

## 5. Diskussion

### 5.1 Optimierung der DHPLC-Analysebedingungen

#### 5.1.1 Modifizierung der DNA-Schmelztemperaturen und Einsatz von bekannten *KRT8/18*-Sequenzvarianten zur Optimierung der DHPLC-Sensitivität

Die geschätzte Sensitivität und Spezifität der DHPLC in der Detektion von SNPs liegt bei über 96% (Xiao und Oefner, 2001). Im direkten Vergleich ist die DHPLC häufig anderen Analyseverfahren überlegen, z.B. Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (Gross *et al.*, 1999; Choy *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 1999), denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (Skopek *et al.*, 1999) oder „chemical cleavage of mismatch“ (Cotton und Bray, 2001). Die DHPLC weist eine ähnlich hohe Sensitivität wie die direkte Sequenzierung auf (O'Donovan *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 1999; Le Marechal *et al.*, 2001; Ravnik-Glavac *et al.*, 2002). Die Sensitivität ist über eine Fragmentlänge von 150-700 bp konstant hoch (O'Donovan *et al.*, 1998). Allerdings wird sie entscheidend von der Schmelztemperatur beeinflusst, die sich u.a. nach der Länge und Basenzusammensetzung des DNA-Fragments richtet (Jones *et al.*, 1999). AT-reiche Sequenzen sind instabiler als GC-reiche Regionen aufgrund der geringeren Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen. Sie denaturieren bei niedrigeren Temperaturen und bilden „low melting domains“ aus. Je nach AT- bzw. GC-Basenkonzentration kann daher die optimale Schmelztemperatur zwischen 48 und 68°C variieren (Xiao und Oefner, 2001). Zur Berechnung der optimalen Analysetemperaturen wurde der DHPLCMelt-Algorithmus (<http://insertion.stanford.edu/melt.html>) entwickelt, der jedoch die Tendenz hat, in bestimmten Fällen zu niedrige Analysetemperaturen zu berechnen (Rudolph *et al.*, 1999). Jones *et al.* (1999) konnten 97% der heterozygoten Varianten bei den so berechneten Temperaturen identifizieren, während 100%ige Sensitivität der DHPLC nur durch zusätzliche Analyse mit 2°C höheren Temperaturen zu erreichen war. In Studien von Le Marechal *et al.* (2001) und Ravnik-Glavac *et al.*, (2002) konnte die Sensitivität ebenfalls auf 100% gesteigert werden unter Anwendung von bis zu 2°C höheren als den vorhergesagten Trennsäulentemperaturen. Möglicherweise beeinflussen lokale Faktoren (z.B. Haarnadelformationen) oder Ionen der PCR die Stabilität der Basenfehlpaarungen (Jones *et al.*, 1999; Rudolph *et al.*, 1999), die nicht von der Software berücksichtigt werden können. Es wurde ein modifizierter Algorithmus entwickelt, auf dem die Software Wavemaker (Transgenomic, USA) basiert. Sie erstellt im Vergleich zum DHPLCMelt-Algorithmus präzisere Temperaturberechnungen (Rudolph *et al.*, 2002). Die Ergebnisse unserer Untersuchung zeigten allerdings, dass

auch das verwendete Programm Wavemaker, Version 4.1.44, für bestimmte DNA-Sequenzen zu niedrige Analysetemperaturen vorhersagt (Tab. 4.1). Daher sollte das softwaregenerierte Spektrum der Analysetemperaturen durch empirische Messungen ergänzt werden. Die Analyse von *KRT8* Exon 1 zeigte beispielsweise eine Diskrepanz von etwa 3°C zwischen dem softwareberechneten (Abb. 4.1 A) und experimentell ermittelten Schmelzprofil (Abb. 4.1 E). Die optimalen Schmelztemperaturen von *KRT8* Exon 1 lagen tatsächlich um 2,3 bis 3,4°C über den softwareberechneten Temperaturen (Tab. 4.1). Die empirisch ermittelten Schmelzkurven in Kombination mit den Softwareberechnungen ermöglichen also relativ genaue Aussagen über die optimalen Analysetemperaturen einzelner Domänen. Besonders schwierig ist die Berechnung der Analysetemperatur von Domänen mit hoher Schmelztemperatur, die in „low melting domains“ mit signifikant niedriger Schmelztemperatur von >8°C eingebettet sind (Xiao und Oefner, 2001; Breton *et al.*, 2003). Das heterogene Schmelzprofil von *KRT18* Exon 1 (Abb. 4.3 A) veranschaulicht die Problematik. Die Mutation K18 Serin53→Alanin (K18 S53A) ist in einer relativ thermostabilen Sequenz innerhalb einer „low melting domain“ lokalisiert. Die softwareberechneten Schmelztemperaturen wurden ca. 3,3°C zu niedrig kalkuliert (Tab. 4.1). Die Variante konnte bei den vorhergesagten Temperaturen nicht detektiert werden. Auch die Länge und der GC-Basenanteil des Amplikons beeinflussen das Schmelzverhalten der DNA. Das zeigten die Analysen von *KRT8* Exon 1, 6 und *KRT18* Exon 1. Dort wurde die größte Diskrepanz zwischen prognostizierter und optimaler Schmelztemperatur festgestellt (Tab. 4.1). Diese Exone gehörten zu den längsten analysierten Fragmenten mit der tendenziell höchsten GC-Basenkonzentration: *KRT8* Exon 1 ist 392 bp lang mit 63,8% GC-Basen (Tab. 3.2), *KRT8* Exon 6 ist 369 bp lang mit 63,7% GC-Basen (Tab. 3.2) und *KRT18* Exon 1 ist 481 bp lang mit 63,6% GC-Basenpaaren (Tab. 3.3). Keine der sechs bekannten Kontrollvarianten in diesen Exonen (Abb. 3.1) waren bei den softwareberechneten Temperaturen sicher zu identifizieren (Tab. 4.1). Alle Varianten waren jedoch durch zusätzlich Analyse mit einer 2°C höheren Schmelztemperatur zuverlässig detektiert worden. Somit stellt die Addition mindestens einer zusätzlichen Analysetemperatur eine effektive Maßnahme zur Steigerung der DHPLC-Sensitivität in der Analyse von *KRT8/18*-Exonen dar. Erfahrungsgemäß sollten für die Analyse der kodierenden Sequenzen von *KRT8/18* mindestens zwei verschiedene Temperaturen verwendet werden. Amplifikate mit heterogenem Schmelzprofil und hohem GC-Basengehalt stellen die größte Herausforderung für eine korrekte Analyse dar. Hier sollten zur adäquaten Analyse aller Schmelzdomänen weitere abgestufte Analysetemperaturen verwendet werden. *KRT18* Exon 1 stellte das längste analysierte Amplikon (481 bp) mit einem hohen GC-Basenanteil (63,6%; Tab. 3.3) und einem stark heterogenen Schmelzprofil dar (Abb. 4.3 A). Für die komplette Analyse dieses Exons wurden fünf verschie-

dene Schmelztemperaturen in Abstufungen von 2°C verwendet (62, 64, 66, 68 und 70°C), um eine adäquate Auflösung aller Schmelzdomänen zu gewährleisten. Darüber hinaus kann auch eine Diskrepanz zwischen der angezeigten und der tatsächlichen Trennsäulentemperatur bei DHPLC-Systemen verschiedener Hersteller auftreten (Jones *et al.*, 1999). Abweichungen von bis zu 2°C sind beobachtet worden, v.a. wenn die Ofenkalibrierung nur bei einer Temperatur vorgenommen wurde (Ravnik-Glavac *et al.*, 2002). Deswegen sollte die korrekte Ofenkalibrierung für unterschiedliche Temperaturbereiche durch regelmäßige Anwendung von Mutationsstandards überprüft werden. Bei dieser Untersuchung wurden dazu regelmäßig Standards des Herstellers Transgenomic (San Jose, CA, USA) eingesetzt: „WAVE high-range mutation control standard“ bei 70°C und „WAVE low-range mutation control standard“ bei 56°C. Die Anwendung von bekannten, natürlich vorkommenden und *in-vitro*-generierten Mutationen bietet zudem eine effektive Möglichkeit, die Sensitivität der DHPLC-Analyse zu optimieren. Beispielsweise wurde die korrekte Analyse von *KRT18* Exon 1 anhand von drei bekannten Varianten überprüft, die in transgenen Mäusen generiert worden waren. Sie ergänzten die Auswahl an humanen DNA-Mutationen, die als Kontrollen eingesetzt wurden (Abb. 3.1). Dadurch konnte die Sensitivität der DHPLC in der Analyse von *KRT8/18*-Mutationsschwerpunkten wesentlich verbessert werden. Zusammenfassend ist eine sorgfältige Auswahl der Schmelztemperaturen anhand von Softwareberechnungen und ergänzenden empirischen Messungen und der Einsatz bekannter Mutationen als Kontrollen zu empfehlen, um eine maximale Sensitivität der DHPLC zu erzielen.

### **5.1.2 Validierung der optimierten Analysbedingungen anhand einer deutschen Patientenkohorte mit chronischen Lebererkrankungen (Hesse *et al.*, 2004)**

In einer Studie von Hesse *et al.* (2004) wurden außer einem häufig vorkommenden, stillen K8 L227L-Polymorphismus (*KRT8* 740A>G) keine exonischen, aminosäuresubstituierenden K8/18-Varianten in 256 Patienten und 100 Kontrollpersonen gefunden. Andere europäische Studien hatten K8/18-Mutationen bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen identifiziert (Tab. 1.6). Ferner traten K8/18-Mutationen mit einer Häufigkeit von 12,4% in einer amerikanischen Kohorte von 467 Patienten mit chronischen Lebererkrankungen und 3,7% in 349 Kontrollen auf (Ku *et al.*, 2005). Sowohl bei Hesse *et al.* als auch bei Ku *et al.* wurde ein identisches DHPLC-System (WAVE DNA Fragment Analysis System mit DNASepHT-Trennsäule, Transgenomic, USA) und die Kalkulationssoftware Wavemaker (Transgenomic, USA) verwendet (Tab. 1.6). Die Re-Analyse einer Subkohorte von Hesse *et al.* (2004) bot daher die Möglichkeit, einerseits die Validität der optimierten DHPLC-Analysebedingungen zu überprüfen (Abs. 5.1.1). Andererseits konnten so wichtige Mutationsschwerpunkte, die in der amerikanischen Kohorte mit

