

2 Materialien und Methoden

2.1 Patienten

In die Studie wurden insgesamt 2436 Patienten eingeschlossen, davon 1698 aus verschiedenen Zentren in Deutschland, 36 aus Großbritannien, 60 aus Indien, 143 aus Italien, 128 aus den Niederlanden, 16 aus Österreich, 3 aus Rumänien, 129 aus der Schweiz, 133 aus Spanien und 90 aus der Tschechischen Republik. Die Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten ist in Tabelle 2 aufgelistet.

Die Gruppe der Patienten mit alkoholischer chronischer Pankreatitis umfaßte 508 Patienten. Es wurden außerdem 1174 Patienten mit nicht-alkoholischer CP (hereditäre oder idiopathische CP) und 60 Patienten mit tropischer kalzifizierender Pankreatitis untersucht.

Die Subpopulation der deutschen Patienten mit ACP stammte aus den jeweiligen Universitätsklinik in Berlin (n=38, rekrutiert 2003), Leipzig (n=30, rekrutiert 2000) und Magdeburg (n=188, rekrutiert zwischen 1969 und 2003).

Die 789 deutschen Patienten mit nicht-alkoholischer CP kamen aus denselben Zentren (Berlin: n=262, rekrutiert zwischen 1998 und 2003; Leipzig: n=202; rekrutiert 1997-2003; Magdeburg: n=118, rekrutiert 1996-2003) und zusätzlich aus Ulm (n=207, rekrutiert 1998-2001). Die beteiligten deutschen Universitätsklinik sind überregionale Zentren mit spezialisierter pankreatologischer Expertise und Zuweisungen aus einem großen Einzugsgebiet. Es muß daher davon ausgegangen werden, daß in dieser Studie Patienten nahezu aus dem gesamten Bundesgebiet untersucht wurden.

Die Diagnose einer CP wurde bei Vorhandensein von zwei oder mehr der folgenden Kriterien gestellt:

- typische Anamnese wiederkehrender Pankreatitiden
- radiologische Befunde wie Pankreaskalzifizierungen und/oder Kaliberschwankungen des Pankreasganges, welche mit endoskopischer retrograder Cholangiopankreatikographie oder Magnetresonanztomographie erhoben wurden
- pathologischer Ultraschallbefund.

Eine hereditäre CP wurde diagnostiziert bei positiver Familienanamnese mit mindestens zwei betroffenen Verwandten ersten Grades ohne weitere offensichtliche Risikofaktoren. Eine alkoholinduzierte CP wurde bei einem Genuß von mehr als 60g

Ethanol/Tag (Frauen) bzw. mehr als 80g/Tag (Männer) über mehr als 2 Jahre diagnostiziert. Die Diagnose idiopathische CP wurde bei Patienten gestellt, bei welchen alle prädisponierenden Risikofaktoren wie Alkoholabusus, Trauma, Medikamenteneinnahme, Infektionen, metabolische Störungen oder eine positive Familienanamnese fehlten.

Die Gruppe der akuten Pankreatitis bestand aus 192 Patienten aus Deutschland (72 Frauen, 120 Männer; Durchschnittsalter \pm SD: 53,1 \pm 17,2), wovon 51 mit alkoholischer, 78 mit biliärer, 33 mit idiopathischer, 13 mit postoperativer, 5 mit traumatisch bedingter, 6 mit ERCP-induzierter, 4 mit hyperlipoproteinämie-bedingter, 1 mit hyperparathyreoidismus-bedingter und 1 mit medikamenteninduzierter Pankreatitis waren.

Alle Patienten mit akuter Pankreatitis (AP) wurden zwischen 1996 und 2003 am Universitätsklinikum in Magdeburg rekrutiert. Die akute Pankreatitis wurde diagnostiziert bei Vorhandensein von

- akuten Bauchschmerzen und dem typischen klinischen Bild einer akuten Pankreatitis
- Serumamylase- oder Serumlipase-Konzentrationen von mindestens dem dreifachen des oberen Normalwertes und
- Typischen Befunden in der Ultraschalluntersuchung oder Computertomographie.

