	0	1	1
Anzahl der Patienten mit exonischen Varianten (%)			5 (7,9%)	5 (5,1%)	10 (6,2%)

Die Tabelle fasst die Anzahl der Patienten mit und ohne Leberzirrhose für jede aminosäuresubstituierende exonische Keratinvariante zusammen. Die Lokalisation der K8- und K18-Varianten basiert auf den mRNA-Sequenzen NM 002273.2 bzw. NM 000224.2. Die Nummerierung der Aminosäuren schließt das Startkodon ein. ^aBei zwei Patienten wurde die Angabe von HCC als Leberzirrhose gewertet. *Eckige Klammern geben die Anzahl exonischer Compound-Varianten wider. 1 Patient war Träger einer K8 R341H+A319S-Variante. \diamond Die K8 R341H-Mutationen trat immer in Kombination mit der intronischen IVS7+10delC-Variante auf. \dagger Neue, bisher nicht beschriebene Varianten.

Im Rahmen der Analysen wurden zusätzlich zwei neue K8-Varianten identifiziert: K8 Q169E in Exon 2 und R275W in Exon 5, deren biologische Relevanz noch nicht durch Studien analysiert worden ist. Der Vergleich der DNA-Sequenzen zwischen den Spezies Ratte (*Rattus norvegicus*, NM 199370.1), Maus (*Mus musculus*, NM 031170.2), Frosch (*Xenopus laevis*, BC 044116.1) und Zebrafisch (*Danio rerio*, NM 200080.2) zeigte allerdings, dass diese Sequenzen hoch konserviert sind innerhalb verschiedener Spezies. Eventuell können Varianten dieser Sequenzen zu Instabilität und funktionaler Beeinträchtigung führen. Innerhalb der Gruppe humaner Typ II-Keratine war Glutamin169 (K8 Q169) in allen Keratinen (außer *KRT3*) konserviert (Abb. 4.10 B), während Arginin275 eher variabel und kaum konserviert zu sein scheint (Abb. 4.10 D).

