

# 1 Einleitung:

## 1.1 Chronische Pankreatitis

### 1.1.1 Allgemeine und klinische Aspekte

Die chronische Pankreatitis (CP) ist eine kontinuierliche oder rekurrende entzündliche Erkrankung des Pankreas, die durch irreversible morphologische Veränderungen charakterisiert ist und bei einem Teil der Patienten in einen permanenten Funktionsverlust mündet. Mit dieser Definition wird die chronische von der akuten Pankreatitis abgegrenzt, die ohne wesentliche morphologische Veränderung abheilt [Sarner *et al.* 1984, Sarles *et al.* 1989]. Die akuten Episoden sind durch eine ödematöse bis nekrotisierende Entzündungsreaktion gekennzeichnet. Morphologisch zeigt sich eine irreguläre Sklerose des Organs mit fokaler, segmentaler oder diffuser Destruktion des Parenchyms. Zusätzlich können Veränderungen des Gangsystems gefunden werden wie z.B. Strikturen, Dilatationen oder intraduktale Obstruktionen.

Nach einer subklinischen Phase variabler Dauer manifestiert sich die CP initial durch rezidivierende Oberbauchschmerzen, die oft von Nausea und Erbrechen begleitet sind. In 5% (alkoholisch bedingte chronische Pankreatitis, ACP) bis 54% („late onset“ idiopathische chronische Pankreatitis, ICP) der Fälle präsentiert sich die CP jedoch als schmerzlose Erkrankung [Ammann *et al.* 1987]. Im Verlauf der Erkrankung kann es zu einer exokrinen und/oder endokrinen Pankreasinsuffizienz mit konsekutiver Maldigestion, Gewichtsverlust und Insulinmangeldiabetes kommen. Weitere Komplikationen sind Pankreaspseudozysten, Milz- und Pfortaderthrombosen, Stenosen des Pankreasgangsystems oder des distalen Ductus choledochus mit Ikterus sowie als Spätkomplikation das Pankreaskarzinom.

Die Inzidenz der CP liegt in den Industrienationen bei 1-12/100.000/Jahr mit einer Bevorzugung des männlichen Geschlechts [Bornman *et al.* 2001, Lankisch *et al.* 2001, Tandon *et al.* 2002, Otsuki *et al.* 2003].

In Tabelle 1 sind im Überblick die häufigsten ätiologischen Risikofaktoren für eine akut rekurrende oder chronische Pankreatitis dargestellt.

Tabelle 1: Ätiologische Risikofaktoren (modifiziert nach Weizman *et al.* 1988)

Toxisch-metabolisch	Alkohol Hyperkalziämie Hypertriglyzeridämie chronische Niereninsuffizienz Medikamente
"Idiopathisch"	<i>SPINK1</i> -Mutationen <i>CFTR</i> -Mutationen ( <i>PRSS1</i> -Mutationen), andere ?
"Hereditär"	<i>PRSS1</i> -Mutationen ( <i>SPINK1</i> ), andere?
Autoimmun / Systemisch	Isolierte autoimmune Pankreatitis Autoimmunerkrankungen mit Beteiligung des Pankreas (Sjögren Syndrom, PSC, chronisch entzündliche Darmerkrankungen) Hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS)
Mechanisch / Strukturell	Anatomische Anomalien: Choledochuszysten, Pankreas divisum? Trauma Tumore Steine Parasiten
"Tropische" Pankreatitis	<i>SPINK1</i> -Mutationen Malnutrition? Dietätisch?

Im Folgenden sollen die alkoholische chronische Pankreatitis (ACP), die idiopathische chronische (ICP) bzw. hereditäre (HP) und die tropische kalzifizierende Pankreatitis (TCP) näher beschrieben werden.

Alkoholische chronische Pankreatitis: In industrialisierten Ländern sind etwa 70-80% der chronischen Pankreatitiden durch lang andauernden Alkoholabusus verursacht [Durbec *et al.* 1978, Ammann *et al.* 1987]. Trotz intensiver Bemühungen ist der Pathomechanismus nur unzureichend geklärt. Dies liegt im Wesentlichen daran, daß für die alkoholische chronische Pankreatitis (ACP) bisher keine Tiermodelle etabliert werden konnten. Zwar rufen Fettsäure-Ethylester, welche nicht-oxidative Produkte des Alkoholmetabolismus sind, in Rattenpankreatata Pankreatitis-ähnliche Veränderungen hervor [Werner *et al.* 1997, Criddle *et al.* 2006], jedoch löst Alkohol bei Nagetieren selbst bei Zufuhr großer Mengen keine chronische Pankreatitis aus [Schneider *et al.* 2002]. Es ist bisher auch ungeklärt, weshalb nur ein geringer Anteil der Alkoholiker im Laufe ihres Lebens an einer ACP erkranken. Möglicherweise spielen hier neben der Noxe Alkohol auch endogene Faktoren eine Rolle. So wurde beispielsweise bei Patienten mit einer ACP eine Häufung der N34S-Mutation im *SPINK1*-Gen gefunden [Witt *et al.* 2001].

Idiopathische und hereditäre CP: Obwohl in den Industrienationen die überwiegende Mehrheit der Patienten mit CP an einer ACP leiden, kann bei 10-30% der Betroffenen jedoch kein Risikofaktor gefunden werden [Ammann *et al.* 1987]. Wenn weder auslösende exogene Faktoren noch eine positive Familienanamnese bestehen, wird die Krankheit als idiopathische CP (ICP) klassifiziert. Bei Vorliegen einer entsprechenden Familienanamnese spricht man von hereditärer Pankreatitis. Da in den letzten Jahren Mutationen in mehreren Genen bei Patienten mit HP wie auch insbesondere bei Patienten mit ICP als Risikofaktoren identifiziert werden konnten, ist die Bezeichnung „idiopathisch“ oftmals nicht mehr im eigentlichen Sinne korrekt. So wurde in mehreren Studien eine starke Assoziation zwischen ICP und *SPINK1*-, *PRSS1*- und *CFTR*-Mutationen beschrieben. Eine Mutation in einem dieser drei Gene liegt in 30% [Audrézet *et al.* 2002] bis 62% [Noone *et al.* 2001] der Patienten mit ICP vor. Bei den verbleibenden Patienten mit ICP konnten keine Mutationen in den bisher bekannten Pankreatitis-assoziierten Genen gefunden werden. Weitere Studien werden zeigen, ob bei diesen Patienten Mutationen in bisher nicht identifizierten Genen vorliegen.