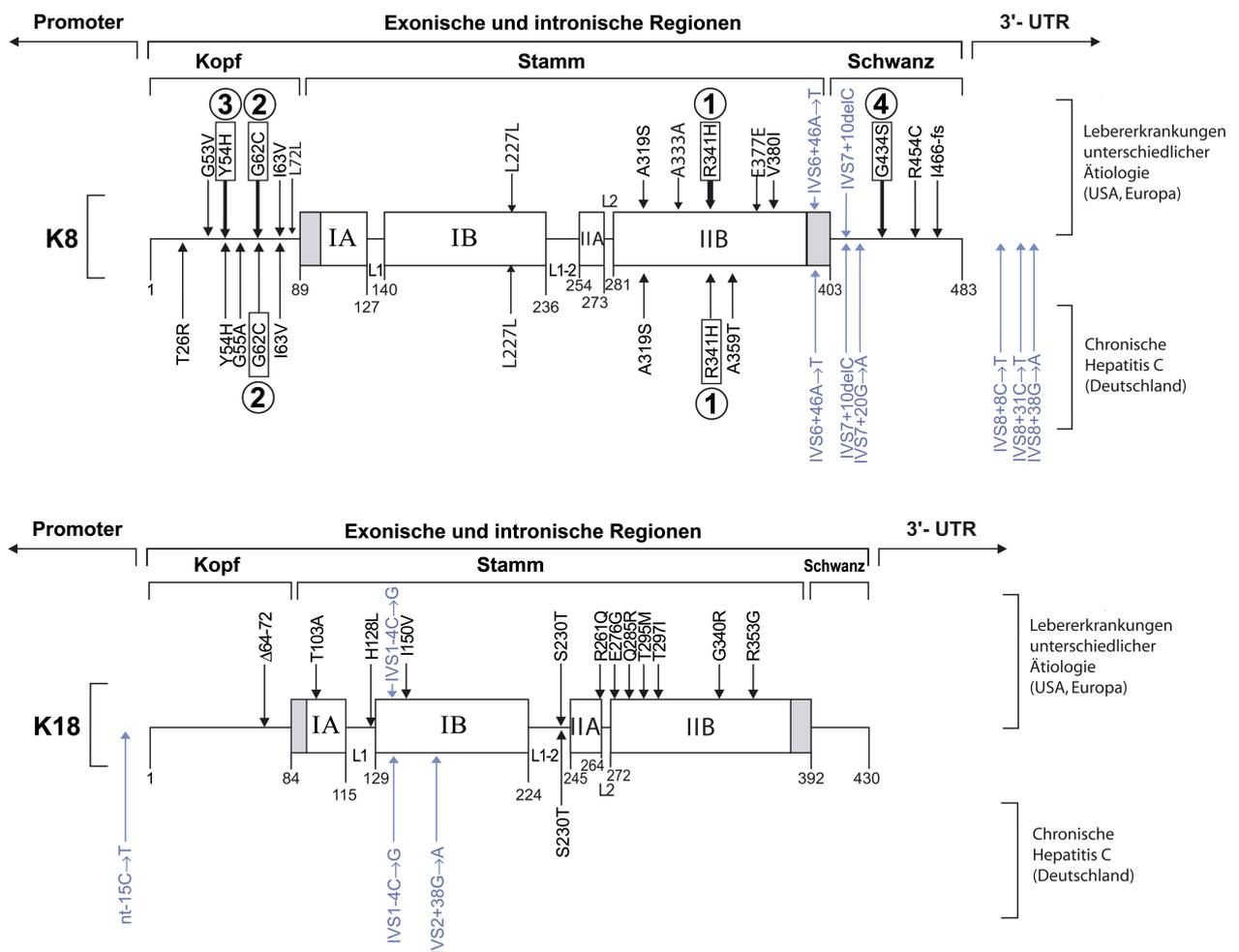
chronischen Lebererkrankungen beschrieben wurden (Ku *et al.*, 2005) und mit den softwareberechneten Schmelztemperaturen schwierig zu analysieren sind (Tab. 4.1), bei deutschen Patienten mit chronischen Lebererkrankungen untersucht werden. Die optimierte DHPLC-Analyse deckte 12 exonische Mutationen, davon 11 aminosäuresubstituierende und eine stille Variante, in *KRT8* Exon 1 und 6 sowie zwei intronischen Varianten in *KRT8* IVS6 auf (Tab. 4.2). Es ist durchaus möglich, dass weitere Varianten in der Kohorte vorhanden sind, da sich diese Untersuchung auf zwei *KRT8*-Exone beschränken musste (Abs. 4.1.2). Es wurde nachgewiesen, daß Keratinvarianten bei deutschen Patienten mit chronischen Lebererkrankungen tatsächlich vorkommen, darunter die häufigsten K8-Varianten Arginin341→Histidin in Exon 6 (7 Patienten) und Glyzin62→Zystein in Exon 1 (1 Patient; Tab. 4.2). Hesse *et al.* verwendeten Temperaturgradienten von 62,5-65,5°C für K8 Exon 1 und 63,5-65,5°C für K8 Exon 6. Diese Analysetemperaturen lagen alle unter den optimalen Detektionstemperaturen der Kontrollvarianten in *KRT8* Exon 1 und 6 (Tab. 4.1). So lag die von Hesse *et al.* eingestellte Schmelztemperatur für *KRT8* Exon 1 um bis zu 3,4°C unter der optimalen Temperatur und hatte wahrscheinlich signifikanten Einfluß auf die Sensitivität der DHPLC-Analyse. Allerdings lag die maximale Schmelztemperatur von *KRT8* Exon 6 (65,5°C) nur 0,2°C unter der optimalen Temperatur (65,7°C), so dass eine Detektion von K8 R341H und E376E eventuell möglich gewesen wäre. Jedoch unterschieden sich die beiden Untersuchungen in weiteren Faktoren, die ebenfalls zu den unterschiedlichen Ergebnissen beigetragen haben könnten. Unterschiedliche PCR-Bedingungen könnten die Spezifität der DNA-Amplifikation beeinflusst haben. Dadurch kann ein kleiner Peakabsatzes (Schulter) oder eine diskrete Peakverbreiterung maskiert und das Erkennen einer heterozygoten Variante erschwert werden. Deswegen wurden bei der Re-Analyse die empfohlenen PCR-Kriterien für die DHPLC-Analyse (Xiao und Oefner, 2001; Donohoe, 2005) wie beispielsweise „Hot-start-Aktivierung“ und „Touchdown-Protokoll“ (Tab. 3.4), Titrierung der optimalen Mg<sup>2+</sup>-Konzentration und sorgfältiges Primerdesign eingehalten. Zudem kann die Ablagerung eisenhaltiger Metallionen zu einer rapiden Degradation der Trennsäulenleistung führen (Xiao und Oefner, 2001). Deshalb wurde darauf geachtet, ausschließlich zweifach destilliertes Wasser für die Herstellung der DHPLC-Puffer zu verwenden, die Pufferreservoir und das WAVE-System in regelmäßigen Abständen nach den Vorgaben des Herstellers zu reinigen und die Metallionen durch sporadische EDTA-Spülungen des Systems zu entfernen (Donohoe, 2005). Außerdem wurde die Trennsäule in regelmäßigen Abständen erneuert und die Ofentemperatur regelmäßig kalibriert (Abs. 5.1.1). Das unterschiedliche Primerdesign hatte wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Ergebnisse, da auch die nach Hesse *et al.* synthetisierten Primer von *KRT8* Exon 6 (Tab. 3.2), die ein 5-10 bp kürzeres DNA-Fragment amplifizieren, eine

problemlose Identifikation der Varianten erlaubten. Darüber hinaus mischten Hesse *et al.* die DNA-Proben in äquimolarem Verhältnis mit einer Wildtyp-Probe, um potentielle homozygote Sequenzvarianten zu identifizieren (Abs. 3.2.6). Dadurch könnte die Identifikation heterozygoter Varianten, v. a. bei zu niedrigen Temperaturen, erschwert worden sein, auch wenn die DHPLC heterozygote Varianten eines DNA-Pools mit einer Häufigkeit von weniger als 5% detektieren kann (Wolford *et al.*, 2000). Allerdings konnten unsere Kontrollvarianten auch in einer Mischung mit (durch Sequenzierung bestätigter) Wildtyp-DNA zweifelsfrei identifiziert werden. Obwohl die bei amerikanischen Patienten am häufigsten vorkommenden Keratinvarianten (K8 R341H, K8 G62C) auch bei den deutschen Patienten gefunden wurden (Tab. 4.2), gibt es Hinweise darauf, dass populationsspezifische Unterschiede der Variantenhäufigkeit bestehen. So wurde die K8 Y54H-Mutation (Halangk *et al.*, 2004; Ku *et al.*, 2005; Treiber *et al.*, 2006) und K8 G434S-Variante (Ku *et al.*, 2005) häufiger bei Patienten mit afrikanischem Ursprung beobachtet. Ferner wurden zwei bisher nicht beschriebene Varianten identifiziert: K8 Valin380 → Isoleuzin in der Kohorte von Hesse *et al.* (Tab. 4.2) und K18 Arginin353 → Glyzin bei einem unabhängigen, kaukasischen Patienten (Abs. 3.1.1.1; Abb. 3.1). Die Ethnizität des K8 V380I-Trägers ist nicht bekannt, allerdings wurde diese Variante kürzlich auch bei einem asiatischen Patienten mit akutem Leberversagen entdeckt (Ku *et al.*, 2007). Sie ist in der K8 Subdomäne IIB in einer Sequenz lokalisiert, die in verschiedenen Spezies, humanen Typ II-Keratinen und zytoplasmatischen IF-Proteinen hoch konserviert ist (Abb. 4.4). Die K18 Arginin353 → Glyzin-Variante ist in der Subdomäne IIB lokalisiert (Abb. 3.1). Diese Sequenz ist in verschiedenen Spezies konserviert, aber nicht in humanen Typ I-Keratinen. Beide Sequenzvarianten sind eher selten, denn sie wurden weder in 467 amerikanischen Leberpatienten oder 349 Kontrollen (Ku *et al.*, 2005) noch in einer englischen Kohorte von 140 Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen oder 100 Kontrollen (Owens *et al.*, 2004) entdeckt (Tab. 1.6). Alternativ kann es sich um Varianten handeln, die spezifisch für eine noch nicht untersuchte Population/Ethnizität oder Erkrankung sind. Falls die seltene K8 V380I-Variante eine ethnische Präferenz besitzt, könnte es sein, dass sie in der Studie von Ku *et al.* (2005) nicht in Erscheinung getreten ist, da die Studie lediglich 57 (12,2%) asiatische Patienten und 23 (6,6%) asiatische Kontrollen umfasste. Eine biochemische Charakterisierung der mutierten Keratine konnte nicht vorgenommen werden, weil kein Biopsiematerial der Träger dieser seltenen Varianten vorlag, jedoch könnten zukünftige Studien zum Verständnis der pathophysiologischen Bedeutung dieser Mutationen beitragen.

## 5.2 Analyse der Kohorte deutscher Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion

### 5.2.1 Häufigkeit und Verteilung von *KRT8/18*-Varianten bei Patienten mit chronischer Lebererkrankung

Die genetische Assoziation von *KRT8/18*-Mutationen mit dem Endstadium der Lebererkrankung bei US-amerikanischen Patienten ist der bisher einzige etablierte Zusammenhang von Keratinmutationen mit Erkrankungen des Verdauungsapparates (Ku *et al.*, 2001, 2003a, 2005). In dieser großen US-amerikanischen Kohorte mit chronischen Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologie wurden *KRT8/18*-Varianten in 12,4% von 467 Leberexplantaten vs. 3,7% in einer Kontrollgruppe von 365 Blutspendern entdeckt: Prävalenz-OR = 3,8; 95%-KI = 2,1-7,1;  $p < 0,0001$  (Ku *et al.*, 2005). Eine Aussage über die potentielle Assoziation mit einer spezifischen Lebererkrankung war nicht möglich. Im Gegensatz zu den Studien von Ku *et al.* fanden drei europäische Studien bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen unterschiedlicher Genese keinen Zusammenhang mit der Präsenz von *KRT8/18*-Sequenzvarianten. Bei deutschen Patienten wurde ein häufig vorkommender K8 L227L-Polymorphismus, aber keine aminosäuresubstituierenden Mutationen, nach Analyse der kompletten *KRT8/18*-Gene entdeckt (Hesse *et al.*, 2004). Auch bei Fokussierung der Analyse auf zwei häufige K8-Varianten Y54H und G62C wurde keine Assoziation mit chronischen Lebererkrankungen bei deutschen Patienten (Halangk *et al.*, 2004) oder österreichischen Patienten (Schöniger-Hekele *et al.*, 2006) festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse unserer Untersuchung, dass aminosäuresubstituierende, heterozygote Keratin 8/18-Varianten bei deutschen Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion vorkommen (Abb. 5.1) und signifikanten Einfluß auf den Schweregrad und Verlauf der Lebererkrankung haben (Tab. 4.10, 4.11). Insgesamt wurden aminosäuresubstituierende heterozygote K8/18-Mutationen bei 24/329 (7,3%) und nicht kodierende Varianten bei 26/329 (7,9%) der deutschen CHC-Patienten gefunden (Abb. 5.1). Davon haben 11 Patienten einen exonischen-intronischen Compound-Polymorphismus (Tab. 4.8). Die tatsächliche Anzahl der Varianten liegt eventuell höher, da homozygote Varianten unter den angewandten Bedingungen schwierig zu detektieren sind (Abs. 3.2.6). Wahrscheinlich sind sie aber selten in Anbetracht der insgesamt niedrigen Frequenz heterozygoter K8/18-Varianten. Zudem wurden keine homozygoten Mutationen in Studien mit mehreren tausend Personen gefunden (Halangk *et al.*, 2004; Treiber *et al.*, 2006). Die Gesamthäufigkeit der exonischen Keratin 8/18-Varianten war in der deutschen Kohorte niedriger als in der US-amerikanischen Kohorte von Ku *et al.* (2005): 7,3% vs. 12,4%.



**Abb. 5.1: Verteilung von Keratinvarianten innerhalb der *KRT8/18*-Gene bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen.** Die Aminosäurepositionen der K8- und K18-Proteindomänen (Kopf, Stamm und Schwanz) und der Subdomänen (IA, IB, IIA, IIB und Linker L1, L1-2, L2) sind angegeben. Diese Proteindomänen sind konserviert in allen IF-Proteinen. Die grau unterlegten Regionen am Anfang und Ende der Stammdomäne entsprechen Mutationsschwerpunkten bei epidermalen Keratinen. Keine exonischen K8/18-Mutationen wurden dort bisher identifiziert. Die Positionen bereits beschriebener K8/18-Varianten (Ku *et al.*, 2007) sind oberhalb des Proteinschemas verzeichnet, während die identifizierten Keratinvarianten bei deutschen CHC-Patienten unterhalb notiert sind. Kodierende Varianten sind schwarz, nicht kodierende Varianten grau eingezeichnet. Zusätzlich sind die Varianten in den unmittelbar an *KRT8/18* angrenzenden Regionen (Promotor- und 3'-UTR) vermerkt. Die Position der intronischen Varianten gibt die ungefähre Lokalisation wider, da die Introne selbst nicht dargestellt sind. Die zahlreichsten Keratinvarianten früherer Studien sind nach absteigender Häufigkeit von 1 bis 4 nummeriert und die häufigsten Varianten dieser Studie mit 1 und 2 markiert. Alle unmarkierten Varianten wurden in einer deutlich geringeren Frequenz gefunden. Die neuen, kodierenden K8-Varianten (T26R/G55A/A359T) und mehrere nicht kodierende K8/18-Varianten dieser Studie sind durch ein fehlendes Pendant oberhalb des Proteinschemas gekennzeichnet. Diese Studie beschreibt erstmals einen exklusiven und ausschließlichen Compound-Polymorphismus der intronischen *KRT8* IVS7+10delC-Variante (Lee *et al.*, 2002) mit der exonischen K8 R341H-Mutation. Alle Aminosäuren sind nach der Einzelbuchstaben nomenklatur (Jones, 1999) abgekürzt. IVS, intervening sequence; nt, Nukleotid; del, Deletion; UTR, untranslated region; L, Linker.

