

1. Einleitung

1.1 Chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis (CP) ist ein wiederkehrender oder kontinuierlicher Entzündungsprozeß der Bauchspeicheldrüse, der bei einigen Patienten in eine exokrine und/oder endokrine Pankreasinsuffizienz mündet (Singer *et al.* 1985). Der Schweregrad des akuten Schubs variiert von einer leichten, interstitiell-ödematösen bis zu einer schweren, hämorrhagisch-nekrotisierenden Entzündung.

Morphologisch findet sich im fortgeschrittenen Stadium eine unregelmäßige Sklerosierung des Organs mit fokaler, segmentaler oder diffuser Zerstörung des exokrinen Gewebes. Häufig lassen sich auch Veränderungen des Pankreasgangsystems wie Dilatationen oder Strikturen sowie intraduktale Konkreme in Form von Proteinausfällungen oder Steinen nachweisen.

Leitsymptom im Kindesalter sind rezidivierende, plötzlich auftretende abdominelle Schmerzen. Im Gegensatz zum Erwachsenenalter bestehen selten permanente Schmerzzustände. Weitere Befunde sind Übelkeit, Erbrechen und ein abdomineller Druckschmerz. Im Verlauf der Erkrankung entwickelt ein Teil der Patienten eine Pankreasinsuffizienz mit massigen, stinkenden Stuhlentleerungen, Steatorrhoe und Gewichtsabnahme sowie einen Insulinmangeldiabetes.

Zur Inzidenz und Prävalenz der chronischen Pankreatitis im Kindesalter existieren keine epidemiologischen Daten. Die Inzidenz im Erwachsenenalter wird für die USA und Europa mit 3,5 bis 10 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner und Jahr angegeben (Secknus *et Mössner* 2000). Da die chronische Pankreatitis in industrialisierten Ländern bei Erwachsenen zu 70-80 % der Fälle äthyltoxisch bedingt ist, sind diese Daten nicht auf das Kindesalter übertragbar (Durbec *et Sarles* 1978; Ammann *et al.* 1987).

Andere Ursachen als anhaltender Alkoholabusus, wie anatomische Anomalien, Hypertriglyzeridämie und Hyperkalziämie gelten als selten. In 10-30 % der Fälle findet sich weder eine auslösende Ursache noch eine positive Familienanamnese (DiMagno *et al.* 1993). Diese als idiopathisch bezeichnete chronische Pankreatitis kommt in zwei Formen vor (Ammann 1976; Ammann 1990; Layer *et al.* 1994): Die sogenannte „juvenile“ oder „early onset“-Form manifestiert sich bis zum 30. Lebensjahr mit rezidivierenden abdominellen Schmerzen und nur langsamer Ausbildung einer Pankreasinsuffizienz. Die seltenere „senile“ oder „late onset“-Form manifestiert sich zwischen dem 6. und 8. Lebensjahrzehnt mit exokriner Insuffizienz und zeigt in der Mehrzahl der Fälle einen weitgehend schmerzlosen Verlauf.

1952 beschrieben Comfort und Steinberg zum ersten Mal eine familiäre Häufung der Pankreatitis und zeigten damit die Möglichkeit einer genetischen Grundlage in der Pathogenese

der Pankreatitis auf (Comfort *et* Steinberg 1952). Diese sogenannte hereditäre Pankreatitis ist neben der positiven Familienanamnese durch rezidivierende Pankreatitisschübe seit der Kindheit, eine gleiche Geschlechtsverteilung und durch Fehlen prädisponierender Faktoren charakterisiert (Perrault 1994).

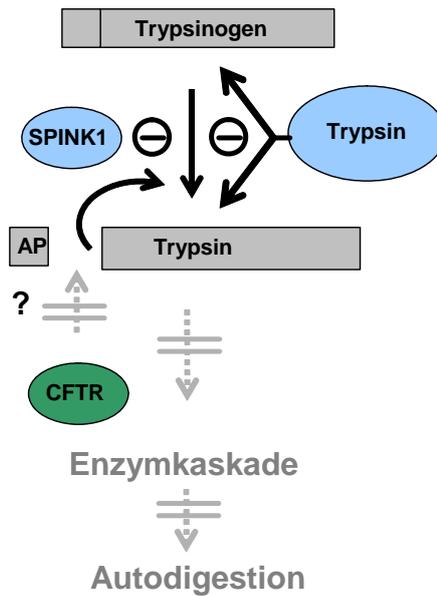
1.2 Krankheitsmodell der vererbten chronischen Pankreatitis (CP)

Im Jahre 1896 postulierte Hans Chiari, daß die Pankreatitis das Ergebnis einer Selbstverdauung des Organs sei (Chiari 1896). Der vorzeitigen Aktivierung des Trypsinogens zu Trypsin wurde hierbei eine entscheidende Rolle zugeschrieben, da Trypsin alle proteolytischen Vorläuferenzyme in ihre aktive Form umwandelt und somit die pankreatische Enzymkaskade zu initiieren vermag (Steer *et* Meldolesi 1987).

Zahlreiche Mechanismen schützen das Pankreas vor Autodigestion durch aktivierte Verdauungsenzyme. Die intrapancreatische Enzymaktivität wird durch die Synthese und Sekretion inaktiver Vorläufer-Enzyme (Zymogene), eine niedrige Kalziumkonzentration und durch die Lokalisation des aktivierenden Enzyms Enteropeptidase (Enterokinase) außerhalb des Organs verhindert. Unter physiologischen Bedingungen werden dennoch geringe Mengen an Trypsinogen innerhalb des Pankreas aktiviert. Diese Aktivität wird durch gleichzeitig sezernierte Proteaseinhibitoren wie den Serinproteaseinhibitor Kazal Typ 1 (SPINK1) gehemmt. Des Weiteren werden Trypsin wie auch weitere Proteasen durch Trypsin selbst und trypsinähnliche Enzyme wie Mesotrypsin degradiert.