Tropische kalzifizierende Pankreatitis (TCP): Die TCP gilt als eigenständige Krankheitsentität, die nur in nicht industrialisierten, tropischen Ländern auftritt und

häufig zu progredientem Verlust der Betazellen des Pankreas mit konsekutiver Entwicklung eines insulinabhängigen Diabetes mellitus führt [Shaper *et al.* 1960, McMillan *et al.* 1979, Mohan *et al.* 1998]. Da die TCP hauptsächlich bei jungen Patienten auftritt, die keine der bekannten Risikofaktoren wie z.B. Alkoholabusus vorweisen, wurden lange Zeit ausschließlich regional bzw. geographisch determinierte Risikofaktoren angenommen. Zu nennen sind hier insbesondere die Protein-Energie-Mangelernährung [Shaper *et al.* 1960] und der Verzehr der Cassavawurzel, die toxische zyanogene Glykoside enthält [McMillan *et al.* 1979]. Dagegen spricht allerdings, daß die TCP auch in Gegenden vorgefunden wird, in denen Cassava nicht verzehrt wird und mitunter bei Patienten auftritt, bei denen aufgrund des gehobenen sozioökonomischen Status keine Protein-Energie-Mangelernährung anzunehmen ist. Zum anderen wurden familiäre Häufungen der TCP beschrieben, die eine genetische Basis vermuten lassen [Mohan *et al.* 1998]. Im Jahre 2002 berichteten vier Arbeitsgruppen über eine starke Assoziation zwischen der N34S-Mutation im *SPINK1*-Gen (s. unten) und der TCP [Chandak *et al.* 2002; Hassan *et al.* 2002; Bhatia *et al.* 2002; Schneider *et al.* 2002].

## **1.1.2 Chronische Pankreatitis und assoziierte Genmutationen**

### **1.1.2.1 Kationisches Trypsinogen (PRSS1)**

Trypsinogen wird im Darm durch die in der Bürstensaummembran lokalisierte Enteropeptidase (Enterokinase) zu Trypsin aktiviert. Durch Spaltung des Aktivierungspeptides, einer aus 8 Aminosäuren bestehenden N-terminalen Sequenz, wird inaktives Trypsinogen infolge einer Konformationsänderung zu aktivem Trypsin umgewandelt. Trypsin aktiviert seinerseits hydrolytisch alle weiteren Zymogene des Pankreassekrets wie auch sich selbst (autokatalytische Aktivierung) [Steer *et al.* 1987].

Es werden drei verschiedene Isoenzyme des Trypsinogens unterschieden, die nach ihren elektrophoretischen Eigenschaften in der isoelektrischen Fokussierung als kationisches Trypsinogen (PRSS1), anionisches Trypsinogen (PRSS2) und Mesotrypsinogen bezeichnet werden [Scheele *et al.* 1981]. Im Vergleich zu den anderen Isoenzymen, weist PRSS1 eine höhere Autoaktivierung und eine höhere Resistenz gegenüber Autolyse auf [Colomb *et al.* 1978, Colomb *et al.* 1979].

1996 wurde erstmals eine Punktmutation im *PRSS1*-Gen, bei der Arginin durch Histidin an Position 122 (R122H) ersetzt wird, bei HP beschrieben [Whitcomb *et al.* 1996].

R122H scheint weltweit die häufigste *PRSS1*-Mutation zu sein. In nachfolgenden Studien wurden zwei weitere Mutationen häufig gefunden: N29I [Gorry *et al.* 1997] sowie A16V [Witt *et al.* 1999]. Letztere Mutation wurde hauptsächlich bei Patienten mit ICP beobachtet.

Obwohl die genauen Pathomechanismen nicht vollständig geklärt sind, gilt es als akzeptiertes Modell, daß eine übermäßige intrapankreatische Trypsinaktivität zu Autodigestion und Inflammation des Pankreas führt. *in vitro*-Studien an rekombinanten Proteinen zeigten eine erhöhte Autoaktivierung der Trypsinogenvarianten I29 und H122. Zusätzlich weist H122-Trypsinogen eine geringere Autolyse auf [Sahin-Tóth *et al.* 2000]. V16-Trypsinogen zeigt im Vergleich zum Wildtyp-Protein jedoch keine erhöhte Autoaktivierung [Kiraly *et al.* 2006]. Eine kürzlich erschienene Publikation konnte jedoch 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 al.* 2006]. Zusammengefaßt scheinen jedoch die meisten *PRSS1*-Mutationen zu einer erhöhten intrapankreatischen Trypsinogen-Aktivierung und Trypsin-Stabilisierung zu führen.

#### **1.1.2.2 Serinproteaseinhibitor Kazal Typ 1 (SPINK1)**

Da eine beträchtliche Anzahl von HP-Patienten keine *PRSS1*-Mutation aufweisen [Witt *et al.* 1999], wurden Defekte in weiteren Pankreatitis-assoziierten Genen postuliert. Der Serinproteaseinhibitor Kazal Typ 1 (SPINK1), auch als pankreatischer sekretorischer Trypsininhibitor (PSTI) bekannt, ist eine potente Antiprotease und ein wichtiger intrapankreatischer Trypsin-Inaktivator [Bartelt *et al.* 1977]. SPINK1 wurde erstmals 1948 von Kazal *et al.* isoliert [Kazal *et al.* 1948]. SPINK1-vermittelte Trypsinogen-Inhibition ist jedoch nur temporär, da der Trypsin-SPINK1-Komplex selbst als Substrat für Trypsin dient, was eine Degradation von SPINK1 und damit die Wiederherstellung der ursprünglichen Trypsinaktivität bewirkt [Laskowski *et al.* 1953].