Die Einteilung der Schweregrade erfolgte nach den Kriterien des Atlanta Symposiums von 1992 [Bradley, 1992]. Bei dieser Klassifikation gilt eine Episode als mild (Grad 1), wenn sie mit nur minimaler Dysfunktion des Organs und komplikationsloser Abheilung einhergeht. Eine Episode wird hingegen als schwer eingestuft, wenn sie mit lokalen (Grad 2) oder systemischen (Grad 3) Komplikationen vergesellschaftet ist. In der vorliegenden Untersuchung wurden 29 von 192 Patienten (15%) als Grad 1, 103/192 (54%) als Grad 2 und 60/192 (31%) als Grad 3 AP klassifiziert. Diese Verteilung weicht von dem üblichen Verteilungsmuster ab, welches sich durch ein Übergewicht der Grad 1 - Erkrankungen auszeichnet. Dem zugrunde liegt ein selektiertes Patientengut, das das Universitätsklinikum Magdeburg als überregionales Kompetenzzentrum aufweist.

In die Studie wurden ebenfalls 483 Patienten mit Adenokarzinom des Pankreas eingeschlossen (im folgenden bezeichnet als „Pankreaskarzinom 1“), welche aus Deutschland (n=382), der Schweiz (n=35) und Spanien (n=66) rekrutiert wurden. Die

Population	ACP		ICP/HP		PCa1		Kontrollen	
	n:	Geschlecht: Alter: MW±SD	n:	Geschlecht: Alter: MW±SD	n:	Geschlecht: Alter: MW±SD	n:	Geschlecht:
Deutschland	256	33/223 45,1±9,5 f/m MW±SD	789	399/390 30,3±19,0 f/m MW±SD	382	166/216 61,7±10,3 f/m MW±SD	1532	914/618 f/m
Großbritannien	25	7/18 50,1±7,8 f/m MW±SD	11	8/3 52,0±15,9 f/m MW±SD	-	- -	200	72/128
Italien	-	- -	143	54/89 38,8±15,9 f/m MW±SD	-	- -	254	120/134
Niederlande	71	25/46 49,7±9,0 f/m MW±SD	57	33/24 42,1±17,7 f/m MW±SD	-	- -	262	105/157
Österreich	-	- -	16	8/8 18,3±13,9 f/m MW±SD	-	- -	405	163/242
Rumänien	-	- -	3	0/3 45,0±7,3 f/m MW±SD	-	- -	150	75/75
Schweiz	59	3/56 57,0±8,4 f/m MW±SD	35	14/21 42,8±16,1 f/m MW±SD	35	16/19 63,4±10,0 f/m MW±SD	339	116/223
Spanien	62	3/59 47,9±12,9 f/m MW±SD	5	3/2 68,8±15,2 f/m MW±SD	66	28/38 69,7±11,8 f/m MW±SD	539	138/401
Tschechische Republik	35	7/28 51,2±7,5 f/m MW±SD	55	21,34 29,5±18,4 f/m MW±SD	-	- -	486	205/281
Indien	-	- -	60	21/39 30,3±10,5 f/m MW±SD	-	- -	67	nicht bekannt

Tabelle 2: Alters- und Geschlechtsverteilung von Patienten und Kontrollen. ACP: alkoholische chronische Pankreatitis; ICP/HP: idiopathische/hereditäre Pankreatitis; PCa1: Adenokarzinom des Pankreas. *: bei den Indischen Patienten handelt es sich um Patienten mit tropischer Pankreatitis.

Subpopulation der deutschen Patienten mit duktalem Adenokarzinom setzte sich zusammen aus Patienten der Universitätsklinik aus Berlin (n=89), Leipzig (n=12), und Magdeburg (n=281) und wurde im Zeitraum von 1996 bis 2003 rekrutiert. Hinzu kamen noch weitere 79 deutsche Patienten mit anderen Entitäten von Pankreasneoplasien („Pankreaskarzinom 2“, alle in Magdeburg zwischen 1996 und 2003 rekrutiert). Davon waren 15 Patienten mit serösem Zystadenom, 2 mit muzinösem Zystadenom, 10 mit neuroendokrinem Karzinom, 24 mit Adenokarzinom der Papilla Vateri, 12 mit Adenom der Papilla Vateri, 5 mit intraduktalem papillär-muzinösem Karzinom, 6 mit Insulinom, 1 mit Pankreaslymphangiom, 2 mit Zystadenokarzinom und 2 mit solidem pseudopapillärem Tumor. Von diesen Patienten waren 50 männlichen und 29 weiblichen Geschlechts, das Durchschnittsalter \pm SD lag bei $59,7 \pm 12,2$ Jahren.

