Molekulare Mechanismen von Pankreaserkrankungen

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dr. Johann Ockenga

geboren am 18.05.1964 in Spetzerfehn

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek
Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

eingereicht: Dezember 2002
Datum des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrags: 17.07.2003

Gutachter:
1. Prof. Dr. J. Schölmerich
2. Prof. Dr. P. Malfertheiner

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG **1**

Historischer Rückblick **1**

Epidemiologie von Pankreaserkrankungen **2**

Risiokofaktoren **3**

EIGENE ARBEITEN **5**

Untersuchungen zur zellulären Immunantwort bei Patienten mit chronischer Pankreatitis **7**

Mutation des kationischen Trypsionogen (D22G, K23R): Reduzierte Trypsin Aktivierung durch veränderte Aktivierungspeptide. **7**

Mutationen des CFTR Gen aber nicht des kationischen Trypsinogen Gens sind assoziiert mit idiopathischer oder rezidivierender Pankreatitis. **8**

Niedrige Prävalenz von Mutationen des Serine Proteinase Inhibitor Kazal Type I (SPINK1) Gen bei adulten Patienten mit idiopathischer Pankreatitis. **9**

Genetische Risikofaktoren bei chronischer Pankreatitis **10**

Polymorphismen der UDP-Glukuronosyltransferase UGT1A7 als Risikofaktor der chronischen Pankreatitis und des Pankreaskarzinomes. **10**

Rolle von Polymorphismen der Karzinogen entgiftenden UDP-Glukuronosyl-transferase UGT1A7 bei Tumoren des proximalen Verdauungstraktes. **11**

Effekt einer mit Glutamin angereicherten parenteralen Ernährung bei Patienten mit akuter Pankreatitis. **11**

DISKUSSION **13**

Pathophysiologie der Pankreatitis **13**

Aetiologie der Pankreatitis **16**

Immunologische Veränderungen **17**

Genetische Prädisposition einer Pankreatitis **20**

Hereditäre Pankreatitis 20

Mutationen des Trypsinogeninhibitors (SPINK1) 23

Mutationen des CFTR (Cystic Fibrosis Transmebrane Conductance Regulator) Gen 25

Gen – Umwelt Interaktionen als Risikofaktoren für Pankreaserkrankungen 31

Zusammenfassung **38**

Anhang **49**

Ergebnisse der internationalen Konsensus Konferenz zur genetischen Untersuchung bei hereditärer Pankreatitis: Leitlinien zur Indikation und Beratung sowie zu den Aspekten der Privatsphäre. 49

Ergebnisse der internationalen Konsensus Konferenz zum Pankreaskarzinom bei Patienten mit hereditärer Pankreatitis: Leitlinien zu Prävention, Screening und Behandlung. 50

Danksagung 51

Abstrakt:

Die Ätiologie von entzündlichen Pankreaserkrankungen, insbesondere bei den idiopathischen Pankreatitiden, ist weitgehend noch nicht verstanden. In der folgenden Arbeit sollen immunologische und molekularbiologische Aspekte zu Pankreaserkrankungen unter Berücksichtigung eigener Untersuchungen dargestellt werden. Zu Beginn unserer Arbeit haben wir untersucht inwieweit immunologische Veränderungen an der Entstehung einer chronischen Pankreatitis beteiligt sind. Wir fanden eine systemische Aktivierung des zellulären Immunsystems, ohne dass sich Unterschiede zwischen idiopathischer und alkoholtoxischer Pankreatitis ergaben. Im folgenden haben wir uns mit dem molekularbiologischen Hintergrund von entzündlichen und malignen Pankreaserkrankungen beschäftigt. Eine genetische Modellerkrankung ist die hereditäre Pankreatitis, deren genetische Ursache 1996 mit der Entdeckung zweier Mutationen im kationischen Trypsinogen entschlüsselt wurde. Mit der Identifizierung einer neuen Mutation im kationischen Trypsinogen und deren funktionellen Charakterisierung konnten wir hier zum weiteren Verständnis dieser Erkrankung beitragen. Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit dem genetischen Hintergrund bei Patienten mit idiopathischer Pankreatitis. Bei etwa 30% dieser Patienten fanden wir ein abnormales Allel im Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gen und bei einzelnen Patienten einen Polymorphismus im Serine Proteasen Inhibitor (SPINK1) Gen. Das zunehmende Wissen um genetische Veränderungen und deren Folgen setzt auch eine kritische Auseinandersetzung mit ethischen und rechtlichen Fragen voraus. Daher wurden während einer internationalen Konsensus Konferenz Richtlinien zum Umgang mit diesen Fragen erarbeitet. Die Assoziation von UGT1A7*3 Polymorphismus, welches ein Phase II Protein mit niedriger katalytischer Entgiftungsaktivität im Xenobiotika Stoffwechsel kodiert, mit dem Auftreten von Pankreaserkrankungen war Gegenstand weiterer Untersuchungen. Hierzu untersuchten wir

Patienten mit alkoholischer chronischer Pankreatitis, Patienten mit einer SPINK1 Mutation und gesunde Kontrollen. Darüberhinaus betrachteten wir ein Kollektiv von Patienten mit einem Pankreaskarzinom. Unsere Ergebnisse belegen einen synergistischen negativen Effekt von exogenen Risikofaktoren (Alkohol, Nikotin) und genetischer Prädisposition. Die Rolle des oxidativen Stresses in der Genese von Pankreaserkrankungen wird damit untermauert. Erste therapeutische Ansätze aus den gewonnenen Erkenntnisses haben wir in einer prospektiven Studie mit einer immunmodulierenden und antioxidativ wirksamen Glutaminsubstitution bei Patienten mit akuter Pankreatitis gezeigt. Die Glutaminsubstitution führte zu einem besseren Krankheitsverlauf.

Schlagworte: Pankreas, Genetik, CFTR, hereditäre Pankreatitis, Xenobiotika, oxidativer Stress

Abstract:

The etiology of inflammatory and malignat pancreatic disease are poorly understood. This thesis will discuss our results of immunological and genetic investigations in patients with inflammatory and malignat pancreatic diseases. Especially the background of idiopathic pancreatitis will be discussed. We started our investigations with immunological investigations and demonstrated an evidence for a systemic activated cellular immune system in patients with chronic pancreatitis irrespectively of the aetiology of pancreatitis. Further studies deal with the genetic background of pancreatitis. The discovery of the association between a mutation of the cationic trypsinogen gene and the hereditary pancreatitis was a milestone in the modern pancreatology. We contribute to the understanding of this disease by detecting a new mutation (D22G). We were able to functional characterise this mutation. Mutation of the activation peptides (D22G, K23R) are related to an increased release of trypsin in hydrolisation studies in vitro. In addition, our further investigations confirmed and extended the knowledge of the role of mutation in the CFTR gene and the SPINK 1 gene in patients with 'idiopathic' pancreatitis. Cognisant of the ethical and clinical responsibilities guidelines for the genetic testing and managing of patients with genetic diseases of the pancreas were developed. The low detoxification activity UGT1A7*3 polymorphism has been identified as a novel risk factor of pancreatic inflammatory and malignant diseases defining the interaction of genetic predisposition and environmentally induced oxidative injury. Based on this data we conducted a prospective, randomised clinical trial on the supplementation with glutamine in patients with acute pancreatitis shedulded for total parenteral nutrition. The administration of glutamine, which has been shown to have an immune-modulating and antioxidative capacity, was associated with a favourable clinical course of the patiens receiving glutamine.

Keywords: pancreas, genetic, CFTR, hereditary pancreatitis, immunology, xenobiotica, oxidative stress

Einleitung

Historischer Rückblick

Die erste Beschreibung des Pankreas findet sich in einem babylonischen Talmud, wo eine Struktur als „Finger der Leber“ beschrieben wird. Galen beschrieb das Organ ausführlich, jedoch waren weder er noch Hippokrates, Erasistratus oder Herophilus in der Lage eine Beziehung zwischen der Bauchspeicheldrüse und einer Erkrankung herzustellen. Der Name Pankreas gründet sich auf Rufus von Ephesus (100 v. Christus) und ist zusammengesetzt aus griechischen Wort *pan*: gesamt und *kreas*: Fleisch.

Die Anatomie des Pankreas wurde von Andreas Vesalius (1514 – 1564) schon recht genau beschrieben. Es dauerte jedoch bis zum 17. Jahrhundert bis Sylvius und sein Schüler Regnier de Graff von Delft durch die experimentelle Kanülierung des Pankreasganges bei Hunden erste Hinweise auf die Funktion erkannten. Der Name „Bauchspeicheldrüse“ wird von Sommering (1755 – 1830) in die medizinische Literatur eingeführt, was dazu führte, dass das Pankreas bis Ende des 18. Jahrhunderts als abdominelle Speicheldrüse angesehen wurde. Das Trypsin wurde von Willy Kuhne (1837 – 1900) entdeckt. Kurz vorher (1815) hatte Alexander Marcet (1770 – 1822) die Lipase identifiziert. In den weiteren Jahren wurde die exokrine Funktion des Pankreas zunehmend besser verstanden. Im Jahr 1869 gelang es Paul Langerhans erstmalig die Aufgaben des Pankreas in eine endokrine und exokrine Funktion zur Regulation des Stoffwechsels und der Digestion zu differenzieren.

Bereits 1896 stellte in der ‚Zeitschrift für Heilkunst’ Hans Chiari die Hypothese auf, dass die Pankreatitis Folge einer Selbstverdauung des Organs sei (1). Es sollte jedoch genau 100 Jahre dauern, bis Whitecomb 1996 molekularbiologische Argumente für diese Hypothese lieferte. Durch die Identifikation einer mit der hereditären chronischen Pankreatitis assoziierten

Mutation des kationischen Trypsinogen Gens begann jetzt eine neue Ära in der Pankreatitisforschung (2).

Epidemiologie von Pankreaserkrankungen

Entzündliche Erkrankungen des exokrinen Pankreas werden aufgrund klinischer Kriterien als akute oder chronische Pankreatitis klassifiziert. Die akute Pankreatitis ist die häufigste Erkrankung der Bauchspeicheldrüse. Das klinische Bild einer akuten Pankreatitis entspricht in 80 % der Fälle einer ödematösen Pankreatitis die zumeist leicht verläuft und einem selbstlimitierenden Krankheitsprozeß entspricht. Bei einer nekrotisierenden Pankreatitis (20%) bestimmt das Ausmaß der Pankreasnekrosen die Schwere des Krankheitsbildes und die systemischen Manifestationen. Neben den entzündlichen Pankreaserkrankungen tritt das Pankreaskarzinom mit einer Häufigkeit von 8 / 100000 bei Frauen und 12 / 100000 bei Männern auf und hat eine mittlere 5 – Jahresüberlebensrate von 3 – 5 % (3).

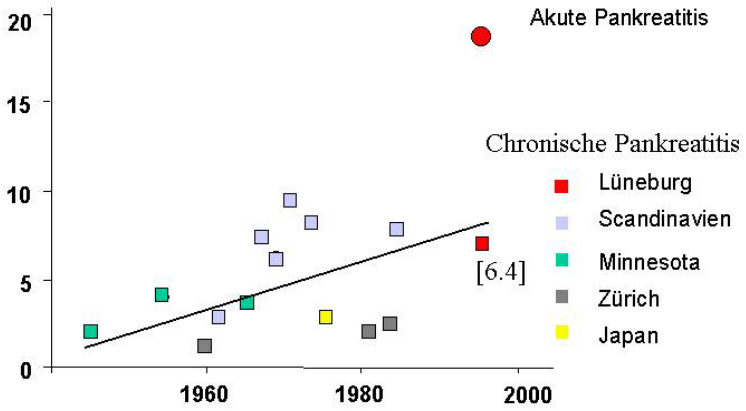

Abb. 1: Inzidenz von Pankreaserkrankungen.

Die Inzidenz der Pankreatitis variiert in verschiedenen Ländern und ist abhängig von den ursächlichen Faktoren, wie Alkoholkonsum, Gallensteinen, metabolischen Einflußgrößen und dem Medikamentenkonsum (4). So steht in den USA z. B. die Pankreatitis häufiger mit dem Alkoholkonsum als mit Gallensteinen in Zusammenhang; in England und in Deutschland sind die Verhältnisse umgekehrt.

Die Häufigkeit der chronischen Pankreatitis hat in den Industrienationen in den letzten 50 Jahren zugenommen (Abb. 1). Prof. Lankisch aus Lüneburg ist es zu verdanken, dass Zahlen zur Epidemiologie in Deutschland vorliegen. Die Inzidenz (Zeitraum 1988-95) einer akuten Pankreatitis in der Region Lüneburg lag bei 19,7 / 100000 Einwohner/Jahr, die der chronischen Pankreatitis bei 6,4/100 000 Einwohnern / Jahr. Die altersspezifische Häufigkeit zeigte einen Gipfel für die akute Pankreatitis in der Altersgruppe zwischen 35-44 Jahren und für die chronische Pankreatitis bei 45 – 54 Jahren (5). Trotz der Fortschritte in den letzten Jahrzehnten, insbesondere in der Intensivmedizin, liegt die Letalität der akuten Pankreatitis immer noch bei 5 – 8% (4, 6).

Risiokofaktoren

Alkohol ist neben der Cholecysto- und docholithiasis die zweithäufigste Ursache einer akuten Pankreatitis und mit Abstand die häufigste Ursache einer chronischen Pankreatitis in den industrialisierten Ländern. Darüber hinaus sind eine Vielzahl von weiteren potentiellen Ursachen beschrieben, die jedoch nur bei einem kleinen Anteil der Patienten (5-8%) eine Rolle spielen (4, 7). So war in der Lankisch Studie die Ätiologie der akuten Pankreatitis in 40% biliär und in 31% durch Alkoholabusus bedingt. Andere seltene Ursachen waren in 8% ausschlaggebend und in den verbleibenden 21% der Patienten konnte keine Ursache eruiert werden (5). In allen Untersuchungen findet sich eine Gruppe von 15 – 25 % der Patienten, bei denen trotz adäquater Untersuchungen und fehlenden Risikofaktoren sowie negativer Familienanamnese keine Ursache für das Auftreten einer akuten oder chronischen Pankreatitis gefunden wurde(7;8). Hier scheint es sich um eine Gruppe von Patienten zu handeln, die eine anatomische oder genetische Prädisposition zu einer Pankreaserkrankung haben (7).

Aber auch diejenigen Patienten mit einem Alkoholabusus, die eine Pankreatitis entwickeln, stellen möglicherweise eine besondere Subpopulation mit einer zusätzlichen Prädisposition

dar. Obwohl das Risiko eine Pankreatitis zu entwickeln mit der Menge an konsumiertem Alkohol exponentiell steigt (9) kommt es nur bei ca 10% der Patienten mit einem signifikantem Alkoholabusus (> 80g/Tag über mehr als 5 Jahre) zu einer chronischen Pankreatitis (10). Eine bisher nur als Abstrakt vorgestellte prospektive deutsche Untersuchung beschreibt das Auftreten einer chronischen Pankreatitis bei starken Trinkern (Alkoholzufuhr > 60 g/Tag) sogar nur mit 2 – 3 % (11). Dieses lässt annehmen, dass weitere Ursachen in der Induktion einer akuten oder chronischen Pankreatitis eine größere Rolle spielen als bisher angenommen.

