

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

DISSERTATION

***CFTR*-, *PRSS1*- und *SPINK1*-Varianten bei chronischer  
Pankreatitis**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jonas Rosendahl  
aus Tübingen

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. H. Witt  
2. Prof. Dr. med. R. M. Schmid  
3. Priv.-Doz. Dr. med. D. Staab

Datum der Promotion: 30.11.2007

---

## Inhaltsverzeichnis

---

Abkürzungen	4
Abbildungen	7
Tabellen	8
<b>1. Einleitung</b>	9
1.1 Chronische Pankreatitis	9
1.2 Krankheitsmodell der vererbten chronischen Pankreatitis (CP)	10
1.2.1 Kationisches Trypsinogen (PRSS1)	11
1.2.2 Anionisches Trypsinogen (PRSS2)	12
1.2.3 Serinproteaseinhibitor, Kazal Typ 1 (SPINK1)	13
1.2.4 $\alpha$ 1-Antitrypsin (PI)	14
1.2.5 Zytokeratin 8 (KRT8)	14
1.3 <i>CFTR</i> und zystische Fibrose (CF)	15
1.3.1 <i>CFTR</i> -Variationen bei CP	17
1.3.2 <i>CFTR</i> -, <i>PRSSI</i> - und <i>SPINK1</i> -Variationen bei CP	17
1.4 Methodische Aspekte	18
1.4.1 Schmelzkurvenanalyse mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie- Transfer (FRET)-Proben	19
1.4.2 Locked Nucleic Acids (LNA)	20
1.5 Fragestellung	22
<b>2. Studienteilnehmer und Materialien</b>	23
2.1 Patienten	23
2.2 Kontrollen	24
2.3 Verbrauchsmaterialien	25
2.4 Geräte	25
<b>3. Methoden</b>	26
3.1 DNA Extraktion	26
3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
3.3 Primer	26
3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	28
3.4.1 Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analyse	28
3.4.2 Herstellung der Polyacrylamidgele	29
3.4.3 Elektrophorese der PCR-Produkte und Silberfärbung	30

---

3.5	Sequenzierung	31
3.6	Hybridisierungssonden	32
3.7	Schmelzkurvenanalyse	37
3.8	Statistik	38
<b>4. Ergebnisse</b>		39
4.1	<i>CFTR</i> -Variationen	39
4.2	<i>CFTR</i> -„Polymorphismen“	42
4.3	<i>PRSSI</i> - und <i>SPINK1</i> -Variationen	43
4.4	TDT-Analysen ( <i>PRSSI</i> , <i>SPINK1</i> und <i>CFTR</i> )	44
4.5	Gemischt und trans-heterozygote Variationsträger	45
4.6	Relatives Risiko bei <i>CFTR</i> -, <i>PRSSI</i> - und <i>SPINK1</i> -Variationen	47
4.7	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)/Schmelzkurvenanalyse	49
<b>5. Diskussion</b>		54
5.1	<i>CFTR</i> -Variationen bei CP	55
5.2	<i>CFTR</i> -Mutationsspektrum und Verteilungsmuster bei CP, CF und CBAVD	58
5.3	<i>CFTR</i> -„Polymorphismen“	59
5.4	Gemischt-heterozygote Variationsträger	61
5.5	<i>PRSSI</i> - und <i>SPINK1</i> -Variationen	63
5.6	Trans-heterozygote Variationsträger	64
5.7	Methodische Aspekte	66
<b>6. Zusammenfassung</b>		68
<b>7. Abstract</b>		70
<b>8. Literaturverzeichnis</b>		72
Danksagung		85
Erklärung		86
Lebenslauf		87
Publikationsliste		88

---

## Abkürzungen

---

A	Adenin
ACP	alkoholische chronische Pankreatitis
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BIS	Bis-Acrylamid
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CBAVD	kongenitale bilaterale Aplasie des Vas deferens
CF	Zystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CP	chronische Pankreatitis
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DGGE	denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
DHPLC	denaturing high-performance liquid chromatography
DIOS	distales intestinales Obstruktionssyndrom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E	Exon
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Forward (vorwärts)
FL	Fuoreszein
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
HCP	hereditäre chronische Pankreatitis
I	Intron
ICP	idiopathische chronische Pankreatitis
kb	Kilobasen
KRT8	Zytokeratin 8