Allerdings umfaßte unsere Untersuchung ein breites Spektrum von unterschiedlichen Leberfibrosestadien und konzentrierte sich auf eine einzige Krankheitsentität. Andererseits war die Frequenz von K8/18-Mutationen bei deutschen CHC-Patienten (7,3 %) signifikant höher als in der US-amerikanischen (Ku *et al.*, 2005) und englischen Kontrollgruppe (Owens *et al.*, 2004) mit 3,7% bzw. 2,1%. Zudem ist die Häufigkeit bei Patienten mit Leberzirrhose ähnlich: 10,3% (8/78) bei deutschen CHC-Patienten im Vergleich zu 12,4% bei US-amerikanischen Patienten von Ku *et al.* (2005). Ein bereits bekannter, häufig vorkommender K8 L227L-Polymorphismus (Hesse *et al.*, 2004; Ku *et al.*, 2005) wurde bei 51% der deutschen Patienten mit CHC gefunden. Dieser Polymorphismus hat wahrscheinlich keine biologischen Konsequenzen, da er zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz führt und auch frühere Studien keine Hinweise auf einen biologischen Effekt ergaben. Daher wurde er in der Auswertung nicht weiter berücksichtigt. Die am häufigsten vorkommenden, aminosäuresubstituierenden Keratinvarianten sind bei deutschen und amerikanischen Patienten mit Lebererkrankungen identisch (Abb. 5.1). Die K8 Arginin341 → Histidin-Mutation ist die bislang häufigste kodierende Keratinvariante. 6,7% der US-amerikanischen Patienten vs. 3,1% Kontrollen ( $p < 0,03$ ) und 3,5% der deutschen Patienten tragen diese Mutation, während sie in einer englischen Kontrollgruppe nicht vorkam ( $p < 0,09$ ; Ku *et al.*, 2007). Sie ist mit 3% (10/329) bei deutschen Patienten mit CHC am häufigsten, gefolgt von der K8 G62C-Mutation, die bei 1,8% (6/329) Patienten vorlag (Tab. 4.6). Die K8 G62C-Variante zeigt keine signifikant unterschiedliche Verteilung zwischen Patienten und Kontrollen in europäischen und amerikanischen Kohorten. Allerdings stellten Treiber *et al.* (2006) ein deutliches Nord-Süd-Gefälle der K8 G62C-Frequenz innerhalb einer europäischen Kontrollgruppe fest mit Häufigkeiten von 3,5% (7/200) in England, 1,5% (23/1532) in Deutschland, 0,8% (4/486) in Tschechien und 0,4% (2/539) in Spanien. Am dritthäufigsten war die K8 I63V-Substitution bei 4/329 (1,2%) deutschen CHC-Patienten vertreten. In der amerikanischen Kohorte war sie jedoch häufiger bei Kontrollen als bei Patienten (2% vs. 0,2%) und wurde daher von Ku *et al.* (2005) als einfacher Polymorphismus gewertet. Die Häufigkeit von K8/18-Varianten bei Lebererkrankungen zeigt keine geschlechtsspezifischen Unterschiede, allerdings gibt es Hinweise auf eine Assoziation spezifischer Varianten mit der Population bzw. Ethnizität. So wurden die Varianten K8 Y54H und G434S bei US-amerikanischen Patienten mit Lebererkrankung signifikant häufiger bei Afroamerikanern (6/26, 23,1%) im Vergleich zu Kaukasiern (1/274, 0,4%) ( $p < 0,0001$ ) oder anderen ethnischen Gruppen gefunden (Ku *et al.*, 2005). Beobachtungen in deutschen Kohorten unterstützen diese Vermutung. So wurde die einzige K8 Y54H-Mutation in unserer Untersuchung bei einem CHC-Patienten afrikanischer Ethnizität identifiziert (Tab. 4.5). Halangk *et al.* (2004) fanden K8 Y54H bei zwei Patienten in einer

deutschen Kohorte, die beide afrikanischer Herkunft waren. In einer großen Studie von Treiber *et al.* (2006) wurde diese Variante bei 0,1% (1/1532) Deutschen, aber 2,4% (17/722) Afrikanern gefunden. Die K8 Y54H-Mutation ist wahrscheinlich spezifisch für Patienten afrikanischer Ethnizität, während die Assoziation von K8 G434S in weiteren Studien validiert werden muß. Treiber *et al.* fanden zudem eine signifikant höhere Frequenz der K8 G62C-Mutation bei Deutschen (50/3230, 1,5%) und Europäern (98/6543, 1,5%) als bei Afrikanern (2/951, 0,2%): jeweils  $p = 0,001$ . In der US-amerikanischen Kohorte wurde die K8 G62C-Mutation hingegen bei 4/274 (1,5%) Kaukasiern vs. 1/26 (3,8%) Afroamerikanern gefunden. Halangk *et al.* (2004) identifizierte diese Variante bei 26/1400 (1,9%) deutschen Kaukasiern und 0/4 Afrikanern mit chronischen Lebererkrankungen. In unserer Untersuchung war sie bei 5/278 (1,8%) deutschen Kaukasiern und 1/2 (50%) afrikanischen Patienten vorhanden (Tab. 4.5). Allerdings ist die afrikanische Ethnizität in diesen Studien zu schwach repräsentiert, um Signifikanz abzuleiten. Ein weiterer Unterschied besteht in der Häufigkeit von K8 und K18-Varianten, da K8-Varianten weitaus häufiger vorkommen (Ku *et al.*, 2007). So wurde nur eine einzige K18 Serin230→Threonin-Variante bei insgesamt 2 deutschen CHC-Patienten (0,6%) identifiziert (Tab. 4.6). Dagegen wurden K18-Varianten bei 16/467 (3,4%) US-amerikanischen Patienten detektiert (mit einer Häufigkeit von 4,5% bei lateinamerikanischen und 1,8% bei kaukasischen Patienten) vs. 4/349 (1,1%) in der Kontrollgruppe (Ku *et al.*, 2005). Patienten lateinamerikanischer Abstammung waren in unserer Kohorte nicht vorhanden (Tab. 4.5). Neben populationsspezifischen Unterschieden könnten auch Unterschiede im Krankheitsspektrum für den Mangel an K18-Varianten verantwortlich sein, da nur ca. 25% der amerikanischen K18-Varianten-Träger an einer viralen Hepatitis erkrankt waren. Möglicherweise sind manche K18-Varianten bei den von mir angewendeten DHPLC-Analysebedingungen auch nicht erkannt worden. Das trifft vor allem für die eher seltenen homozygoten Sequenzvarianten zu (siehe oben). Andererseits erklärt es nicht die niedrige Frequenz heterozygoter K18-Varianten. Allerdings konnten bereits bekannte, heterozygote K18-Varianten, die als Positivkontrollen für die wichtigsten K18-Exone eingesetzt wurden, eindeutig identifiziert werden (Abs. 4.1.1). Darüber hinaus fanden auch Owens *et al.* (2004) nach Analyse aller *KRT18*-Exone allein die K18 S230T-Variante in einer englischen Kohorte. Daher ist anzunehmen, dass Sequenzvarianten von *KRT18* deutlich seltener sind als von *KRT8* aus bisher ungeklärten Gründen. In der Studie von Hesse *et al.* (2004) wurden keine aminosäureverändernden Varianten bei deutschen Patienten nach Analyse aller *KRT8/18*-Exone gefunden. Allerdings konnte unsere Untersuchung diesen initialen Mangel an Mutationen widerlegen, der wahrscheinlich auf methodische Schwierigkeiten zurückzuführen ist (Abs. 4.1.2). Die Analyse konzentrierte sich auf zwei wichtige K8 Exone, in denen 12 exonische,

heterozygote Varianten gefunden wurden (Tab. 4.2). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Varianten von *KRT8* und *KRT18* in der Kohorte von Hesse *et al.* vorhanden sind. Möglicherweise gibt es eine Assoziation mit dem Schweregrad der Lebererkrankung in dieser Kohorte, allerdings konnte diese Frage wegen fehlender histologischer Angaben nicht geklärt werden. In einer anderen, großen deutschen Kohorte wurde kein Zusammenhang zwischen K8/18-Mutationen und dem Verlauf chronischer Lebererkrankungen festgestellt (Halangk *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse unserer Untersuchung, dass K8/18-Mutationen einen signifikanten Risikofaktor für die Entwicklung schwerer Lebererkrankungen (Stadium 3, 4) bei deutschen Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion (Tab. 4.10) und für die Progression zu Leberzirrhose (Tab. 4.11) darstellen. Das allgemeine Risiko bei CHC-Patienten aller Ethnizitäten, eine Leberfibrose Stadium 3 oder 4 zu entwickeln, ist bei Trägern einer K8/18-Mutation etwa 5,7-fach erhöht (95%-KI = 2,02-16,08;  $p = 0,001$ ). In der Subkohorte der 278 deutschen Kaukasier liegt dieses Risiko nur geringfügig niedriger: OR = 4,39; 95%-KI = 1,42-13,55;  $p = 0,01$  (Tab. 4.10). Träger einer K8/18-Mutation mit CHC unterliegen sogar einem noch höheren Risiko, das Endstadium der Leberfibrose bzw. Leberzirrhose zu entwickeln. Bei Patienten aller Ethnizitäten war das Risiko etwa 7-fach erhöht (95%-KI = 2,37-20,6;  $p < 0,001$ ), bei den deutschen Kaukasier bis zu 8,7-fach gesteigert (95%-KI = 2,63-29,07;  $p < 0,001$ ). K8/18-Mutationen begünstigen also die Progression der Fibrose zur Leberzirrhose im Rahmen der chronischen HCV-Infektion. Allerdings sollten diese Ergebnisse anhand einer langfristigen, groß angelegten Longitudinalstudie validiert werden. Im Einklang mit früheren Studienergebnissen stellen Alter, Dauer der HCV-Infektion und Übergewicht (Abs. 1.6.4) auch in dieser Kohorte einen signifikanten, wenn auch moderaten Risikofaktor dar. Erhöhter Alkoholkonsum hingegen verdoppelt sogar das Risiko schwerer Leberfibrose bei deutschen CHC-Patienten (Tab. 4.10). Insgesamt deuten die Ergebnisse aber darauf hin, dass von allen signifikanten Risikofaktoren K8/18-Mutationen den weitaus größten Einfluß auf den Schweregrad und Verlauf der Lebererkrankung haben (Abb. 4.8). Die fehlende Assoziation von Keratinmutationen mit Lebererkrankung unterschiedlicher Ätiologie in der Studie von Halangk *et al.* (2004) könnte verschiedene Gründe haben. Die unterschiedliche Frequenz bei deutschen und US-amerikanischen Patienten könnte beispielsweise durch die ethnische Zusammensetzung der Kohorten bedingt sein. Wie bereits erwähnt treten spezifische Varianten häufiger bei Patienten afrikanischer Herkunft auf und deren Anteil differierte deutlich in den Kohorten von Halangk *et al.* (2004) und Ku *et al.* (2005): 0,2% vs. 5,6%. Auch der Anteil kaukasischer Patienten war deutlich unterschiedlich (97% vs. 58,7%), was möglicherweise die Frequenz von K8 G62C beeinflusst haben könnte (Treiber *et al.*, 2006). Andererseits wurde diese Mutation häufiger bei Schwarzen

als bei Kaukasiern in der Kohorte von Ku *et al.* (2005) detektiert. Auch erklären populationsbedingte Unterschiede nicht die unterschiedlichen Ergebnisse von Halangk *et al.* und unserer Untersuchung aufgrund der vergleichbaren Ethnizitätsverhältnisse. Die Häufigkeit der K8-Varianten G62C und Y54H war in unserer Kohorte (n = 329) und der Subkohorte mit CHC bei Halangk *et al.* (n = 672) ähnlich: 1,8% (6/329) vs. 1,9% (13/672) für K8 G62C und 0,3% (1/329) vs. 0,1% (1/672) für K8 Y54H. Allerdings fokussierte die Untersuchung von Halangk *et al.* auf nur zwei Mutationsstellen in *KRT8* Exon 1, während andere wichtige Sequenzen nicht analysiert wurden. Mutationsschwerpunkte wie z.B. *KRT8* Exon 6, wo die bei chronischer Lebererkrankung häufigste K8 R341H-Mutation lokalisiert ist (Ku *et al.*, 2007), oder *KRT18* wurden nicht untersucht. Bei 794/1668 (47,6%) der Patienten wurde eine Lebertransplantation aufgrund weit fortgeschrittener Lebererkrankung durchgeführt, bei den übrigen 874 Patienten waren alle Stadien der Leberfibrose vertreten (Halangk *et al.*, 2004). Die zugrunde liegenden histologischen Kriterien und die Verteilung der Leberfibrosestadien wurden nicht näher beschrieben, so dass ggf. unterschiedliche Gewichtungen histologischer Stadien im Vergleich zu meiner Kohorte vorlagen. Die vollständige Analyse von *KRT8/18* in der umfangreichen und ethnisch homogenen Kohorte von Halangk *et al.* (2004) könnte die Bedeutung von K8/18-Mutationen in der Entwicklung chronischer Lebererkrankungen und bei einzelnen Krankheitsentitäten bei deutschen Patienten weiter erhellen. Schöniger-Hekele *et al.* (2006) untersuchten ebenfalls die zwei Mutationsschwerpunkte in *KRT8* Exon 1 bei österreichischen Patienten (n = 107) mit verschiedenen chronischen Lebererkrankungen. Sie fanden die K8 G62C-Mutation bei 2,8% der Patienten vs. 2,2% in Kontrollen (p >0,8) und einen Trend zu gehäufterem Vorkommen bei Patienten mit kryptogener Leberzirrhose (p = 0,07). Die K8-Mutationen G62C und Y54H können zu kryptogener Leberzirrhose bei US-amerikanischen Patienten prädisponieren (Ku *et al.*, 2001). Der fast ausschließlich kaukasische Hintergrund der österreichischen Kohorte könnte zum Fehlen der K8 Y54H-Variante beigetragen haben. Ferner wurde keine Variante in *KRT18* Exon 1 detektiert. Allerdings mangelte es der österreichischen Studie an statistischer Power aufgrund der geringen Kohortengröße, so dass es größeren multizentrischen Studien überlassen bleibt, das Risiko durch K8/18-Mutationen in dieser Population zu bewerten. Insgesamt wurde eine Assoziation von K8/18-Mutationen mit dem Schweregrad humaner Lebererkrankungen bei US-amerikanischen Patienten und bei deutschen CHC-Patienten festgestellt. Allerdings waren die meisten einzelnen Varianten ohne signifikante Assoziation, da sie insgesamt selten sind und im Mausmodell phänotypisch „still“ sind und erst unter hepatotoxischer Belastung in Erscheinung treten.