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 gelang es, Defekte in drei verschiedenen Genen zu identifizieren, die eindeutig mit einer CP assoziiert sind: *PRSSI*, *SPINK1* und *CFTR*. Zusätzlich konnte vor kurzem ein protektiver Einfluß durch eine Variante im *PRSS2*-Gen identifiziert werden.

Normales Pankreas



Hereditäre Pankreatitis

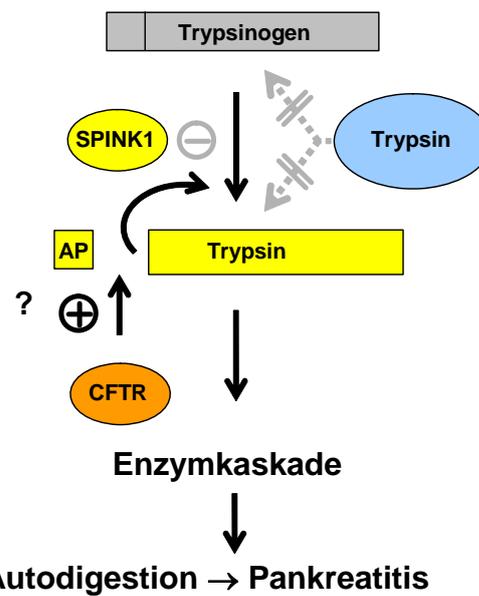


Abbildung 1: Hypothetisches Modell der erblichen Pankreatitis. Im gesunden Pankreas verhindern SPINK1 und Trypsin selbst die Aktivierung der Verdauungsenzymkaskade. Ob und wie CFTR in diesen Regelkreis eingreift, ist bis heute nur unvollständig verstanden. Bei der erblichen Pankreatitis führen Mutationen des Trypsinogens und seines Inhibitors, SPINK1, zu einer vermehrten intrapancreatischen Trypsinaktivität, die die Enzymkaskade und damit die Selbstverdauung des Pankreas in Gang setzt. Abkürzungen: AP = Aktivierungspeptid.

1.2.1 Kationisches Trypsinogen (*PRSS1*)

Das kationische Trypsinogen, auch als Serinprotease 1 (*PRSS1*) bezeichnet, gehört zu den meistsynthetisierten sekretorischen Proteinen des Pankreas (Guy *et al.* 1978). Drei verschiedene Trypsinogene wurden aus dem Pankreassekret isoliert, die entsprechend ihres Wanderungsverhaltens in der isoelektrischen Fokussierung als anionisches, kationisches und Mesotrypsinogen bezeichnet werden (Scheele *et al.* 1981). Der Anteil der kationischen Form am Gesamttrypsinogen beträgt 60% und der Anteil der anionischen Form 40%, während das Mesotrypsinogen nur in geringer Menge nachweisbar ist (Scheele *et al.* 1981). Kationisches und anionisches Trypsinogen besitzen die gleiche enzymatische Aktivität; das kationische Isoenzym zeigt aber eine stärkere Neigung zur Selbstaktivierung und eine geringere Inaktivierungstendenz (Colomb *et al.* 1978; Colomb *et al.* 1979).

Im Jahre 1996 konnten drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander durch Kopplungsanalysen einen Genort für die autosomal dominant vererbte Pankreatitis auf dem langem Arm von Chromosom 7 (7q35) lokalisieren (Le Bodic *et al.* 1996; Pandya *et al.* 1996; Whitcomb *et al.* 1996). Wenig später wurde eine Mutation im kationischen Trypsinogen (*PRSS1*) als Erkrankungsursache identifiziert (Whitcomb *et al.* 1996). Bei fünf untersuchten Familien fand sich ein Arginin-Histidin-Austausch an Position 122 des Proteins (R122H). Diese Veränderung

führt zu einer erhöhten Autoaktivierung und zu einem geringeren Abbau des kationischen Trypsinogens (Várallyay *et al.* 1998; Sahin-Tóth *et al.* 1999; Sahin-Tóth *et al.* 2000).

Inzwischen wurden mehrere weitere *PRSSI*-Mutationen beschrieben, von denen zwei, A16V und N29I, häufiger nachzuweisen sind (Gorry *et al.* 1997; Teich *et al.* 1998; Witt *et al.* 1999). Funktionelle Analysen an rekombinantem menschlichen Trypsinogen konnten zeigen, daß I29-Trypsinogen *in vitro* vermehrt zur Autoaktivierung neigt, aber im Gegensatz zu H122-Trypsin nicht verzögert abgebaut wird (Sahin-Tóth *et al.* 2000). Sowohl R122H als auch N29I werden hauptsächlich bei Patienten mit positiver Familienanamnese gefunden (Whitcomb *et al.* 1996, Witt *et al.* 1999). Studien bei pädiatrischen Patienten zeigten, daß Trypsinogen-Mutationen auch bei Patienten ohne Familienanamnese für eine Pankreatitis nachweisbar sind. Bei 3 von 30 Patienten mit idiopathischer CP fand sich eine Mutation der ersten Aminosäure des Aktivierungspeptides, A16V (Witt *et al.* 1999). Es wurde angenommen, daß diese Veränderung eine erleichterte Abspaltung des Aktivierungspeptides bewirkt wie es bei anderen Varianten im Aktivierungspeptid (D22G und K23R) gezeigt werden konnte (Witt *et al.* 1999, Férec *et al.* 1999, Teich *et al.* 2000). V16-Trypsinogen weist jedoch im Vergleich zum Wildtyp-Protein keine erhöhte Autoaktivierung auf (Kiraly *et al.* 2006). Eine kürzlich erschienene Publikation konnte zeigen, daß die A16V-Mutation die Chymotrypsin C-vermittelte Prozessierung des Trypsinaktivierungspeptides erleichtert. Folge ist eine beschleunigte Aktivierung des mutierten V16-Trypsinogens durch Chymotrypsin C (Nemoda *et Sahin-Tóth* 2006).