---

---

## Abkürzungen

---

l	Liter
LC	LightCycler
LNA	Locked Nucleic Acids
m	milli = 10 <sup>-3</sup>
μ	mikro = 10 <sup>-6</sup>
Abkürzungen	Erläuterung
M	mol/l
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
OR	Odds-Ratio
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PI	α1-Antitrypsin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PRSS1	kationisches Trypsinogen
PRSS2	anionisches Trypsinogen
R	Reverse (rückwärts)
sek	Sekunde
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
ssDNA	Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure
SPINK1	Serin Protease Inhibitor, Kazal Typ 1
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus Polymerase
TBE	Tris Borat EDTA Puffer
TCP	tropische chronische Pankreatitis
TDT	transmission disequilibrium test
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Temp.	Temperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

---

---

**Abkürzungen**

---

W

Watt

WT

Wildtyp

---

---

## Abbildungen

---

Abb. 1:	Hypothetisches Modell der chronischen Pankreatitis	11
Abb. 2:	Einteilung der <i>CFTR</i> Mutationsklassen (I-VI)	16
Abb. 3:	Schema der genetischen und umweltbedingten Einflüsse auf die Pathogenese der chronischen Pankreatitis	18
Abb. 4:	Prinzip der FRET-Sonden	19
Abb. 5:	Schmelzkurven am Beispiel der <i>CFTR</i> -Variante R117H	19
Abb. 6:	Struktur der LNA	20
Abb. 7:	SSCP-Analyse des Exon 10 und des Exon 7 des <i>CFTR</i> -Gens	29
Abb. 8a/b:	Exemplarische Elektropherogramme von R117H und R347H	31
Abb. 9:	Schmelzkurvenanalyse am Beispiel des Exon 7 des <i>CFTR</i> -Gens	37
Abb. 10a/b:	Schmelzkurvenanalyse des TG-Repeats des Intron 8 des <i>CFTR</i> -Gens	50
Abb. 11a/b:	Schmelzkurvenanalyse des Polypyrimidin-Abschnittes des Intron 8 des <i>CFTR</i> -Gens	51
Abb. 12a/b/c:	Schmelzkurvenanalyse des Exon 10 des <i>CFTR</i> -Gens	53
Abb. 13:	Schmelzkurvenanalyse am Beispiel von Exon 3 des <i>CFTR</i> -Gens	67

---



---

**Tabellen**

---

Tab. 1: Primer für PCR, Sequenzierung und SSCP-Analyse des <i>CFTR</i>	27
Tab. 2: Primer für PCR und Sequenzierung des <i>SPINK1</i>	28
Tab. 3: Primer für PCR und Sequenzierung des <i>PRSSI</i>	28
Tab. 4: Stammlösungen für C2-, C0,5- und MDE-Gele	30
Tab. 5: Gelzusammensetzung für die SSCP-Analyse	30
Tab. 6: Sequenz der FRET-Sonden	33/34
Tab. 7: <i>CFTR</i> -Variationen bei CP-Patienten und Kontrollen	39
Tab. 8: Frequenz der häufigsten <i>CFTR</i> -Variationen bei Patienten und Kontrollen	40
Tab. 9: Mittels SSCP detektierte <i>CFTR</i> -Variationen bei 128 Patienten	41
Tab. 10: Häufigkeit verschiedener <i>CFTR</i> -Variationen bei CP, CF und CBAVD	41
Tab. 11: Allelfrequenzen der <i>CFTR</i> -Polymorphismen bei Patienten und Kontrollen	42
Tab. 12: Häufigkeiten der TG-, M470V, c.2694T>G und c.4521G>A-Genotypen bei Patienten und Kontrollen	43
Tab. 13: Häufigkeiten der TG- und M470V-Genotypen bei Patienten und Kontrollen nach Korrektur	43
Tab. 14: <i>PRSSI</i> - und <i>SPINK1</i> -Varianten aller untersuchter Patienten und bei 552 Kontrollen	44
Tab. 15: TDT-Berechnungen für <i>PRSSI</i> -, <i>SPINK1</i> - und <i>CFTR</i> -Varianten	45
Tab. 16: Gemischt- und trans-heterozygote Mutationsträger bei allen Patienten	46
Tab. 17: Relatives Risiko bei <i>CFTR</i> -, <i>PRSSI</i> - und <i>SPINK1</i> -Variationen	48
Tab. 18: FRET-Sonden Temperaturunterschiede für das TG-Repeat	49
Tab. 19: FRET-Sonden Temperaturunterschiede für den Polypyrimidin-Abschnitt	49
Tab. 20: FRET-Sonden Temperaturunterschiede für den p.F508del-Bereich	52