### 5.2.2 Biologische Konsequenzen der identifizierten *KRT8/18*-Varianten

Die Analyse deutscher Patienten mit CHC deckte mehrere neue Varianten in kodierenden und nicht kodierenden Sequenzen auf. Vor allem ist unklar, welche potentiellen Auswirkungen die nicht exonische Varianten auf die Lebererkrankung haben. Allerdings können intronische Varianten Spleißstellen verändern, das Spleißen der Keratin-prä-mRNA beeinträchtigen und dadurch die Bildung und Organisation der Keratinfilamente stören (Hatsell *et al.*, 2001; Tojo *et al.*, 2003; Virtanen *et al.*, 2003). Auch können Sequenzveränderungen in der Promoterregion die Expression der Keratinproteine beeinflussen. Darüber hinaus fiel auf, daß die intronische *KRT8* IVS7+10delC-Deletion ausschließlich und exklusiv mit der exonischen K8 R341H-Mutation auftrat bei allen CHC-Patienten (Tab. 4.8). Die *KRT8*-IVS7+10delC-Variante wurde in keinem anderen Patienten mit kodierenden oder nicht kodierenden Varianten identifiziert. Diese starke Bindung zwischen einer intronischen und exonischen K8-Variante legt eine kausale Beziehung nahe. Denkbar wäre, dass eine Variante die Entstehung der anderen Variante während der DNA-Replikation auslöst. Die exklusive Kombination könnte dadurch bedingt sein, dass die Varianten sich gegenseitig stabilisieren. Die physiologischen Konsequenzen von K8 R341H sind unklar, aber Analysen der Proteinstruktur ergaben einen potentiell destabilisierenden Effekt dieser Mutation (Ku *et al.*, 2005). Außerdem waren drei bisher unbekannte, heterozygote Varianten in der Kohorte der deutschen CHC-Patienten vorhanden: K8 Threonin26→Arginin, Glyzin55→Alanin und Alanin→359Threonin (Abb. 5.1). Die biologischen Auswirkungen dieser Varianten bei chronischer Lebererkrankung sind noch nicht untersucht. Die Träger der K8-Varianten T26R und G55A waren jedoch an schwerer Leberfibrose Stadium 3 und 4 erkrankt (Tab. 4.6). Die Leberhistologie des K8 A359T-Trägers zeigte zudem eine hohe Entzündungsaktivität Grad 4 (Tab. 4.7), die nur selten in dieser Kohorte vorkam (4 Patienten). Die Aminosäuren K8 Glyzin55 und Alanin359 sind hoch konserviert innerhalb verschiedener Spezies (Abb. 4.6 C, E) und humaner Typ II-Keratine (Abb. 4.6 D, F). K8 T26 ist in verschiedenen Spezies konserviert als Threonin oder Serin (Abb. 4.6 A), aber nicht in humanen Typ II-Keratinen (Abb. 4.6 B). Es ist nicht bekannt, ob K8 Threonin26 phosphoryliert ist. Durch Substitution von Threonin26 durch Arginin26 wird jedoch eine potentielle Proteinkinase C-Phosphorylierungsstelle (mit der Konsensussequenz <sup>23</sup>RXXTS GP [Pearson und Kemp, 1991]) entfernt und eine neue potentielle cAMP-abhängige Phosphorylierungsstelle in das benachbarte Serin27 (mit der Konsensussequenz <sup>23</sup>RXXRSGP [Pearson und Kemp, 1991]) eingeführt. K8 Threonin26-Phosphorylierung wurde vor kurzem in Mallory bodies entdeckt und ist möglicherweise ursächlich an der Bildung solcher Aggregate in Hepatozyten beteiligt (Zatloukal *et al.*, persönliche Kommunikation) wie es bereits bei K8 Serin73 gezeigt wurde (Ku und Omary, 2006; Zatloukal *et al.*, 2007). Die

mutationsbedingte Ablation einer bestehenden Phosphorylierungsstelle oder Einführung einer neuen Bindungsstelle kann pathophysiologische Konsequenzen haben (Omary *et al.*, 2006). In transgenen Mäusen kann die Ablation oder Mutation von Keratinphosphorylierungsstellen zu verstärkter hepatotoxischer Anfälligkeit der Hepatozyten prädisponieren. Eine Konformationsänderung durch die K8 G434S-Variante vermindert z.B. die Phosphorylierung von K8 S432 um etwa 50% im Vergleich zu Wildtyp-K8, wodurch phosphorylierungsabhängige dynamischen Prozesse gestört werden (Ku *et al.*, 2005). Es gibt Hinweise darauf, dass die Varianten K8 G434S und Y54H ethnizitätsspezifisch gehäuft vorkommen (Abs. 5.2.1). Auch K8 Y54H ist wahrscheinlich pathogen, da diese Variante in Zellkultur instabile Keratinfilamente generiert (Ku *et al.*, 2001) und bei einem afrikanischen CHC-Patienten mit fortgeschrittener Fibrose (Stadium 3) gefunden wurde (Tab. 4.6). K8/18-Hyperphosphorylierung wurde hingegen in unterschiedlichen Stresssituationen in Zellkultur und transgenen Mäusen beobachtet und gilt daher als allgemeiner Marker von epithelialer Zellschädigung (Omary *et al.*, 2002). Sie korreliert mit der Progression chronischer Lebererkrankungen beim Menschen (Toivola *et al.*, 2004; Zatloukal *et al.*, 2004) und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Keratinfilamentorganisation und -umbau und Bindung von Proteinen (Coulombe und Omary, 2002). Zudem können Keratine eine Funktion als Phosphatreservoir („Phosphatschwamm“) übernehmen und so als Puffer gegenüber unkontrollierter Phosphorylierung durch stressaktivierte Proteinkinasen fungieren (Ku und Omary, 2006). Unter apoptotischer Stimulation verursachten sowohl K8 G62C-induzierte Konformationsänderung als auch K8 S74A-Ablation eine Hemmung der K8 S74-Phosphorylierung in Hepatozyten, infolgedessen eine erhöhte pro-apoptotische Phosphorylierung von Nicht-Keratin-Substraten *via* stressaktivierter Kinasen eintrat (Ku und Omary, 2006). Die K8 G62C-Mutation ist die zweithäufigste Variante bei Patienten mit Lebererkrankung, jedoch ist sie unter physiologischen Bedingungen bei Mensch und Maus phänotypisch komplett unauffällig (Ku *et al.*, 2007). In der Zelle vermindert K8 G62C die Keratinlöslichkeit und verursacht Quervernetzungen durch Bildung von kovalenten Disulfidbrücken unter oxidativer Belastung (Owens *et al.*, 2004; Ku *et al.*, 2001, 2005; Ku und Omary, 2006). Die Überexpression dieser natürlichen humanen Variante in transgenen Mäusen machte Hepatozyten anfälliger gegenüber Apoptose und schwerer Leberverletzung unter hepatotoxischer Belastung (Ku und Omary, 2006). Diese Ergebnisse sind konform zu der Bedeutung von K8/18-Mutationen als Risikofaktoren bei chronischer Lebererkrankung in unserer CHC-Kohorte und der amerikanischen Kohorte von Ku *et al.* (2005). Auch wurde die K8 G62C-Mutation häufiger bei Patienten *vs.* Kontrollen im Rahmen anderer digestiver Erkrankungen identifiziert, z.B. bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (3,9% *vs.* 1,0%; Owens *et al.*, 2004) oder Pankreatitis (8,9% *vs.* 0%;

Cavestro *et al.*, 2003). Die dritthäufigste Mutation K8 I63V bei deutschen CHC-Patienten (Abb. 5.1) wurde in der Studie von Ku *et al.* (2005) als einfacher Polymorphismus gewertet, da sie häufiger bei Kontrollen als bei Patienten gefunden wurde. Im Gegensatz dazu trat die K8 I63V-Mutation in unserer Untersuchung ausschließlich bei Patienten mit Leberzirrhose (Fibrosestadium 4; Tab. 4.6) auf. Außerdem identifizierten Owens *et al.* (2004) diese Variante auch bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen und zeigten, dass diese Mutation die Keratinfilamentorganisation beeinträchtigen kann. Bisher wurden keine Mutationen bei Patienten identifiziert, die zu einem vollständigen Fehlen von K8/18 oder Filamentabbrüchen führen. Die deutlich erhöhte Fragilität solcher Hepatozyten in verschiedenen Mausmodellen (Tab. 1.5) weist auf die wichtige mechanische Schutzfunktion des flexiblen Keratinzytoskeletts (Wagner *et al.*, 2007) für Hepatozyten hin. Es wird daher angenommen, dass solche K8/18-Mutationen beim Menschen letal sind (Ku *et al.*, 2007). Keratine sind an einer Reihe weiterer Zellprozesse beteiligt, die der nicht mechanischen Zytoprotektion dienen (Omary *et al.*, 2002; Zatloukal *et al.*, 2004). Keratine können oxidativ geschädigte Zellproteine sequestrieren (Tao *et al.*, 2005) und Keratinmutationen können die Schwelle für oxidative Leberzellverletzung senken (Zhou *et al.*, 2005). Ferner beeinträchtigt K8/18-Mutationen oder Ablation die keratinvermittelte Zytoprotektion gegenüber Apoptose (Caulin *et al.*, 2000; Gilbert *et al.* 2001; Ku *et al.*, 2003b). Sowohl Apoptose als auch oxidative Belastung sind wichtige zelluläre Pathomechanismen bei chronischer Hepatitis C-Virusinfektion (Okuda *et al.*, 2002; Bantel und Schulze-Osthoff, 2003). Außerdem wurden Wechselwirkungen von HCV-Kernproteinen mit Keratinen in transfektierten Zellen beobachtet (Kang *et al.*, 2005). Allerdings ist bisher ungeklärt, ob bzw. wie stark sich Keratinmutationen auf die Virusreplikation während der Hepatitis C-Virusinfektion auswirken. Die Bedeutung von Keratin 8/18-Mutationen bei humanen Lebererkrankungen ist noch nicht abschließend geklärt. Jedoch deuten unsere Ergebnisse und andere Studien an, dass Keratine eine Rolle als zytoprotektive Stressproteine in Hepatozyten spielen in Hinblick auf ihre Induktion bei Leberzellverletzung und Schutzfunktion vor Apoptose und anderen Formen nicht mechanischer und mechanischer Leberschädigung. Diese Untersuchung zeigt, dass Keratin 8/18-Mutationen zu den wenigen, besser bekannten genetischen Risikofaktoren bei chronischer HCV-Infektion gezählt werden können. Zukünftige Studien dürften die Rolle von K8/18-Mutationen in der Pathogenese weiterer spezifischer Lebererkrankungen und die Bedeutung bestimmter K8/18-Varianten bei spezifischen Ethnizitäten/Populationen weiter klären und Möglichkeiten der Prävention und Therapie von keratinassoziierten Lebererkrankungen erschließen.