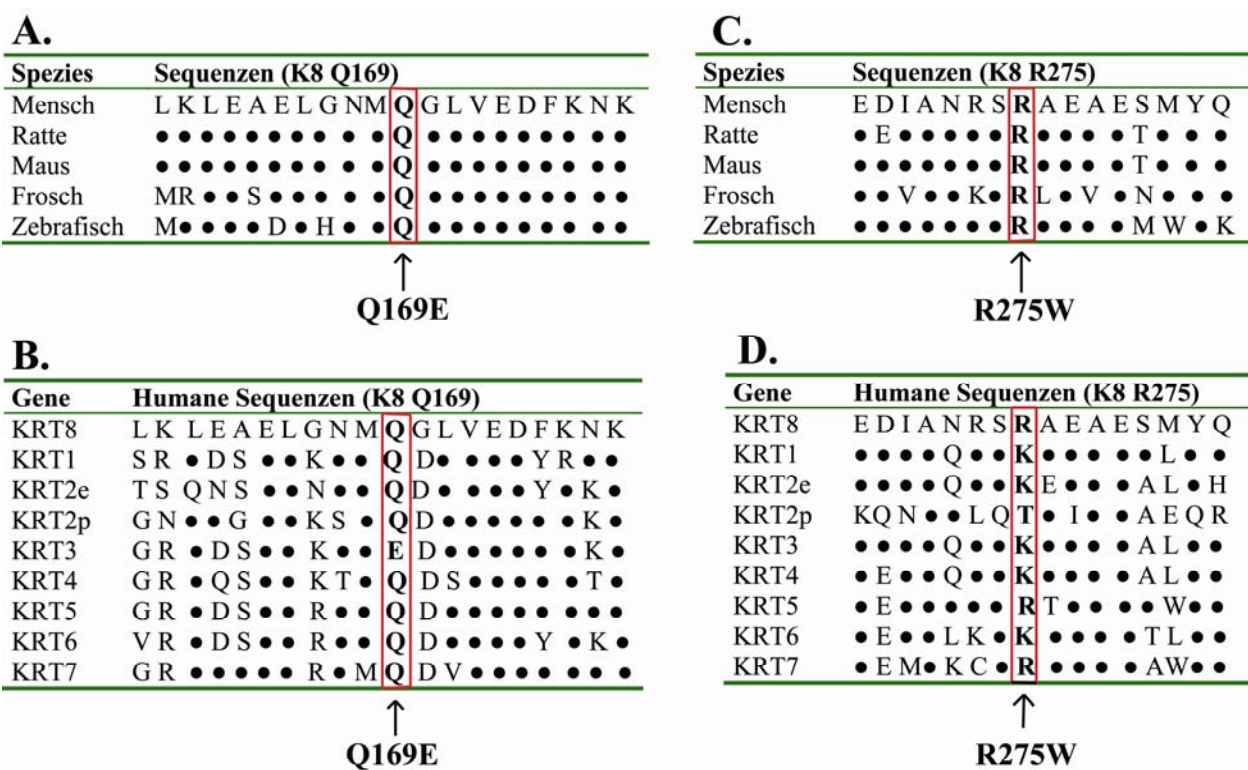


Abb. 4.10: Konservierung der Aminosäuresequenzen um K8 Q169 und K8 R275 in verschiedenen Spezies und humanen Typ II-Keratinen. **A, B:** Sequenzen um Position Q169 in verschiedenen Spezies (A) und in humanen Typ II-Keratinen (B). **C, D:** Sequenzen um Position R275 in verschiedenen Spezies (C) und in humanen Typ II-Keratinen (D). Punkte markieren konservierte Aminosäuren im Vergleich zu humanen *KRT8*-Sequenzen. Aminosäuren sind nach der Einzelbuchstabennotierung abgekürzt (Jones, 1999). Die Referenzsequenzen waren NM 002273.2 (*Homo sapiens*), NM 199370.1 (*Rattus norvegicus*), NM 031170.2 (*Mus musculus*), BC 044116.1 (*Xenopus laevis*) und NM 200080.2 (*Danio rerio*).

4.3.3 Charakterisierung der identifizierten nicht kodierenden Keratinvarianten

Darüber hinaus wurden vier heterozygote, nicht kodierende Polymorphismen bei insgesamt zehn Patienten (6,2%) mit hereditärer Hämochromatose identifiziert, die innerhalb der intronischen Sequenzen und 3'-UTR-Region von *KRT8* lokalisiert waren (Tab. 4.15).

Tabelle 4.15: Verteilung nicht kodierender Keratinvarianten bei Patienten mit hereditärer Hämochromatose mit bzw. ohne Leberzirrhose

Gen	Varianten Nukleotide	Präsenz von Leberzirrhose (n/%)		Genabschnitt	Varianten insgesamt
		Ja (63/38,9%) ^a	Nein (99/61,1%)		
<i>KRT8</i>	IVS6+46A→T	1	1	Intron	2
	IVS7+10delC	2 [2]*	2 [2]	Intron	4 [4]
	IVS7+20G→A†	3	0	Intron	3
	IVS8+31C→T†	1	0	3'-UTR	1
Varianten insgesamt (%)		7 [2] (11,1%)	3 [2] (3,0%)		10 [4] (6,2%)

IVS, intervening sequence, Intron; del, Deletion; UTR, untranslated region. ^aBei zwei Patienten wurde HCC als Leberzirrhose gewertet. *Eckige Klammern enthalten die Anzahl der exonisch-intronischen Compound-Varianten. Die intronische IVS7+10delC-Variante trat ausschließlich mit der exonischen K8 R341H-Variante auf. †Neue, bisher nicht dokumentierte Varianten.

Darunter waren zwei neue, bisher nicht publizierte Varianten, die bereits in der Kohorte deutscher Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion identifiziert worden waren (Tab. 4.8). *KRT8* IVS7+20G→A verursachte einen Guanin→Adenin-Basenaustausch 20 Nukleotide „downstream“ vom 3'-Ende von Exon 7 in der intronischen Zwischensequenz 7, der bei drei Patienten mit Leberzirrhose auftrat. IVS8+31C→T resultiert in einer Substitution von Cytosin durch Thymin, die in der „3'-untranslated region“ von *KRT8* lokalisiert ist und bei einem zirrhotischen Patienten gefunden wurde (Tab. 4.15). Vier Patienten präsentierten Compound-Varianten bestehend aus exonischer K8-Arginin341→Histidin-Mutation plus intronischer *KRT8* IVS7+10delC-Deletion (Tab. 4.15). Die Detektion bei allen vier Patienten lässt eine exklusive und ausschließliche Beziehung dieser exonisch-intronischen Sequenzvarianten vermuten, die bereits in der Kohorte deutscher Hepatitis C-Patienten beobachtet wurde (Abs. 4.2.3; Tab. 4.8, 4.9).