In einem Kandidatengenansatz fanden sich bei 96 pädiatrischen Patienten mit ICP oder HP in 18 Fällen eine *SPINK1*-Mutation (N34S). Außer N34S wurden in dieser Studie vier weitere *SPINK1*-Mutationen gefunden. In der Kontrollgruppe wurde N34S lediglich bei 1/279 Individuen nachgewiesen [Witt *et al.* 2000]. Weitere Studien, welche die Assoziation von *SPINK1* mit CP untersuchten, erbrachten ähnliche Ergebnisse [Pfützner *et al.* 2000, Noone *et al.* 2001, Audrézet *et al.* 2002].

Es wird gegenwärtig postuliert, daß *SPINK1*-Mutationen zu einem Funktionsverlust bzw. zu einer Funktionseinschränkung des Proteaseinhibitors führen und dadurch eine erhöhte intrapankreatische Trypsinaktivität bedingen. Ähnlich wie bei *PRSS1*-Mutationen resultiere daraus eine inadäquate Konversion pankreatischer Zymogene in ihre aktive Form innerhalb des Pankreasparenchyms mit konsekutiver Autodigestion und Inflammation des Organs.

### **1.1.2.3 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)**

Klinisch bestehen zwischen der zystischen Fibrose (CF) und der CP Parallelen: Beide Erkrankungen zeichnen sich durch mitunter abnormale Chloridkonzentrationen im Schweiß sowie durch duktale Obstruktion aus [Bank *et al.* 1978, Nakamura *et al.* 1972, DeAngelis *et al.* 1992]. Des Weiteren leiden einige CF-Patienten unter rezidivierenden Pankreatitisschüben [Shwachman *et al.* 1975].

1998 berichteten zwei Studien über eine Assoziation zwischen *CFTR*-Mutationen und CP [Sharer *et al.* 1998, Cohn *et al.* 1998]. Neuere Studien untersuchten die gesamte kodierende *CFTR*-Sequenz sowie *PRSS1* und *SPINK1* und fanden bei 25-30% der Patienten mindestens eine *CFTR*-Mutation (ohne 5T-Allel). Mehrere Patienten waren gemischt heterozygot für *CFTR*-Mutationen oder trans-heterozygot (*SPINK1*- und *CFTR*-Mutation), was die Bedeutung der Kombination von Mutationen in verschiedenen Genen hervorhebt [Noone *et al.* 2001, Audrézet *et al.* 2002].

### **1.1.2.4 Anionisches Trypsinogen (PRSS2)**

Während Pankreatitis-assoziierte Mutationen bisher nur im kationischen Trypsinogen und nicht in den übrigen Isoenzymen beschrieben sind, wurde in einer kürzlich publizierten Studie die genetische Variation G191R im anionischen Trypsinogen (*PRSS2*) untersucht, welche Träger dieser Veränderung vor einer Pankreatitis schützen [Witt *et al.* 2006]. An einem großen Kollektiv trat die Variation bei gesunden Kontrollen häufiger auf als bei Patienten mit CP. Zudem zeigte sich in den funktionellen Untersuchungen an rekombinantem Protein, daß die mutierte Form nach Aktivierung keine Enzymaktivität aufweist. Durch die Mutation entsteht eine neue proteolytische Spaltungsstelle, 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.

### 1.1.3 Krankheitsmodell der CP

Das Pankreas verfügt über mehrere Schutzmechanismen, die es vor Autodigestion und Inflammation schützen. Hierzu gehören die Synthese und Sekretion der Verdauungsenzyme als inaktive Proenzyme, die Lokalisation der aktivierenden Enteropeptidase außerhalb des Pankreas sowie eine niedrige Kalziumkonzentration und ein hoher pH des Pankreassekretes. Auch im normalen Pankreas werden geringe Mengen an Trypsinogen innerhalb des Parenchyms zu aktivem Trypsin hydrolysiert. Diese Trypsinaktivität wird jedoch durch SPINK1 und trypsinähnliche Enzyme wie Mesotrypsin blockiert. Die Identifizierung genetischer Defekte im *PRSS1*- und *SPINK1*-Gen führte zur Hypothese, daß die Pankreatitis das Ergebnis eines Ungleichgewichtes von Proteasen und ihren Inhibitoren innerhalb des Pankreasparenchyms sei mit dem Ergebnis einer inadäquaten Enzymaktivierung innerhalb des Pankreas (Abbildung 1).

Es wird vermutet, daß die pankreatische Dysfunktion bei CF das Ergebnis einer pH-Erniedrigung im duktilären und azinären System ist [Freedman *et al.* 2000]. Folge dieser pH-Erniedrigung könnte ein defektes Ausschleusen der Zymogengranula oder eine vermehrte Trypsinogen-Autoaktivierung sein. Sowohl Autoaktivierung als auch Degradierung des Trypsinogens ist stark pH-abhängig [Lerch *et al.* 2000]. Unter alkalischen Bedingungen läßt sich nur eine geringe Autoaktivierung beobachten, während die Hydrolyse ein Maximum besitzt. Mit sinkendem pH nimmt die Proteolyse ab, während die Neigung zur Autoaktivierung steigt. Es wird diskutiert, daß die Disposition zur Pankreatitis bei heterozygoten *CFTR*-Trägern Folge einer unterschwellig reduzierten *CFTR*-Funktion ist, aus der eine erleichterte Trypsinogenaktivierung resultiert.