### 5.3 Analyse der Kohorte österreichischer Patienten mit C282Y-homozygoter hereditärer Hämochromatose

#### 5.3.1 Häufigkeit und Verteilung von *KRT8/18*-Varianten in der österreichischen Kohorte

Bei 162 C282Y-homozygoten Patienten wurden insgesamt 11 heterozygote K8-Mutationen entdeckt. Die häufigste heterozygote, aminosäuresubstituierende Mutation war K8 R341H bei 4 von 162 (2,5%) Patienten, gefolgt von der K8 G62C-Mutation bei drei (1,9%) Patienten (Tab. 4.14). Die Häufigkeit der K8 R341H-Variante war in den österreichischen Patienten deutlich geringer als bei den amerikanischen C282Y-homozygoten Patienten von Lee *et al.* (2002). Sie identifizierten die K8 R341H-Mutation bei 9 von 119 (7,6%) C282Y-homozygoten Patienten. Andererseits ist die Häufigkeit der K8 R341H- und G62C-Variante in österreichischen HHC-Patienten vergleichbar mit der Frequenz bei deutschen Patienten mit chronischer HCV-Infektion (3% bzw. 1,8%) und Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologie bei Halangk *et al.* (K8 G62C = 1,6%). Bei der Re-Analyse der Kohorte von Hesse *et al.* (2004) war K8 R341H etwas häufiger (4,6%) und K8 G62C etwas seltener (0,7%; Tab. 4.2) als in den österreichischen HHC-Patienten. Die ethnische Zusammensetzung und Homogenität der deutschen und österreichischen Populationen erklären die ähnlichen Frequenzen der K8-Varianten in diesen Studien. Die höhere Frequenz der K8 R341H-Mutation bei HHC in den USA könnte durch die ethnische Heterogenität der amerikanischen Population bedingt sein. Lee *et al.* (2002) machten keine Angaben über den ethnischen Hintergrund der Patienten. In der Kohorte von Ku *et al.* (2005) trat die K8 R341H-Mutation jedoch bei 14/274 (5,1%) Kaukasiern vs. 10/67 (15%) Lateinamerikanern mit unterschiedlichen Lebererkrankungen auf. Möglicherweise ist diese Variante also deutlich häufiger bei Lateinamerikanern vertreten und solche Patienten waren in den deutschen Kohorten (Tab. 4.5; Halangk *et al.*, 2004; Hesse *et al.*, 2004) und der österreichischen HHC-Kohorte (Abs. 3.1.3.1) nicht vorhanden. Außerdem wurden zwei bisher nicht beschriebene, exonische K8-Varianten (Tab. 4.14) entdeckt: K8 Glutamin169→Glutaminsäure (Q169E) in der Subdomäne IB und Arginin275→Tryptophan (K8 R275W) in der nicht helikalen Linker-Sequenz L2. Das Vorkommen der K8 Q169E-Variante bei insgesamt zwei Hämochromatosepatienten, aber nicht bei insgesamt über 1000 analysierten Patienten früherer Untersuchungen, spricht für eine enge Assoziation mit dieser Erkrankung oder mit der analysierten Bevölkerungsgruppe. Insbesondere die K8 Q169E-Alteration könnte daher spezifisch für die hereditäre Hämochromatose sein. Die K8 R275W-Variante kommt vermutlich ebenfalls selten vor, da sie bisher allein bei einem C282Y-homozygoten Hämochromatosepatienten beobachtet wurde (Tab. 4.14). Beide Aminosäurepositionen sind auch in den Spezies *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Xenopus*

*laevis* und *Danio rerio* hoch konserviert (Abb. 4.10 A, C). Die Sequenz um K8 Glutamin169 ist unverändert in den humanen Typ II-Keratinen (Abb. 4.10 B), während der Grad der Konservierung von K8 Arginin275 unter den humanen Typ II-Keratinen eher gering ist (Abb. 4.10 D). Der hohe Konservierungsgrad der Sequenzen deutet darauf hin, dass Alterationen zu funktionalen Konsequenzen führen könnten. Obwohl bei keinem der drei Träger eine Leberzirrhose dokumentiert war (Tab. 4.14), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Patienten eventuell ein fortgeschrittenes Leberfibrosestadium hatten, da keine Informationen zu einzelnen Stadien vorlagen. Außerdem wurde die K8 R275W- und eine K8 Q169E-Variante bei weiblichen Patienten entdeckt, bei denen ansonsten eine geringe klinische Penetranz der hereditären Hämochromatose typisch ist (Asberg *et al.*, 2001; Ajioka und Kushner, 2002; Adams *et al.*, 2005). Der andere Patient mit der K8 Q169E-Mutation war männlichen Geschlechts und lag mit einem Alter von 28,6 Jahren deutlich unter dem Durchschnittsalter der Patienten von 50,4 Jahren (Tab. 4.12). Er hatte bei der Biopsieentnahme keine Leberzirrhose, allerdings ist die Entwicklung einer Lebererkrankung im höheren Lebensalter nicht auszuschließen. Auffallend war auch die geringere Anzahl an *KRT18*-Varianten bei Kaukasiern im Vergleich zu Lateinamerikanern in der Kohorte von Ku *et al.*: 1,8% vs. 4,5%. Der Mangel an K18-Varianten in deutschen und österreichischen Studien könnte daher eventuell auch durch eine niedrige Frequenz dieser Varianten bei Kaukasiern bzw. in der westeuropäischen Population bedingt sein. Auch bei den österreichischen, ausschließlich kaukasischen, C282Y-homozygoten Patienten wurden keine K18-Varianten identifiziert (Tab. 4.14). Treiber *et al.* (2006) wiesen darauf hin, dass spezifische Keratinmutationen einer relativ großen Frequenzvariabilität innerhalb Europas unterliegen und andererseits – im Einklang mit früheren Studien (Halangk *et al.*, 2004; Ku *et al.*, 2005) – Hinweise auf eine ethnische Präferenz spezifischer Keratinvarianten vorliegen. Darüber hinaus wurde die exklusive und ausschließliche Kombination der intronischen *KRT8* IVS7+10delC mit exonischer K8 R341H-Substitution, die bei deutschen Patienten mit chronischer HCV-Infektion festgestellt wurde (Abs. 4.2.3), in der Kohorte österreichischer Hämochromatosepatienten bestätigt (Tab. 4.15). Das Fehlen dieser intronischen Mutation bei anderen HHC-Patienten mit kodierenden oder nicht kodierenden Varianten legt die Möglichkeit einer kausalen Beziehung nahe (Abs. 5.2.2). Auch bei amerikanischen C282Y-homozygoten Hämochromatosepatienten wurde die intronische *KRT8* IVS7+10delC-Variante beschrieben (Lee *et al.*, 2002). Allerdings ist nicht beschrieben worden, ob diese Variante ausschließlich in Kombination mit der exonischen K8 R341H in dieser Kohorte auftrat.

### 5.3.2 Biologische Bedeutung von *KRT8/18*-Varianten bei C282Y-homozygoter hereditärer Hämochromatose

In einer Studie von Lee *et al.* (2002) wurde ein breites Spektrum von Kandidatengen, die Einfluss auf die Penetranz der hereditären Hämochromatose nehmen könnten, auf das Vorliegen von Genmutationen untersucht, darunter *KRT8* und *KRT18*. Die bei Lebererkrankungen am häufigsten vorkommende K8 R341H-Variante wurde bei 7,6% der C282Y-homozygoten Hämochromatosepatienten gefunden vs. 0% in der Kontrollgruppe. Allerdings tendierten die K8 R341H-heterozygoten Träger – wenn auch nicht signifikant – zu niedrigeren Konzentrationen von Serumkollagen IV als solche Patienten ohne K8-Mutation oder gesunde Personen mit *HFE*- und *KRT8*-Wildtyp (Lee *et al.*, 2002). Auch bei den österreichischen C282Y-homozygoten Patienten wurde kein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Leberzirrhose festgestellt: OR = 0,78; 95%-KI = 0,13-4,68; p = 0,78. Diese Ergebnisse bei amerikanischen und österreichischen Hämochromatosepatienten deuten darauf hin, dass exonische aminosäuresubstituierende *KRT8/18*-Mutationen nicht mit der Entwicklung von Leberzirrhose bei C282Y-homozygoter hereditärer Hämochromatose assoziieren im Gegensatz zu ihrer Rolle bei chronischer Hepatitis C-Virusinfektion (Abb. 4.8). Stickel *et al.* (2005) stellten fest, daß Polymorphismen des antioxidativen Enzyms GSTP1 mit der Entwicklung von Leberfibrose bei Patienten mit hereditärer Hämochromatose, aber nicht bei solchen mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion assoziieren. Sie äußerten die Vermutung, dass unterschiedliche zellbiologische Mechanismen in beiden Erkrankungen für die Entwicklung von Leberfibrose verantwortlich sein könnten. Untersuchungen am transgenen Mausmodell weisen in dieselbe Richtung. Transgene Mäuse mit K18 R90C-Mutation zeigen erhöhte Anfälligkeit gegenüber Thioacetamid-induzierter Leberfibrose, aber nicht gegenüber Carbontetrachlorid-induzierter Leberfibrose (Strnad *et al.*, 2008). Das deutet darauf hin, dass *KRT8/18*-Varianten wahrscheinlich unterschiedliche Gewichtung in den unterschiedlichen Pathomechanismen der Entwicklung von Leberfibrose haben. Andererseits wies die Analyse der österreichischen Hämochromatosepatienten auf einen nicht signifikanten Trend zu erhöhtem Leberzirrhoserisiko bei den zehn Trägern mit nicht kodierenden Keratinvarianten hin: OR = 8,45; 95%-KI = 0,72-99,24; p = 0,09 (Tab. 4.16). Intronsche Keratinvarianten können über verschiedene Mechanismen pathophysiologisch relevant werden. So können sie durch Mutation von Spleißstellen nahe der Exon-Intron-Grenze auf die Keratinproteinexpression und -funktion Einfluß nehmen. Eine japanische Studie zeigte, dass aberrantes Spleißen von Keratin 8 zu Störungen der Organisation des Keratinfilamentnetzwerks und Zellfragilität in Lungenkarzinomzellen führt (Tojo *et al.*, 2003). Die beobachtete erhöhte Apoptose-resistenz bestimmter Lungenkarzinomzellen könnte durch Verlust einer Caspase-Schnittstelle

des fertigen Genprodukts bedingt sein (Tojo *et al.*, 2003), da die Proteolyse durch Caspasen eine wichtige Funktion bei der Zytoskelettorganisation während der Apoptose einnimmt (Ku *et al.*, 1999). Pathogenetische Konsequenzen von intronischen Sequenzvarianten wurden auch bei epidermalen Keratinen beschrieben. Bei schottischen Patienten führte die Mutation einer Donor-Spleißstelle in *KRT1* Exon 6 zur Insertion von 18 Aminosäuren mit der Folge von milden fokalen Epidermolysen der palmo-plantaren Epidermis (Hatsell *et al.*, 2001). Bei skandinavischen Patienten mit epidermolytischer Hyperkeratose führte die Mutation der Donor-Spleißstelle in Intron 1 zur Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle und großen „In-frame-Deletion“ von 22 Aminosäuren mit ebenfalls milder phänotypischer Ausprägung (Virtanen *et al.*, 2003). Eine ähnliche Mutation der Donor-Spleißstelle in *KRT5* Intron 1 wurde außerdem bei Patienten mit *Epidermolysis bullosa simplex* beschrieben (Rugg *et al.*, 1999). Die Studien belegen, dass Mutationen intronischer Spleißstellen bei Keratinen vorkommen und zur Störung der Keratinfilamentbildung führen. Möglicherweise sind intronische Keratinvarianten über ähnliche Mechanismen an der Entwicklung hämochromatoseassoziiierter Lebererkrankung beteiligt, allerdings läßt die Analyse der österreichischen Patienten aufgrund der limitierten Fallzahl keine abschließenden Aussagen zu. Die Analyse einer weitaus größeren Kohorte von C282Y-homozygoten Hämochromatosepatienten könnte Klarheit darüber schaffen, ob und in welchem Ausmaß *KRT8/18*-Varianten den Verlauf und Schweregrad der Lebererkrankung bei C282Y-homozygoter hereditärer Hämochromatose beeinflussen. In der österreichischen Kohorte wurde Leberzirrhose bei 63/162 (38,9%; Tab. 4.14) der Patienten diagnostiziert, davon 60 (95%) männlichen und 3 (5%) weiblichen Patienten. Diese disproportionale Verteilung ist vereinbar mit der höheren Penetranz der hereditären Hämochromatose und beschleunigten Progression der Lebererkrankung bei männlichen Patienten, während bei Frauen eine niedrigere Penetranz und – insbesondere vor der Menopause – langsamere Entwicklung der Leberfibrose typisch ist (Poynard *et al.*, 2003; Beutler, 2006). Das Alter des Patienten stellte einen mäßigen Risikofaktor (OR = 1,08; 95%-KI = 1,04-1,12;  $p < 0,001$ ) für Zirrhoseentwicklung dar, während die Serumferritin-Konzentration ein deutlicher Prädiktor für erhöhtes Zirrhoserisiko war: OR = 32,74; 95%-KI = 7,63-140,5;  $p < 0,001$  (Tab. 4.16). Andere Parameter des Eisenstoffwechsels konnten aufgrund unzureichender Dokumentation (Tab. 4.13) nicht in der statistischen Analyse berücksichtigt werden. Ferner zeichnete sich ein nicht signifikanter Trend zur Entwicklung von Leberzirrhose bei HHC-Patienten mit erhöhtem Alkoholkonsum ab: OR = 6,26; 95%-KI = 0,73-54,09;  $p = 0,095$  (Tab. 4.16). Die Assoziation der Faktoren männliches Geschlecht, Serumferritin-Konzentration und Alter mit Präsenz von Leberzirrhose bei HHC wurde auch von Stickel *et al.* (2005) beschrieben und stimmt mit den beobachteten Risikofaktoren aus frühere Studien überein (Abs. 1.7.3).