Zusammengefaßt scheinen *PRSSI*-Mutationen zu einer erhöhten Trypsinogen-Aktivierung und/oder Trypsin-Stabilisierung und damit zu einer vermehrten intrapankreatischen Trypsinaktivität zu führen (Rosendahl *et al.* 2007).

1.2.2 Anionisches Trypsinogen (*PRSS2*)

Während Pankreatitis-assoziierte Mutationen bisher nur im kationischen Trypsinogen und nicht in den übrigen Isoenzymen beschrieben sind, konnte in einer kürzlich publizierten Studie gezeigt werden, daß die genetische Variation p.G191R im anionischen Trypsinogen (*PRSS2*), Träger dieser Veränderung vor einer Pankreatitis schützt (Witt *et al.* 2006). In einem großen Kollektiv trat die Variation bei gesunden Kontrollpersonen signifikant häufiger auf als bei Patienten mit CP. Funktionelle Untersuchungen an rekombinantem R191-Protein zeigten ein vollständiges Fehlen der Enzymaktivität, da durch die Mutation eine neue proteolytische Spaltungsstelle entsteht, die zu autokatalytischer Degradation des Enzyms führt. Diese Studie zeigte erstmalig,

daß bei der CP auch protektive genetische Veränderungen existieren, was die Komplexität der Erbgänge der idiopathischen bzw. hereditären Krankheitsformen unterstreicht.

1.2.3 Serinproteaseinhibitor, Kazal Typ 1 (*SPINK1*)

Der Serinproteaseinhibitor, Kazal-Typ 1 (*SPINK1*), auch als pankreatischer sekretorischer Trypsin-Inhibitor (PSTI) oder als tumorassoziiertes Trypsin-Inhibitor (TATI) bezeichnet, ist ein spezifischer intrapancreatischer Trypsin-Inhibitor. *SPINK1* wurde erstmalig 1948 von Kazal und Mitarbeitern aus dem Rinderpankreas isoliert (Kazal *et al.* 1948). Es läßt sich im Pankreassekret aller untersuchten Spezies nachweisen. Außer dem Pankreas exprimieren auch der Gastrointestinaltrakt sowie zahlreiche andere Gewebe wie Leber, Lunge, Nieren, Ovarien und Brustdrüse *SPINK1* (Shibata *et al.* 1986; Shibata *et al.* 1987). *SPINK1* fungiert nicht nur als intrapancreatischer Proteaseinhibitor, sondern auch als Akute-Phase-Protein und ist möglicherweise bedeutsam beim Schutz der gastrointestinalen Epithelschicht vor exzessiver Verdauung und bei der Wundheilung (Marchbank *et al.* 1998).

Die Inkubation äquimolarer Mengen von Trypsin und dem Inhibitor führt zu einer kovalenten Bindung zwischen dem katalytischen Serin der Protease und dem Lysin im reaktiven Zentrum von *SPINK1*. Nach längerer Inkubation wurde allerdings ein kontinuierlicher Wiederanstieg der Trypsinaktivität beobachtet (Laskowski *et al.* 1953). Dieses Phänomen der „temporären Inhibition“ wird durch die Tatsache erklärt, daß der Trypsin-Inhibitor-Komplex selber als Substrat für Trypsin dient. Die dadurch bedingte Degradierung des Inhibitormoleküls resultiert in einer Wiederherstellung der ursprünglichen Trypsinaktivität.

Im Jahr 2000 zeigten Witt *et al.*, daß Variationen im *SPINK1*-Gen gehäuft bei Patienten mit CP zu finden sind (Witt *et al.* 2000). Eine Punktmutation im Exon 3, die zu einem Asparagin-Serin-Austausch an Position 34 des Proteins führt (N34S), ist mit 80-90 % aller *SPINK1*-Mutationen die häufigste Veränderung. Die N34S-Mutation findet sich vornehmlich bei Patienten ohne Familienanamnese: 20-40 % der Patienten mit sogenannter idiopathischer chronischer Pankreatitis tragen auf einem oder beiden Allelen diese Mutation (Witt *et al.* 2000; Pfützer *et al.* 2000). Eine Heterozygotie für N34S dürfte allerdings pathogenetisch nicht ausreichend sein, da etwa 1-2 % der Bevölkerung N34S-Träger sind. Wahrscheinlich führt erst die Kombination mit anderen Gendefekten oder Umweltfaktoren zum Ausbruch der Erkrankung. Neben N34S wurden mehrere weitere *SPINK1*-Mutationen identifiziert, deren Bedeutung zur Zeit noch größtenteils unklar ist. Für zwei *SPINK1*-Varianten, L14P und L14R, die beide im Signalpeptid lokalisiert sind, konnte vor kurzem eine aufgehobene Sekretion bedingt durch massive intrazelluläre Degradierung nachgewiesen werden (Király *et al.* 2007).