---

## 6. Zusammenfassung

Die chronische Pankreatitis (CP) ist ein wiederkehrender oder kontinuierlicher Entzündungsprozeß der Bauchspeicheldrüse, der bei einigen Patienten in eine exokrine und/oder endokrine Pankreasinsuffizienz mündet. Bei der vererbten Form der CP wird heutzutage diskutiert, daß ein Ungleichgewicht der Proteasen der Verdauungsenzymkaskade und ihrer Inhibitoren für die Pathogenese verantwortlich ist. Bislang wurde eine Assoziation mit vier verschiedenen Genen beschrieben: *PRSSI*, *PRSS2*, *SPINK1* und *CFTR*.

Aufgrund ihrer geringen Spezifität und mangelnden Effizienz ist die SSCP als Untersuchungsverfahren nicht zu empfehlen. Zum heutigen Zeitpunkt ist die Sequenzierung das Verfahren der Wahl. Jedoch war ihr Einsatz aufgrund der Größe des *CFTR*-Gens für das vorliegende Patienten- und Kontrollkollektiv nicht sinnvoll, weshalb ein hochspezifischer, hochempfindlicher und beliebig erweiterbarer Schmelzkurvenassay unter Einsatz von LNAs entwickelt wurde. Einerseits ist durch die Erweiterbarkeit eine Anpassung des Assays bei der Untersuchung ethnisch verschiedener Gruppen unproblematisch möglich. Andererseits konnten durch diesen Assay Bereiche wie der TG-Repeat und der Polypyrimidin-Abschnitt im Intron 8 als auch die Region im Bereich von p.F508del durch den gezielten Einsatz von LNAs analysiert werden. Darüber hinaus ist in diesen Bereichen eine DNA-Sequenzierung, die häufig bidirektional durchgeführt werden musste, nicht mehr notwendig.

In der durchgeführten Untersuchung entdeckten wir 101 *CFTR*-Variationen bei 533 Patienten (18,9 %). Da 12 Patienten gemischt-heterozygote *CFTR*-Variationsträger waren, wurde bei 89 Patienten mindestens eine *CFTR*-Variation gefunden (89/533, 16,7 %). Signifikant angehäuften waren die *CFTR*-Variationen p.R117H, p.F508del und p.L997F. Dahingegen konnte für die Variationen p.I148T, p.D1152H und p.S1235R keine signifikante Anreicherung berechnet werden. In der TDT-Analyse war lediglich für p.F508del die Erhebung signifikanter Werte gegeben, was höchstwahrscheinlich auf die geringe Anzahl der vorhandenen Trios zurückzuführen ist. Der Anteil der p.F508del Variation an den gesamten gefundenen *CFTR*-Variationen war niedriger als bei der CF (36,6 % gegen 66 %) und die gefundenen Variationen waren überwiegend „seltene“ und „milde“ Variationen. Weiterhin zeigte sich ein unterschiedliches Verteilungsmuster der Variationen bei CP, CF und CBAVD. Eine Assoziation zu den von uns untersuchten *CFTR*-Polymorphismen bestand nicht.

Bei 533 Patienten erfolgte der Nachweis von 50 *PRSSI*- und 111 *SPINK1*-Varianten. Signifikant angereichert waren die *PRSSI*-Varianten p.R122H, p.A16V und p.N29I sowie die *SPINK1*-Varianten p.N34S und [c.1-215G>A + c.194+2T>C]. Eine signifikant erhöhte Weitergabe dieser

Variationen von den Eltern auf die Kinder fand sich in der TDT-Analyse für p.R122H, p.A16V und p.N34S. Darüber hinaus war eine signifikante Anhäufung von gemischt-heterozygoten *CFTR*-Variationsträgern und *trans*-heterozygoten Trägern für *CFTR*-, *PRSS1*- und *SPINK1*-Varianten erkennbar.