### 5.3.3 Problematik der statistischen Auswertung

Die begrenzte Anzahl an verfügbaren DNA-Proben österreichischer HHC-Patienten stellte einen maßgeblich limitierenden Faktor der statistischen Aussagefähigkeit dieser Untersuchung dar. Da die Frequenz von Keratin 8/18-Varianten insgesamt niedrig ist, wären zur Klärung einer potentiellen genetischen Assoziation mit der Lebererkrankung bei C282Y-homozygoter Hämochromatose weitaus größere Patientenzahlen erforderlich gewesen. So ergab die Kalkulation der statistischen Power für die Demonstration einer genetischen Assoziation nicht kodierender Varianten bei der gegebenen Fallzahl einen unzureichenden Wert von 57%. Um eine Power von 80% zur Detektion eines Unterschieds mit Signifikanzniveau von 0,05 zu erreichen, wurde eine Kohortengröße von mindestens 228 Patienten errechnet. Wenn man die niedrige Frequenz der beiden häufigsten Varianten K8 R342H und G62C in dieser Population und eine Power von 80% im Chi-Quadrat-Test mit zweiseitigem Signifikanzniveau von 5% zugrunde legt, dann wären zur Analyse einer genetischen Assoziation dieser Mutationen mehr als eintausend HHC-Patienten notwendig gewesen. Es bleibt also umfassenderen, multizentrischen Studien mit sorgfältigem Studiendesign überlassen, die Bedeutung von K8/18-Mutationen bei C282Y-hereditärer Hämochromatose näher zu definieren.

## 6. Zusammenfassung

Keratin 8 und 18 schützen die Leber gegenüber mechanischen und nicht mechanischen Formen von Belastung und *KRT8/18*-Varianten können das Risiko zur Entwicklung von Leberzirrhose erhöhen. Die Häufigkeit und Verteilung von *KRT8/18*-Varianten in US-amerikanischen und europäischen Populationen ist unterschiedlich. Während in einer Studie keine aminosäure-substituierenden *KRT8/18*-Mutationen bei 256 deutschen Patienten mit Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologie gefunden wurden, waren solche in einer US-amerikanischen Kohorte mit terminaler Lebererkrankung bei 58 von 467 (12,4%) vorhanden. In beiden Studien wurde die genomische DNA mittels denaturierender Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (DHPLC) unter Verwendung eines WAVE DNA Fragment Analysis Systems (Transgenomic, San Jose, CA USA) analysiert. Daraus leitete sich die Hypothese ab, dass experimentelle Bedingungen zu der Diskrepanz der Studienergebnisse beigetragen haben könnten. Ziel der ersten Untersuchung war es daher, anhand von bereits bekannten *KRT8/18*-Mutationen und einer neu entdeckten K18 R353G-Variante die DHPLC-Analysebedingungen für die wichtigsten zehn K8/18-Exone unter einem Spektrum von denaturierenden Temperaturen zu optimieren. Sechs der 16 getesteten Varianten in drei von zehn Exonen konnten bei den von der Analysesoftware berechneten Temperaturen nicht zuverlässig detektiert werden. Darunter waren die bei humanen Lebererkrankungen am häufigsten vorkommenden Varianten K8 G62C, I63V und R341H. Alle Varianten waren jedoch bei Zusatz von 2°C höheren Schmelztemperaturen eindeutig zu identifizieren. Unter optimierten DHPLC-Analysebedingungen wurden 151 der 256 deutschen Patienten mit Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologie erneut analysiert. Die Re-Analyse fokussierte auf K8 Exon 1 und 6, in denen die meisten kodierenden Varianten in der großen US-amerikanischen Patientenkohorte gefunden worden waren. Insgesamt wurden 12 exonische und zwei intronische heterozygote K8-Varianten gefunden: eine K8 G62C, zwei K8 I63V, sieben K8 R341H, eine K8 E376E und eine bisher nicht beschriebene K8 V380I, sowie zwei intronische *KRT8* 1202+46 A→T. Es konnte nachgewiesen werden, dass zuvor nicht entdeckte exonische und intronische Keratinmutationen in der deutschen Kohorte vorhanden sind. Die DHPLC stellt eine zuverlässige Methode zur Mutationsdetektion dar, allerdings hat die Auswahl der DNA-Schmelztemperaturen entscheidenden Einfluss auf die Sensitivität des Verfahrens. Der Einsatz von bekannten Kontrollvarianten bietet eine effektive Möglichkeit zur Überprüfung softwareberechneter und Generierung empirischer Analysetemperaturen. In der US-amerikanischen Kohorte wurden K8/18-Mutationen als Risikofaktor für die Entwicklung terminaler Lebererkrankung unterschiedlicher Ätiologie identifiziert. Es ist unklar, ob spezifische Leberkrankheiten

präferentiell betroffen sind. In der folgenden Untersuchung wurde daher die Häufigkeit und Verteilung von *KRT8/18*-Varianten in einer deutschen Kohorte und Assoziation mit dem Schweregrad und Verlauf bei einer spezifischen und hoch prävalenten Lebererkrankung analysiert. Dazu wurden 329 deutsche Patienten mit chronischer Hepatitis C-Virusinfektion unterschiedlicher Schweregrade ausgewertet. Alle kodierenden Regionen von *KRT8/18* wurden mittels DHPLC und DNA-Sequenzierung analysiert. Heterozygote Keratinvarianten, die zu einer Aminosäuresubstitution führten, wurden bei 24 von 329 (7,3%) deutschen CHC-Patienten und nicht kodierende Varianten bei 26 Patienten (7,8%) identifiziert. Darunter waren 3 neue exonische K8-Varianten (K8 T26R, G55A, A359T), 6 neue nicht kodierende Varianten und eine kodierende K18 S230T-Variante bei 2 Patienten. Die häufigsten Varianten waren K8 R341H bei 10 Patienten (3%), K8 G62C bei 6 Patienten (1,8%) und K8 I63V bei 4 Patienten (1,2%). Zudem wurde erstmals eine ausschließliche und exklusive Kombination der intronischen *KRT8* IVS7+10delC- und exonischen K8 R341H-Mutation in allen 10 Patienten beschrieben. Diese Beobachtung suggeriert eine kausale Beziehung der beiden genetischen Veränderungen. Darüber hinaus stellen kodierende exonische Keratinmutationen einen signifikanten Risikofaktor für die Entwicklung schwerer Leberfibrose bzw. Leberzirrhose bei CHC dar: OR = 8,74; 95%-KI = 2,63-29,07;  $p < 0,001$ . Eine andere Studie fand die K8 R341H-Mutation auch gehäuft bei C282Y-homozygoten amerikanischen Hämochromatosepatienten: 7,6% vs. 0% in Kontrollen. Ähnliche Mechanismen können die Fibrogenese bei CHC und hereditärer Hämochromatose fördern. Ziel der abschließenden Untersuchung war es, Häufigkeit und Verteilung von K8/18-Varianten und mögliche Assoziation mit der Lebererkrankung in einer österreichischen Population mit hereditärer Hämochromatose zu studieren. Dazu wurde genomische DNA von 162 *HFE*-C282Y-homozygoten Patienten auf das Vorliegen von *KRT8/18*-Sequenzalterationen mit DHPLC und DNA-Sequenzierung analysiert. Heterozygote exonische K8-Varianten mit Aminosäuresubstitution wurden bei 10 von 162 Patienten (6,2%) gefunden. Darunter waren zwei neue Varianten K8 Q169E und R275W mit potentiellen biologischen Auswirkungen. Unter den 10 identifizierten, nicht kodierenden *KRT8*-Varianten waren zwei bisher unbekannt. In *KRT18* wurden keine Mutationen detektiert. Am häufigsten kamen K8 R341H und K8 G62C bei 4 bzw. 3 Patienten vor. Die ausschließliche Kombination der intronischen *KRT8* IVS7+10delC-Deletion mit der exonischen K8 R341H-Mutation wurde bei allen 4 Patienten bestätigt. Eine signifikante Assoziation von kodierenden ( $p = 0,78$ ) oder nicht kodierenden ( $p = 0,09$ ) *KRT8/18*-Varianten mit der Präsenz von Leberzirrhose bei C282Y-homozygoter Hämochromatose wurde nicht beobachtet. Allerdings ließ der begrenzte Kohortenumfang dieser Studie nur eine eingeschränkte statistische Aussagekraft der Ergebnisse zu.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1 Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, *et al.* Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med* 2005;352:1769-1778
- 2 Aikawa T, Kojima M, Onishi H, *et al.* HLA DRB1 and DQB1 alleles and haplotypes influencing the progression of hepatitis C. *J Med Virol* 1996;49:274-278
- 3 Ajioka RS, Kushner JP. Hereditary hemochromatosis. *Semin Hematol* 2002;39:235-241
- 4 Ajioka RS, Kushner JP. Clinical consequences of iron overload in hemochromatosis homozygotes. *Blood* 2003;101:3351-3354
- 5 Albers KM, Davis FE, Perrone TN, Lee EY, Liu Y, Vore M. Expression of an epidermal keratin protein in liver of transgenic mice causes structural and functional abnormalities. *J Cell Biol* 1995;128:157-169
- 6 Albers KM. Keratin biochemistry. *Clin Dermatol* 1996;14:309-320
- 7 Antonarakis SE and the Nomenclature Working Group. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. *Hum Mutat* 1998;11:1-3
- 8 Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G245-G249
- 9 Åsberg A, Hveem K, Thorstensen K. *et al.* Screening for hemochromatosis: high prevalence and low morbidity in an unselected population of 65,238 persons. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:1108-1115
- 10 Bacon BR. Hemochromatosis: diagnosis and management. *Gastroenterology* 2001;120:718-725
- 11 Bantel H, Schulze-Osthoff K. Apoptosis and hepatitis C virus infection. *Cell Death Differ* 2003;10:S48-S58
- 12 Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem* 2004;37:529-540
- 13 Baribault H, Price J, Miyai K, Oshima RG. Mid-gestational lethality in mice lacking keratin 8. *Genes Dev* 1993;7:1191-1202
- 14 Baribault H, Penner J, Iozzo RV, Wilson-Heiner M. Colorectal hyperplasia and inflammation in keratin 8-deficient FVB/N mice. *Genes Dev* 1994;8:2964-2973
- 15 Bataller R, North KE, Brenner DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology* 2003;37:493-503
- 16 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209-218

- 17 Berg T, Hopf U, Stark K, Baumgarten R, Lobeck H, Schreier E. Distribution of hepatitis C virus genotypes in German patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and virological parameters. *J Hepatol* 1997;26:484-491
- 18 Beutler E, Gelbart T, Lee P, Trevino R, Fernandez MA, Fairbanks VF. Molecular characterization of a case of atransferrinemia. *Blood* 2000;96:4071-4074
- 19 Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845G→A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 2002;359:211-218
- 20 Beutler E. The HFE Cys282Tyr mutation as a necessary but not sufficient cause of clinical hereditary hemochromatosis. *Blood* 2003;101:3347-3350
- 21 Beutler E. Hemochromatosis: Genetics and pathophysiology. *Annu Rev Med* 2006; 57:331-47
- 22 Breton J, Sichel F, Abbas A, Marnay J, Arsène D, Lechevrel M. Simultaneous use of DGGE and DHPLC to screen TP53 mutations in cancers of the esophagus and cardia from a European high incidence area (Lower Normandy, France). *Mutagenesis* 2003; 18:299-306
- 23 Büning C, Halangk J, Dignass A, *et al.* Keratin 8 Y54H and G62C mutations are not associated with inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 2004;36:388-391
- 24 Camaschella C, Roetto A, Cali A, *et al.* The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet* 2000;25:14-15
- 25 Casanova ML, Bravo A, Ramirez A, *et al.* Exocrine pancreatic disorders in transgenic mice expressing human keratin 8. *J Clin Invest* 1999;103:1587-1595
- 26 Caulin C, Ware CF, Magin TM, Oshima RG. Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Cell Biol* 2000;149:17-22
- 27 Cavestro GM, Frulloni L, Nouvenne A, *et al.* Association of keratin 8 gene mutation with chronic pancreatitis. *Dig Liver Dis* 2003;35:416-420
- 28 Cheng J, Syder AJ, Yu QC, Letai A, Paller AS, Fuchs E. The genetic basis of epidermolytic hyperkeratosis: a disorder of differentiation-specific epidermal keratin genes. *Cell* 1992;70:811-819
- 29 Chou CF, Riopel CL, Rott LS, Omary MB. A significant soluble keratin fraction in "simple" epithelial cells. Lack of an apparent phosphorylation and glycosylation role in keratin solubility. *J Cell Sci* 1993;105:433-444
- 30 Choy YS, Dabora SL, Hall F, *et al.* Superiority of denaturing high performance liquid chromatography over single-stranded conformation and conformation-sensitive gel electrophoresis for mutation detection in TSC2. *Ann Hum Genet* 1999;63:383-391
- 31 Cotton RG. Slowly but surely towards better scanning for mutations. *Trends Genet Sci* 1997;13:43-46

- 32 Cotton RG, Bray PJ. Using CCM and DHPLC to detect mutations in the glucocorticoid receptor in atherosclerosis: a comparison. *J Biochem Biophys Methods* 2001;47:91-100
- 33 Coulombe PA, Hutton ME, Letai A, Hebert A, Paller AS, Fuchs E. Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses. *Cell* 1991;66:1301-1311
- 34 Coulombe PA, Ma L, Yamada S, Wawersik M. Intermediate filaments at a glance. *J Cell Sci* 2001;114:4345-4347
- 35 Coulombe PA, Omary MB. "Hard" and "soft" principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14:110-122
- 36 Coulombe PA, Wong, P. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat Cell Biol* 2004;6:699-706
- 37 Diwakaran HH, Befeler AS, Britton RS, Brunt EM, Bacon BR. Accelerated hepatic fibrosis in patients with combined hereditary hemochromatosis and chronic hepatitis C infection. *J Hepatol.* 2002;36:687-91.
- 38 Donohoe E. Denaturing high-performance liquid chromatography using the WAVE DNA fragment analysis system. *Methods Mol Med* 2005;108:173-187
- 39 Entrez Nukleotide Database, Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>. Stand Mai 2005
- 40 Franke WW, Winter S, Schmid E, Sollner P, Hammerling G, Achtstatter T. Monoclonal cytokeratin antibody recognizing a heterotypic complex: immunological probing of conformational states of cytoskeletal proteins in filaments and in solution. *Exp Cell Res* 1987;173:17-23
- 41 Freeman AJ, Dore GJ, Law MG, *et al.* Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001;34:809-816
- 42 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275:2247-2250
- 43 Friedman SL. Liver fibrosis – from bench to bedside. *J Hepatol* 2003;38 Suppl 1:S38-53
- 44 Früh FW, Noyer-Weidner M. The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impact for diagnostics and pharmacogenetics. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:452-461
- 45 Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure dynamics, function and disease. *Annu Rev Biochem* 1994;63:345-382
- 46 Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 1998;279:514-519