SPINK1-Mutationen finden sich außer bei der sogenannten idiopathischen Pankreatitis auch vermehrt bei alkoholinduzierter chronischer Pankreatitis (Witt *et al.* 2001; Drenth *et al.* 2002) und bei tropischer Pankreatitis (Chandak *et al.* 2002; Hassan *et al.* 2002; Bhatia *et al.* 2002; Schneider *et al.* 2002).

1.2.4 α 1-Antitrypsin (PI)

α 1-Antitrypsin ist ein wichtiger Inhibitor proteolytischer Enzyme wie der neutrophilen Elastase, des Cathepsin G, der Proteinase 3 und des Trypsins (Perlmutter *et al.* 1998). Zwei kleinere Studien beschrieben eine Assoziation zwischen einem α 1-Antitrypsinmangel und der chronischen Pankreatitis (Novis *et al.* 1975; Mihas *et Hirschowitz* 1976). Andere Arbeitsgruppen konnten diese Assoziation jedoch nicht bestätigen (Lankisch *et al.* 1978; Braxel *et al.* 1982; Haber *et al.* 1991). Auch in drei kürzlich publizierten genetischen Studien an Patienten mit idiopathischer und hereditärer CP fand sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung des α 1-Antitrypsin-Genotyps bei Patienten und Kontrollen (Witt *et al.* 2002; Teich *et al.* 2002; Sobczynska-Tomaszewska *et al.* 2006).

Diese Daten legen nahe, daß dem α 1-Antitrypsinmangel keine Bedeutung bei der Pathogenese der chronischen Pankreatitis zukommt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen einer großen Follow-up-Studie, die bei 246 PiZ-Homozygoten keinen einzigen Fall einer Pankreatitis beschrieb (Larsson 1978).

1.2.5 Zytokeratin 8 (KRT8)

Das Zytoskelett besteht aus drei filamentösen Systemen: den Intermediärfilamenten, den Mikrofilamenten und den Mikrotubuli. Das Zytoskelett erfüllt primär mechanische Funktionen, indem es für die Aufrechterhaltung der äußeren Zellform sorgt. Zusätzlich zu dieser Strukturfunktion sind einzelne Bestandteile auch an der Regulation der Zellteilung, der Zellstreßverarbeitung und der Zellmotilität beteiligt (Ku *et al.* 1999). Zytokeratine gehören zu der Gruppe der Intermediärfilament-Proteine. Das menschliche Pankreas exprimiert fast ausschließlich Keratin 8 und Keratin 18 (Ku *et al.* 1999).

Transgene Mäuse, die humanes *KRT8* überexprimieren, zeigen histologische Veränderungen des Pankreas, wie mononukleäre Infiltrate, interstitielle Fibrose sowie Dysplasie der Azinuszellen und Apoptose, die dem Bild einer CP ähneln. Im weiteren entwickeln die Tiere eine exokrine Pankreasinsuffizienz (Casanova *et al.* 1999).

In einer vor kurzem publizierten Studie wurden 67 Patienten mit CP unterschiedlicher Ätiologie auf die *KRT8*-Mutationen Y54H und G62C untersucht. Dabei zeigte sich G62C bei 6 Patienten (8,9 %), aber nicht bei 100 gesunden Kontrollen ($p < 0,003$) (Cavestro *et al.* 2003). Y54H wurde weder bei Patienten noch bei Kontrollen nachgewiesen. Diese Assoziation zu *KRT8*-Mutationen konnte allerdings in einer großen multizentrischen Studie mit über 1500 Patienten und über 4000 Kontrollpersonen nicht bestätigt werden (Treiber *et al.* 2006).

1.3 *CFTR* und zystische Fibrose (CF)

Die zystische Fibrose ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung mit einer Inzidenz von etwa 1:2500 in der weißen Bevölkerung. 1989 wurde das *CFTR*-Gen (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) als Krankheitsgen identifiziert (Riordan *et al.* 1989; Kerem *et al.* 1989). Beim Menschen ist das *CFTR*-Gen auf dem langen Arm des Chromosom 7 (7q31) lokalisiert. Es umfaßt 250 kb und ist in 27 Exone unterteilt (Kerem *et al.* 1989; Zielenski *et al.* 1991). *CFTR* kodiert für ein Protein von 1480 Aminosäuren, bestehend aus zwei Transmembrandomänen, zwei Nukleotidbindungsdomänen und einer regulatorischen Domäne mit zahlreichen Phosphorylierungsstellen (Riordan *et al.* 1989, 1993; Sheppard *et al.* 1999). *CFTR* gehört zur Familie der „ATP binding cassette“ (ABC) und ist an der Oberfläche der meisten Epithelzellen lokalisiert. *CFTR* fungiert als Chloridkanal, der durch zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) reguliert wird (Riordan *et al.* 1993).

Klinisch geht die zystische Fibrose mit einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung, die in den meisten Fällen in ein Lungenversagen mündet, einer exokrinen Pankreasinsuffizienz mit Maldigestion und konsekutiver Steatorrhoe, einem Insulinmangeldiabetes, einer männlichen Infertilität infolge obstruktiver Azoospermie sowie mit Nasenpolypen und chronischer Sinusitis einher. Des weiteren können Gallensteine, ein Mekoniumileus, ein distales intestinales Obstruktionssyndrom (DIOS) und eine Leberzirrhose auftreten. Die Pankreasaffektion variiert von einer kompletten endokrinen und exokrinen Insuffizienz bis hin zu fast normaler Pankreasfunktion. Im histomorphologischen Bild zeigt sich eine Fibrosierung mit großflächigem Untergang der Azinuszellen, die durch Fettgewebe ersetzt sind.