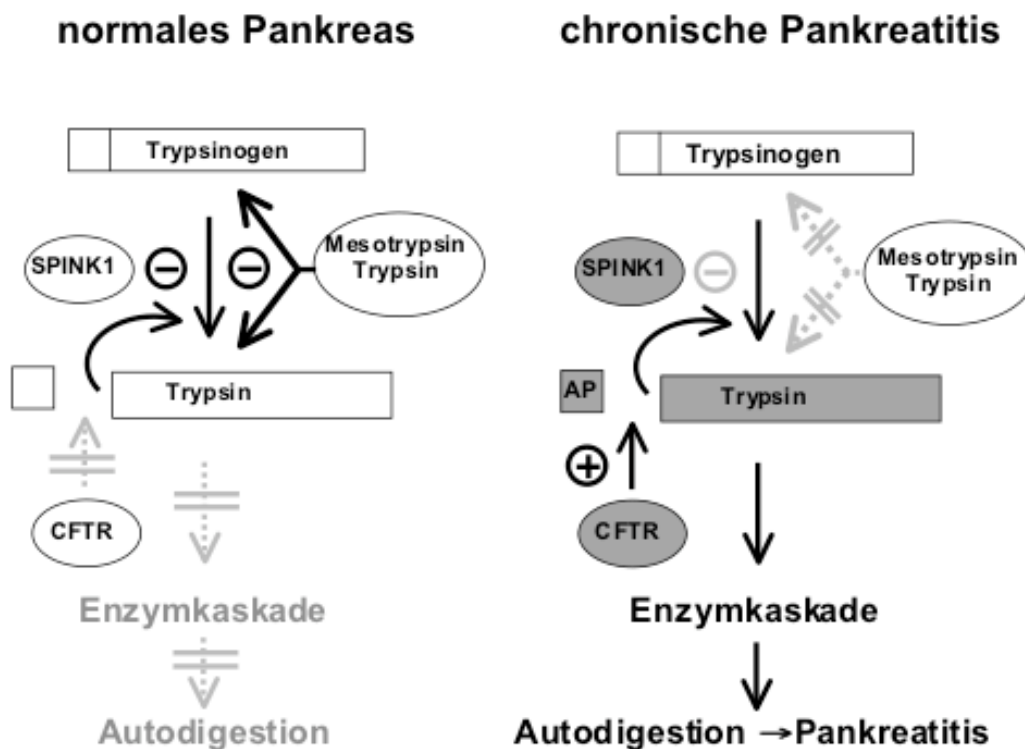


Abbildung 1: Modell der genetisch bedingten Pankreatitis [nach Witt 2003]. Die hervorgehobenen Textfelder markieren mutierte Gene; AP, Aktivierungspeptid.

Die genetischen Studien der letzten Jahre haben das Verständnis der erblichen Pankreatitis, die lange Zeit als seltene Erkrankung galt, entscheidend verändert. Der Nachweis von *PRRS1*-, *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 bestehen mit fließenden Übergängen zwischen den einzelnen Entitäten (Abbildung 2).



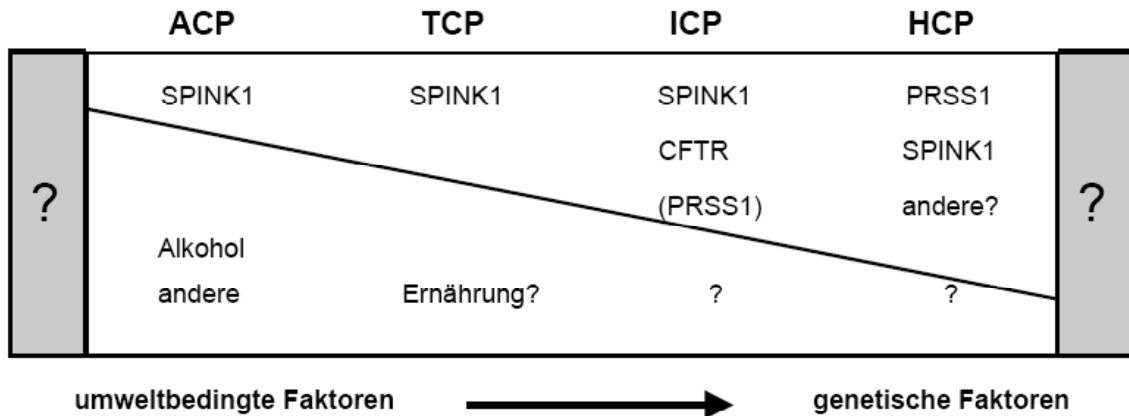


Abbildung 2: Schema der genetischen und umweltbedingten Einflüsse auf die Pathogenese der CP [nach Witt 2003].

## 1.2 Pankreaskarzinom

### 1.2.1 Allgemeine und klinische Aspekte

Das Pankreaskarzinom (PCa) ist eine der aggressivsten Neoplasien und zeichnet sich durch sehr schnelles Wachstum, frühe Metastasierung, hohe Therapieresistenz und eine schlechte Prognose aus. Der Tumor ist meist im Pankreaskopf lokalisiert (70%) und geht in 80-90% vom Gangepithel (duktales Adenokarzinom), gelegentlich auch von den Azinuszellen aus. Seltene histologische Sonderformen sind das muzinöse Adenokarzinom, das Siegelringkarzinom, das adenosquamöse Adenokarzinom sowie das pleomorph-riesenzellige Karzinom. Eine topographische Sonderform stellt das Papillenkarzinom dar, das durch einen früheren klinischen Beginn der Symptomatik und eine bessere Prognose gekennzeichnet ist.

Diagnostische Schwierigkeiten bereitet die häufig späte und uncharakteristische klinische Symptomatik. Das PCa präsentiert sich oft ähnlich wie eine CP mit Appetitverlust, unspezifischen Oberbauchschmerzen, Übelkeit und Gewichtsverlust. Bei tumorbedingtem Verschluss des Ductus choledochus kann es zusätzlich zu einem Ikterus kommen.

Obwohl das PCa beispielsweise in den USA nur 2% aller Malignome ausmacht, ist es mit 5% aller Krebstodesfälle die vierthäufigste Todesursache unter den Neoplasien. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit aller Pankreaskarzinome in den USA beträgt 4% [Jemal *et al.* 2002].