In epidemiologischen Studien findet sich ein unabhängiger Effekt des Nikotinabusus auf die Entwicklung einer chronischen Pankreatitis (12;13). Die ODDS-Ratio für Raucher mit einer chronischen Pankreatitis im Vergleich zu Nichtrauchern variiert zwischen 7.8 – 17.3, wobei das Risiko mit dem Ausmaß des Nikotinabusus korreliert (13;14). Ein negativer synergistischer Effekt von Nikotin- und Alkoholabusus scheint spezifisch für das Pankreas zu bestehen. In einer französischen Studie fand sich ein negativer Effekt des Nikotinabusus und Alkoholabusus besonders bei Patienten mit Pankreatitis, nicht jedoch bei Patienten mit Leberzirrhose (12). Darüber hinaus gibt es tierexperiementielle Hinweise, daß Xenobiotika sowie eine vermehrte Zufuhr von ungesättigten Fettsäuren an der Entwicklung einer chronischen Pankreatitis beteiligt sind (15;16).

Obwohl eine Vielzahl von epidemiologischen und klinischen Daten vorlagen, war die Pathophysiologie der entzündlichen Erkrankungen des exokrinen Pankreas bis Mitte der neunziger Jahre nur unzureichend verstanden. In den letzten Jahren wurden erhebliche Fortschritte in dem Verständnis von Pankreaserkrankungen gemacht, nicht zuletzt aufgrund der wachsenden Kenntnis des humanen Genoms und dem Einsatz von molekularbiologischen Methoden. Die vorliegende Habilitationsschrift stellt die eigenen Arbeiten zu diesem Thema unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur zusammen.

Eigene Arbeiten

Die eigenen Untersuchungen beschäftigen sich mit unterschiedlichen Aspekten der Aetiologie und Pathogenese der chronischen Pankreatitis und des Pankreaskarzinomes. Initial stellten wir uns die Frage, inwieweit immunologische Veränderungen an der Entstehung einer chronischen Pankreatitis beteiligt sind und ob immunologischen Vorgängen eine besondere Rolle bei der idiopathischen Pankreatitis zukommt. Der Vergleich von Patienten mit alkoholischer Genese der Erkrankung versus einer ‚idiopathischen' Pankreatitis erbrachte für beide Gruppen gleichermaßen Zeichen einer zelluären Immunstimulation.
Vor dem Hintergrund des wachsenden molekularbiologischen Wissens dehnten wir unsere Untersuchungen auf die Beziehungen zwischen Genotyp und – Phänotyp aus. Für genetische Untersuchungen sind besonders familiäre Erkrankungen wie die hereditäre Pankreatitis geeignet. Nach der Entdeckung der Mutationen (N29I, R122H) des kationischen Trypsinogen Gen (PRSS1) als Ursache der hereditären Pankreatitis (17), wurde schnell deutlich, dass diese beiden Mutationen im PRSS1 nur einen Teil der hereditären Pankreatitiden erklären. Wir konnten eine neue Mutation im kationischen Trypsinogen Gen bei einer von uns identifizierten Familie mit familiärer Pankreatitis nachweisen. Zusätzlich haben wir erstmals in einem in vitro Modell einen möglichen Wirkmechanismus der von uns entdeckten Mutationen D22G sowie einer weiteren Mutation K23R erarbeitet.
Neben der seltenen genetischen Modellerkrankung der hereditären Pankreatitis blieb aber weiterhin die Frage offen, inwieweit genetische Prädispositionen an der Entstehung von nicht familiären akuten und chronischen Pankreatitiden beteiligt sind. Daher konzipierten wir weitere Studien unter Berücksichtigung verschiedener Kandidatengene bei Patienten mit sogenannter idiopathischer chronischer Pankreatitis oder rezidivierenden Pankreatitiden unklarer Genese. Hierzu führten wir ein Screening bei den Patienten auf das Vorliegen von Mutationen des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gens durch.

Neben der exakten Erfassung des Phänotyps koppelten wir die genetischen Untersuchungen mit elektrophysiologischen in-vitro Untersuchungen um die funktionelle Relevanz der entdeckten Mutationen zu charakterisieren. Neben dem CFTR Gen wurde in einer weiteren Untersuchungen die Prävalenz und der Einfluss von Mutationen im Serineproteasen Inhibitor SPINK1 bei Patienten mit chronischer idiopathischer Pankreatitis evaluiert. Hierbei charakterisierten wir den bisher unbekannten Polymorphismus R65Q. Wir beobachteten in dieser Studie eine bisher nicht beschriebene compound Heterozygotie von CFTR und SPINK1 Mutation bei einem Patienten mit unklarer Pankreatitis.
Unter Berücksichtigung der Interaktionen zwischen genetischer Prädisposition und Umwelteinflüssen suchten wir nach weiteren Kandidatengenen, die an der Entstehung von Pankreaserkrankungen beteiligt sind. In diesen Untersuchungen bezogen wir auch Patienten mit Pankreaskarzinom ein. Hier wandten wir unserer Aufmerksamkeit der UDP-Glukuronosyltransferases (UGT) zu, welche als Phase II Enzym an der Zyto- und Genoprotektion beteiligt ist. Diese Arbeit zeigt erstmalig, dass UGT1A7*3 Polymorphismen, welche ein Enzym mit erniedrigter katalytischer Aktivität kodieren, in Verbindung mit einem Risikoverhalten das Auftreten von entzündlichen und malignen Pankreaserkrankungen beeinflusst. Darüber hinaus konnten wir darstellen, dass UGT1A7 in den Epithelien des oberen Gastrointestinaltraktes aber auch dominierend im Pankreasgewebe nachweisbar ist. Unsere Daten untermauern die protektive Rolle gegenüber Umweltfaktoren (Ernährung, Xenobiotika, Benzpyrene etc.) dieses Phase II Enzym am sogenannten „point of entry“ aber auch im Zielgewebe (Pankreas). Die Ergebnisse aus der UGT1A7 Studie haben vermuten lassen, dass eine antioxidative Therapie den Verlauf einer Pankreatitis verbessern könnte. Unsere positiven Ergebnisse der bisher einzigen Studie zum Effekt einer immunmodulierenden und antioxidativ wirksamen Supplementation mit Glutamin bei Patienten mit akuter Pankreatitis, die einer parenteralen Ernährung bedürfen, bestätigt diese Hypothese.

Untersuchungen zur zellulären Immunantwort bei Patienten mit chronischer Pankreatitis

(Ockenga J, Jacobs R, Kemper A, Benschop RJ, Schmidt RE, Manns MP. Lymphocyte subsets and cellular immunity in patients with chronic pancreatitis. Digestion 2000; 62:14-21). Histologische Untersuchungen zeigen eine lymphozytäre Inflitration mit aktivierten T-Zellen im Pankreasgewebe von Patienten mit langjähriger chronischer Pankreatitis. Daher stellte sich die Frage, inwieweit an einer chronischen Pankreatitis auch eine autoimmune Komponente beteiligt ist. Unsere Ergebnisse zeigten, dass Patienten mit chronischer Pankreatitis auch in klinisch stabilen Krankheitsphasen eine aktivierte zelluläre Immunantwort aufweisen; unter anderem fand sich eine stimulierte Zytokinausschüttung in vitro. Hierbei sahen wir keinen Unterschied ob die chronische Pankreatitis auf dem Boden eines Alkoholabusus entstanden war oder eine idiopathische chronische Pankreatitis vorlag . Diese Ergebnisse unterstützen die Ansicht, dass eine zellulär vermittelte Immunantwort in der Pathogenese der chronischen Pankreatitis eine Rolle spielt.

Mutation des kationischen Trypsionogen (D22G, K23R): Erleichterte Trypsin Aktivierung durch veränderte Aktivierungspeptide.

(Teich N, Ockenga J, Hoffmeister A, Manns M, Mossner J, Keim V. Chronic pancreatitis associated with an activation peptide mutation that facilitates trypsin activation. Gastroenterology 2000; 119:461-465). Nach der Entdeckung der Mutationen des kationischen Trypsinogen Gen (R122I, N29I, A16V, K23R) als Ursache der hereditären Pankreatitis bei einem Teil der Indexpatienten war klar, dass hiermit nicht alle Fälle einer familiären Pankreatitis erklärt werden können. Darüber hinaus stand der funktionelle Nachweis dieser Mutationen aus. Der genaue Mechanismus der Pankreatitisentstehung bei Vorliegen der

Mutationen blieb spekulativ. In dieser Arbeit konnten wir eine neue missense Mutation D22G in einer von uns identifizierten Familie mit chronischer Pankreatitis beschreiben. D22G führt zu einem Aminosäurenaustausch im Bereich des Aktivierungspeptides des Trypsinogens. Anhand dieser und einer weiteren Mutation (K23R), die auch zu einem Aminosäurenaustausch im Aktivierungspeptid führt, wurde ein in vitro Modell entwickelt, in dem zu den Mutationen korrespondierende synthetische N-terminale Peptide hergestellt wurden. Unter verschiedenen physiologischen Bedingungen zeigten die beiden zu den Mutationen korrespondierenden synthetischen Peptiden erhöhte Hydrolisierungsraten und lassen damit eine höhere Freisetzung bzw. Aktivierung von Trypsin in vivo vermuten. Es gelang in einem in vitro Modell eine mögliche funktionelle Bedeutung von Mutationen im PRSS1 Gen nachzuweisen.

Mutationen des CFTR Gen aber nicht des kationischen Trypsinogen Gens sind assoziiert mit idiopathischer oder rezidivierender Pankreatitis.

(Ockenga J, Stuhrmann M, Ballmann M, Teich N, Keim V, Dork T, Manns MP. Mutations of the cystic fibrosis gene, but not cationic trypsinogen gene, are associated with recurrent or chronic idiopathic pancreatitis. Am J Gastroenterol 2000; 95:2061-2067). In 10 – 20% der Patienten mit rezidivierender oder chronischer Pankreatitis kann eine Ursache nicht eruiert werden und diese werden als idiopathisch definiert. Es finden sich in dieser Gruppe zwei Altersgipfel. In einem klinisch eng definiertem Patientengut mit Erstdiagnose der idiopathischen chronischen oder rezidivierenden Pankreatitis nach der Adoleszenz (> 18 Jahre) und vor der vierten Lebensdekade zeigte sich, dass in etwa einem Drittel der Patienten mindesten ein abnormales Allele des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gens nachweisbar ist. Die erwartete Häufigkeit in der Normalbevölkerung liegt bei 4-6%. Veränderungen des kationischen Trypsinogen Gens, welches sich bei hereditärer

Pankreatitis findet, spielen hier keine Rolle. Elektrophysiologische Messungen in vitro an Rektum Biopsien in einer Ussing Kammer erbrachten entgegen unseren Erwartungen keine nachweisbaren CF typischen funktionellen Veränderungen. Weitere Familienuntersuchungen lassen vermuten, dass für eine Prädisposition der Pankreatitis eine compound Heterozygotie notwendig ist. Unsere Daten bestätigen und erweitern zum ersten Mal in einer deutschen Studie die kurz zuvor publizierten Ergebnisse aus dem englischem und amerikanischem Sprachraum. Darüber hinaus konnten wir Mutationen des kationischen Trypsinogen Gens als einen den Phänotyp modifizierenden Faktor ausschließen.

Niedrige Prävalenz von Mutationen des Serine Proteinase Inhibitor Kazal Type I (SPINK1) Gen bei adulten Patienten mit idiopathischer Pankreatitis.

(Ockenga J, Dork T, Stuhrmann M. Low prevalence of SPINK1 gene mutations in adult patients with chronic idiopathic pancreatitis. J Med Genet 2001; 38:243-244). Unsere eigenen wie auch andere Arbeiten deuten zunehmend dahin, dass bei einem signifikantem Anteil der Patienten mit idiopathischer chronischer Pankreatitis eine genetische Prädisposition für Pankreaserkrankungen vorliegt. In dieser Arbeit haben wir unser Kollektiv an Patienten auf das Vorliegen von Mutationen in dem Serine Proteinase Inhibitor Kazal Type I (SPINK1) Gen untersucht. Hierbei haben wir eine neue bisher nicht beschriebene Veränderung des Gens (G->A, Nukleotidposition 194) entdeckt, die zu einer Missence Mutation R65Q führt. Eine weitere RNA Analyse aus der Rektumschleimhaut zeigte, dass das Splicing durch diese Veränderung nicht betroffen ist. Darüber hinaus fand sich bei demselben Patienten ein Nonsense-Mutation des CFTR Gen (Y1092X) in Exon 17b, so daß die Rolle einer doppelten Heterozygotie diskutiert wird.

Genetische Risikofaktoren bei chronischer Pankreatitis

(Teich N, Ockenga J, Keim V, Mössner J. Genetic risk factors in chronic pancreatitis. J Gastroenterology 2002; 37:1-9) In der zweiten Hälfte der Neunziger Jahre gab es wesentliche Erkenntnisse zu dem molekularbiologischen Hintergrund von Pankreaserkrankungen. Zu nennen sind hier die PRSS1 Mutationen, SPINK 1 Mutationen und die Assoziation zwischen CFTR Mutationen und Pankreaserkrankungen. In dem Review wird der Wissensstand dargestellt und ein Algorithmus zur klinischen Anwendung der genetischen Untersuchungen bei Patienten mit chronischer Pankreatitis vorgeschlagen.

Polymorphismen der UDP-Glukuronosyltransferase UGT1A7 als Risikofaktor der chronischen Pankreatitis und des Pankreaskarzinomes.

(Ockenga J, Vogel A, Teich N, Keim V, Manns MP, Strassburg CP. Polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 are a risk factor of chronic pancreatitis and pancreatic cancer (Gastroenterology, in Druck). Alkohol und Nikotinabusus sind etablierte Risikofaktoren für die Entwicklung einer chronischen Pankreatitis, wobei aber nur ca. 10 % der Patienten mit deutlichem Alkoholabusus eine chronische Pankreatitis entwickeln. Dieses lässt weitere – genetische – Einflußgrößen vermuten. Der Nikotinabusus ist darüber hinaus der stärkste Risikofaktor für das Pankreaskarzinom. Die UDP-Glukuronosyltransferase UGT1A7 ist ein Metabolisierungsenzym, das z.B. Tabakrauchkarzinogene inaktivieren kann und zyto- und genoprotektiv z.B. gegenüber oxidativem Stress wirkt. Wir konnten nachweisen, dass von den bisher bekannten 17 UGT Isoenzymen fast ausschließlich nur UGT1A7 im humanen Pankreas exprimiert wird. Wir demonstrieren weiter in dieser Arbeit, dass der Polymorphismus des UGT - UGT1A7*3, welches ein Protein mit niedriger katalytischer Entgiftungsaktivität kodiert, signifikant mit einer chronischen alkoholischen

Pankreatitis und dem Pankreaskarzinom assoziiert ist. Die Assoziation zum Karzinom ist besonders stark, wenn ein Pankreaskarzinom früh (< 55 Lebensjahr) aufgetreten ist. Hiermit ergibt sich ein Zusammenhang zwischen genetischer Prädisposition und exogenen Faktoren in der Entstehung von entzündlichen und malignen Pankreaserkrankungen.

Rolle von Polymorphismen der Karzinogen entgiftenden UDP-Glukuronosyltransferase UGT1A7 bei Tumoren des proximalen Verdauungstraktes.

(Vogel A, Ockenga J, Ehmer U, Barut A, Kneipp S, Tukey R, Manns M, Strassburg C. Polymorphisms of the carcinogen detoxifying UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 in cancers of the proximal gastrointestinal tract. Z Gastroenterologie 2002;40:497-502). Auch die Karzinome des proximalen Verdauungstraktes sind mit Tabakrauch und Ethanolexposition assoziiert. In Ergänzung zu der vorangegangenen Untersuchung an Patienten mit Pankreaserkrankungen demonstrieren wir in dieser Arbeit die Expression des UGT1A7 in der Mukosa des Mundes, des Ösophagus und des Magens. Es findet sich eine Assoziation zwischen dem UGT1A7*3 Allele und Karzinomen des proximalen Verdauungstraktes. Diese Daten stützen unsere Beobachtungen an Patienten mit Pankreaserkrankungen und lassen vermuten, dass der Einfluss von karzinogenen Substanzen nicht nur abhängig ist von der zyto- und genoprotektiven Kompetenz in den ‚Endorganen', sondern auch von der protektiven Kompetenz der Grenzfläche zwischen Aussenwelt und Organismus (proximaler Verdauungstrakt).