Für die Diagnose der CF sind unter anderem die Pilocarpin-Iontophorese (sog. Schweiß-Test), bei dem erhöhte Natrium- und/oder Chloridkonzentrationen gemessen werden und molekulargenetische Untersuchungen des *CFTR*-Gens von Bedeutung.

Bislang sind mehr als 1000 verschiedene *CFTR*-Variationen beschrieben worden (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>). Die häufigste Variation bei Patienten mit CF ist F508del, die ca. 66 % aller CF-Chromosomen weltweit ausmacht (The Cystic Fibrosis Genetic Analysis

Consortium 1994). Bei F508del handelt es sich um eine Deletion von 3 Basen, die den Verlust eines Phenylalanin im Kodon 508 zur Folge hat.

Der Einfluß einer Variation auf den Schweregrad des Krankheitsbildes hängt von der Art der Mutation (Aminosäureaustausch, Leserasterverschiebung usw.), der Klasse (Klasse I-VI, Abbildung 2) und der Lokalisation innerhalb des Gens ab. Allerdings zeigte sich, daß der Krankheitsverlauf bei Patienten mit denselben *CFTR*-Varianten sehr unterschiedlich sein kann, was vermuten läßt, daß umweltbedingte und erbliche Faktoren Einfluß auf den Phänotyp nehmen.

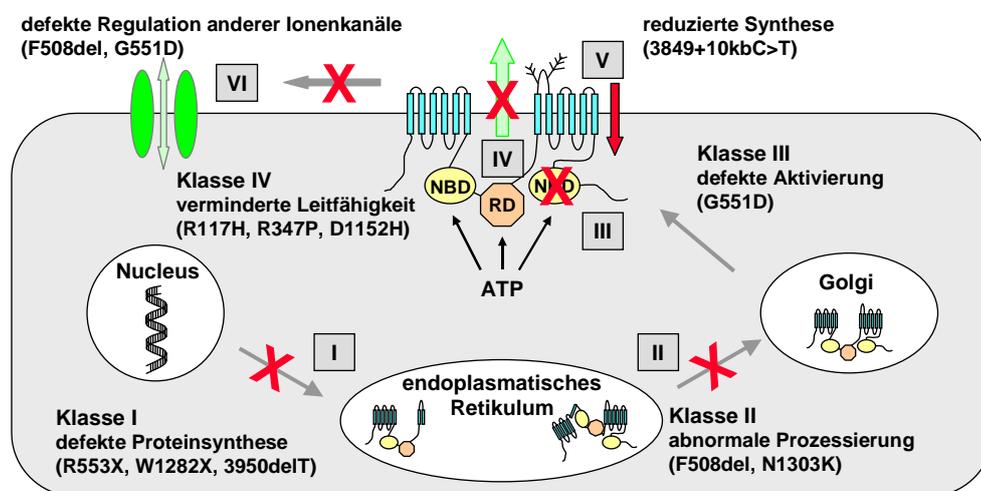


Abbildung 2: Einteilung der *CFTR* Mutationsklassen (I-VI) (nach Witt 2003).

Bei Patienten mit CF findet sich eine große Variabilität des pulmonalen Phänotyps, die kaum mit dem Genotyp korreliert (Lester *et al.* 1994; Koch *et al.* 2001). Im Gegensatz dazu besteht bei der Pankreasfunktion eine deutliche Genotyp-Phänotyp-Korrelation. So sind bei CF-Patienten milde *CFTR*-Variationen mit einer suffizienten Pankreasfunktion assoziiert (The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium 1993; Durno *et al.* 2002). In manchen Fällen kann auch die Lokalisation eines weiteren Defekts in *cis* d.h. auf demselben Allel einen Einfluß auf den Phänotyp haben, wie das Beispiel von R117H und dem 5T Allel zeigt (Kiesewetter *et al.* 1993). *CFTR* ist nicht nur mit der CF assoziiert, sondern auch mit anderen Erkrankungen wie männlicher Infertilität (kongenitale bilaterale Aplasie des Vas deferens; CBAVD), mit disseminierten Bronchiektasien, der Sarkoidose und der idiopathischen CP.