Wichtige Risikofaktoren für das PCa sind Nikotinabusus sowie eine positive Familienanamnese mit mindestens einem betroffenen Verwandten ersten Grades. Ebenfalls sind ein Diabetes mellitus, eine CP [Malka *et al.* 2002] sowie eine Adipositas mit dem PCa assoziiert [Simon *et al.* 2001, Silverman *et al.* 2001]. Die genauen Mechanismen wie diese Risikofaktoren letztlich zu einer Regulationsstörung des Zellzyklus und unkontrollierter Proliferation führen sind unbekannt.

### **1.2.2 Genetische Veränderungen:**

Genetischen Studien trugen wesentlich zu einem besseren Verständnis der Pathogenese des PCa bei. Durch die Kombination aus morphologischen und genetischen Beobachtungen von Pankreaskarzinomzellen und deren Vorläufern konnte ein Modell der Tumorprogression entwickelt werden [Hruban *et al.* 2000], ähnlich wie dies schon seit längerem für das kolorektale Karzinom existiert. Die schrittweise Anreicherung von Mutationen im Proto-Onkogen *KRAS2* sowie in den Tumorsuppressoren *CDKN2A*, *TP53* und *MADH4* führen zu tiefgreifenden Regulationsstörungen des Zellzyklus. *KRAS2*-, *CDKN2A*-, *TP53*- und *MADH4*-Mutationen sind häufig, wohingegen Mutationen des Tumorsuppressors *BRCA2*, der mismatch repair-Gene sowie der Serin-Threonin-Kinase *AKT2* und *LKB1/STK11* seltene Ereignisse sind [Schneider *et al.* 2003]. Im Gegensatz zu den genetischen Veränderungen, die typischerweise bei CP auftreten, finden sich beim PCa meistens somatische und nur selten Keimbahnmutationen.

### **1.2.3 KRAS2**

Unter den menschlichen Tumoren hat das Pankreaskarzinom die höchste Inzidenz von *KRAS2*-Mutationen [Almoguera *et al.* 1988]. Mutationen im Kodon 12 erreichen eine Frequenz von 20 bis 100% und treten in frühen Stadien der Tumorprogression auf [Caldas *et al.* 1995, Terhune *et al.* 1998]. Die *KRAS2*-Mutationen führen zu einem Funktionsgewinn dieses GTP-bindenden zytoplasmatischen Proteins, was zu einem Verbleib desselben im aktivierten Zustand führt [Shields *et al.* 2000].

*KRAS2*-Mutationen sind allerdings nicht malignitätsspezifisch und das Risiko zu maligner Transformation ist in Abwesenheit zusätzlicher genetischer Veränderungen gering [Tada *et al.* 1993, Tada *et al.* 1996, Yanagisawa *et al.* 1993, Moskaluk *et al.* 1997].

#### **1.2.3.1 CDKN2A (INK4A)**

Eine homozygote Deletion des *CDKN2A*-Genorts findet sich in 80% - 95% der PCa-Fälle und tritt gewöhnlich erst in den späteren Stadien auf [Wilentz *et al.* 1998, Rozenblum *et al.* 1997]. Dieser Genort auf Chromosom 9q21 kodiert die zwei verwandte Tumorsuppressoren, *CDKN2A* und *ARF*, deren Gensequenz teilweise überlappt. Die zwei Proteine werden durch ein unterschiedliches erstes Exon und einen verschiedenartigen Leserahmen in Exon 2 generiert. Mutationen dieses Genorts betreffen oft nur *CDKN2A*, und selten *ARF* alleine [Rozenblum *et al.* 1997, Lal *et al.* 2000]. Die seltenen Fälle von *CDKN2A*-Keimbahnmutationen in Exon 1 sind assoziiert mit dem malignen Molensyndrom [Gruis *et al.* 1995]. Diese Mutationen prädisponieren auch zu Pankreaskarzinomen, die allerdings im Gegensatz zu den Melanomen erst spät auftreten und nur eine geringe Penetranz zeigen [Goldstein *et al.* 1995].

#### **1.2.3.2 TP53**

Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* treten in über 50% der PCa-Fälle auf und sind oft von einem Verlust des Wildtypallels begleitet. Sie finden sich erst spät im Verlauf der Tumorprogression [Rozenblum *et al.* 1997, Lal *et al.* 2000]. Der Transkriptionsfaktor p53 wird durch extrazellulären Streß aktiviert bzw. stabilisiert und kann Zelltransformationen unterdrücken, die durch Onkogenaktivierung oder Verlust von Tumorsuppressoren ausgelöst werden. Aktivierung von p53 kann ein Innehalten des Zellzyklus oder Apoptose induzieren [Levine 1997]. *TP53*-Keimbahnmutationen wurden beim Li-Fraumeni-Syndrom beschrieben, das zu verschiedenen Neoplasien prädisponiert, wobei Pankreaskarzinome jedoch selten sind [Strong *et al.* 1987, Li *et al.* 1988].

#### **1.2.3.3 MADH4 (SMAD4, DPC4)**

Der Transkriptionsfaktor MADH4 ist ein wichtiger Regulator des „Transforming Growth Factor  $\beta$ “ (TGF- $\beta$ )-Signaltransduktionsweges [Hahn *et al.* 1996] und ist in 50% der Pankreaskarzinome mutiert. Dies tritt erst spät im Verlauf der Tumorprogression auf

[Wilentz *et al.* 2000]. Die bekannteste biologische Wirkung von TGF- $\beta$  ist dessen Inhibition des Zellwachstums, die durch einen Verbleib des Zellzyklus im Stadium G1 vermittelt wird.

#### **1.2.3.4 Weitere Gene**

Zu den Mutationen, die nur selten bei Pankreaskarzinomen gefunden werden, gehören die Mutationen im *BRCA2* [Goggins *et al.* 2000], der Serin-Threonin-Kinase *LKB1/STK11* (Peutz-Jegher-Syndrom) [Su *et al.* 1999], der Serin-Threonin-Kinase *AKT2* [Cheng *et al.* 1996] sowie in den DNA mismatch repair Genen *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* (Lynch-Syndrom) [Aarnio *et al.* 1995].