Effekt einer mit Glutamin angereicherten parenteralen Ernährung bei Patienten mit akuter Pankreatitis.

(Ockenga J, Borchert K, Rifai K, Bischoff SC, Manns MP. Effect of Glutamine supplementation in patients with acute pancreatitis. Clincal Nutrition 2002 (in press)). Im

Rahmen einer akuten Pankreatitis wird der oxidative Stress als ein zytotoxischer Mechanismus der Zellschädigung angesehen. Glutamin ist ein wesentlicher Prekursor für das Gluthation, welchem eine wesentliche Rolle im Schutz der Zellen gegenüber oxidativen Stress zukommt. Darüberhinaus wird dem Glutamin ein positiver Effekt in der Immunmodulation und der Erhaltung der intestinalen Integrität zugeschrieben. In dieser prospektiven, randomisierten Studie fanden wir Hinweise auf einen positiven Einfluß einer Glutamin (Glutamin-Dipeptid) Substitution auf den klinischen Verlauf bei Patienten mit akuter Pankreatitis, die einer parenteralen Ernährung bedurften.

Diskussion

Pathophysiologie der Pankreatitis

Obwohl bereits 1896 Hans Chiari erstmalig den Begriff der „Selbstverdauung“ als ein Schlüsselereignis in der Entstehung einer Pankreatitis aufbrachte (1), dauerte es 100 Jahre, bis molekulargenetische Ergebnisse diese Hypothese weiter untermauerten.
Zwei ältere Erklärungsansätze sind durch die Autodigestions-Theorie weitestgehend verdrängt worden. Die erstere, die Theorie der ,,gemeinsamen Endstrecke" (common channel), ging davon aus, dass anatomische Gegebenheiten einen Gallereflux in den Ductus pancreaticus erlauben und dieser dann zu einer Aktivierung von Pankreasenzymen führt. (Eine gemeinsame Endstrecke mit freier Kommunikation zwischen dem Ductus choledochus und Ductus pancreaticus ist in einigen Fällen tatsächlich nachweisbar). Die zweite Theorie ging davon aus, dass ein Verschluß des Ductus pancreaticus und eine Hypersekretion für die Entwicklung einer Pankreatitis ausschlaggebend sind. Jedoch verursacht der experimentielle Verschluß des Ductus pancreaticus in der Regel ein Pankreasödem, aber keine generelle Pankreatitis. Inwieweit diese Mechanismen dann aber auch zu einer intrazellulären Enzymaktivierung führen, ist nicht geklärt.

Eine Autodigestion des Organe durch intrazellulär aktivierte proteolytische Enzyme (z. B. Trypsinogen, Cathepsin B, Chymotrypsinogen, Proelastase und Phospholipase A) ist eines der ersten Ereignisse, die zu einer akuten Pankreatitis führen (Abb. 2). Dem Trypsin kommt hierbei eine Schlüsselrolle zu. Das Pankreas synthetisiert und sezerniert Trypsin als inaktives Trypsinogen (Zymogen), welches erst im Darm durch Abspaltung des Aktivierungspeptides durch das Enzym Enteropeptidase zu Trypsin umgewandelt wird. Unsere eigenen Daten zu genetischen Veränderungen im Trypsinsystem und deren funktionellen Konsequenz bekräftigen die Vorstellung, dass es als initiales Ereignis bei der akuten Pankreatitis zu einer

intrazellulären Trypsinaktivierung in der Azinuszelle bzw. im Pankreas kommt. Eine ganze Anzahl von Faktoren (z. B. Endotoxine, Exotoxine, virale Infektionen, Ischämie, Anoxie und direktes Trauma) scheinen an der vorzeitigen Aktivierung der Proenzyme beteiligt zu sein. Auch im normalen Pankreasgewebe werden geringe Mengen an Trypsinogen durch Autolyse zu aktivem Trypsin umgewandelt, diese Trypsinaktivität wird allerdings durch zwei Schutzmechanismen antagonisiert. Ein Teil des Trypsins wird durch Bindung an den Serinproteasen-Inhibitor Kazal-Typ 1 (SPINK1) zu inaktiven Komplexen gebunden. Aber aktives Trypsin kann auch durch sich selbst und durch Mesotrypsin degradiert werden (18). Einer neueren Hypothese zur Erklärung der intrapankreatischen Aktivierung von Zymogenen zufolge, werden diese innerhalb der Azinuszellen des Pankreas durch lysosomale Hydrolasen aktiviert. In 2 unterschiedlichen Modellen der experimentellen Pankreatitis zeigte sich, dass Verdauungsenzyme und lysosomale Hydrolasen intrazellulär zusammen vorkommen können; dies würde die Aktivierung der ersteren durch die letzteren innerhalb der Azinuszellen ermöglichen. In vitro können lysosomale Enzyme, wie das Cathepsin B, Trypsinogen aktivieren. Trypsin wiederum aktiviert die Vorstufen der anderen Proteasen (19-21). Neuere Untersuchungen allerdings zeigten widersprüchliche Ereignisse (22;23). Bisher ist auch noch nicht bewiesen, ob innerhalb der menschlichen Azinuszellen ein entsprechendes pH-Milieu (d. h. pH >3,0) entstehen kann, bei dem Trypsinogen durch lysosomale Hydrolasen aktiviert werden kann. Es gibt Hinweise, dass eine Ischämie oder Hypoperfusion alleine für eine Trypsinogenaktivierung mit nachfolgender Pankreasschädigung ausreicht (24). Die aktivierten Enzyme führen dann zu einem Zelltod und nachfolgender Kaskade von lokalen und systemischen Ereignissen (siehe Abb. 2).

Neben den immunologischen Mediatoren kommt dem oxidativen Stress eine weitere azinusschädigende und proinflammatorische Rolle zu. Sowohl experimentelle als auch klinische Daten zeigen, dass z.B. freie Sauerstoffradikale im Rahmen der akuten Pankreatitis vermehrt auftreten und Patienten mit akuter als auch chronischer Pankreatitis einen

verminderten antioxidativen Status aufweisen (25;26). Freie Sauerstoffradikale bzw. eine Imbalanz des Redox-Status führen in der Azinuszelle u.a. zu einer Aktivierung des Nuklear Faktor κB (NF-κB). Aktivierung von NF-κB ist sowohl in vitro als auch in vivo mit einer vermehrten Expression von proinflammatorischen Genen verbunden (27) und führt im Tierexperiment zu dem Bild einer Pankreatitis (28). Eine wesentliche protektive Rolle gegenüber exogenen und endogenen Sauerstoffradikalen hat das Glutathionsystem. Glutathion ist ein ubiquitäres Tripeptid (γ-Glu-Cys-Gly), welches in allen Geweben in hoher Konzentration vorkommt und zu seiner Synthese Glutamin, Cystein und Methionin benötigt. Der Erhalt des zellulären Redox Gleichgewicht ist ein dynamischer Prozess und wird durch das Verhältnis zwischen dem reduziertem Glutathion und seiner oxidierten Form dem Glutathion Disulfid aufrechterhalten (27).

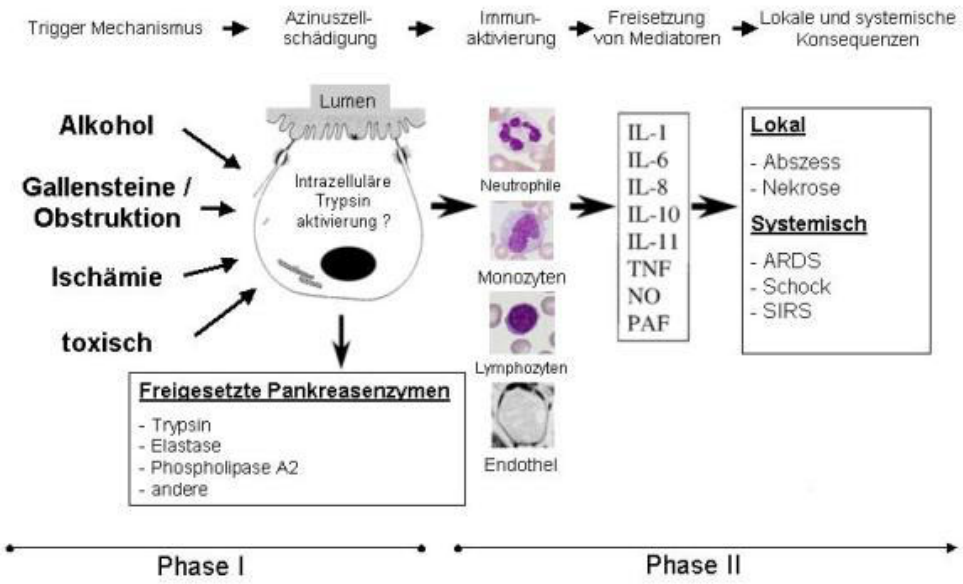

Abb. 2: Stadien der akuten Pankreatitis und beteiligte Strukturen oder Mediatoren. IL, Interleukine; TNF, Tumornekrose Faktor; NO, Nitridoxid; PAF, Platlet Activating Factor; ARDS, acute respiratory distress syndrome; SIRS, severe inflammatory response syndrome.

Durch die Gabe von Prekursoren der Glutathionsynthese, wie z.B. Glutamin, ist es möglich

den zellulären Glautathionstatus und damit die antioxidative Kapazität zu verbessern (29;30). Bisher gab es keine Untersuchung zur klinischen Anwendung von Glutamin bei der akuten Pankreatitis. Mit unserer prospektiven Interventionsstudie fanden wir erstmalig Hinweise darauf, dass eine Gabe von Glutamin zu einer Verbesserung des klinischen Verlaufs bei Patienten mit moderater Pankreatitis führt (31). Es fand sich nicht nur eine bessere Synthese von viszeralen Proteinen und eine Verbesserung des Redoxstatus, sondern es war möglich die Patienten mit Glutamin schneller zu oralisieren und tendenziell früher wieder zu entlassen.

Aetiologie der Pankreatitis

Ein langjähriger Alkoholabusus ist am häufigsten mit einer chronischen Pankreatitis (70%) assoziiert (Lit). (32;33). In mehreren Untersuchungen findet sich immer eine Subpopulation von 15 – 25%, in der keine Ursache der chronischen Pankreatitis evaluiert werden konnte. Innerhalb dieser Gruppe gibt es zwei Häufigkeitsgipfel in der Erstmanifestation der Erkrankung zu geben, die zu einer Aufteilung in eine juvenile (bis zum 40 Lebensjahr) oder senile (ab dem 60 Lebensjahr) idiopathische chronische Pankreatitis führt (34). Vor kurzem wurde ein neues Risiko Klassifikationssystem (TIGAR-O, Version 1.0) vorgestellt, welches die Patienten wie folgt aufteilt (7):

1. **T**oxisch-metabolisch;
2. **I**diopathisch;
3. **G**enetisch;
4. **A**utoimmun;
5. **R**ezidivierende akute Pankreatitis;
6. **O**bstruktive Pankreatitis.

Sowohl die Langzeit Beobachtung von Ammann et al. an einer Gruppe von alkoholischen Pankreatitiden (35), als auch der Verlauf innerhalb Familien mit hereditärer chronischer Pankreatitis sprechen dafür, dass das klinische Bild der chronischen Pankreatitis Folge von

wiederholten akuten oder subakuten Attacken einer Pankreatitis ist. In diesem Zusammenhang wurde von Amman der Begriff Nekrose – Fibrose Sequenz eingeführt (36). Hierbei wird deutlich, dass bei der akuten und chronischen Pankreatitis gleichartige pathophysiologische Mechanismen eine Rolle spielen.

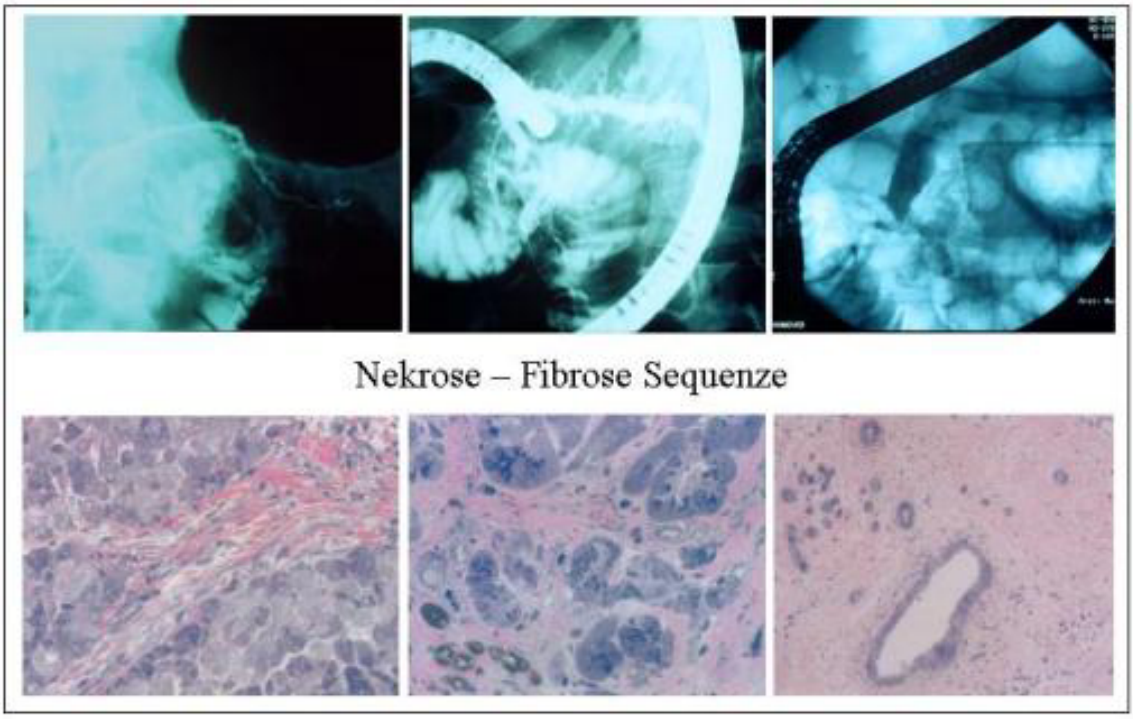

Abb. 3: Verlauf einer chronischen Pankreatitis – In der oberen Reihe sind die ERCP Veränderungen eines Patienten mit alkoholischer chronischer Pankreatitis über 15 Jahre aufgeführt. In der unteren Bildfolge sind dazu beispielhaft korrespondierende histologische Veränderungen mit zunehmender Fibrosierung dargestellt.