1.3.1 CFTR-Variationen bei CP

Im Jahr 1998 beschrieben zwei unabhängige Arbeitsgruppen zum erstenmal einen Zusammenhang zwischen *CFTR*-Variationen und CP (Sharer *et al.* 1998; Cohn *et al.* 1998). Hinweise auf die Bedeutung von *CFTR* bei CP ergaben sich aus der Beobachtung, daß 1-2 % aller Patienten mit zystischer Fibrose an einer Pankreatitis leiden (Shwachman *et al.* 1975). Ebenso können bei beiden Erkrankungen erhöhte Chloridkonzentrationen im Schweiß und Obstruktionen der Pankreasausführungsgänge durch eingedicktes Sekret gefunden werden. Sharer *et al.* fanden bei ihrer Untersuchung von 134 Patienten auf 22 spezifische *CFTR*-Variationen bei 18 Patienten (13,4 %) ein verändertes *CFTR*-Allel (12x F508del, 2x R117H, je 1x, R553X, R560T, 621+1 G>T, Q493X, 14x 5T) (Sharer *et al.* 1998). Cohn *et al.* untersuchten 27 Patienten auf 17 spezifische *CFTR*-Variationen und das 5T-Allel. Sie fanden bei 37 % der Patienten mit idiopathischer CP zumindest ein verändertes *CFTR*-Allel (5x F508del, 2x R117H, 1x N1303K, 5x 5T) (Cohn *et al.* 1998). Obwohl auch kürzlich publizierte Studien die Bedeutung des *CFTR* bei CP bestätigten, ist der zugrunde liegende Pathomechanismus kaum verstanden (Castellani *et al.* 1999; Castellani *et al.* 2001; Noone *et al.* 2001; Audrézet *et al.* 2002; Weiss *et al.* 2005; Cohn *et al.* 2005). Freedman *et al.* postulierten, daß die pankreatische Dysfunktion durch einen erniedrigten duktalem pH-Wert zustande kommt (Freedman *et al.* 2000). Eine pH-Wert-Erniedrigung könnte zu einer veränderten Löslichkeit von Proteinen und einem veränderten intrazellulären Transport der Zymogengranula sowie zu einer verstärkten Autoaktivierung des Trypsinogens führen. Durch eine geringfügige Reduktion der *CFTR*-Funktion, wie sie im heterozygoten Zustand vorliegt, könnte eine erleichterte intrapankreatische Aktivierung von Verdauungsenzymen die Entstehung einer CP fördern. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, daß die Kombination von zwei milden bzw. einer milden und einer schweren *CFTR*-Variation die Empfänglichkeit für eine CP erhöht. Jedoch weisen viele der Patienten mit CP nur ein verändertes *CFTR*-Allel auf, so daß die erhöhte Empfänglichkeit für eine CP möglicherweise durch eine Kombination von Veränderungen im *CFTR*-, *PRSS1*-, *PRSS2*-, *SPINK1*-Gen und bisher nicht identifizierten weiteren Genen zustande kommt (Noone *et al.* 2001; Audrézet *et al.* 2002).

1.3.2 CFTR-, PRSS1- und SPINK1-Variationen bei CP

In kürzlich erschienen Studien untersuchten Noone *et al.* und Audrézet *et al.* die gesamten kodierenden Abschnitte des *CFTR*, *PRSS1* sowie des *SPINK1* bei Patienten mit idiopathischer CP. Beide Studien fanden bei 25-30 % der Patienten eine *CFTR*-Variation (ohne 5T-Allel). Zahlreiche Patienten waren gemischt heterozygot für *CFTR*-Variationen bzw. trans-heterozygot

für Variationen im *CFTR*-, *PRSS1*- und *SPINK1*-Gen (Noone *et al.* 2001; Audrézet *et al.* 2002). Auch Gomez *et al.* berichteten von CP-Patienten, die trans-heterozygot für Variationen im *CFTR*- und *SPINK1*-Gen waren (Gomez *et al.* 2003). Diese Studien verdeutlichen, daß der Kombination von genetischen Alterationen in verschiedenen Genen bei der Pathogenese der idiopathischen CP wahrscheinlich ein wesentlicher Stellenwert zukommt.

Die genetischen Studien der letzten Jahre haben das Verständnis der erblichen Pankreatitis, die lange Zeit als seltene Erkrankung galt, entscheidend verändert. Der Nachweis von *PRSS1*-, *SPINK1*- und *CFTR*-Mutationen bei Patienten mit sogenannter idiopathischer CP zeigt, daß erbliche Fälle der CP weitaus häufiger sind als früher vermutet. Diese Befunde stellen zugleich die Unterscheidung zwischen „hereditärer“ und „idiopathischer“ Pankreatitis in Frage. Die Assoziation von *SPINK1*-Mutationen mit tropischer (Bhatia *et al.* 2002) und alkoholischer CP (Witt *et al.* 2001) verwischt weiter die Grenzen zwischen den einzelnen Subtypen. In den nächsten Jahren wird sich wahrscheinlich zeigen, daß sehr komplexe Interaktionen zwischen Umwelteinflüssen und zahlreichen genetischen Faktoren mit fließenden Übergängen zwischen den einzelnen Entitäten bestehen (Abbildung 3).

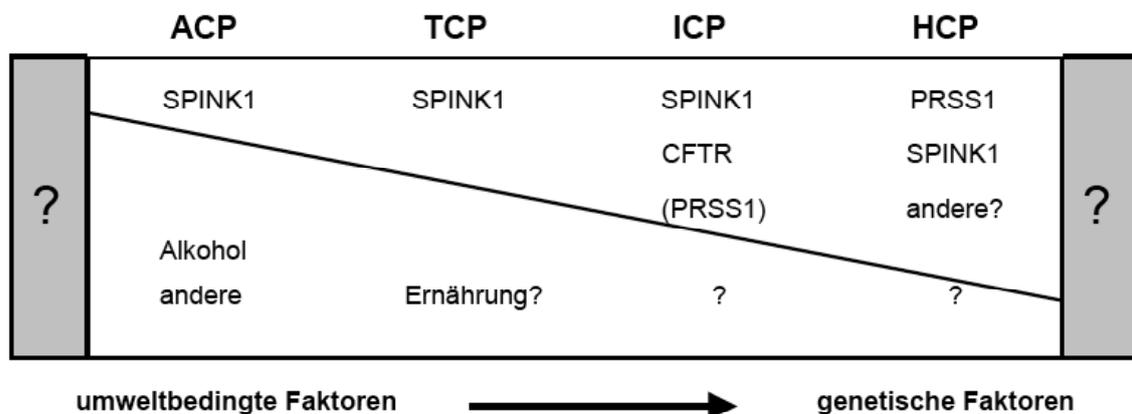


Abbildung 3: Schema der genetischen und umweltbedingten Einflüsse auf die Pathogenese der chronischen Pankreatitis (nach Witt 2003).

1.4 Methodische Aspekte

Um bei genetischen Analysen eine zuverlässige Aussage zu erhalten, müssen die angewandten Verfahren sowohl sensitiv als auch spezifisch sein. Die zum Einsatz kommenden Verfahren sollten einfach zu handhaben, kostengünstig und möglichst wenig zeitaufwendig sein, um einen hohen Probendurchsatz zu ermöglichen.