### **1.3 Proteine des Zytoskeletts**

Um zu erläutern, weswegen in dieser Studie der Zusammenhang zwischen Variationen im Keratin 8 (*KRT8*)-Gen und Pankreaserkrankungen untersucht wurde, soll an dieser Stelle ein Überblick über die Proteine des Zytoskeletts und eine etwas nähere Betrachtung der Zytokeratine folgen.

Die Bezeichnung Zytoskelett stammt aus dem Griechischen und setzt sich aus „zyto“ von „kutos“ („hohles Gefäß“) und „skeletos“ („ausgedörrt“) zusammen. Beim Zytoskelett handelt es sich somit um die faserigen Elemente der Zelle, die verbleiben, wenn die Organellen und das Zytosol entfernt werden.

Das Zytoskelett erfüllt primär mechanische Funktionen. Es sorgt für die Aufrechterhaltung der äußeren Zellform und bietet mechanischen Widerstand. Zusätzlich zu dieser Strukturfunktion sind einzelne Bestandteile jedoch auch an der Regulation der Zellteilung, der Zellstressverarbeitung, des Transportes von Vesikeln und der Zellmotilität beteiligt [Ku *et al.* 1999].

Die zytoskelettalen Proteine lassen sich nach ihrem Durchmesser in drei Klassen einteilen: Mikrofilamente (MF), ca. 6nm, Intermediärfilamente (IF), ca. 10nm, und Mikrotubuli (MT), ca. 23nm [Fuchs *et al.* 1994].

### 1.3.1 Intermediärfilamente: Struktur und biochemische Eigenschaften

Intermediärfilamente können aufgrund ihrer Struktur in fünf Gruppen unterteilt werden (I-V). Die größte Subgruppe sind die Keratine, die in Epithelzellen zu finden sind und sich in Typ I und Typ II unterteilen lassen. Zu den Typ I-Keratinen gehören die „harten“ Haarkeratine Ha1-Ha8 sowie die „weichen“ epithelialen Keratine K9-20. Die Gruppe der Typ II-Keratine setzt sich aus den „harten“ Haarkeratinen Hb1-Hb6 und den „weichen“ epithelialen Keratinen K1-8 zusammen. Desmin, saures fibrilläres Gliaprotein (GFAP), Vimentin und Peripherin bilden die Gruppe der Typ III-IF, Neurofilament Tripletproteine L/M/H, Syncoilin, Nestin, Synemin, Paranemin und  $\alpha$ -Internexin die Typ IV-IF und die Lamine A-C die Typ V-IF [Übersicht in Fuchs *et al.* 1994].

Obwohl über 50 verschiedene IF existieren, haben alle eine gemeinsame Struktur. Die Proteinmonomere der IF sind lange Fasermoleküle mit einer stabförmigen mittleren und jeweils einer globulären N- und C-terminalen Domäne. Die zentrale Domäne besteht aus einer  $\alpha$ -Helix mit langen Tandemwiederholungen, die als Heptaden-Wiederholung bezeichnet werden. Dieses Motiv ermöglicht die Bildung von heterogenen (z.B. im Falle der Keratine) oder homogenen (Vimentin, Desmin) Doppelwendel-Dimeren aus zwei parallel verlaufenden  $\alpha$ -Helices. Zwei antiparallele Dimere bilden ein Protofilament, zwei Protofilamente schließen sich wiederum als Dimer zu einer Protofibrille zusammen. Drei bis vier Protofibrillen setzen sich dann zu einem unpolarem IF zusammen. Die Basiseinheit der IF vom Keratintyp ist ein Tetramer, bestehend aus 2 Typ I- und 2 Typ II-Keratinen, die obligat nonkovalent miteinander verbunden sind. Die Doppelwendel-Dimere können sich wiederum in der Längsachse zu langen Ketten formieren, wobei sich die globulären Domänen aneinander lagern. Während die mittlere, stabförmige Domäne in allen IF eine ähnliche Struktur hat, variieren die globulären N- und C-terminalen Domänen dagegen in Größe und Aminosäuresequenz zum Teil beträchtlich; sie ragen oft aus der Oberfläche des Filaments heraus und vermitteln Wechselwirkungen mit anderen Zellbestandteilen [Fuchs *et al.* 1994/1998, Ku *et al.* 1999, Strelkov *et al.* 2003]