Entsprechend des unterschiedlichen Variationsspektrums bei CP, CF und CBAVD ist ein einheitliche Untersuchung dieser Patienten nicht zweckmäßig. Da einige der bereits in anderen Studien beschriebenen Variationen und Polymorphismen nicht assoziiert sind, sind die in vorangegangenen Studien genannten Häufigkeiten von *CFTR*-Varianten bei CP niedriger als bisher angenommen. Die vorhandenen funktionellen Daten und die hier durchgeführte genetische Analyse sprechen dafür, daß eine *CFTR*-Unterfunktion ursächlich für die Pathogenese der CP sein kann und nur in seltenen Fällen eine atypische Verlaufsform der CF vorliegt. In einzelnen Fällen kann anhand des komplexen Zusammenspiels von Variationen aller 3 Gene Einsicht in den Vererbungsmodus gewonnen werden. Im Falle eines Patienten ist anzunehmen, daß erst die Kombination von Variationen aller 3 Gene, welche von unterschiedlichen Elternteilen stammten, zur Ausbildung einer CP führte.

Deshalb schlagen wir vor, daß eine Untersuchung von Patienten mit CP ungeklärter Ätiologie ein genetisches Screening für Veränderungen in den oben genannten Genen auch beim Fehlen einer positiven Familienanamnese bezüglich einer Pankreatitis beinhalten sollte. Auch wenn sich aus dem Nachweis genetischer Alterationen aktuell keine Konsequenz hinsichtlich der Therapie ergibt, mag dieser den Patienten helfen, ihre Erkrankung besser zu verstehen.

**Schlagerworte:** Chronische Pankreatitis, Gen, *CFTR*, *SPINK1*, *PRSS1*, *PRSS2*, Zystische Fibrose, FRET, LNA, Variation, Polymorphismus

## 7. Abstract

Chronic pancreatitis (CP) is defined as a continuing or relapsing inflammatory disease of the pancreas, leading to endocrine and/or exocrine insufficiency and irreversible morphological changes. Currently, it is thought that the imbalance of pancreatic proteases and their inhibitors results in the development of chronic pancreatitis. Until now, genetic variations of four genes have been associated to chronic pancreatitis: *PRSSI*, *PRSS2*, *SPINK1* and *CFTR*.

Since direct DNA-sequencing has become affordable and efficient over the last years it should be the gold standard for the investigation of genetic questions. However, the *CFTR*-gene consists of 27 exons and regarding our investigated patient and control population sequencing is not applicable. Therefore, we established an efficient, expandable and highly specific melting curve assay using locked nucleic acids integrated in fluorescence resonance energy transfer probes.

We detected 101 *CFTR*-variations in 533 investigated patients (18,9 %). Since, 12 patients were compound-heterozygous *CFTR*-carriers, 89 patients carried at least one *CFTR*-variation (89/533, 16,7 %). The *CFTR*-variations, p.R117H, p.F508del and p.L997F were significantly enriched in contrast to p.I148T, p.D1152H and p.S1235R. TDT-analysis revealed only significant findings for p.F508del, which might be due to the small amount of trios we were able to investigate. In comparison to CF (66 %) p.F508del accounted only for 36,6 % of the *CFTR*-variations detected. Moreover, most of the *CFTR*-variations were “seldom” and “mild” variations. Furthermore, the mutation spectrum found, was distinct from that in CF or CBAVD and the investigated *CFTR*-polymorphisms were not associated to CP.

In addition, we found 50 *PRSSI*- and 111 *SPINK1*-variations, whereupon p.R122H, p.A16V and p.N29I (*PRSSI*) and p.N34S and [c.1-215G>A + c.194+2T>C] (*SPINK1*) were significantly accumulated. Here, p.R122H, p.A16V and p.N34S showed a significant transmission in TDT-analysis. Additionally, compound-heterozygous *CFTR*-carrier and trans-heterozygous carrier for *CFTR*-, *PRSSI*- and *SPINK1*-variations were significantly enriched.