1.4.1 Schmelzkurvenanalyse mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Proben

Analytische „Test-Kits“ für *CFTR* detektieren überwiegend nur die häufigsten, bei zystischer Fibrose vorkommenden Mutationen. Ein schnelles und hochempfindliches, wie auch hochspezifisches Verfahren zu etablieren, mit dem auch die häufigsten bei CP vorkommenden *CFTR*-Varianten nachweisbar sind, war ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit.

Bei der Schmelzkurvenanalyse mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Proben werden eine mit LightCycler Red-markierte Akzeptor-Sonde (LC Red 640 oder 705) und eine Fluoreszein-markierte Donor-Sonde eingesetzt (Abbildung 4).

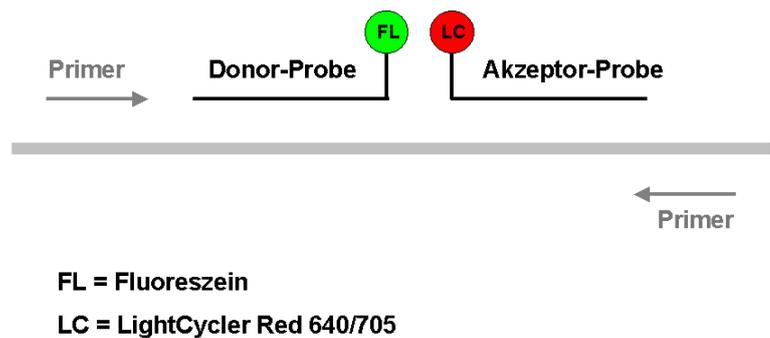


Abbildung 4: Prinzip der FRET-Sonden.

Nach Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Hybridisierung der Sonden bei niedriger Temperatur kommt es durch eine kontinuierliche Temperaturerhöhung zum Abschmelzen der Sonden und damit zu einer Abnahme der gemessenen Fluoreszenz. Je nach Basenabfolge der Sensor-Sonde (mutationsspezifisch oder wildtypspezifisch) schmilzt die Sonde bei Nachweis einer Mutation bei einer höheren oder niedrigeren Temperatur als der Wildtyp.

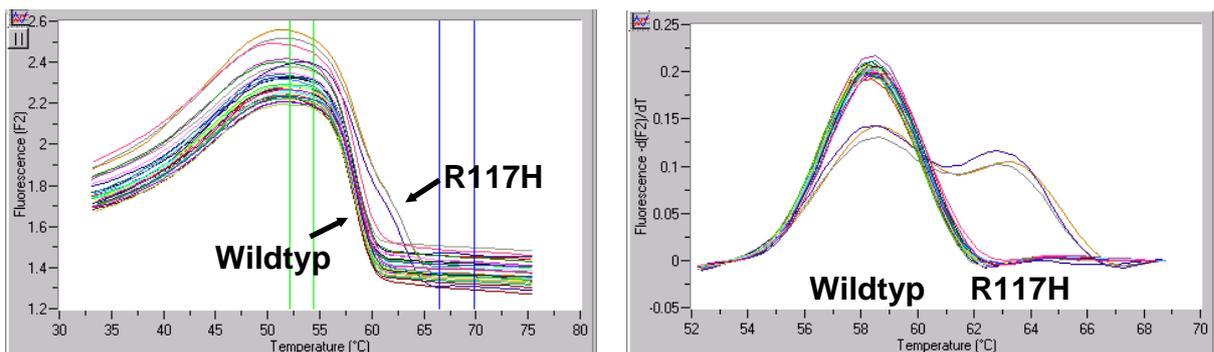


Abbildung 5: Schmelzkurven am Beispiel der *CFTR*-Variante R117H (Sonde mutationsspezifisch).

Bei einer einzelnen fehlerhaften Basenpaarung beträgt der Temperaturunterschied zwischen Wildtyp und Mutation typischerweise bei einer ca. 25 bp-langen FRET-Sensorsonde 0,5-3 °C (Ugozzoli *et al.* 2004; Johnson *et al.* 2004). Durch diesen teilweise geringen Temperaturunterschied wird der Einsatz von FRET-Sonden limitiert. Um eine bessere

Diskriminierung zu erreichen, ist der Einsatz von kürzeren FRET-Sonden möglich, der jedoch aufgrund einer notwendigen „Mindestschmelztemperatur“ begrenzt ist. In kürzlich veröffentlichten Arbeiten zeigte das gezielte Einbringen von „locked nucleic acids“ (LNA) innerhalb von FRET-Sonden eine verbesserte Möglichkeit der Diskriminierung.

1.4.2 Locked Nucleic Acids (LNA)

Der Einsatz von LNA ermöglicht eine bessere Duplex-Stabilität und somit eine bessere Diskriminierung von Basenfehlpaarungen („mismatch“). LNA, auch als „bridged nucleic acids“ (BNA) bezeichnet, stellen modifizierte Nukleotide dar, die zum ersten Mal 1998 beschrieben wurden (Singh *et al.* 1998; Obika *et al.* 1998).

LNA (2'-O,4'-C-Methylen- β -D-Ribofuranosyl-Nukleotid) enthalten eine modifizierte Ribose: Durch die Einführung eines Methylenrestes zwischen dem 2'-Sauerstoffatom und dem 4'-Kohlenstoffatom des Ribosemoleküls wird die Ribose in der N-Typ-Konformation (C3'-endo) gehalten („locked“), einer Struktur, die insbesondere bei A-DNA und RNA vorkommt (Singh *et al.* 1998; Koshkin *et al.* 1998) (Abbildung 6).