2.2 Kontrollen

Insgesamt wurden DNA-Proben von 5726 Kontrollpersonen untersucht. Die DNA-Proben stammten aus denselben Populationen wie die der Patientengruppen sowie aus 5 weiteren Ländern. Die Alters- und Geschlechtsverteilung der europäischen und Indischen Kontrollen ist Tabelle 2 zu entnehmen, die Geschlechtsverteilung der afrikanischen und Südamerikanischen Kontrollen Tabelle 4.

Die 1532 deutschen Kontrollen setzen sich folgendermaßen zusammen: 143 Blutspender, wovon n=50 im Jahre 2000 in Leipzig rekrutiert wurden und weitere n=93 im Jahre 2001 in Münster; 220 Medizinstudenten und medizinisches Personal, rekrutiert in Berlin (n=149) von 1996 bis 1998 und Magdeburg (n=71) zwischen 1998 und 2003; 975 Eltern gesunder Neugeborener, welche zwischen 1990 und 1992 in Berlin (n=393), Düsseldorf (n=62), Freiburg (n=216), Mainz (n=143) und München (n=161) rekrutiert wurden; 164 Probanden aus Berlin, welche für die „Berlin Aging Study (BASE)“ zwischen 1993 und 1995 rekrutiert wurden; 30 Individuen aus Magdeburg, rekrutiert im

Jahre 2000, mit bestehendem Alkoholabusus, bei denen eine Erkrankung des Pankreas ausgeschlossen wurde.

Die übrigen Kontrollen stammten aus Großbritannien (n=200, rekrutiert für genetische Populationsstudien), Indien (n=67, rekrutiert für genetische Assoziationsstudien), Italien (n=254, Personen zur Vaterschaftstestung), den Niederlanden (n=262, durch eine Zeitungsannonce für genetische Assoziationsstudien rekrutiert), Österreich (n=405, rekrutiert für genetische Populationsstudien), Rumänien (n=150, Krankenhauspatienten ohne Erkrankungen des Pankreas), der Schweiz (n=339, alle Blutspender), Spanien (n=539, rekrutiert für genetische Assoziations- oder Populationsstudien), der Tschechischen Republik (n=486, davon 235 gesunde Neugeborene [Nabelschnurblut] und 251 gesunde Samen- bzw. Oozytenspender/innen), sowie der Türkei und Nordzypren (n=346, Studenten und medizinisches Personal).

Um die Häufigkeit der Polymorphismen zusätzlich in Kontrollpopulationen nicht kaukasischen Ursprungs zu untersuchen, analysierten wir zusätzlich Individuen afrikanischen Ursprungs, welche aus Benin (n=185), Kamerun (n=384), Äthiopien (n=153) und Ecuador (n=424, davon 229 afrikanischen Ursprungs und 195 Eingeborene) stammten. Alle Proben von nicht kaukasischen Probanden wurden zwischen 1990 und 1998 (Äthiopien, Benin, Ecuador) bzw. 1986 bis 1990 (Kamerun) für genetische Populationsstudien rekrutiert.

Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Charité (Antrag 181/2001) genehmigt wie auch von den entsprechenden Ethikkommissionen der weiteren an der Studie teilnehmenden inländischen und ausländischen Zentren. Alle Patienten wurden über die wissenschaftlichen Ziele und die Durchführung molekular-genetischer Untersuchungen aufgeklärt. Die Entnahme venösen Blutes erfolgte nach Aufklärung und Zustimmung der Patienten.

2.3 Verbrauchsmaterialien

QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Oligonukleotide	TIB MOLBIOL, Berlin
AmpliTaq Gold DNA-Polymerase	Perkin Elmer, Überlingen
GeneAmp 10x PCR-Puffer, MgCl ₂ , dNTPs	Perkin Elmer, Überlingen
Bayol F	Serva, Heidelberg
PCR-Gefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf
LightCycler-Kapillaren	Roche Diagnostics, Mannheim
Alkalische Phosphatase, Exonuklease	USB, Cleveland, USA
ABI Prism BigDye Terminator Kit	Applied Biosystem, Weiterstadt
Centri Sep-Säulen	Princeton Separations, Adelphia, USA
Sephadex G-50	Amersham, Uppsala, Schweden

2.4 Geräte

Zentrifuge Labofuge 400 (DNA-Extraktion)	Heraeus
T3 Thermocycler (PCR)	Biometra
LightCycler (Schmelzkurvenanalyse)	Roche Diagnostics
LightCycler-Zentrifuge	Roche Diagnostics
Vortex	IKA
Zentrifuge 5417R (Aufreinigung für Sequenzierung)	Eppendorf
ABI 3100 Sequencer	Applied Biosystems

2.5 Methoden

2.5.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion der an unserem Zentrum extrahierten Proben erfolgte mittels "QIAamp DNA Mini Kit" nach Anweisungen des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland).