- 47 Gilbert S, Loranger A, Daigle N, Marceau N. Simple epithelial keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. *J Cell Biol* 2001;154:763-773
- 48 Gross E, Arnold N, Goette J, Schwarz-Boeger U, Kiechle M. A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Genet* 1999;105:72-78
- 49 Halangk J, Berg T, Puhl G, *et al.* Keratin 8 Y54H and G62C mutations are not associated with liver disease. *J Med Genet* 2004;41:e92
- 50 Hatsell SJ, Eady RA, Wennerstrand L, *et al.* Novel splice site mutation in keratin 1 underlies mild epidermolytic palmoplantar keratoderma in three kindreds. *J Invest Dermatol* 2001; 116:606-609
- 51 Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:79-90
- 52 Herrmann H, Hesse M, Reichenzeller M, Aebi U, Magin TM. Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. *Int Rev Cytol* 2003;223:83-175
- 53 Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments: molecular structure assembly mechanisms, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds. *Annu Rev Biochem* 2004;73:749-789
- 54 Hesse M, Franz T, Tamai Y, Taketo MM, Magin TM. Targeted deletion of keratins 18 and 19 leads to trophoblast fragility and early embryonic lethality. *EMBO J.* 2000;19: 5060-5070
- 55 Hesse M, Magin TM, Weber K. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci* 2001;114:2569-2575
- 56 Hesse M, Berg T, Wiedenmann B, Spengler U, Woitas RP, Magin TM. A frequent keratin 8 p.L227L polymorphism, but no point mutations in keratin 8 and 18 genes, in patients with various liver disorders. *J Med Genet* 2004;41:e42
- 57 Hijikata M, Ohta Y, Mishiro S. Identification of a single nucleotide polymorphism in the MxA gene promoter (G/T at nt -88) correlated with the response of hepatitis C patients to interferon. *Intervirology* 2000;43:124-127
- 58 Hillebrandt S, Wasmuth HE, Weiskirchen R, *et al.* Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nat Genet* 2005;37:835-43
- 59 Irvine AD, Corden LD, Swensson O, *et al.* Mutations in cornea-specific keratin K3 or K12 genes cause Meesmann's corneal dystrophy. *Nat Genet* 1997;16:184-187
- 60 Irvine AD and McLean WHI. Human keratin diseases: the increasing spectrum of disease and subtlety of the phenotype-genotype correlation. *Br J Dermatol* 1999; 140:815-828

- 61 Ishak K, Baptista A, Bianchi L, *et al.* Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-699
- 62 Jones JH. A short guide to abbreviations and their use in peptide science. *J Peptide Sci* 1999; 5:465-471
- 63 Jones AC, Austin A, Hansen N, *et al.* Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clin Chem* 1999;45:1133-1140
- 64 Kang SM, Shin MJ, Kim JH, Oh JW. Proteomic profiling of cellular proteins interacting with the hepatitis C virus core protein. *Proteomics* 2005;5:2227-2237
- 65 Kimonis V, DiGiovanna JJ, Yang JM, Doyle SZ, Bale SJ, Compton JG. A mutation in the V1 end domain of keratin 1 in non-epidermolytic palmar-plantar keratoderma. *J Invest Dermatol* 1994;103:764-769
- 66 Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on poly-nucleotides. *J Mol Biol* 1971;56:341-361
- 67 Knodell RG, Ishak KG, Black WC, *et al.* Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431-435
- 68 Kremer H, Zeeuwen P, McLean WH, *et al.* Ichthyosis bullosa of Siemens is caused by mutations in the keratin 2e gene. *J Invest Dermatol* 1994;103:286-289
- 69 Kristensen VN, Kelefiotis D, Kristensen T, Borresen-Dale AL. High-throughput methods for detection of genetic variation. *Biotechniques* 2001;30:318-322
- 70 Ku NO, Michie S, Oshima RG, Omary MB. Chronic hepatitis, hepatocyte fragility, and increased soluble phosphoglycokeratins in transgenic mice expressing a keratin 18 conserved arginine mutant. *J Cell Biol* 1995;131:1303-1314
- 71 Ku NO, Michie SA, Soetikno RM, *et al.* Susceptibility to hepatotoxicity in transgenic mice that express a dominant-negative human keratin 18 mutant. *J Clin Invest* 1996; 98:1034-1046
- 72 Ku NO, Wright TL, Terrault NA, Gish R, Omary MB. Mutation of human keratin 18 in association with cryptogenic cirrhosis. *J Clin Invest* 1997;99:19-23
- 73 Ku NO, Liao J, Omary MB. Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *EMBO J* 1998a;17:1892-1906
- 74 Ku NO, Michie SA, Soetikno RM, Resurreccion EZ, Broome RL, Omary MB. Mutation of a major keratin phosphorylation site predisposes to hepatotoxic injury in transgenic mice. *J Cell Biol* 1998b;143:2023-2032
- 75 Ku NO, Zhou X, Toivola DM, Omary MB. The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *Am J Physiol* 1999;277:G1108-1137

- 76 Ku NO, Gish R, Wright TL, Omary MB. Keratin 8 mutations in patients with cryptogenic liver disease. *N Engl J Med* 2001;344:1580-1587
- 77 Ku NO, Michie S, Resurreccion EZ, Broome RL, Omary MB. Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:4373-4378
- 78 Ku NO, Darling JM, Krams SM, *et al.* Keratin 8 and 18 mutations are risk factors for developing liver disease of multiple etiologies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003a; 100:6063-6068
- 79 Ku NO, Soetikno RM, Omary MB. Keratin mutation in transgenic mice predisposes to FAS but not TNF induced apoptosis and massive liver injury. *Hepatology* 2003b; 37:1006-1014
- 80 Ku NO, Lim JK, Krams SM, *et al.* Keratins as susceptibility genes for end-stage liver disease. *Gastroenterology* 2005;129:885-893
- 81 Ku NO, Omary MB. A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8. *J Cell Biol* 2006;174:115-125
- 82 Ku NO, Strnad P, Zhong BH, Tao GZ, Omary MB. Keratins let liver live: Mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies. *Hepatology* 2007;46:1639-49
- 83 Lane EB, Alexander CM. Use of keratin antibodies in tumor diagnosis. *Semin Cancer Biol* 1990;1:165-179
- 84 Le Maréchal C, Audrézet MP, Quéré I, Raguénès O, Férec C. Complete and rapid scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC): major implications for genetic counselling. *Hum Genet* 2001;108:290-298.
- 85 Lee P, Gelbart T, West C, Halloran C, Beutler E. Seeking candidate mutations that affect iron homeostasis. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:471-487
- 86 Loranger A, Duclos S, Grenier A, *et al.* Simple epithelium keratins are required for maintenance of hepatocyte integrity. *Am J Pathol* 1997;151:1673-1683
- 87 Louagie HK, Brouwer JT, Delanghe JR, De Buyzere ML, Leroux-Roels GG. Haptoglobin polymorphism and chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1996;25:10-14
- 88 Ludwig J. The nomenclature of chronic active hepatitis: an obituary. *Gastroenterology* 1993;105:274-278.
- 89 Magin TM. Lessons from keratin transgenic and knockout mice. In: Herrmann H, Harris JR, (Eds.) *Intermediate filaments*. Plenum Press, New York, NY, USA: Subcell Biochem 1998; 31:141-172

- 90 Magin TM, Schröder R, Leitgeb S, *et al.* Lessons from keratin 18 knockout mice: formation of novel keratin filaments, secondary loss of keratin 7 and accumulation of liver-specific keratin 8-positive aggregates. *J Cell Biol* 1998;140:1441-1451
- 91 Magin TM, Reichelt J, Hatzfeld M. Emerging functions: diseases and animal models reshape our view of the cytoskeleton. *Exp Cell Res* 2004;301:91-102
- 92 Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S47-S56
- 93 McLean WH, Morley SM, Lane EB, *et al.* Ichthyosis bullosa of Siemens - a disease involving keratin 2e. *J Invest Dermatol* 1994;103:277-281
- 94 McLean WH, Lane EB. Intermediate filaments in disease. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:118-125
- 95 McLean WH, Rugg EL, Lunny DP, *et al.* Keratin 16 and keratin 17 mutations cause pachyonychia congenita. *Nat Genet* 1995;9:273-278
- 96 DHPLCMelt-Algorithmus, Stanford Genome Technology Center, Stanford University, Palo Alto, CA. <http://insertion.stanford.edu/melt.html>. Stand: Juli 2006
- 97 Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cyto-keratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982;31:11-24
- 98 Montosi G, Donovan A, Totaro A, *et al.* Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest.* 2001;108:619-23
- 99 Morita H, Ikeda S, Yamamoto K, *et al.* Hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis: a clinicopathological study of a Japanese family. *Ann Neurol* 1995;37:646-56
- 100 Mühlbauer M, Bosserhoff AK, Hartmann A, Thasler WE, Weiss TS, Herfarth H, Lock G, *et al.* A novel MCP-1 gene polymorphism is associated with hepatic MCP-1 expression and severity of HCV-related liver disease. *Gastroenterology* 2003;125:1085-93
- 101 Müller T, Mas-Marques A, Sarrazin C, Wiese M, Halangk J, Witt H, Ahlenstiel G, *et al.* Influence of interleukin 12B (IL12B) polymorphisms on spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2004;41:652-658
- 102 Nishida K, Honma Y, Dota A, *et al.* Isolation and chromosomal localization of a cornea-specific human keratin 12 gene and detection of four mutations in Meesmann corneal epithelial dystrophy. *Am J Hum Genet* 1997;61:1268-1275
- 103 Oefner PJ, Underhill PA. Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Am J Hum Genet* 1995;57:A266

- 104 O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, *et al.* Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics* 1998;52:44-49
- 105 Okuda M, Li K, Beard MR, *et al.* Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 2002;122:366-375
- 106 Olynyk JK, Digby JC, Aquilia S, Rossi E, Summerville L, Powell LW. A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 1999;341:718-724
- 107 Omary MB, Ku NO. Intermediate filament proteins of the liver: emerging disease association and functions. *Hepatology* 1997;25:1043-1048
- 108 Omary MB, Ku NO, Liao J, Price D. Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. In: Herrmann H, Harris JR, (Eds.) *Intermediate filaments*. Plenum Press, New York, NY, USA: Subcell Biochem 1998;31:105-140
- 109 Omary MB, Ku NO, Toivola DM. Keratins: Guardians of the liver. *Hepatology* 2002;35:251-257
- 110 Omary MB, Coulombe PA, McLean WH. Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med* 2004;351:2087-2100
- 111 Omary MB, Ku NO, Tao GZ, Toivola DM, Liao J. "Heads and tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem Sci* 2006;31:383-394
- 112 OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, MD.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
- 113 Owens DW, Lane EB. The quest for the function of simple epithelial keratins. *Bioessays* 2003;25:748-758
- 114 Owens DW, Lane EB. Keratin mutations and intestinal pathology. *J Pathol* 2004; 204:377-385
- 115 Owens DW, Wilson NJ, Hill AJ, *et al.* Human keratin 8 mutations that disturb filament assembly observed in inflammatory bowel disease patients. *J Cell Sci* 2004;117:1989-1999.
- 116 Parry DA, Steinert PM. Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism. *Q Rev Biophys* 1999;32:99-187
- 117 Pearson RB, Kemp BE. Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol* 1991;200:62-81
- 118 Phatak PD, Sham RL, Raubertas RF, *et al.* Prevalence of hereditary hemochromatosis in 16031 primary care patients. *Ann Intern Med* 1998;129:954-61

- 119 Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis – a new look at an old disease. *N Engl J Med* 2004;350:2383-2397
- 120 Porter RM, Lane EB. Phenotypes, genotypes and their contribution to understanding keratin function. *Trends Genet* 2003;19:278-285
- 121 Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, *et al.* Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000;31:828-833
- 122 Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997;349:825-832
- 123 Poynard T, Mathurin P, Lai CL, *et al.* A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2003;38:257-265
- 124 Ramm GA, Ruddell RG. Hepatotoxicity of iron overload: mechanisms of iron-induced hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2005;25:433-449
- 125 Ravnik-Glavač M, Atkinson A, Glavač D, Dean M. DHPLC screening of cystic fibrosis gene mutations. *Hum Mutat* 2002;19:374-383
- 126 Reis A, Hennies HC, Langbein L, *et al.* Keratin 9 gene mutations in epidermolytic palmoplantar keratoderma (EPPK). *Nat Genet* 1994;6:174-179
- 127 Richard G, De Laurenzi V, Didona B, Bale SJ, Compton JG. Keratin 13 point mutation underlies the hereditary mucosal epithelial disorder white sponge nevus. *Nat Genet* 1995;11:453-455
- 128 Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, *et al.* Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2003;33:21-2
- 129 Rothenberg BE, Volland JR. Beta2 knockout mice develop parenchymal iron overload: A putative role for class I genes of the major histocompatibility complex in iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:1529-34.
- 130 Rothnagel JA, Dominey AM, Dempsey LD, *et al.* Mutations in the rod domains of keratins 1 and 10 in epidermolytic hyperkeratosis. *Science* 1992 257(5073) 1128-1130
- 131 Rudolph JG, White S, Sokolsky C, *et al.* Determination of melting temperature for variant detection using dHPLC: a comparison between an empirical approach and DNA melting prediction software. *Genet Test* 2002;6:169-176
- 132 Rugg EL, McLean WH, Allison WE, *et al.* A mutation in the mucosal keratin K4 is associated with oral white sponge nevus. *Nat Genet* 1995;11:450-452
- 133 Saiki RK, Scharf S, Faloona F, *et al.* Enzymatic amplification of b-globin sequences and restriction for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-1354
- 134 Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491