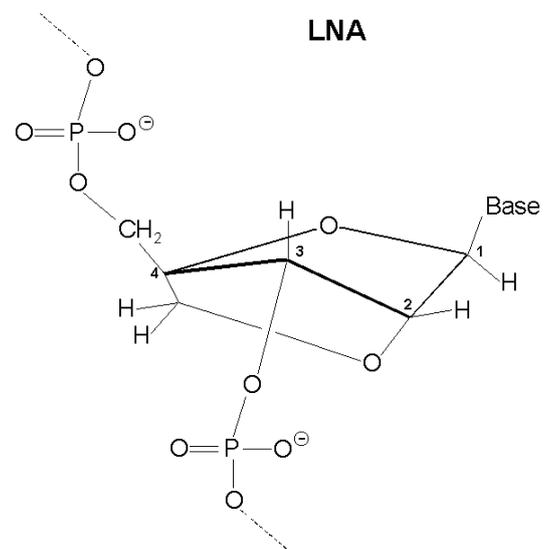


Abbildung 6: Struktur der LNA.

Diese Konformation verstärkt die Basenstapelung wie auch die Präorganisation des Phosphatrückgrates und bedingt somit eine höhere Affinität zu komplementärer DNA und RNA, was in einer erhöhten Schmelztemperatur resultiert. Die Erhöhung der Schmelztemperatur durch DNA-LNA-Verbindungen kann 1-3 °C pro LNA-Molekül betragen (Petersen *et al.* 2002). Hierbei ist es wichtig, die Lokalisation der LNA-Moleküle innerhalb der FRET-Sonden überlegt zu wählen, um einen größtmöglichen Unterschied bei der Diskriminierung zu erreichen. Die Positionierung eines LNA-Triplets im Bereich der zu detektierenden Veränderung zeigte die beste diskriminatorische Effektivität (You *et al.* 2006). Einen Ausnahmefall stellt eine G- zu T-Basenfehlpaarung dar, bei der sich durch den Einsatz von LNA im Bereich der Fehlpaarung und der flankierenden Nukleotide die Diskriminierung verschlechtern kann.

Weiterhin können Bereiche mit niedriger Schmelztemperatur besser untersucht werden. Theoretisch ließe sich durch LNA ebenso die Unterscheidung nahe beieinander lokalisierter Mutationen verbessern bzw. ermöglichen.

1.5 Fragestellung

Ziel unserer Studie war es, die Bedeutung von *CFTR*-, *SPINK1*- und *PRSSI*-Varianten bei Patienten mit idiopathischer oder hereditärer chronischer Pankreatitis zu untersuchen. Um zuverlässige Aussagen treffen zu können, sollte die Analyse mit einer deutlich größeren Fallzahl als in bisherigen publizierten Studien durchgeführt werden und auch eine große Anzahl von Kontrollpersonen einschließen.

Bei 128 Patienten analysierten wir das gesamte *CFTR*-Gen mittels SSCP-Analyse („single strand conformation polymorphism“), um auch „milde“ bzw. „seltene“ Variationen zu finden. Durch diese umfangreiche Analyse an einer ausgewählten Subgruppe wollten wir den Anteil an gemischt heterozygoten *CFTR*-Trägern möglichst vollständig aufdecken.

Darüber hinaus sollte durch Untersuchung von über 500 Patienten und über 500 Kontrollen auf 37 verschiedene *CFTR*-Varianten mittels Schmelzkurvenanalyse aufgezeigt werden, ob das Spektrum der gefunden Variationen dem der CF und/oder dem der CBAVD ähnelt. Um die Bedeutung einiger Variationen besser zu verstehen, untersuchten wir bei einzelnen Variationen über 1200 Kontrollen, da aufgrund mangelhafter Daten in der Literatur die Bedeutung einzelner Veränderungen unklar ist.

Zudem gingen wir der Frage nach, ob es sich bei Patienten mit *CFTR*-Variationen um eine atypische Form der CF oder um vorwiegend heterozygote Träger mit Veränderung einer *CFTR*-Unterfunktion handelt. Weiterhin untersuchten wir 211 Eltern von Patienten mit CP auf 36 *CFTR*-Varianten, um zu überprüfen, ob diese vermehrt auf die betroffenen Kinder übertragen werden oder nicht (transmission disequilibrium test; TDT).

Ebenfalls versuchten wir zu klären, ob eine Interaktion verschiedener Genloci vorhanden ist. Dafür wurden die beiden bereits mit CP assoziierten Gene *PRSSI* und *SPINK1* bei allen Patienten mittels direkter DNA-Sequenzierung analysiert.

Um eine ausreichend große Anzahl von Patienten und Kontrollpersonen untersuchen zu können, sollte eine Multiplex-Schmelzkurvenassay mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Sonden (FRET-Sonden) für 37 verschiedene *CFTR*-Varianten etabliert und validiert werden.

Zur verbesserten Diskriminierung komplexer Zielsequenzen, bei denen entweder AT-reiche Abschnitte bzw. wiederkehrende Sequenzmotive (Repeats) vorliegen, wie z.B. die *5T/7T/9T*-Allele bzw. das 9-13 TG-Repeat im Intron 8, oder bei denen mehrere bedeutsame *CFTR*-Alterationen nahe beieinander lokalisiert sind, wie im Fall der F508del-Region im Exon 10, sollten mit Hilfe von „locked nucleic acids“ (LNA) zuverlässige Schmelzkurvenassays entwickelt werden.