2.5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine von Mullis *et al.* [1987] entwickelte *in vitro*-Technik, bei der definierte DNA-Abschnitte enzymatisch vervielfältigt werden können. Anfang und Ende des zu amplifizierenden Abschnitts werden durch komplementäre bzw. umgekehrt komplementäre, einzelsträngige Primer definiert, die sich an die 5'-Enden der Ziel-DNA anlagern. Durch zyklische Temperaturveränderung wird die DNA denaturiert, was eine Anlagerung der Primer ermöglicht (Annealing). Durch die Aktivität der DNA Polymerase wird der Primerstrang verlängert (Extension) und somit die Ziel-DNA kopiert. Durch die Wiederholung der Zyklen kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der Zielsequenz.

Der PCR-Reaktionsansatz enthielt 2,8 µl Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂, 0,1 % Gelatine), 400 µM Desoxynukleotidtriphosphate (in äquimolaren Mengen jedes dNTP), je 0,1 µM Primer, 0,75 U DNA-Polymerase (AmpliTaQ Gold) und 3 µl genomische DNA in einem Gesamtvolumen von 28 µl. Der PCR-Ansatz wurde mit einem Tropfen Öl (Bayol F) überschichtet, um Verdunstung zu vermeiden. Die PCR wurde in einem automatisierten Thermocycler (T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Deutschland) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initial erfolgte eine Denaturierung der DNA für 12 min bei 95°C. Anschließend folgten 48 Zyklen Denaturierung für 20 s bei 95°C, Anlagerung der Primer (Annealing) für 40 s bei 56°C, Elongation für 90 s bei 72°C und eine abschließende Extension für 2 min bei 72°C.

Die verwendeten Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) hergestellt. Die Primer zur Amplifikation der Ziel-DNA in Exon 1 des *KRT8*-Gens wurden anhand der publizierten Nukleotidsequenz (GenBank #M34482, [Krauss *et al.* 1990]) synthetisiert. Folgende Oligonukleotide wurden für die PCR eingesetzt: 5'-CGCTCCTTCTAGGATCTCCG-3' und 5'-GGCACAGTCAGCCACGCAG-3'.

2.5.3 Schmelzkurvenanalyse

Nach der Amplifikation des gewünschten PCR-Produktes wurde dieses mit zwei fluoreszenzmarkierten FRET-Proben-Paaren hybridisiert. Die Sequenz der Sensorsonden war komplementär zur Sequenz des zu untersuchenden Polymorphismus, so daß der Komplex zwischen Sensorsonde und mutiertem Allel stabiler war als der Komplex zwischen Sensorsonde und Wildtyp. Bei Vorliegen des

gesuchten Polymorphismus entstand eine allelspezifische Schmelzkurve, deren Schmelztemperatur höher war als die des Wildtyps, da die Sensorsonden eine Basen-Fehlpaarung zu dem Wildtyp aufwiesen. Würde unter der Sonde eine andere Mutation als die nachzuweisende liegen, würde das Vorhandensein von 2 Basen-Fehlpaarungen in einer weiteren Schmelzpunkterniedrigung resultieren.

Die FRET-Sonden wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) anhand der publizierten Nukleotidsequenz (GenBank #M34482) synthetisiert. Für die Detektion der Y54H-Variation wurde eine fluoreszeinkmarkierte Sensorsonde mit der Sequenz 5'-CCCCACCATGGCCGCC-FL (FL: 5,6-Carboxy-Fluoreszeink) verwendet und eine mit LC 705-markierte Ankersonde mit der Sequenz 5'-LC 705-CCCAGGCCACCGCGAAAGTTGC-ph (LC: LightCycler Red; ph: Phosphat). Für die G62C-Variation wurde eine LC 640-markierte Sensorsonde mit der Sequenz 5'-LC 640-GTGATGCATCCCATGCCGCT-ph verwendet und ein fluoreszeinkmarkierter Anker mit der Sequenz 5'-TCAGCAGGCTCTGGTTGACCGTAACTGC-FL.

Die Mutationen wurden entsprechend den Empfehlungen der „Nomenclature Working Group for human gene mutations“ numeriert [Antonarakis 1998].