Due to this, a consistent investigation of CP, CF and CBAVD patients is insufficient. Since, earlier studies counted some of the polymorphisms that are not associated, the overall frequency of *CFTR*-variations in CP patients is in fact lower. After all, our data suggest a disorganisation of a *CFTR*-subfunction and that only in rare cases an atypical form of CF is present. In one family we were able to demonstrate that only the complex interaction of alterations of all 3 genes inherited from mother and father may predispose to the development of CP.

In summary, we suggest genetic testing of the above mentioned genes in patients with CP of unknown origin, even in the absence of a family history. Although, the verification of genetic

alterations has no consequence in respect of the therapy of CP, it might help the patients to better understand their disease.

**Key words:** chronic pancreatitis , gene, *CFTR*, *SPINK1*, *PRSS1*, *PRSS2*, cystic fibrosis, FRET, LNA, variation, polymorphism

## **Danksagung**

Mein größter Dank gilt Herrn PD Dr. med. Heiko Witt, der Vater des Gedanken, Betreuer, Ratgeber und strenger Korrektor dieser Arbeit war. Wissenschaftlicher Scharfsinn und wissenschaftliche als auch persönliche Integrität sowie eine Betreuung die sich ebenso außerhalb der medizinischen Fragestellungen fortsetzte, kennzeichneten diese Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Michael Becker, der diese Arbeit ermöglichte und mir mit medizinischen und nicht medizinischen Ratschlägen zu jeder Zeit zur Seite stand.

Ebenfalls möchte ich mich im Besondern bei Frau Claudia Güldner und bei allen anderen Mitarbeitern des Labors für die Einweisung in die Laboratoriumsmedizin bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Bertram Wiedenmann, in dessen Abteilung diese Promotion durchgeführt wurde, danke ich für die freundliche Unterstützung.

Zum Schluss, aber nicht zuletzt, gilt mein Dank meiner gesamten Familie; meiner verstorbenen Mutter, Dr. med. dent. Riitta Rosendahl (geb. Nupponen) möchte ich diese Arbeit als Anerkennung von ganzem Herzen widmen; mein besonderer Dank und Respekt gilt meinem Vater, Prof. Dr. med. Werner Rosendahl der stets ein Vorbild für mich ist und war; weiterhin möchte ich meinem Onkel Bernd Rosendahl danken, der mir aus einer misslichen Situation geholfen hat.

## **Erklärung**

Ich, Jonas Rosendahl, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „*CFTR*-, *PRSSI*- und *SPINK1*-Varianten bei chronischer Pankreatitis“ 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.

Datum: Leipzig, den 07.07.2007

Jonas Rosendahl

## **Lebenslauf**

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



## Publikationsliste

Keim V, Witt H, Bauer N, Bödeker H, Rosendahl J, Teich N, Mössner J. The course of genetically determined chronic pancreatitis. *JOP* 2003;4:146-154.

Verlaan M, Drenth JP, Truninger K, Koudova M, Schulz HU, Bargetzi M, Kunzli B, Friess H, Cerny M, Kage A, Landt O, te Morsche RH, Rosendahl J, Luck W, Nickel R, Halangk J, Becker M, Macek M, Jansen JB, Witt H. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase 1A7 are not involved in pancreatic diseases. *J Med Genet* 2005;10:e62.

Witt H, Sahin-Tóth M, Landt O, et al. A degradation-sensitive anionic trypsinogen (*PRSS2*) variant protects against chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2006;38:668-673.

Rosendahl J, Teich N, Mossner J, et al. Compound heterozygous mutations of the *SBDS* gene in a patient with Shwachman-Diamond syndrome, type 1 diabetes mellitus and osteoporosis. *Pancreatology* 2006;6:549-554.

Teich N, Rosendahl J, Toth M, et al. Mutations of human cationic trypsinogen (*PRSS1*) and chronic pancreatitis. *Hum Mutat* 2006;27:721-730.

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.

Kiraly O, Boulling A, Witt H, et al. Signal peptide variants that impair secretion of pancreatic secretory trypsin inhibitor (*SPINK1*) cause autosomal dominant hereditary pancreatitis. *Hum Mutat* 2007;28:469-476.

Rosendahl J, Bodeker H, Mossner J, Teich N. Hereditary chronic pancreatitis. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:1.