Immunologische Veränderungen

Wiederholte akute Attacken einer Pankreatitis führen zu einem Untergang der Azinuszellen und zu einer lokalen Infiltration von aktivierten CD8+ T-Zellen (37). Dabei kommt es zu einem Verlust des funktionellen Pankreasgewebes und dem Ersatz durch fibrotisches Material (Abb. 3). Hierbei scheint eine zelluläre zytotoxische Immunreaktion gegen noch unbekannte Antigene eine Rolle zu spielen (38;39). Unklar war aber bisher, ob systemische

immunologische Veränderungen auftreten und wie diese zum Krankheitsverlauf und der Aetiologie der Pankreatitis assoziiert sind. Wir konnten zeigen, dass eine chronische Pankreatitis mit einem vermindertem Anteil an zirkulierenden CD8+, CD56+ und CD25+ positiven Zellen verbunden ist. Diese Veränderungen sind besonders ausgeprägt bei Patienten mit starker Karnkheitsaktivität, Ähnliches wurde auch für den Morbus Crohn beschrieben, wo eine inverse Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und zirkulierenden CD25+ Lymphozyten beobachtet wurde (40). Immunhistologische Studien zeigen eine verstärkte Infiltration des Pankreas mit T - Lymphozyten und eine verstärkte Expression von MHC (major histocompatibility complex) Klasse II oder Neoantigenen auf den Azinuszellen (Übersicht bei (38)). Im Mausmodell konnte durch den Transfer von peripher entnommenen Lymphozyten einer Maus mit experimentell induzierter chronischer Pankreatitis auf eine HLA identische, gesunde Maus das Bild einer Pankreatitis induziert werden (41). In vitro wie auch in vivo haben wir eine verstärkte Aktivität sowohl von pro- als auch von antiinflammatorischen Zytokinen beobachtet, wobei hier besonders der Transforming Growth Faktor ß (TGF-ß), der Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) und Interleukin-10 (IL-10) zu nennen sind (42, 43). Die Aetiologie der Pankreatitis hatte keinen unterschiedlichen Einfluss auf die Lymphozytensubpopulationen und die Zytokinantwort, womit unsere Ergebnisse gegen immunologische Veränderungen als primäre Ursache der idiopathischen Pankreatitis sprechen.

Dieses schließt jedoch nicht generell die Möglichkeit einer Autoimmunpankreatitis aus. Bereits 1965 wurde von Sarles et al. ein Patient mit Pankreatitis und einer Hypergammaglobulinämie beschrieben (44). In der Literatur wurden immer wieder einzelne ähnliche Fälle aufgeführt, die in Kombination mit anderen Autoimmunerkrankungen wie Sjörgen Syndrom, primär sklerosierender Cholangitis, Colitis Ulcerosa oder Lupus erythematodes auftraten. (45). Neuere systematische – überwiegend japanische- Untersuchungen zeigen, dass diese Patienten durch eine erhöhte Konzentrationen von

Immunglobulin G, insbesondere der Subklasse Ig 4 und der Ig4 Immunkomplexe, weitere zirkulierende Autoantikörper (z.B. antinukleäre Antiköper, anti Carboanhydrase II Antikörper, Rheumafaktor), Infiltration des Pankreasgewebes mit Lymphozyten, sowie einer diffusen Schwellung des Pankreas charakterisiert sind.

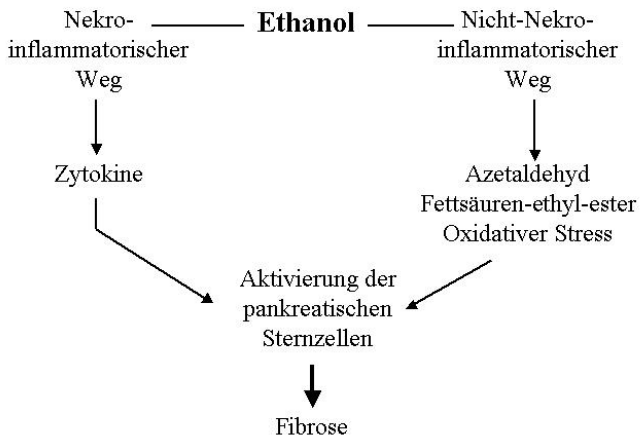

Abb. 4: Vorstellungen zur Entstehung der pankreatischen Fibrose. Beim nicht-nekro-inflammatorischen Weg bewirkt Alkohol selber oder seine Abbauprodukte bzw. der dadurch entstehende oxidative Stress eine Sternzellaktivierung. Beim nekro-inflammatorischem Weg werden die Sternzellen durch die im Rahmen der Entzündung freigesetzten Zytokine aktiviert. Beide Wege führen zu einer vermehrten Bildung von Extrazellulärmatrix und einer Fibrose (modifiziert nach (48)).

Eine wesentliche Rolle in der Entwicklung einer Fibrose und damit einem Funktionsverlust des Pankreas haben die pankreatischen Sternzellen, welche erst Mitte der neunziger Jahre im Pankreas beschrieben wurden. Parallel zu den Vorgängen bei einer Leberzirrhose sind die pankreatischen Sternzellen an der Fibrogenese beteiligt (46, 47). Abbildung 4 fasst schematisch in einem Modell die Rolle der Sternzellen und ihre möglichen Aktivatoren in der Entstehung der Pankreasfibrose zusammen.

Genetische Prädisposition einer Pankreatitis

Hereditäre Pankreatitis

Das klinische Bild der hereditären (familiären) Pankreatitis wurde erstmals im Jahre 1952 von Comfort & Steinberg beschrieben (49). Die Definition umfasst ein autosomal dominantes Krankheitsbild von rezidivierenden akuten Pankreatitiden und der Entwicklung einer chronischen Pankreatitis mit zwei Betroffenen einer Generation oder drei Betroffenen in mehr als einer Generation (Abb. 5). Es handelt sich hierbei um eine seltene Erkrankung, der jedoch Modellcharakter zukommt. In den USA, Europa und Japan sind schätzungsweise etwa 400 – 500 Familien betroffen.

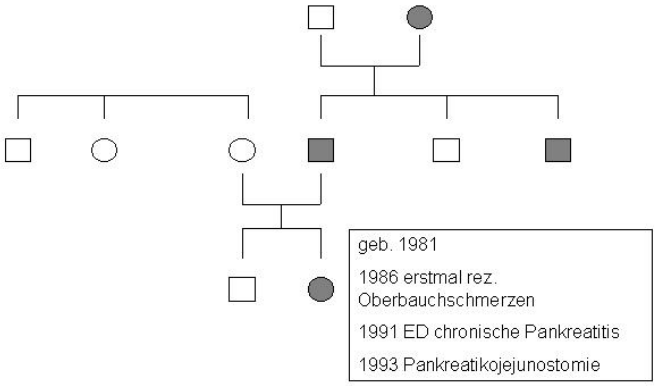

Abb. 5: Stammbaum einer von uns identifizierten Familie mit hereditärer Pankreatitis (N29I). Die klinischen Daten der Indexpatientin sind im Kasten aufgeführt.

1996 wurde in mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander mittels Kopplungsanalysen ein Genort auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (7q35) lokalisiert (50). Hier sind wichtige pankreatische Verdauungsenzyme (z.B. Carboxypeptidase A_1, Trypsinogen Familie) lokalisiert. Im selben Jahr gelang es dann Whitcomb und Mitarbeitern eine Mutation im kationischen Trypsinogen Gen (auch als Serinprotease 1 (PRSS1) bezeichnet, Omim 276000) als Ursache der Erkrankung zu identifizieren (2). Es fand sich ein Austausch des Arginins

durch Histidin an Position 122 des Proteins (R122H). Basierend auf der Chymotrypsin Nomenklatur wurde dies Mutation initial als R117H bezeichnet, später dann aber nach der Trypsinogen Nomenklatur umbenannt nach R122H. Ausgehend von einer Simulation am dreidimensionalen Strukturmodell des Trypsinmoleküls („molecular modelling“) (Abb. 6) stellten die Autoren die Hypothese auf, dass durch die R122H Mutation aktiviertes Trypsin resistenter gegenüber hydrolytischer Inaktivierung sei.

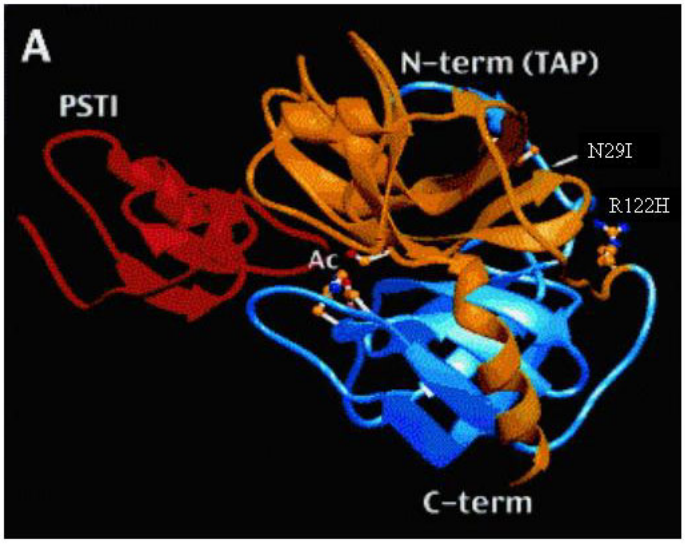

Abb. 6: Hypothetisches Strukturmodell des kationischen Trypsinogens mit der Mutation R122H. In Rot ist der physiologische Trypsininhibitor des Serin Proteasen Inhibitors PSTI dargestellt (modifiziert nach (2) und http://pancreas.org/assets/hp_presentation/sld007.htm).

Eine missense Mutation in Exon 2 des PRSS1 Gens definiert eine weitere Mutation N29I. Die Entdeckung einer Mutation im kationischen Trypsinogen als Ursache einer chronischen Pankreatitis und die Tatsache, dass Trypsin alle anderen Verdauungsenzyme aktivieren kann, unterstützt die Vorstellung, dass die Aktivierung von Trypsin eine Schlüsselrolle in der Entstehung einer Pankreatitis spielt.

Eine Zusammenstellung der publizierten Genotyp-Phänotyp Korrelation bei 101 Patienten mit nachgewiesener Mutation des PRSS1 Gens (N29I, R122H), erbrachte eine Penetration der chronischen Pankreatitis von ca. 78% (51). In allen Studien finden sich aber auch Patienten,

die keine Mutation des PRSS1 Gens tragen. In einer Analyse von 105 Indexpatienten aus diesen Studien finden sich 45% der Patienten ohne Nachweis einer Veränderung im PRSS1 Gen (Übersicht in (52)).

Wir konnten erstmalig die Mutation D22G beschreiben (53). Hierbei handelt es sich um eine Mutation unmittelbar neben der Schnittstelle des Aktivierungspeptids (Abb. 6). Zwei weitere Mutationen in dem Aktivierungspeptid (A16V, K23R) sind beschrieben (54) (55). Eine aktuelle Aufstellung der PRSS1 (und SPINK1) Mutationen ist verfügbar unter: www.uni-leipzig.de/pancreasmutation.

Die unmittelbare Nähe der D22G und K23R Mutationen zur physiologischen Schnittstelle führten uns zu der Hypothese, dass eine veränderte Kinetik der Hydrolisierung und damit Freisetzung von aktiviertem Trypsin als Ursache der Pankreatitis vorliegen könnte. In vitro Versuche mit synthetischen N-terminalen Peptiden, die die Schnittstelle zur Aktivierung beinhalteten, ergaben, dass die entsprechend der K23R und D22G Mutation veränderten Peptide eine erhöhte Hydrolisierungsrate and der Schnittstelle im Vergleich zum Wildtyp Peptid hatten (53). Wir konnten damit erstmalig in vitro eine funktionellen Wirkmechanismus der Mutationen nachvollziehen. Unsere Ergebnisse lassen daher vermuten, dass die A16V und die D22G Mutation in vivo zu einer vermehrten Freisetzung von intrazellulärem aktiviertem Trypsin und damit zu einem Ungleichgewicht in dem pankreatischem Protease – Antiprotease System führt.

Zum Teil aufbauend auf unseren Ergebnissen liegen zwischenzeitlich auch erste experimentelle Daten über die Funktionsweise der N29I und R122H, als auch R122C Mutationen vor. Sahin-Toth et al. fanden Hinweise auf eine erleichterte Autoaktivierung und/oder eine reduzierte Rate an Autoinaktivierung des Trypsins (56, 57-59).

In einer aktuellen Zusammenstellung von 108 Indexpatienten aus dem deutschen Raum haben sogar 69% der Indexpatienten keine Mutation im PRSS1 Gen, 19% eine R122H, 6% eine N29I und jeweils nur ein Patient die A16V, D22G, L104P, R116C und C139F Variante (60).

Diese Daten verdeutlichen, dass die Suche nach weiteren genetischen Veränderungen bei der hereditären Pankreatitis noch nicht abgeschlossen ist. Bisherige Untersuchungen zu weiteren Kandidatengenen wie das Anionische Trypsinogen, Lithostatin oder das Pankreas assoziierte Protein waren negativ (61 - 63).

Mutationen des Trypsinogeninhibitors (SPINK1)

Die Entdeckung der Mutation des kationischen Trypsinogens als Ursache der hereditären Pankreatitis unterstreicht die Bedeutung des Trypsins und seiner Inhibitoren in der Pathogenese der Pankreatitis. Folglich war es naheliegend nach Mutationen in den bekannten Trypsininhibitoren zu suchen. Der Serineprotease Inhibitor Kazal-Typ 1 (SPINK1) (OMIM 167790), auch als pankreatischer sekretorischer Trypsin-Inhibitor (PSTI) bezeichnet, ist ein spezifischer intrapankreatischer Trypsin Inhibitor (siehe Abb. 6). Er lässt sich in Pankreassekreten aller untersuchter Spezies nachweisen und wurde erstmalig 1948 von Kazal und Mitarbeitern isoliert. Erstmalig wurde das entsprechende Kandidatengen von Chen et al. in 14 Familien mit hereditärer chronischer Pankreatitis untersucht. Zwei Varianten im SPINK1 Allele wurden entdeckt: N34S und P55S. Jedoch wurden diese als nicht relevante Polymorphismen gewertet. Kurze Zeit später konnte dann aber Witt et al. bei 22 von 96 (23%) pädiatrischen Patienten mit chronischer idiopathischer Pankreatitis einen Zusammenhang von Veränderungen im SPINK1 Gen und dem Auftreten der Pankreatitis nachweisen (64). Insbesondere die N34S Mutation in Exon 3 dieses Gens ist von besonderem Interesse. 18 Patienten besaßen diese Mutation, die zu einem Austausch des Asparagin gegen Serin an Position 34 führte (N34S). Nur 6 Patienten waren homozygot für diese Veränderung. Es gab keine Unterschiede zwischen den homozygoten und heterozygoten Trägern bzgl. des Phänotyps. Zwischenzeitlich wurden diese Ergebnisse bestätigt und auch weitere Varianten entdeckt. Interessanterweise ist die N34S Mutation mit mehreren in den Introns lokalisierten Sequenz-Alterationen in kompletter Linkage verbunden, so dass die wirkliche funktionell

relevante Veränderung nicht klar ist. Auch noch nicht endgültig geklärt erscheint die Rolle der N34S Mutation bei der hereditären Pankreatitis. N34S wurde bei 5 von 55 Patienten und in einer weiteren Studie bei 2 von 108 Patienten mit hereditärer Pankreatitis nachgewiesen. In einem großen Kollektiv von Patienten mit idiopathischer Pankreatitis wurde sie in 68 von 413 Fällen nachgewiesen. Gemeinsam ist allen Studien, dass der Nachweis der N34S Mutation mit einer Manifestation der Pankreatitis überwiegend im Kindesalter bzw. bis zum 20 Lebensjahr assoziiert ist (65). Dies mag auch erklären, warum wir in unserer eigenen Studie nur eine Prävalenz von 1/20 Patienten gesehen haben, da die Erstmanifestation der Erkrankung in unserem Kollektiv zwischen dem 18. und 40. Lebensjahr lag (66). Wir fanden darüber hinaus eine bisher nicht beschriebene G->A Transition an Position 194, welches das letzte Nukleotid des Exon 3 darstellt. Dieses konnten wir bestätigen mit einer Restriktions Enzym Analyse, da hierdurch die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym HphI maskiert und gleichzeitig die Spaltung durch TspRI ermöglicht wird. Untersuchungen mit einer nested RT-PCR in der Rektumschleimhaut des betroffenen Patienten ergaben jedoch keinen Hinweis auf einen Splicing Defekt auf RNA Ebene.