4.3.4 Statistische Auswertung

Die Analyse der Daten erfolgte mittels multivariater logistischer Regression mit vorwärts und rückwärts stufenweiser Variablenauswahl nach dem Kriterium der „likelihood ratio“ für das „outcome“ Leberzirrhose (Fibrosestadium 4). Die statistischen Auswertungen umfaßte alle identifizierten kodierenden (Tab. 4.14) und nicht kodierenden Keratinvarianten (Tab. 4.15) einschließlich der compound-heterozygoten Variante K8 R341H plus *KRT8* IVS7+10delC.

Ferner wurde die Korrelation der übrigen Expositionsvariablen überprüft und bei $p < 0,2$ für Einschluß in der multivariaten Regressionsanalyse berücksichtigt. Die Serumferritinwerte wurden aufgrund der sehr schiefen Verteilung zunächst logarithmisch transformiert. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in Tabelle 4.16 zusammengefaßt.

Tabelle 4.16: Ergebnisse der multivariaten logistischen Regressionsanalyse für das „outcome“ Leberzirrhose (Stadium 4) bei hereditärer Hämochromatose

Expositionsvariable (Inkrementelle Vergleichseinheit)	Leberzirrhose (Stadium 4)		
	OR	95%-KI	p-Wert
Alter (1 Jahr)	1,08	1,04-1,12	<0,001
Erhöhter Alkoholkonsum (ja:nein)*	6,26	0,73-54,09	0,095
Serumferritin (log)#	32,74	7,63-140,5	<0,001
Nicht kodierende K8-Variante (ja:nein)	8,45	0,72-99,24	0,09
Kodierende K8-Variante (ja:nein)	0,78	0,13-4,68	0,78

OR, Odds Ratio; KI, Konfidenzintervall. * Der Grenzwert für erhöhten Alkoholkonsum war >20 g/d für Frauen und >60 g/d für Männer nach WHO-Empfehlung. # Die sehr schiefe Variable Serumferritin wurde logarithmisch transformiert.

Nur die Faktoren Patientenalter und erhöhte Serumferritinkonzentration assoziieren signifikant mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Leberzirrhose bei Patienten mit hereditärer Hämochromatose. So ist die Zunahme des Alters um 1 Jahr mit geringer Steigerung des Zirrhoserisikos verbunden (OR = 1,08, KI = 1,04-1,12; $p < 0,001$). Die Serumferritinkonzentration stellt einen wesentlichen Risikofaktor für Leberzirrhose bei HHC dar: OR = 32,74; 95%-KI = 7,63-140,5; $p < 0,001$). Allerdings wird das Odds Ratio durch die enorme Spannweite des Konfidenzintervalls relativiert. Ein größerer Stichprobenumfang wäre zur Präzisierung des OR notwendig gewesen. Darüber hinaus deutete sich ein nicht signifikanter Trend zu erhöhtem Zirrhoserisiko bei HHC-Patienten mit gesteigertem Alkoholkonsum an: OR = 6,26; 95%-KI = 0,73-54,09; $p = 0,095$. Abschließend wurde ein erhöhtes Zirrhoserisiko bei hereditärer Hämochromatose weder bei Trägern kodierender noch bei Trägern nicht kodierender K8-Varianten festgestellt (Tab. 4.16). Obwohl die Ergebnisse einen leichten Trend ($p = 0,09$) zu erhöhtem Leberzirrhoserisiko (OR = 8,45; 95%-KI = 0,72-99,24) bei Trägern nicht kodierender K8-Varianten vermuten lassen, offenbart die große Spannweite des Konfidenzintervalls die beschränkte statistische Aussagekraft dieses Ergebnisses (Tab. 4.16). So ist die statistische Power zur Demonstration eines Effekts nicht kodierender Varianten bei gegebener Fallzahl auf nur 57% beschränkt. Ferner zeigte die multivariate Analyse kein signifikant gesteigertes Zirrhoserisiko bei Trägern einer exonischen aminosäuresubstituierenden Keratinvariante: OR = 0,78; KI = 0,13-4,68; $p = 0,78$. Die Problematik der statistischen Auswertung wird in Kapitel 5.3 diskutiert.