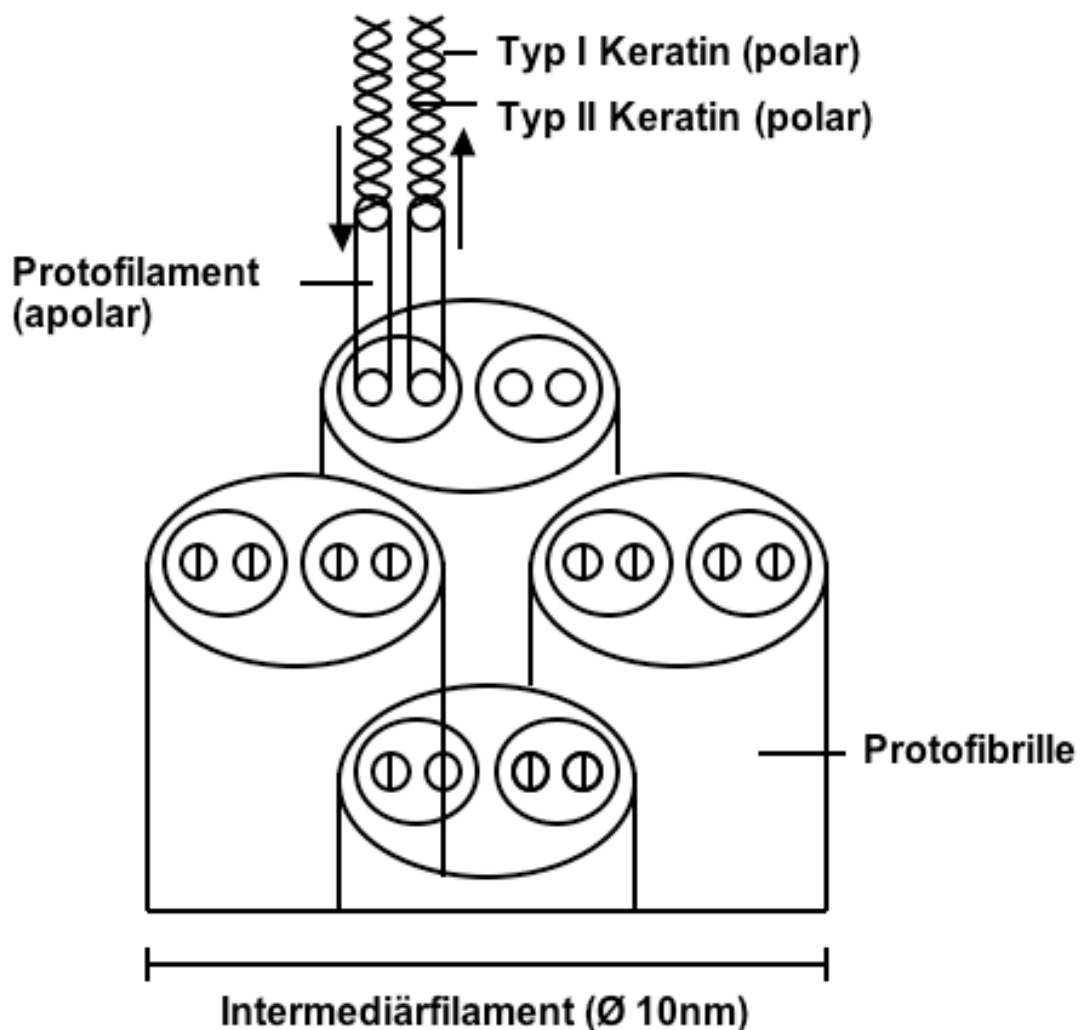


Abbildung 3: Aufbau von Intermediärfilamenten [nach Fuchs 1998]

### 1.3.2 Funktion zytoskelettaler Proteine

Alle zytoskelettalen Proteine erfüllen im wesentlichen 3 Funktionen: Gerüst-, Bewegungs- und Transportfunktion. Allerdings mehren sich die Hinweise, daß diese Proteine zusätzlich in die intra- und interzelluläre Signaltransduktion involviert sind.

Besonders hervorzuheben ist die Bedeutung der IF für die mechanische Zellstabilität. Während MF und MT nur geringen Belastungen standhalten, können IF aufgrund ihrer viskoelastischen und strukturellen Eigenschaften auch großen mechanischen Beanspruchungen widerstehen ohne zu rupturieren [Maniotis *et al.* 1997]. Während MT fast starr sind und MF nur semiflexibel, erweisen sich IF als flexibel

[Janmey *et al.* 1998], so daß sie bei Einwirkung von Scherkräften nachgeben, um dann ihre ursprüngliche Form wiederherzustellen [Ma *et al.* 1999].

Für die Signalfunktion von IF sind posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Glykosylierung und Transglutaminierung entscheidend. Keratine sind äußerst dynamische Proteine, die sich in Reaktion auf verschiedenste Stimuli umstrukturieren. Tierversuche zeigten, daß verschiedene Formen des Zellstress mit einer Hyperphosphorylierung von KRT8/18 einhergehen [Liao *et al.* 1997, Ku *et al.* 1996]. Die Phosphorylierung von KRT8/18 reguliert die Filamentreorganisation, erhöht die Keratinlöslichkeit und beeinflusst die Lokalisation von KRT8/18 innerhalb bestimmter Zellkompartimente [Ku *et al.* 1996, Liao *et al.* 1997]. Die genauen Mechanismen wie diese chemischen und strukturellen Veränderungen zur Regulation von Zellstreß und Mitose beitragen sind allerdings noch ungeklärt. Als sicher kann jedoch gelten, daß IF keine reine Strukturfunktionen, sondern auch wichtige Signalfunktionen übernehmen.

### **1.3.3 IF und deren Assoziation mit Erkrankungen**

Einige Erkrankungen konnten bereits auf Störungen der IF zurückgeführt werden, darunter blasenbildende Dermatosen [Irvine *et al.* 1999], Kardiomyopathien [Hutchinson *et al.* 2001], die orale Leukokeratose [Irvine *et al.* 1999] und eine Form der amyotrophen Lateralsklerose [Al-Chalabi *et al.* 2000]. Die mit IF in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes werden gesondert in Abschnitt 4 besprochen.

## **1.4 Zytokeratine**

Einzelne Gewebe exprimieren nur bestimmte, gewebstypische Zytokeratine, was in einigen Fällen auch zur histologischen Gewebetypisierung herangezogen wird. Epitheliale Zellen des Verdauungstraktes können mehrere verschiedene Kombinationen von Typ I- und II-Keratinen exprimieren, haben jedoch typischerweise ein dominierendes Keratinpaar mit mehreren variablen Anteilen anderer Keratine.

In den Azinuszellen des menschlichen Pankreas wird fast ausschließlich KRT8 und KRT18 exprimiert; in den dukталen Zellen finden sich zusätzlich die Keratine 7 und 19 [Ku *et al.* 1999].