Neun µl PCR-Produkt wurden in LightCycler-Kapillaren (Roche, Mannheim) mit 4,5 µl Sondenmix versetzt. Der Sondenmix bestand aus 760 µl aqua bidest, 28 µl G62C-Ankersonde (FL), 35 µl G62C-Sensorsonde (LC 640), 42 µl Y54H-Sensorsonde (FL) und 52,5 µl Y54H-Ankersonde (LC 705) (Sondenkonzentration jeweils 5 µM). Die Kapillaren wurden mit einem Kunststoffdeckel verschlossen und 20 Sekunden bei 2000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Schmelzkurvenanalyse im LightCycler unter folgenden Bedingungen: Initiale Denaturierung bei 95°C für 60 s (Rampe: 20°C/s), Abkühlen auf 45°C für 10 s (Rampe: 20°C/s), Schmelzkurvenanalyse mit Temperaturerhöhung auf 72°C (Rampe: 0,05°C/s) und erneutes Abkühlen auf 40°C für 2 s (Rampe: 20°C/s). Die Aufzeichnung und Auswertung der Schmelzkurven erfolgte computergesteuert (Roche Molecular Biochemicals Version 3.5) (Abbildung 4 und 5).

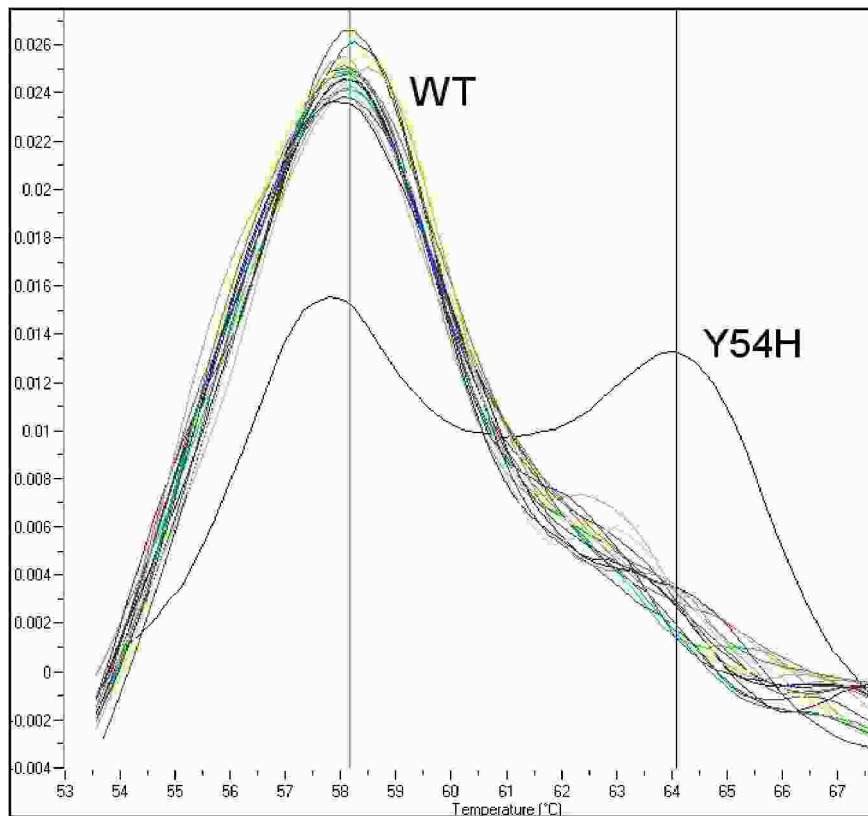


Abbildung 4: LightCycler-Schmelzkurve, hier berechnet als Integral der Fluoreszenz über die Temperaturerhöhung. Bei den Wildtyp-DNA-Proben schmelzen die Sonden bei ca. 58°C ab (WT), bei der DNA-Probe mit dem Y54H Polymorphismus hingegen erst bei ca. 64°C