Die N34S Mutation findet sich dagegen bei 1% innerhalb der Normalbevölkerung ohne Pankreaserkrankung und die erwartete Häufigkeit von homozygoten N34S Trägern liegt bei 1 / 40 000. Die bisherigen Daten lassen vermuten, dass etwa 10% aller Patienten mit idiopathischer chronischer Pankreatitis homozygote Träger von N34S sind. Unter der Annahme einer erwarteten Prävalenz der idiopathischen chronischen Pankreatitis von 1 / 16 000 (7) ergibt sich damit eine Penetration der N34S Homozygoten von 25%. Hierbei ist allerdings die Tatsache, dass es keinen Unterschied im Phänotyp zwischen homozygot und heterozygot gibt nicht berücksichtigt. Ein anderes Bild bietet die bisher nur einmalig von Witt et al. beschriebene M1T Mutation. Das Verteilungsmuster innerhalb der untersuchten Familie lässt auf eine autosomal dominante Erkrankung schließen (64). Zur Zeit wird noch kontrovers diskutiert inwieweit es sich bei SPINK1 Mutationen um eine autosomal rezessive, eine

polygenetische oder autosomal dominante Erkrankung handelt. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass verschiedene Mutationen in einem Gen zu unterschiedlichen funktionellen Veränderungen führen können. Das heißt, dass die Mutationen zu einer deutlich herabgesetzten antiproteolytischen Wirkung des SPINK1 Proteins (M1T) führen oder nur zu einer leicht reduzierten antiproteolytischen Wirkung (N34S). Eine ähnliche phänotypische Einteilung ist auch von Mutationen des CFTR Gens bekannt (siehe unten). Darüber hinaus scheinen weitere modifizierende Faktoren wie „Lifestile“ und das gleichzeitige Vorliegen weiterer genetischer Veränderungen eine Rolle zu spielen. So ist die Zahl der N34S Träger bei Patienten mit alkoholischer chronischer Pankreatitis auf 6% erhöht (67). Das Vorliegen einer compound Heterozygotie für Mutationen im CFTR Gen und der N34S Mutation ist mit einem deutlich erhöhtem Risiko für eine idiopathische Pankreatitis verbunden (siehe auch unten) (66;68).

Neue genetische Untersuchungen bei Patienten mit tropischer Pankreatitis ergaben den überraschenden Befund, dass 32 von 68 Patienten eine Mutation des SPINK1 Gen aufwiesen (69). PRSS1 Mutationen waren nicht vorhanden. Dieser hohe Anteil an SPINK Mutationen wurde in einer weiteren Studie bestätigt (70). Die tropische Pankreatitis wurde bisher als eine Sonderform der idiopathischen Pankreatitis, die nur in tropischen Regionen auftritt, klassifiziert (7). Aufgrund der jetzigen neuen Daten, die einen ähnlichen genetischen Hintergrund (N34S) von Patienten mit tropischer Pankreatitis und Patienten mit ‚idiopathischer’ Pankreatitis aus den westlichen Industrieländern zeigen, muß dieses sicherlich neu überdacht werden.

Mutationen des CFTR (Cystic Fibrosis Transmebrane Conductance Regulator) Gen

Die Mukoviszidose (Cystic fibrosis, CF) (OMIM 219700) ist die häufigste autosomal rezessive Erkrankung der weißen Bevölkerung. Etwa 4% der deutschen Bevölkerung sind

asymptomatische heterozygote Genträger und die Erkrankung kommt mit einer Häufigkeit von 1:2000 vor. Die Erkrankung wird hervorgerufen durch eine Mutation des CFTR Gens auf Chromosom 7 , welches ein Protein mit 1480 Aminosäuren kodiert, dass in der apikalen Membran der exokrinen Epithelzellen exprimiert wird. Das CFTR Protein funktioniert in erster Linie als cAMP induzierter Chloridkanal. Das klassische Bild der Mukoviszidose ist unter anderem mit einer exokrinen Pankreasinsuffizienz verbunden, die sich häufig bereits intrauterin manifestiert. Generell ist die Mukoviszidose die am häufigsten das Pankreas betreffende genetische Erkrankung. Eine Fehlfunktion des CFTR Proteins resultiert in einer Reduktion der Bicarbonat- und Chloridsekretion in den duktalen Zellen, welches sowohl zu einem erniedrigten Volumen als auch einer erhöhten Viskosität des Pankreassekretes führt (71). Darüber hinaus werden Veränderungen in der Endozytose und eine Imbalance der Membranlipidzusammensetzung als weitere relevante Faktoren in der CF assoziierten Pankreasschädigung diskutiert (72-74).

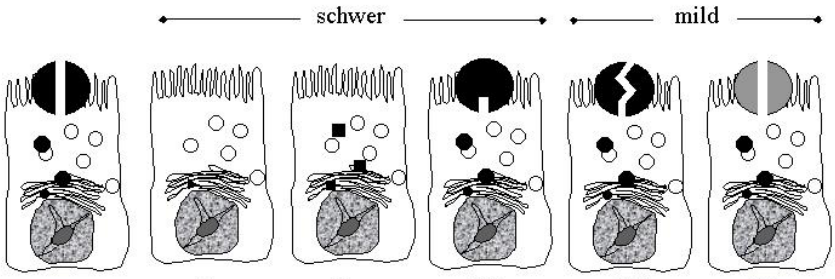

Abb. 7: Klassifikation der Mutationen im CFTR Gen nach deren funktionellen Bedeutung. In der Zeile Pankreasinsuffizienz ist der Prozentsatz der CFTR-Patienten mit Pankreasinsuffizienz angegeben, die eine der häufigen ‚schweren' (z.B. delta-F508) und eine zweite Mutation der jeweils entsprechenden Klasse haben (nach (52))

Seit der Entdeckung des CF-Gens 1989 sind bisher mehr als 1000 verschiedene Mutationen

beschrieben [aktuelle Liste unter www.genet.sickkids.on.ca/cftr]. Im deutschen Sprachraum sind ca. 72% der Patienten mit Mukoviszidose homozygot oder compound heterozygot für acht Mutationen des CFTR Gens: delta F508, G542X, R553X, W1282X, N1303K, 621+1G->T, 1717-1G->A und R117H. wobei allein die delta F508 Deletion in 66% der Fälle vorliegt. Die Mutationen in der Noncoding Sequenz des CFTR Gen in Intron 8 (5T, 7T und 9T Allele) sind mit einer Reduktion der normalen Messenger RNA für das CFTR Protein um 80% verbunden.

Es hat sich gezeigt, dass der Zusammenhang zwischen dem CFTR Genotyp und Phenotyp besonders am Pankreas ausgeprägt ist (75). CFTR Mutationen können in mindesten fünf Kategorien unterteilt werden, die sich aufgrund der molekularen Konsequenz der Mutation und der sich daraus ergebenden funktionellen Einschränkung definieren (Abb. 7) (52). Eine etwas vereinfachte Einteilung unterscheidet zwischen einer „schweren“ und „milden“ Mutation. Etwa 85% der Patienten mit Mukoviszidose leiden an einer exokrinen Pankreasinsuffizienz, während etwa 15% eine ausreichende exokrine Pankreasfunktion haben. Die Mehrzahl der CF-Patienten mit einer Pankreasinsuffizienz haben jeweils eine ‚schwere’ Mutationen auf beiden Allelen, während die Patienten mit einer ausreichenden Pankreasfunktion zumindest eine Mutation haben, die mit einer ‚milden’ Funktonseinschränkung des CFTR Poteins assoziiert ist.

Bereits 1978 beschrieben Bank et al. erniedrigte Konzentrationen von NaCl im Schweiß von einigen Patienten mit chronischer Pankreatitis und diskutierten, inwieweit es sich hierbei um eine atypische CF Erkrankung handeln könnte. Es sollte jedoch noch 20 Jahre dauern, bis diese Beobachtung wieder aufgegriffen wurde.

1998 wurden dann zeitgleich zwei Studien publiziert, die ein gehäuftes Vorkommen von CFTR Mutationen bei Patienten mit idiopathischer chronischer Pankreatitis beschrieben (76;77). Sharer et al. fanden in 18 von 134 Patienten mit chronischer Pankreatitis eine heterozygote CFTR Mutation (13%)(77), während Cohn et al. in 7 von 27 Patienten

mindestens eine CFTR Mutation (26%) und in 5 Patienten ein 5T Allele (19%) fanden (76). Seit September 1997 haben wir alle Patienten mit idiopathischer chronischer oder rezidivierender Pankreatitis in eine prospektive Studie aufgenommen um auf das Vorliegen von Mutationen im CFTR Gen zu untersuchen. Unsere Daten und auch zwischenzeitlich andere Studien bestätigten diese Ergebnisse und zeigen, dass bei ca. 30% der Patienten mit idiopathischer chronischer oder rezidivierender Pankreatitis mindestens ein abnormales CFTR Allele nachweisbar ist, im Gegensatz zu den 3-4 % in der kaukasischen Normalbevölkerung (52;78;79). Nicht ganz eindeutig sind die Daten zu der Rolle des 5T Allele. Diese scheinen zusammen mit compound heterozygoten Veränderungen eine Rolle spielen (80;81). Wie bereits oben erwähnt sind über 1000 Varianten im CFTR Gen bekannt. Die üblicherweise verwendeten und von den Fachgesellschaften für die Mukoviszidose empfohlenen Screening Mutationen beschränken sich aber nur auf die häufigen Mutationen (in der Regel 17 – 31 verschiedene Mutationen). Aufgrund der Größe des CFTR Genortes ist ein komplettes Screening extrem aufwendig. Unsere Daten und die anderer Gruppen suggerieren aber, dass bei den Patienten mit idiopathischer Pankreatitis auf dem Boden einer CFTR Mutation zumindestens auf einem Allele eine der weniger häufigen Mutationen der Klasse III – V vorliegt. Liegen zwei häufige Mutationen der Klasse I-II vor, so kommt es zu dem klassischen Bild der Mukoviszidose kombiniert mit einer Pankreasinsuffizienz . Dieses macht deutlich, dass mit den üblichen kommerziellen Screening Sets eine zu niedrige Detektionsrate zu erwarten ist. Eine Zusammenstellung der publizierten Daten zeigt, dass in 18% der Patienten mit idiopathischer chronischer Pankreatitis, die mit einem Routinescreening untersucht wurden, ein Nachweis einer CFTR Mutation auf mindesten einem Allele gelingt. In unserer Arbeit konnten wir durch Ausweitung des Panel an CFTR Mutationen, welche wir untersuchten, die Sensitivität erhöhen (78). Eine kürzlich erschienene Arbeit, in der das gesamte CFTR Gen bei Patienten mit ‚idiopathischer' Pankreatitis untersucht wurde, bestätigte unsere Beobachtung, dass in der Regel eine compound Heterozygotie für eine

leichte und eine schwere Mutation vorliegt (68). Eltern von an Mukovizidose erkrankten Kindern sind Träger eines abnormales CFTR Allel, haben aber kein erhöhtes Risiko für Pankreaserkrankungen. Diese Beobachtung bestätigt letztendlich auf anderer Weise, dass beide Allele betroffen sein müssen um das Risiko für eine Pankreatitis zu erhöhen (82). Über die Genetik hinaus hat man versucht Patienten mit abnormalem CFTR Allel und einer Pankreatitis funktionell zu charakterisieren. Die Arbeitsgruppe um Cohn beobachtete einen reduzierten CFTR vermittelten in vivo Ionen Transport in der Nasenschleimhaut bei den Patienten mit CFTR Mutationen (Nasenpotential Messung) (68). Unsere Ergebnisse aus in vitro Versuchen an Biopsien aus der Rektumschleimhaut in einer Ussing Kammer ließen dagegen keine Diskriminierung zwischen Patienten mit chronischer Pankreatitis und nachgewiesener CFTR Mutationen gegenüber Kontrollen zu. Die Ussing Kammer Methode wurde von uns gewählt, da für die Messung in der Ussing Kammer eine höhere Sensitivtät zum Nachweis von Störungen des Chloridtransportes bei CFTR Patienten beschrieben wurde (83). Eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse ergibt sich aus neueren Beobachtungen, worin die funktionellen Veränderungen, die durch CFTR Mutationen hervorgerufen werden, unterschiedliche Ausprägung in Abhängigkeit des jeweils untersuchten Organs haben können (84).

Liegt eine sogenannte ‚milde' CFTR Mutation vor, so ist eine 5 – 25% Restfunktion des CFTR Proteins erhalten, die einerseits für die suffiziente Pankreasfunktion ausreicht, andererseits es aber auch ermöglicht, dass sich eine Pankreatitis entwickeln kann. Eine Einschränkung der CFTR Funktion scheint auch zu anderen Erkrankungen ausserhalb des Pankreas – insbesondere Lungenerkrankungen wie z.B. den Bronchiekatsien und dem Asthma - zu prädisponieren (Abb. 9) (79).

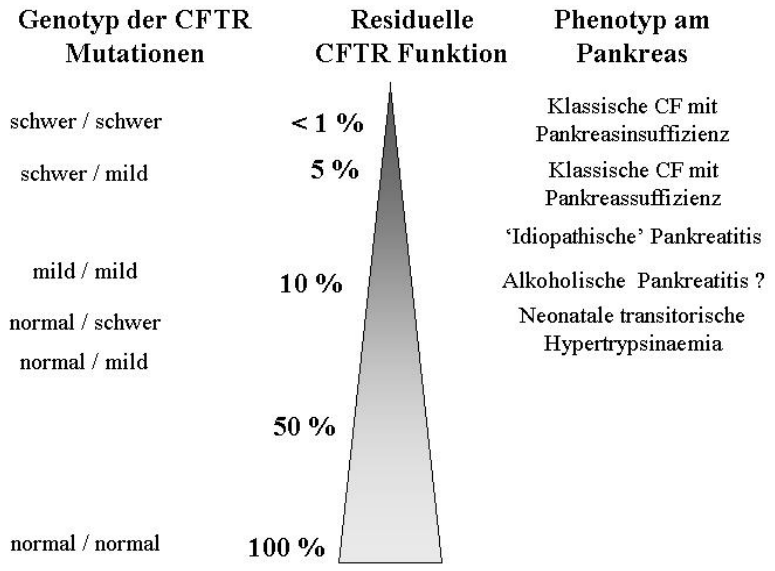

Abb. 8: Beziehung zwischen CFTR Genotyp, residualer CFTR Funktion und Phänotyp.

Alkohol wurde mehrfach diskutiert als ein den Phänotyp modifizierender Lifestile-Faktor bei Vorliegen einer CFTR assoziierten chronischen Pankreatitis. In den bisher vier publizierten Studien an insgesamt 217 Patienten mit alkoholischer Pankreatitis konnte keine erhöhte Frequenz von CFTR Mutationen nachgewiesen werden (4%) (79). Allerdings wurden hier auch nur die häufigen Mutationen untersucht, so dass eine zu erwartende niedrige Sensitivität eine mögliche Fehlerquelle darstellt (siehe oben). CFTR Mutationen führen zu Veränderungen in den duktalen Zellen des Pankreas, während PRSS1 und SPINK1 Mutationen mit einer azinären Zellschädigung verbunden sind. Daher ist zu erwarten, dass es bei gleichzeitigem Vorliegen einer dieser Mutationen zu einer synergistischen Risikoerhöhung für eine Pankreatitis kommt. Wir beobachteten in unserem Kollektiv bei 1/20 Patienten eine CFTR Mutation und eine Variante des SPINK1 Gens (erwartetet: ca. 1/16400). Eine Risikokalkulation ist aufgrund der Fallzahl nicht möglich. Aus der Arbeit von Noone et al. lassen sich folgende Zahlen extrahieren: Das Risiko eine Pankreatitis zu entwickeln steigt um das 40-fache, wenn zwei CFTR Mutationen vorliegen; um das 20-fache, wenn eine N34S Mutation vorliegt; und um das 900-fache, wenn sowohl eine compound

Heterozygotie für CFTR als auch eine N34S Mutation vorliegt (68). Eine compound Heterozygotie für PRSS1 und CFTR Mutationen sind nach unseren Ergebenissen nicht relevant und wurden durch nachfolgende Arbeiten bestätigt (78; 85; 86).