#### 1.4.1 Zytokeratine und Tiermodelle

*Krt8*- oder *Krt18*-knockout-Mäuse weisen verschiedene gastrointestinale Störungen auf. *Krt8*-defiziente Mäuse zeigen hepatische Hämorrhagien während der Embryonalphase, Wachstumsretardierung und eine hohe intrauterine Letalität [Baribault *et al.* 1993]. *Krt8*-defiziente FVB/N-Mäuse leiden an kolorektaler Hyperplasie und an einer Kolitis mit Befall der Mukosa und Submukosa [Baribault *et al.* 1994]. *Krt8*-defiziente Mäuse besitzen eine erhöhte hepatozelluläre Fragilität im Vergleich zu Wildtyp-Tieren [Loranger *et al.* 1997]. In einer weiteren Studie zeigten *Krt8*-Null-Mäuse nach Gabe von Mycrocystein-LR, einem leberspezifischen Inhibitor der Proteinphosphatase Typ 1 und Typ 2A, zentrilobuläre intrahepatische Blutungen und eine deutliche Vakuolenbildung der periportalen Hepatozyten [Toivola *et al.* 1998]. Auch entwickelten *Krt8*-defiziente Mäuse nach Gabe von Griseofulvin oder 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidin (DDC) einen progressiven Leberschaden und gehäuft eine Porphyrie [Zatloukal *et al.* 2000].

Transgene Mäuse, die humanes *KRT8* überexprimieren, zeigten histologische Veränderungen des Pankreas, die dem Bild einer CP ähneln: Mononukleäre Infiltrate, interstitielle Fibrose, Komplexformation von Tubuli, Dysplasie der Azinuszellen und Apoptose. Im weiteren entwickelten die Tiere eine exokrine Pankreasinsuffizienz [Casanova *et al.* 1999].

#### 1.4.2 Zytokeratin-Mutationen und Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes

Aufgrund der oben erwähnten Tiermodelle und der Tatsache, daß sowohl die Leber als auch das azinäre Pankreas fast ausschließlich *KRT8* und *KRT18* exprimieren, könnten *KRT8*- oder *KRT18*-Mutationen mögliche genetische Risikofaktoren für die Entwicklung von Erkrankungen dieser beiden Organe sein.

In einer Studie an humanen Leberexplantaten von Patienten mit Leberzirrhose wurden in 6 von 68 Patienten (8,8%) mit kryptogener Zirrhose *KRT8*- oder *KRT18*-Mutationen gefunden, wohingegen nur 11 von 399 Patienten (2,8%) mit nicht kryptogener Zirrhose Mutationen aufwiesen ( $P < 0,03$ ) [Ku *et al.* 2001, Ku *et al.* 2003]. Am häufigsten wurden folgende Mutationen gefunden: G62C (6 Patienten) und Y54H (5 Patienten) im *KRT8*-Gen sowie H127L (2 Patienten) im *KRT18*-Gen. Da die Mutationen auch in leukozytärer DNA nachweisbar waren, sind diese nicht als somatische



Mutationen in Reaktion auf eine vorbestehende Lebererkrankung, sondern als prädisponierende Keimbahnmutationen zu werten.

Auch im Dünn- und Dickdarm wird Keratin 8 exprimiert und scheint eine wichtige Rolle zu spielen: Mäuse mit *Krt8*-knockout erkrankten spontan an einer Kolitis [Baribault *et al.* 1994]. Eine Studie, in der die Häufigkeit der *KRT8*-Variationen G62C und Y54H in Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untersucht wurde, konnte jedoch keine Assoziation dieser Allele mit Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn feststellen [Büning *et al.* 2004].

In einer anderen Studie wurden 67 Patienten mit CP unterschiedlicher Ätiologie auf die *KRT8*-Mutationen Y54H und G62C untersucht. Dabei fand 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 gefunden. Angesichts dieser Ergebnisse kann eine Assoziation von G62C mit CP vermutet werden. Bei dieser Studie wurden jedoch nur 67 Patienten untersucht, die zudem verschiedene ätiologische Faktoren aufwiesen. Nur 30% der dort untersuchten Patienten hatten eine ICP. Auch die Kontrollgruppe war mit 100 gesunden Personen gering gewählt.

Die meisten Keratinerkrankungen werden autosomal-dominant und mit nahezu vollständiger Penetranz vererbt [Ku *et al.* 2003]. Anders als die Erkrankungen außerhalb des Verdauungstraktes, scheinen die hier beschriebenen gastrointestinalen Erkrankungen lediglich mit Keratinmutationen assoziiert zu sein. Dies bedeutet, daß die Mutationen nicht als alleinige Auslöser der Erkrankung angesehen werden können, sondern als prädisponierende Faktoren, die erst bei Hinzukommen weiterer Faktoren wie z.B. exogener Noxen zur Erkrankung führen.

## 1.5 Fragestellung

Die chronische Pankreatitis wie auch das Pankreaskarzinom sind multifaktorielle Erkrankungen, die mindestens teilweise einen genetischen Hintergrund aufweisen.

Obwohl mehrere Gene identifiziert werden konnten, die an der Pathogenese der chronischen Pankreatitis beteiligt sind, lassen die aus der Literatur verfügbaren Daten vermuten, daß weitere genetische Risikofaktoren existieren.

Transgene Mäuse, die humanes Keratin 8 (*KRT8*) überexprimieren, zeigten histologische Zeichen einer chronischen Pankreatitis sowie Dysplasien des Pankreasgewebes. Zudem entwickelten die Tiere eine exokrine Pankreasinsuffizienz.

Die bekannten Charakteristika von *KRT8* als Regulator des Zellstress und der Zellteilung lassen vermuten, daß Veränderungen in diesem Gen zu Inflammation und/oder neoplastischer Transformation des Pankreas disponieren könnten.

In einer vor kurzem publizierten Studie wurde eine Assoziation zwischen chronischer Pankreatitis unterschiedlicher Ätiologie mit *KRT8*-Mutationen beschrieben.

In der vorliegenden Studie sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit die *KRT8*-Mutationen Y54H und G62C genetische Risikofaktoren für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis oder eines Pankreaskarzinoms darstellen.

Hierfür wurde bei einem großen, multiethnischen Patienten- und Kontrollkollektiv das Exon1 des *KRT8*-Gens mittels PCR amplifiziert und auf das Vorliegen der Y54H und der G62C-Variation mittels Schmelzkurvenanalyse und FRET-Proben (FRET: fluorescence resonance energy transfer) am LightCycler analysiert.