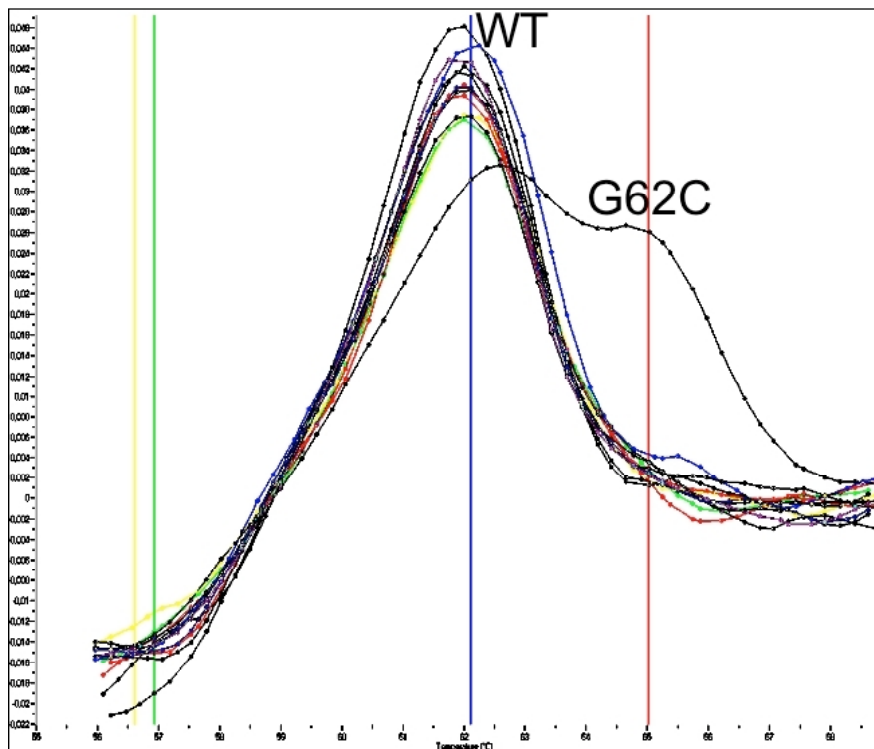


Abbildung 5: LightCycler-Schmelzkurve, Darstellung mehrerer Wildtyp-DNA-Proben (WT) sowie einer Probe mit G62C Polymorphismus.

2.5.4 DNA-Sequenzierung

Das gewünschte DNA-Segment wird durch PCR amplifiziert. Mit Hilfe von dNTPs, fluoreszenzmarkierten ddNTPs, Primern und einer DNA-Polymerase wird das aufgereinigte PCR-Produkt linear vervielfältigt (Cycle Sequencing). Wenn anstelle eines dNTP ein ddNTP mit fehlender Hydroxygruppe am 3'-C-Atom eingebaut wird, folgt der Abbruch der Kettenverlängerung. Es entstehen fluoreszenzmarkierte Fragmente jeder Länge, deren endständige Basen und somit die Sequenz durch elektrophoretische Auftrennung und Photodetektion bestimmt werden kann.

PCR-Produkte mit einem von der spezifischen Mutation bzw. dem Wildtyp abweichendem Schmelzverhalten in der LightCycler-Analyse wurden bidirektional sequenziert. Die PCR wurde wiederholt und erneut am LightCycler analysiert. Anschließend wurden 10 µl PCR-Produkt mit 0,25 U alkalischer Phosphatase (shrimp alkaline phosphatase) und 2,5 U Exonuklease I versetzt und erst für 40 min bei 37°C und dann zur Inaktivierung der Enzyme für 20 min bei 85°C inkubiert.

Der Ansatz für die Sequenzierungsreaktion bestand aus 3 µl des so behandelten PCR-Produktes, 1µl Vorwärts- bzw. Rückwärts-Primer (10 µM), und 3 µl BigDye

Terminator Mix und 3 µl destilliertes Wasser. Nach Überschichtung mit einem Tropfen Öl (Bayol F) erfolgte die Sequenzierungsreaktion unter folgenden Bedingungen: 2 min Denaturierung bei 95°C, dann 30 Zyklen mit 20 s Denaturierung bei 95°C, 30 s Primer-Anlagerung bei 56°C und 30 s Extension bei 60°C. Im Anschluß erfolgte eine Aufreinigung mittels Zentrifugation über Sephadex G-50 gefüllte Säulen um überschüssige ddNTPs zu entfernen. Die Sequenzanalyse erfolgte an einem ABI 3100 Fluoreszenzsequenzierer. Die Aufzeichnung und Auswertung der Basensequenz erfolgt computergesteuert (ABI Prism Version 3.7).

2.5.5 Statistik

Für die statistischen Auswertungen wurde der Chi-Quadrat Test und der Fisher exakt Test verwendet. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Für die statistischen Analysen wurde das SPSS-Programm, Version 11.0 für Windows (Chicago, USA) verwendet.