Gen – Umwelt Interaktionen als Risikofaktoren für Pankreaserkrankungen

Alkoholabusus und Rauchen sind gesicherte Risikofaktoren für eine akute bzw. für eine chronische Pankreatitis (14; 87;88,89). Zugleich ist das Rauchen ein wesentlicher Risikofaktor für das Entstehen eines Pankreaskarzinoms (3;14;88;90). Weitere Risikofaktoren für ein Pankreaskarzinom sind eine energie- und fleischreiche Ernährung, sowie eine berufliche Tätigkeit als Chemiearbeiter, Friseur oder Reinigungskraft (90-93). Allen diesen Risikofaktoren ist gemeinsam, dass sie zu einer vermehrten Exposition gegenüber heterozyklischen Aminen führen, welche ein bekanntes zytotoxisches und genotoxisches Potential haben. So enthält der Zigarettenrauch bis zu 30 verschiedene aromatische Amine, einschließlich verschiedener Benzpyrene (94). Zusätzlich führt das Rauchen zu einem vermehrten oxidativen Stress, welcher wie oben bereits erwähnt, eine Rolle in der Pathogenese der akuten wie auch chronischen Pankreatitis spielt.
In einer Studie an 45 000 Zwillingspaaren aus einem skandinavischen Register untersuchten Lichtenstein et al. den Einfluß von genetischen und Umweltfaktoren auf die Entstehung von Tumoren. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass bis zu 36% der Pankreaskarzinome auf eine genetische Prädisposition zurückzuführen seien (95). Zurückhaltendere Schätzungen gehen von 10% aus (96).

Bei der Bewertung einer genetischen Prädisposition ist zu unterscheiden zwischen genetischen Veränderungen mit hoher und niedriger Penetration. Bei Patienten mit einer positiven Familienanmnese für ein Pankreraskarzinom liegt häufig eine genetische Veränderung mit hoher Penetration vor, welche im allgemeinen Tumor Suppressor Gene

betreffen. In einigen Fällen von familiärem Pankreaskarzinom wurden Mutationen in p16, p53, APC und BRCA2 identifiziert (96). In diesen Fällen ist der Umwelteinfluss nicht entscheidend.

Es finden sich jedoch auch Hinweise, dass genetische Prädispositionen mit niedriger Penetration, die relativ häufig in der Gesamtpopulation vorkommen, eine Rolle spielen in der Entwicklung von Pankreaserkrankungen. Diese genetischen Veränderungen erhöhen die Suszeptibilität für eine Entzündung oder ein Malignom bei gleichzeitiger Präsenz von zusätzlichen Umwelteinflüssen oder gleichzeitig vorliegenden anderen genetischen Risikofaktoren.

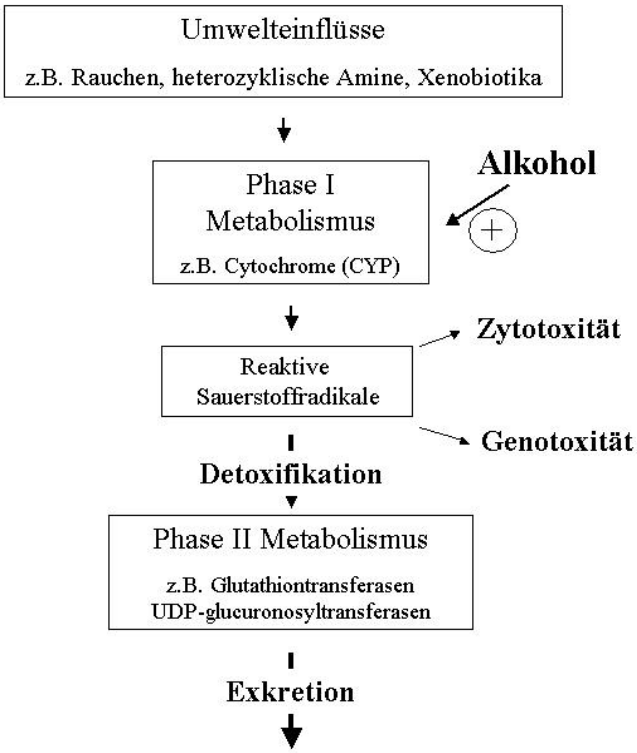

Abb. 9: Rolle der Phase I und Phase II Enzyme in der Zellprotektion.

Diese Gene sind in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen einschließlich dem Metabolismus von Karzinogenen, DNA Reparatur, Xenobiotika Transport, Inflammation, oxidativen Stress, Zellwachstum und Zellzyklusregulation involviert.

Uns hat in diesem Zusammenhang insbesondere der Xenobiotikametabolismus und der

Schutz vor oxidativem Stress interessiert. Der zelluläre Xenobiotikametabolismus erfolgt in zwei Phasen (siehe Abb. 9). Phase I führt durch oxidative Bioaktivierung der Substrate zu reaktiven zyto- und genotoxischen Metaboliten (z.B. freie Sauerstoffradikale). Dieses wird überwiegend durch die Monooxygenaseaktivität der Cytochrom P450 Proteine katalysiert. Phase II nutzt dagegen reaktive Oxidationsprodukte als Substrate für Konjugationsreaktionen, die zu ihrer Inaktivierung und wasserlöslichen Eliminierung führen (97). Hier spielen Glukuronidierungsreaktionen eine quantitative und qualitativ entscheidende Rolle. Im Pankreas finden sich sowohl Phase I (Cytochrome, CYP) als auch Phase II Enzyme (98;99). Im Tierversuch führt Alkohol zu einer verstärkten Induktion und Aktivität von CYP-2E1 und CYP-1A1 (100). Eine Induktion und erhöhte Aktivität der Phase I Enzyme wie CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6 und CYP2D6 im Pankreasgewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis gegenüber gesundem Pankreas wurde nachgewiesen (101-103). Im Gegensatz dazu fand sich in den Azinuszellen keine Erhöhung des Phase II Enzyms der Glutathiontransfersase (99). Besteht aber ein Ungleichgewicht zwischen der Phase I Aktivität und protektiver Phase II Detoxifikation, entstehen vermehrt freie Sauerstoffradikale (oxidativer Stress), die zytotoxisch und genotoxisch wirken (Abb. 9).
Die bekannten Risikofaktoren wie Alkohol und Nikotin für entzündliche Pankreaserkrankungen, als auch Nikotin und heterozyklische Amine als Risikofaktoren für das Pankreaskarzinom, werden jeweils gänzlich oder zum Teil über den Phase I und Phase II Xenobiotika Stoffwechsel metabolisiert oder führen zu einer Induktion der aktivierenden Phase I im Pankreasgewebe. Daher erscheinen genetische Veränderungen, die diesen Xenobiotika Metabolismus beeinflussen, besonders attraktiv als Erklärung für eine erhöhte Suszeptibilität von Patienten gegenüber Pankreaserkrankungen. Insbesondere, wenn die entsprechenden exogen Risikofaktoren vorliegen. Neben einer reduzierten protektiven Aktivität des Phase II Stoffwechsels direkt am Ort der Schädigung (Pankreasgewebe) besteht auch die Möglichkeit, dass am Ort des Eintritts der schädigen Substanzen in den Organismus

die Schutzmechanismen versagen und es somit zu erhöhten systemischen Konzentrationen von z.B. freien Radikalen kommt. Das Epithel des oberen Gastrointestinaltraktes und das Lungenepithel stellen die Strukturen dar, welche der höchsten Konzentration von exogenen mit der Nahrung oder über die Atemluft aufgenommenen Karzinogen ausgesetzt ist. Bisherige Ergebnisse der Studien, die sowohl Polymorphismen der Phase I Enzyme als auch Polymorphismen der Phase II Enzyme bei Patienten mit chronischer Pankreatitis als auch Pankreaskarzinom untersuchten, fanden widersprüchliche Ergebnisse (siehe Übersicht bei (96)). Untersucht wurden die Phase I Enzyme CYP1A1, Cyp2E1, CypP2D6, als auch die Phase II Enzyme Gluthationtransferasen (GSTM1), NAD(P)H:quinon-oxidoreduktase 1(NQO1) und N-acetyltransferase 1 und 2 (NAT-1 und –2) (96;104).

Eine bisher nicht untersuchte und nur wenig charakterisierte Superfamilie der Phase II Enzyme sind die Uridindiphosphat-5'-Glukuronosyltransferasen (UGT). Die extrahepatische Bedeutung dieses wichtigen Stoffwechsel- und Entgiftungssystems des Körpers wurde erst in den letzten Jahren erkannt (105). UGT-Proteine sind in der inneren Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert und katalysieren dort die Konjugation von hydrophoben Substraten mit Glukuronsäure unter Verwendung von Hydroxy- (-OH), Amino- (-NH2), Sulfhydryl- (-SH) oder Karboxyl- (-COOH) Gruppen. Beim Menschen sind bisher 17 Isoformen kloniert und charakterisiert. Auf der Basis der Sequenzhomologien werden zwei Familien, UGT1 und UGT2, unterschieden. UGT2 verstoffwechselt bevorzugt als Substrate Steroidhormone und Gallensäure und zeigt damit eine Präferenz für endobiotische Verbindungen.

UGT1A nimmt eine Schlüsselrolle in der Entgiftung von Xenobiotika wie z.B. die durch Verbrennungsgase, Tabakrauch und durch gebratene Nahrung aufgenommene polyzyklischen, aromatischen Kohlenwasserstoffe ein. Der UGT1A Genort auf Chromosom 2q37 ist durch eine Serie divergenter Exon 1-Kassetten an seinem 5'- Ende charakterisiert (106). Dieses ermöglicht die potentielle Kodierung von 12 Isoformen. In diesem Zusammenhang ist

bemerkenswert, dass in den letzten Jahren eine organspezifische Expression der verschiedenen Isoformen in den extrahepatischen, epithelialen Geweben wie Lunge, Ösophagus, Magen, Gallenwegen und Kolon nachgewiesen wurde (105;107-109). Unklar ist jedoch noch die Expression der verschiedenen Isoformen im oberen Gastrointestinaltrakt und im menschlichen Pankreas. Wir haben erstmalig im Pankreasgewebe als auch in den einzelnen Abschnitten des oberen Gastrointestinal-Traktes die Expression der einzelnen UGT1A Isoformen untersucht (110; 111). Im Gegensatz zu den bisher untersuchten intestinalen UGT1A7 Expressionsprofilen (106;109) finden sich im Pankreasgewebe fast ausschließlich Transkripte für UGT1A7. Neben dem UGT1A7 fanden sich nur UGT1A3 und UGT1A4 in geringer Ausprägung, welche nur eine geringe katalytische Aktivität gegenüber komplexen Phenolen und heterozyklischen Aminen haben (106;112). Wie wir u.a. zeigen konnten wird UGT1A7 auch in der Schleimhaut der Mundhöhle, des Ösophagus (110), der Lunge (113) und in der Magenschleimhaut (110;114) exprimiert. Die Dominanz des UGT1A7 im Pankreasgewebe und die Expression in den Schleimhäuten des oberen Gastrointestinaltraktes machen es als ein potentielles Kandidatengen für entzündliche und maligne Pankreaserkrankungen attraktiv.

Abb. 10: Abb. 11: Polymorphismen im UGT1A7 Gen (nach (115)).

In vitro Experimente konnten zeigen, dass UGT1A7 insbesondere die Detoxifizierung von aromatischen Hydrokarbonen und heterozyklischen Aminen (wie z.B. Benzpyren Metabolite, 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazol[4,5-ß]pyridine (PhiP)) – wie sie im Zigarettenrauch

oder bei der Zubereitung von Fleisch entstehen - katalysiert (siehe Tabelle 1)(115).

Die weitere genetische Analyse des UGT1A7 Gens in einer großen Anzahl von Patienten identifizierte 3 Aminosäurenaustausche, die drei Polymorphism des UGT1A7 Allele definieren (UGT1a7*2, UGT1A/*3, UGT1A7*4) (siehe Abbildung). Die simultane Kombination dreier Missensemutationen (N129K, R131K, W208R) auf einem Allele definiert UGT1A7*3 und führt zu einer signifikanten Reduktion der katalytischen Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten (Tabelle 1) (115) (113).

In diesen Untersuchungen haben wir Patienten mit alkoholischer chronischer Pankreatitis und als krankheitsspezifische Kontrollgruppen Patienten mit einer Pankreatitis auf dem Boden einer SPINK 1 Mutation (siehe oben) oder einer idiopathischen Pankreatitis eingeschlossen. Beide Gruppen wurden zu einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Neben der Frage nach der Zytotoxität stellt sich die Frage nach der Genotoxität. Daher haben wir zusätzlich Patienten mit einem Pankreaskarzinom in diese Studie mit aufgenommen. Es zeigte sich, dass die Patienten mit einem UGT1A7*3 Polymorphismus ein erhöhtes Risiko haben eine chronische alkoholische Pankreatitis (ODDS Ratio: 2,0; 95% CI [1,4 – 3,1]) oder ein Pankreaskarzinom (ODDS Ratio: 1,98; 95% CI [1,2 – 3,1]) zu entwickeln. Patienten mit einer idiopathischen Pankreatitis oder einem genetischen Hintergrund (N34S Mutation, CFTR Mutationen) einer chronischen Pankreatitis unterschieden sich dagegen nicht signifikant von der Kontrollgruppe. UGT1A7*3 prädisponiert zum Entstehen einer Pankreaserkrankung, wenn eine zusätzliche exogene toxische Belastung vorliegt. Neben dem Alkohol muß hier der parallel einhergehende Nikotinabusus (89% in unserem Kollektiv) in Betracht gezogen werden. Das Vorliegen der UGT1A7*3 Allele war besonders stark mit einem frühen Auftreten (< 55 Lebensjahr) eines Pankreaskarzinom assoziiert (ODDS Ratio: 4,7; 95% CI [1,9 – 11,8]), wobei hier alle Patienten mit der Erstmanifestation des Pankreaskarzinomes vor dem 55 Lebensjahr Raucher waren. Dieses bestätigt den negativen synergistischen Effekt von Nikotinabusus und Vorliegen eines UGT1A7*3 Polymorphismus, welches ein Protein mit

niedriger katalytischer Entgiftungsaktivität kodiert. Darüber hinaus unterstützen diese Daten indirekt die Rolle des oxidativen Stress in der Genese von Pankreaserkrankungen (siehe oben).

Tabelle 1: Mittlere katalytische Aktivität des Wildtypes und der bekannten drei Polymorphismen im UGT1A7 Gens nach rekombinanter Expression in einem eukaryotischen Zellsystem. Nach (115).

Substrate	UGT1A7*1 Wildtyp	UGT1A7*4 W208R	UGT1A7*2 N129K /R131K	UGT1A7*3 N129K/R131K /W208R
1-Nitrophenol	1773(615)	32 (23)	13 (2)	Nd
1-Naphthol	592 (100)	36 (16)	nd	Nd
4-Methylumbelliferon	12110 (361)	191 (136)	13 (2)	Nd
4-tert-Butylphenol	121 (2)	nd	12 (0.2)	nd
7-Hydroxybenzo(a)pyren	1263 (20)	51 (10)	14 (0.5)	nd
8-Hydroxybenzo(a)pyren	98 (6)	nd	12 (1)	nd
7–8-Hydroxybenzo(a)pyren	79 (7)	nd	15 (1)	nd
9-Hydroxybenzo(a)pyren	198 (15)	nd	16 (3)	nd
PhIP	48 (4)	nd	17 (5)	nd

PhIP, amino-1-methyl-6-phenylimidazo-(4.5-b)-pyridin (PhIP); angegeben sind Mittelwerte (Standardabweichung).