- 135 Sasaki K, Tsutsumi A, Wakamiya N, *et al.* Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:960-965
- 136 Schmitt TJ, Robinson ML, Doyle J. Single nucleotide polymorphism (SNP), insertion & deletion detection on the Wave nucleic acid fragment analysis system. Transgenomic, San Jose, CA, USA 2000, Application Note 112. <http://www.transgenomic.com>. Stand Juni 2005
- 137 Schneider A, Lamb J, Barmada MM, Cuneo A, Money ME, Whitcomb DC. Keratin 8 mutations are not associated with familial, sporadic and alcoholic pancreatitis in a population from the United States. *Pancreatology* 2006;6:103-108
- 138 Schöniger-Hekele M, Petermann D, Müller C. Mutation of keratin 8 in patients with liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:1466-1469
- 139 Schott E, Witt H, Neumann K, Bergk A, Halangk J, Weich V, Müller T, *et al.* Association of TLR7 single nucleotide polymorphisms with chronic HCV-infection and response to interferon- $\alpha$ -based therapy. *J Viral Hepat* 2008;15:71-8
- 140 Schulze-Krebs A, Preimel D, Popov Y, *et al.* Hepatitis C virus-replicating hepatocytes induce fibrogenic activation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2005;129:246-258
- 141 Schuppan D, Krebs A, Bauer M, Hahn EG. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ* 2003;10:S59-S67
- 142 Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, *et al.* New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol* 2006;174:169-174
- 143 Seeff LB, Miller RN, Rabkin CS, *et al.* 45-year follow-up of hepatitis C virus infection in healthy young adults. *Ann Intern Med* 2000;132:105-111
- 144 Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005;5:558-567
- 145 Skopek TR, Glaab WE, Monroe JJ, Kort KL, Schaefer W. Analysis of sequence alterations in a defined DNA region: comparison of temperature-modulated heteroduplex analysis and denaturing gradient gel electrophoresis. *Mutat Res* 1999;430:13-21
- 146 Smith FJ, Corden LD, Rugg EL, *et al.* Missense mutations in keratin 17 cause either pachyonychia congenita type 2 or a phenotype resembling steatocystoma multiplex. *J Invest Dermatol* 1997;108:220-223
- 147 Sonzogni L, Silvestri L, De Silvestri A, *et al.* Polymorphisms of microsomal epoxide hydrolase gene and severity of HCV-related liver disease. *Hepatology* 2002;36:195-201
- 148 Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516

- 149 Stickel F, Österreicher CH, Datz C, *et al.* Prediction of progression to cirrhosis by a glutathione S-transferase P1 polymorphism in subjects with hereditary hemochromatosis. *Arch Intern Med* 2005;165:1835-1840
- 150 Strnad P, Lienau TC, Tao GZ, Ku NO, Magin TM, Omary MB. Denaturing temperature selection may underestimate keratin mutation detection by DHPLC. *Hum Mutat* 2006; 27:444-452
- 151 Strnad P, Lienau TC, Tao GZ, Lazzeroni LC, Stickel F, Schuppan D, Omary MB. Keratin variants associate with progression of fibrosis during chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 2006;43:1354-1363
- 152 Strnad P, Tao GZ, Zhou Q, Harada M, Toivola DM, Brunt EM, Omary MB. Keratin mutation predisposes to mouse liver fibrosis and unmasks differential effects of the carbon tetrachloride and thioacetamide models. *Gastroenterology* 2008;134:1169-79
- 153 Stumptner C, Omary MB, Fickert P, Denk H, Zatloukal K. Hepatocyte cytokeratins are hyperphosphorylated at multiple sites in human alcoholic hepatitis and in a mallory body mouse model. *Am J Pathol* 2000;156:77-90
- 154 Tamai Y, Ishikawa T, Bosl MR. Cytokeratins 8 and 19 in the mouse placental development. *J Cell Biol* 2000; 151:563-572
- 155 Tao GZ, Zhou Q, Strnad P, Salemi MR, Lee YM, Omary MB. Human Ran cysteine 112 oxidation by pervanadate regulates its binding to keratins. *J Biol Chem* 2005;280:12162-7
- 156 Tao GZ, Strnad P, Zhou Q, *et al.* Analysis of keratin polypeptides 8 and 19 variants in inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:857-64
- 157 Toivola DM, Omary MB, Ku NO, Peltola O, Baribault H, Eriksson JE. Protein phosphatase inhibition in normal and keratin 8/18 assembly-incompetent mouse strains supports a functional role of keratin intermediate filaments in preserving hepatocyte integrity. *Hepatology* 1998;28:116-128
- 158 Toivola DM, Ku NO, Ghorri N, Lowe AW, Michie SA, Omary MB. Effects of keratin filament disruption on exocrine pancreas-stimulated secretion and susceptibility to injury. *Exp Cell Res* 2000a;255:156-170
- 159 Toivola DM, Baribault H, Magin T, Michie SA, Omary MB. Simple epithelial keratins are dispensible for cytoprotection in two pancreatitis models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000b;279:G1343-G1354
- 160 Toivola DM, Nieminen MI, Hesse M, *et al.* Disturbances in hepatic cell-cycle regulation in mice with assembly deficient keratins 8/18. *Hepatology* 2001;34:1174-1183
- 161 Toivola DM, Zhou Q, English LS, Omary MB. Type II keratins are phosphorylated on a unique motif during stress and mitosis in tissues and cultured cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:1857-1870

- 162 Toivola DM, Ku NO, Resurreccion EZ, Nelson DR, Wright TL, Omary MB. Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease. *Hepatology* 2004;40:459-466
- 163 Toivola DM, Tao GZ, Habtezion A, Liao J, Omary MB. Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol* 2005; 15:608-617
- 164 Tojo Y, Bandoh S, Fujita J, *et al.* Aberrant messenger RNA splicing of the cytokeratin 8 in lung cancer. *Lung Cancer* 2003;42:153-161
- 165 Treiber M, Schulz HU, Landt O, *et al.* Keratin 8 sequence variants in patients with pancreatitis and pancreatic cancer. *J Mol Med* 2006;84:1015-1022
- 166 Vassar R, Coulombe PA, Degenstein L, Albers K, Fuchs E. Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* 1991;64:365-380
- 167 Virtanen M, Smith SK, Gedde-Dahl Jr T, Vahlquist A, Bowden PE. Splice site and deletion mutation in keratin (KRT1 and KRT10) genes: unusual phenotypic alterations in Scandi-navian patients with epidermolytic hyperkeratosis. *J Invest Dermatol* 2003;121:1013-1020
- 168 Van Vlierberghe H, Langlois M, Delanghe J, *et al.* Haptoglobin phenotype 2-2 overrepresentation in Cys282Tyr hemochromatotic patients. *J Hepatol* 2001;35:707-11
- 169 Wagner OI, Rammensee S, Korde N, Wen Q, Leterrier JF, Janmey PA. Softness, strenght and self-repair in intermediate filament networks. *Exp Cell Res* 2007;313:2228-2235
- 170 Wang H, Mengsteab S, Tag CG, Gao CF, Hellerbrand C, Lammert F, Gressner AM, *et al.* Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol* 2005;11:1929-36
- 171 WHO. Hepatitis C guide 2002. World Health Organization, Genf, Schweiz. <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo2003/en/>. Stand: Juli 2006
- 172 Wilhelm J. Entwicklung real-time-PCR-basierter Methoden für die moderne DNA-Analytik. Naturwissenschaftliche Dissertation, Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften, Universität Gießen; 2003
- 173 Windoffer R, Leube RE. Detection of cytokeratin dynamics by time-lapse fluorescence microscopy in living cells. *J Cell Sci* 1999;112:4521-4534
- 174 Windoffer R, Leube RE. De novo formation of cytokeratin filament networks originates from the cell cortex in A-431 cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 2001;50:33-44
- 175 Windoffer R, Wöll S, Strnad P, Leube RE. Identification of novel principles of keratin filament network turnover in living cells. *Mol Biol Cell* 2004;15:2436-2448

- 176 Winter H, Rogers MA, Gebhardt M, *et al.* A new mutation in the type II hair cortex keratin hHb1 involved in the inherited hair disorder monilethrix. *Hum Genet* 1997;101:165-169
- 177 Winter H, Schissel D, Parry DA, *et al.* An unusual Ala12Thr polymorphism in the 1A alpha-helical segment of the companion layer-specific keratin K6hf: evidence for a risk factor in the etiology of the common hair disorder pseudofolliculitis barbae. *J Invest Dermatol* 2004;122:652-657
- 178 Wolford JK, Blunt D, Ballecer C, Prochazka M. High-throughput SNP detection by using DNA pooling and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). *Hum Genet* 2000;107:483-487
- 179 Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: a review. *Hum Mutat* 2001;17:439-474
- 180 Yee LJ, Tang J, Gibson AW, Kimberly R, Van Leeuwen DJ, Kaslow RA. Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 2001;33:708-712
- 181 Yee LJ, Perez KA, Tang J, van Leeuwen DJ, Kaslow RA. Association of CTLA4 polymorphisms with sustained response to interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2003;187:1264-71
- 182 Zatloukal K, Stumptner C, Lehner M, *et al.* Cytokeratin 8 protects from hepatotoxicity, and its ratio to cytokeratin 18 determines the ability of hepatocytes to form mallory bodies. *Am J Pathol* 2000;156:1263-1274
- 183 Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsbichler A, *et al.* The keratin cytoskeleton in liver diseases. *J Pathol* 2004; 204:367-376
- 184 Zatloukal K, French SW, Stumptner C, *et al.* From Mallory to Mallory-Denk bodies: What, how and why? *Exp Cell Res* 2007;313:2033-49
- 185 Zhou Q, Ji X, Chen L, Greenberg HB, Lu SC, Omary MB. Keratin mutation primes mouse liver to oxidative injury. *Hepatology* 2005; 41:517-525

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Berg für die Annahme des Dissertationsthemas und die sorgfältige Betreuung, stetige Unterstützung und die zahlreichen wertvollen Hinweise und Anregungen während der Durchführung und Niederschrift meiner Dissertation.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bertram Wiedenmann für das entgegengebrachte Vertrauen und die Annahme des Dissertationsthemas.

Ich danke Herrn Prof. Dr. M. Bishr Omary für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, das unermüdliche Engagement und die vielen guten Ratschläge und Hilfestellungen bei der praktischen Durchführung der Projekte.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Pavel Strnad für die hervorragende und vertrauensvolle Zusammenarbeit bei der Durchführung der Doktorarbeit, für die Einführung in das Forschungsgebiet und das Erlernen der molekularbiologischer Techniken und die vielen guten Ratschläge.

Ich danke Frau Prof. Dr. Nam-On Ku für die Überlassung sequenzierter DNA-Proben zu Kontrollzwecken und für hilfreiche Informationen.

Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Michael Hesse, Prof. Dr. Detlef Schuppan, PD Dr. Felix Stickel und Dr. Christoph Österreicher für die Bereitstellung der Patienten-DNA und umfassender klinischer Daten.

Ein besonderer Dank gilt allen Mitgliedern des Labors von Prof. Dr. Omary an der Stanford University für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, das produktive Umfeld und die wertvollen Ratschläge und stete Unterstützung bei der Durchführung meiner Projekte.

Ich danke Herrn Dr. Justus Welke für die gute statistische Betreuung und die produktive Zusammenarbeit in der statistischen Auswertung der Daten.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Eltern Dr. Inge und Dr. Wolf Lienau für die unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Doktorarbeit.

## Publikationen

Im Verlauf dieser Dissertation entstanden folgende Publikationen:

1. Strnad P, Lienau TC, Tao GZ, Ku NO, Magin TM, Omary MB. Denaturing temperature selection may underestimate keratin mutation detection by DHPLC. *Hum Mutat* 2006; 27:444-452
2. Strnad P, Lienau TC, Tao GZ, Lazzeroni LC, Stickel F, Schuppan D, Omary MB. Keratin variants associate with progression of fibrosis during chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 2006;43:1354-1363

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

## Erklärung

„Ich, Tim-Christian Lienau, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:  
Einfluß von Keratinmutationen (*KRT8/18*) auf den Verlauf bzw. Schweregrad der Leber-  
erkrankung bei chronischer Hepatitis C-Virusinfektion und hereditärer Hämochromatose  
selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die  
(unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt  
habe.“

Dresden, den 20.11.2008

Tim-Christian Lienau