Weiterhin konnten wir zeigen, dass die UGT's und insbesondere das UGT1A7 in dem Epithel des Rachenraums, des Ösophagus und dem Magen exprimiert wird (110). Das Vorliegen des UGT1A7*3 Polymorphismus mit der damit verbundenen reduzierten Detoxifikationskapazität führt daher nicht nur im Pankreasgewebe zu einer erhöhten Konzentration von potentiell toxischen Substanzen (z.B. freie Radikale), sondern bereits die mukosale Detoxifikation ist eingeschränkt. UGT1A7*3 ist mit einem erhöhtem Risiko für das Entstehen von Tumoren in eben diesen Bereichen, der Leber, dem Kolon, als auch in der Lunge assoziiert (110)

(113;115;116). Dies bestätigt die protektive Bedeutung dieses Enzymsystems. Es handelt sich bei dem UGT1A7*3 Polymorphismus also um eine genetische Prädisposition zu malignen Erkrankungen in verschiedenen Organen, wobei im Falle von Pankreaserkrankungen negative synergistische Effekt durch eine reduzierte Detoxifikationskapazität sowohl am ‚point of entry' als auch im Zielgewebe selber auftreten. Es ist anzunehmen, dass durch die weitere genetische Charakterisierung von Phase I und Phase II Enzymen es möglich sein wird Risikoprofile für verschiedene Krankheitsbilder zu entwickeln. Damit sollte eine bessere Überwachung von Risikogruppen und eine gezieltere Prävention von Erkrankungen zu möglich sein.

Zusammenfassung

Wir konnten zeigen, dass chronisch entzündliche Erkrankungen des Pankreas gekennzeichnet sind durch systemische Veränderungen des Immunsystems mit Aktivierung der zellulären Immunantwort. Hierbei findet sich kein Unterschied hinsichtlich der zugrundeliegenden Aetiologie der chronischen Pankreatitis. Abzugrenzen ist diese reaktive Veränderung von dem Bild der erst kürzlich definierten Autoimmunpankreatitis, die eine eigene Entität darstellt.

Mit der Entdeckung der der hereditären Pankreatitis zugrundeliegenden Mutationen im kationischen Trypsinogen Gen hat sich ein neues faszinierendes Kapitel in der Pankreasforschung eröffnet. Wir konnten hier eine neue Mutation im Aktivierungspeptid identifizieren (D22G). Experimentelle funktionelle Daten an entsprechend der K23R und D22G Mutation veränderten synthetischen Peptiden ergaben Hinweise auf eine gegenüber dem Wildtyp Peptiden verstärkten Aktivierung des Trypsins. Andere genetische Veränderungen im kationischen Trypsinogen Gen führen zu einer reduzierten Inaktivierung des intraazinären Trypsin (N29, R122).

Ausserhalb der familiären Pankreatitis sind Mutationen des CFTR Gens oder des SPINK1

Gens in unserem Patientengut mit idiopathischer Pankreatitis mit der Entwicklung einer entzündlichen Pankreaserkrankung assoziiert. Insbesondere die CFTR Mutationen, die nur zu einer eingeschränkten Funktion (5-25%) des CFTR Proteins führen, sind mit einer Pankreatitis verbunden. Im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen finden sich diese Veränderungen bei ca. einem Drittel der Patienten mit sogenannter ‚idiopathischer Pankreatitis'. Aber auch bei der alkoholischen Pankreatitis und dem Pankreaskarzinom spielt der genetische Hintergrund eine Rolle. Unsere Daten zeigen erst mal einen negativen synergistischen Effekt von Alkohol- und Nikotinabusus und dem Vorliegen von Polymorphismen im UGT1A7*3 Gen, welches für ein Protein mit niedriger katalytischer Entgiftungsaktivität des Phase II Enzyms kodiert. Die erniedrigte UGT1A7 Aktivität führt unter anderem zu einer Akkumulation von freien Radikalen und damit zu vermehrtem oxidativem Streß. Damit bestätigen unsere Daten indirekt die bisher bekannten experimentiellen Daten, dass der oxidative Streß eine tragende Rolle sowohl im Verlauf einer akuten als auch chronischen Pankreatitis spielt. Die positiven Ergebnisse einer eigenen prospektiven randomisierten Studie mit einer antioxidativ und immunmodulierend wirkenden parenteralen Glutaminsubstitution bei Patienten mit akuter Pankreatitis bekräftigen dieses Beobachtung und zeigt einen neuen therapeutischen Ansatz auf.

Die zunehmende Kenntnis der genetischen und pathophysiologischen Zusammenhänge der Pankreaserkrankungen werden hoffentlich in Zukunft neben einer besseren Diagnostik auch zu einer verbesserten Therapie dieser Patienten führen.

Literaturverzeichnis

1. Chiari H. Über Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. Z.Heilkd. 1896;17:69-96.
2. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. Nat.Genet. 1996;14:141-5.
3. DiMagno, E. P., Reber, H. A., and Tempero, M. A. AGA Technical Review on the Epidemiology, Diagnosis and Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Gastroenterology 117(6), 1464-1484. 1999.
4. Gullo L, Migliori M, Olah A et al. Acute pancreatitis in five European countries: etiology and mortality. Pancreas 2002;24:223-7.
5. Lankisch P, Assmus C, Maisonneuve P, Lowenfels A. Die Epidemiologie von Pankreaserkrankungen in Deutschland. Z.Gastroenterol. 2002;39:653.
6. Lankisch PG, Burchard-Reckert S, Petersen M et al. Morbidity and mortality in 602 patients with acute pancreatitis seen between the years 1980-1994. Z.Gastroenterol. 1996;34:371-7.
7. Etemad B, Whitcomb DC. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. Gastroenterology 2001;120:682-707.
8. DiMagno EP. Gene mutations and idiopathic chronic pancreatitis: clinical implications and testing. Gastroenterology 2001;121:1508-12.
9. Durbec JP, Sarles H. Multicenter survey of the etiology of pancreatic diseases. Relationship between the relative risk of developing chronic pancreaitis and alcohol, protein and lipid consumption. Digestion 1978;18:337-50.
10. Gumaste VV. Alcoholic pancreatitis: unraveling the mystery. Gastroenterology 1995;108:297-9.
11. Ockenga J, Vogel A, Teich N, Keim V, Manns MP, Strassburg CP. UDP glucuronosyltransferase (UGT1A7) gene polymorphisms increase the risk of chronic pancreatitis and pancreatic cancer. Gastroenterology. 2003 Jun;124(7):1802-8.
12. Bourliere M, Barthet M, Berthezene P, Durbec JP, Sarles H. Is tobacco a risk factor for chronic pancreatitis and alcoholic cirrhosis? Gut 1991;32:1392-5.
13. Lin Y, Tamakoshi A, Hayakawa T, Ogawa M, Ohno Y. Cigarette smoking as a risk factor for chronic pancreatitis: a case- control study in Japan. Research Committee on Intractable Pancreatic Diseases. Pancreas 2000;21:109-14.

14. Talamini G, Bassi C, Falconi M et al. Alcohol and smoking as risk factors in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. Dig.Dis.Sci. 1999;44:1303-11.

15. Wallig MA, Gould DH, Fettman MJ. Selective pancreato-toxicity in the rat induced by the naturally occurring plant nitrile 1-cyano-2-hydroxy-3-butene. Food Chem.Toxicol. 1988;26:137-47.

16. Wallig MA. Xenobiotic metabolism, oxidant stress and chronic pancreatitis. Focus on glutathione. Digestion 1998;59 Suppl 4:13-24.

17. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. Nat.Genet. 1996;14:141-5.

18. Rinderknecht H. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. Dig.Dis.Sci. 1986;31:314-21.

19. Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B et al. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. J.Clin.Invest 2000;106:773-81.

20. Halangk W, Kruger B, Ruthenburger M et al. Trypsin activity is not involved in premature, intrapancreatic trypsinogen activation. Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol 2002;282:G367-G374.

21. Lerch MM, Halangk W, Kruger B. The role of cysteine proteases in intracellular pancreatic serine protease activation. Adv.Exp.Med.Biol. 2000;477:403-11.:403-11.

22. Teich N, Bodeker H, Keim V. Cathepsin B cleavage of the trypsinogen activation peptide. BMC.Gastroenterol. 2002;2:16.

23. Kukor Z, Mayerle J, Kruger B et al. Presence of cathepsin B in the human pancreatic secretory pathway and its role in trypsinogen activation during hereditary pancreatitis. J.Biol.Chem. 2002;277:21389-96.

24. Lerch MM, Gorelick FS. Early trypsinogen activation in acute pancreatitis. Med.Clin.North Am. 2000;84:549-63, viii.

25. Rau B, Poch B, Gansauge F et al. Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage? Ann.Surg. 2000;231:352-60.

26. Schoenberg MH, Birk D, Beger HG. Oxidative stress in acute and chronic pancreatitis. Am.J.Clin.Nutr. 1995;62:1306S-14S.

27. Aw, TY. Molecular und cellular response to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. Am.J.Clin.Nutr. 70, 557-565. 1999.

28. Chen X, Ji B, Han B, Ernst SA, Simeone D, Logsdon CD. NF-kappaB activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. Gastroenterology 2002;122:448-57.

29. Matilla B, Ortiz J, Gonzalez P et al. Effects of parenteral nutrition supplemented with glutamine or glutamine dipeptides on liver antioxidant and detoxication systems in rats. Nutrition 2000;16:125-8.

30. Wernerman J, Hammarqvist F. Modulation of endogenous glutathione availability. Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care 1999;2:487-92.

31. Ockenga J, Borchert K, Rifai K, Manns M, BISCHOFF S. Effect of glutamine-enriched total parenteral nutrition in patients with acute pancreatitis. Clin.Nutr. 2002;21:409.

32. Jalleh RP, Gilbertson JA, Williamson RC, Slater SD, Foster CS. Expression of major histocompatibility antigens in human chronic pancreatitis. Gut 1993;34:1452-7.

33. Slater S, Jalleh R, Gilbertson J, Lampert I, Williamson R, Foster CS. Expression of heat shock proteins in chronic pancreatitis: protective or pathogenic roles? Lab Invest 1997;76:533-45.

34. Layer P, DiMagno EP. Early and late onset in idiopathic and alcoholic chronic pancreatitis. Different clinical courses. Surg.Clin.North Am. 1999;79:847-60.

35. Ammann RW. The natural history of alcoholic chronic pancreatitis. Intern.Med. 2001;40:368-75.

36. Ammann RW, Heitz PU, Kloppel G. Course of alcoholic chronic pancreatitis: a prospective clinicomorphological long-term study. Gastroenterology 1996;111:224-31.

37. Hunger RE, Mueller C, Z'graggen K, Friess H, Buchler MW. Cytotoxic cells are activated in cellular infiltrates of alcoholic chronic pancreatitis. Gastroenterology 1997;112:1656-63.

38. Friess H, Buchler MW, Mueller C, Malfertheiner P. Immunopathogenesis of chronic pancreatitis. Gastroenterology 1998;115:1018-22.

39. Ebert MP, Ademmer K, Muller-Ostermeyer F et al. CD8+CD103+ T cells analogous to intestinal intraepithelial lymphocytes infiltrate the pancreas in chronic pancreatitis. Am.J.Gastroenterol. 1998;93:2141-7.

40. Kontiainen S, Scheinin T, Halme L. Number of activated T-helper cells and NK cells in peripheral blood is decreased in severe Crohn's disease. APMIS 1996;104:355-61.

41. Yamada T, Hashimoto T, Sogawa M et al. Role of T cells in development of chronic pancreatitis in male Wistar Bonn/Kobori rats: effects of tacrolimus. Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol 2001;281:G1397-G1404.

42. Ockenga J, Jacobs R, Kemper A, Benschop RJ, Schmidt RE, Manns MP. Lymphocyte subsets and cellular immunity in patients with chronic pancreatitis. Digestion 2000;62:14-21.

43. Ockenga J, Grabowski J, Martin M, Bischoff SC, Gebel M, Manns MP. Transforming Growth Factor-beta and soluble Tumor-Necrosis-Factor-P75 in chronic Pancreatitis. Gastroenterology 1997;112:A469.

44. Sarles H, Sarles JC, Camatte R et al. Observations on 205 confirmed cases of acute pancreatitis, recurring pancreatitis, and chronic pancreatitis. Gut 1965;6:545-59.

45. Okazaki K, Chiba T. Autoimmune related pancreatitis. Gut 2002;51:1-4.

46. Haber PS, Keogh GW, Apte MV et al. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. Am.J.Pathol. 1999;155:1087-95.

47. Bachem MG, Schmidt-Kostsas A, Gross.H.J. et al. Pancreatic stellate cells and their role in human pancreatic fibrogenesis. In: Büchler MW, Friess H, Uhl W, Malfertheiner P, eds. Chronic Pancreatitis. Berlin: Blackwell 2002:134-47.

48. Apte MV, Phillips PA, Fahmy RG et al. Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. Gastroenterology 2000;118:780-94.

49. Comfort, M. W. and Steinberg, A. G. Pedegree of a family with hereditary pancreatitis. Gastroenterology 21, 54-63. 1952.

50. Whitcomb DC, Preston RA, Aston CE et al. A gene for hereditary pancreatitis maps to chromosome 7q35. Gastroenterology 1996;110:1975-80.

51. Keim V, Bauer N, Teich N, Simon P, Lerch MM, Mossner J. Clinical characterization of patients with hereditary pancreatitis and mutations in the cationic trypsinogen gene. Am.J.Med. 2001;111:622-6.

52. Teich N, Ockenga J, Keim V, Mossner J. Genetic risk factors in chronic pancreatitis. J.Gastroenterol. 2002;37:1-9.

53. Teich N, Ockenga J, Hoffmeister A, Manns M, Mossner J, Keim V. Chronic pancreatitis associated with an activation peptide mutation that facilitates trypsin activation. Gastroenterology 2000;119:461-5.

54. Witt H, Luck W, Becker M. A signal peptide cleavage site mutation in the cationic trypsinogen gene is strongly associated with chronic pancreatitis. Gastroenterology 1999;117:7-10.

55. Ferec C, Raguenes O, Salomon R et al. Mutations in the cationic trypsinogen gene and evidence for genetic heterogeneity in hereditary pancreatitis. J.Med.Genet. 1999;36:228-32.

56. Kukor Z, Mayerle J, Kruger B et al. Presence of cathepsin B in the human pancreatic secretory pathway and its role in trypsinogen activation during hereditary pancreatitis. J.Biol.Chem. 2002;277:21389-96.

57. Sahin-Toth M. Human cationic trypsinogen. Role of Asn-21 in zymogen activation and implications in hereditary pancreatitis. J.Biol Chem. 2000;275:22750-5.

58. Sahin-Toth M. The pathobiochemistry of hereditary pancreatitis: studies on recombinant human cationic trypsinogen. Pancreatology. 2001;1:461-5.

59. Simon P, Weiss FU, Sahin-Toth M et al. Hereditary pancreatitis caused by a novel PRSS1 mutation (Arg-122 --> Cys) that alters autoactivation and autodegradation of cationic trypsinogen. J.Biol.Chem. 2002;277:5404-10.

60. Teich N, Bauer N, Mossner J, Keim V. Mutational screening of patients with nonalcoholic chronic pancreatitis: identification of further trypsinogen variants. Am.J.Gastroenterol. 2002;97:341-6.

61. Keim V, Hoffmeister A, Teich N et al. The pancreatitis-associated protein in hereditary and chronic alcoholic pancreatitis. Pancreas 1999;19:248-54.

62. Chen JM, Audrezet MP, Mercier B, Quere I, Ferec C. Exclusion of anionic trypsinogen and mesotrypsinogen involvement in hereditary pancreatitis without cationic trypsinogen gene mutations. Scand.J.Gastroenterol. 1999;34:831-2.

63. Matozaki T, Sakamoto C, Suzuki T et al. Idiopathic chronic calcifying pancreatitis with diabetes mellitus. Analysis of pancreatic stone protein gene. Dig.Dis.Sci. 1993;38:963-7.

64. Witt H, Luck W, Hennies HC et al. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. Nat.Genet. 2000;25:213-6.

65. Pfutzer RH, Barmada MM, Brunskill AP et al. SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. Gastroenterology 2000;119:615-23.

66. Ockenga J, Dork T, Stuhrmann M. Low prevalence of SPINK1 gene mutations in adult patients with chronic idiopathic pancreatitis. J.Med.Genet. 2001;38:243-4.

67. Witt H, Luck W, Becker M et al. Mutation in the SPINK1 trypsin inhibitor gene, alcohol use, and chronic pancreatitis. JAMA 2001;285:2716-7.

68. Noone PG, Zhou Z, Silverman LM, Jowell PS, Knowles MR, Cohn JA. Cystic fibrosis gene mutations and pancreatitis risk: relation to epithelial ion transport and trypsin inhibitor gene mutations. Gastroenterology 2001;121:1310-9.

69. Chandak GR, Idris MM, Reddy DN, Bhaskar S, Sriram PV, Singh L. Mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (PSTI/SPINK1) rather than the cationic trypsinogen gene (PRSS1) are significantly associated with tropical calcific pancreatitis. J.Med.Genet. 2002;39:347-51.

70. Bhatia, E., Choudhuri, G., Sikora, S. S., Lundt, O., Kage, A., Becker, M., and Witt, H. Tropical calcific Pancreatitis: Strong Association with SPINK1 Trypsin Inhibitor Mutations. Gastroenterology 123. 2002.

71. Whitcomb DC. Pancreatic bicarbonate secretion: role of CFTR and the sodium-bicarbonate cotransporter. Gastroenterology 1999;117:275-7.

72. Freedman SD, Katz MH, Parker EM, Laposata M, Urman MY, Alvarez JG. A membrane lipid imbalance plays a role in the phenotypic expression of cystic fibrosis in cftr(-/-) mice. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1999;96:13995-4000.

73. Freedman SD, Blanco P, Shea JC, Alvarez JG. Mechanisms to explain pancreatic dysfunction in cystic fibrosis. Med.Clin.North Am. 2000;84:657-64, x.

74. Freedman SD, Kern HF, Scheele GA. Pancreatic acinar cell dysfunction in CFTR(-/-) mice is associated with impairments in luminal pH and endocytosis. Gastroenterology 2001;121:950-7.

75. Zielenski, J. and Tsui, L. C. Cystic Fibrosis: Genotyping and Phenotyping Variations. Annu.Rev.Genetics. 29, 777-807. 2002.

76. Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. N.Engl.J.Med. 1998;339:653-8.

77. Sharer N, Schwarz M, Malone G et al. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. N.Engl.J.Med. 1998;339:645-52.

78. Ockenga J, Stuhrmann M, Ballmann M et al. Mutations of the cystic fibrosis gene, but not cationic trypsinogen gene, are associated with recurrent or chronic idiopathic pancreatitis. Am.J.Gastroenterol. 2000;95:2061-7.

79. Ockenga J, Stuhrmann M, Manns MP. Evaluation of the role of CFTR in alcohol related pancreatic disease. Gut 2001;49:312-3.

80. Gomez LM, Patuzzo C, Castellani C et al. CFTR and cationic trypsinogen mutations in idiopathic pancreatitis and neonatal hypertrypsinemia. Pancreatology. 2001;1:538-42.

81. Castellani C, Bonizzato A, Mastella G. CFTR mutations and IVS8-5T variant in newborns with hypertrypsinaemia and normal sweat test. J.Med.Genet. 1997;34:297-301.

82. Lowenfels A, Maisonneuve P, Palys B. Re: Ockenga et al.--mutations of cystic fibrosis gene in patients with pancreatitis. Am.J.Gastroenterol. 2001;96:614-5.

83. Veeze HJ, Halley DJ, Bijman J, de Jongste JC, de Jonge HR, Sinaasappel M. Determinants of mild clinical symptoms in cystic fibrosis patients. Residual chloride secretion measured in rectal biopsies in relation to the genotype. J.Clin.Invest 1994;93:461-6.

84. Bronsveld I, Mekus F, Bijman J et al. Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of Delta F508 homozygous twins and siblings. J.Clin.Invest 2001;108:1705-15.

85. Noone PG, Zhou Z, Silverman LM, Jowell PS, Knowles MR, Cohn JA. Cystic fibrosis gene mutations and pancreatitis risk: relation to epithelial ion transport and trypsin inhibitor gene mutations. Gastroenterology 2001;121:1310-9.

86. Audrezet MP, Chen JM, Le Marechal C et al. Determination of the relative contribution of three genes-the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, the cationic trypsinogen gene, and the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene- to the etiology of idiopathic chronic pancreatitis. Eur.J.Hum.Genet. 2002;10:100-6.

87. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G et al. Prognosis of chronic pancreatitis: an international multicenter study. International Pancreatitis Study Group. Am.J.Gastroenterol. 1994;89:1467-71.

88. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Whitcomb DC, Lerch MM, DiMagno EP. Cigarette smoking as a risk factor for pancreatic cancer in patients with hereditary pancreatitis. JAMA 2001;286:169-70.

89. Hartwig W, Werner J, Ryschich E et al. Cigarette smoke enhances ethanol-induced pancreatic injury. Pancreas 2000;21:272-8.

90. Silverman DT, Dunn JA, Hoover RN et al. Cigarette smoking and pancreas cancer: a case-control study based on direct interviews. J.Natl.Cancer Inst. 1994;86:1510-6.

91. Silverman DT, Brown LM, Hoover RN et al. Alcohol and pancreatic cancer in blacks and whites in the United States. Cancer Res. 1995;55:4899-905.

92. Silverman DT, Swanson CA, Gridley G et al. Dietary and nutritional factors and pancreatic cancer: a case-control study based on direct interviews. J.Natl.Cancer Inst. 1998;90:1710-9.

93. Falk RT, Pickle LW, Fontham ET et al. Occupation and pancreatic cancer risk in Louisiana. Am.J.Ind.Med. 1990;18:565-76.

94. Patrianakos, C. and Hoffman, D. Chemical studies on tobacco smoke LXIV. On the analysis of aromatic amines in cigarette smoke. J.Anal.Toxicol. 3, 150-159. 1979.

95. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer-- analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. N.Engl.J.Med. 2000;343:78-85.

96. Malats, N. Gene-Enviroment Interactions in Pancreatic Cancer. Pancreatology 1, 472-476. 2001.

97. Guengerich. Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals. Crit Rev Biochem Mol Biol 25, 97-153. 1990.

98. Kadlubar FF, Anderson KE, Haussermann S et al. Comparison of DNA adduct levels associated with oxidative stress in human pancreas. Mutat.Res. 1998;405:125-33.

99. Foster, J. R., Idle, J. R., Hardwick, J. P., Bars, R., Scott, P., and Braganza, J. M. Induction of drug-metabolizing enzymes in human pancreatic cancer and chronic pancreatitis. J.Pathol. 169(4), 457-463. 2002.

100. Kessova, I. G., DeCarli, L. M., and Lieber, C. S. Inducibility of cytochromes P-4502E1 and P-4501A1 in the rat pancreas. Alcohol Clin.Exp.Res. 22(2), 501-504. 2002.

101. Acheson DW, Rose P, Houston JB, Braganza JM. Induction of cytochromes P-450 in pancreatic disease: consequence, coincidence or cause? Clin.Chim.Acta 1985;153:73-84.

102. Acheson DW, Hunt LP, Rose P, Houston JB, Braganza JM. Factors contributing to the accelerated clearance of theophylline and antipyrine in adults with exocrine pancreatic disease. Clin.Sci.(Lond) 1989;76:377-85.

103. Wacke R, Kirchner A, Prall F et al. Up-regulation of cytochrome P450 1A2, 2C9, and 2E1 in chronic pancreatitis. Pancreas 1998;16:521-8.

104. Bartsch, H., Malaveille, C., Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., Hautefeuille, A., Boyle, P., and and the International Pancreatic Disease Study Group. Genetic polymorphism of N-actyltransferase, glutathione S transferase M1 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in relation to malignant and benign pancreatic disease risk. Eur.J.Cancer Prev. 7, 215-223. 2002.

105. Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. 2000;40:581-616.:581-616.

106. Tukey RH, Strassburg CP. Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract. Mol.Pharmacol. 2001;59:405-14.

107. Strassburg CP, Oldhafer K, Manns MP, Tukey RH. Differential expression of the UGT1A locus in human liver, biliary, and gastric tissue: identification of UGT1A7 and UGT1A10 transcripts in extrahepatic tissue. Mol.Pharmacol. 1997;52:212-20.

108. Strassburg CP, Manns MP, Tukey RH. Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8. J.Biol.Chem. 1998;273:8719-26.

109. Strassburg CP, Kneip S, Topp J et al. Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. J.Biol.Chem. 2000;275:36164-71.

110. Vogel A, Ockenga J, Ehmer U et al. Polymorphisms of the Carcinogen Detoxifying UDP-Glucuronosyltransferase UGT1A7 in Proximal Digestive Tract Cancer. Z.Gastroenterol. 2002;40:497-502.

111. Ockenga, J., Vogel, A., Teich, N., Keim, V., Manns, M., and Strassburg, C. P. Polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 are a risk factor of chronic pancreatitis and pancreatic cancer. Gastroenterology (in press).

112. Nowell, S. A., Massengill, J. S., Williams, S., Radominska-Pandya, A., Tephly, T. R., Cheng, Z., Strassburg, C. P., Tukey, R. H., MacLeod, S. L., Lang, N. P., and Kadlubar, F. F. Glucuronidation of 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5- b]pyridine by human microsomal UDPglucuronosyltransferase: identification of specific UGT1A family isoforms involved. Carcinogenesis 20, 1107-1114. 1999.

113. Guillemette C, Ritter JK, Auyeung DJ, Kessler FK, Housman DE. Structural heterogeneity at the UDP-glucuronosyltransferase 1 locus: functional consequences of three novel missense mutations in the human UGT1A7 gene. Pharmacogenetics 2000;10:629-44.

114. Strassburg CP, Nguyen N, Manns MP, Tukey RH. Polymorphic expression of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A gene locus in human gastric epithelium. Mol.Pharmacol. 1998;54:647-54.

115. Strassburg CP, Vogel A, Kneip S, Tukey RH, Manns MP. Polymorphisms of the human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A7 gene in colorectal cancer. Gut 2002;50:851-6.

116. Vogel A, Kneip S, Barut A et al. Genetic link of hepatocellular carcinoma with polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 gene. Gastroenterology 2001;121:1136-44.

Anhang

Vorbemerkung

Das wachsende Wissen um das menschliche Genom und genetisch determinierter Erkrankungen hat wesentlich zu einem besseren Verständnis von Pankreaserkrankungen beigetragen. Jedoch bergen die genetischen Untersuchungsmöglichkeiten auch die Gefahr einer unkontrollierten und unreflektierten Anwendung. Diesem Aspekt haben wir während dem „Third International Symposium on Inherited Disease of the Pancreas“ am 5-7 April in Mailand, Italien, Rechnung getragen und eine internationale Konsensus Konferenz zur hereditären Pankreatitis abgehalten. In den beiden folgenden Publikationen sind die Ergebnisse dieser Konsensus Konferenz dargestellt.

Ergebnisse der internationalen Konsensus Konferenz zur genetischen Untersuchung bei hereditärer Pankreatitis: Leitlinien zur Indikation und Beratung sowie zu den Aspekten der Privatsphäre.

(Ellis I, Lerch M, Whitcomb DC. (Ockenga J*) for the Consensus Committees of the European registry of Hereditary Pancreatic Diseases, the Midwest Multi-Center Pancreatic Study Group and the International Association of Pancreatology. * alphabetical list of the authors appears in the Appendix. Genetic Testing for Hereditary Pancreatitis: Guidelines for Indications, Counselling, Consent and Privacy Issues Pancreatology 2001;1:405-415). Nach Entdeckung der PRSS1 Gen Mutationen als Ursache der hereditären Pankreatitis wurde während des „Third International Symposium on Inherited Disease of the Pancreas“ am 5-7 April in Mailand, Italien, eine internationale Konsensus Konferenz abgehalten um das Vorgehen bei hereditärer Pankreatitis festzulegen. Die unter eigener Beteiligung während dieser Konferenz erarbeiteten Richtlinien zur Indikation und Beratung, sowie den Umgang mit DNA Proben, als auch die Privatsphäre des Patienten betreffenden Aspekte bei Patienten

mit hereditärer Pankreatitis sind hier publiziert.

Ergebnisse der internationalen Konsensus Konferenz zum Pankreaskarzinom bei Patienten mit hereditärer Pankreatitis: Leitlinien zu Prävention, Screening und Behandlung.

(Ulrich CD. (Ockenga J*) for the Consensus Committees of the European Registry of Hereditary Pancreatic Diseases, the Midwest Multi-Center Pancreatic Study Group and the International Association of Pancreatology. * alphabetical list of the authors appears in the Appendix. Pancreatic Cancer in Hereditary Pancreatitis: Consensus Guidelines for Prevention, Screening and Treatment. Pancreatology 2001;1:416-4422). Patienten mit hereditärer Pankreatitis haben wahrscheinlich ein deutlich erhöhtes Risiko (40-50 fach) im Verlauf ihres Lebens ein Pankreaskarzinom zu entwickeln. Das Risiko steigt insbesondere ab dem 40. – 50. Lebensjahr und erreicht ein kumulatives Risiko von ca. 40% im 70 Lebensjahr. Der autosomal dominante Erbgang, die hohe Penetration der Erkrankung und die verfügbare genetische Diagnostik prädisponieren die hereditäre Pankreatitis als ein ideales Modell für ein Präventions und Screening Protokoll für das Pankreaskarzinom. 2001 wurde von einem internationalem Expertengremium während einer Konsensus Konferenz (siehe oben) Richtlinien erarbeitet und nachfolgend publiziert. In der vorliegenden Arbeit werden die Möglichkeiten und Limitationen verschiedener bildgebender Methoden und der Endoskopischen Retrograden Pankreatikographie, als auch laborchemische und molekularbiologische Methoden diskutiert.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Deicher und Prof. Dr. M. Müller gebürt mein Dank für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und Denken. Hierdurch wurde die Basis für meine weitere wissenschaftliche Arbeit gelegt. Besonders die intensiven und kritischen Diskussionen sind mir in Erinnerung.

Herrn Professor Dr. M.P. Manns möchte ich danken für den Freiraum das Thema meiner Arbeit zu entwickeln und ich bin ihm für die Unterstützung zur Durchführung meiner Untersuchungen sehr verbunden.

Herrn Professor Dr. H. Lochs danke ich sehr für die Möglichkeit meine Arbeiten in Berlin abzuschließen und freue mich hier weitere Projekte mit ihm zu entwickeln.

Mein nachdrücklicher Dank gilt aber meiner Frau, Renate Heinemeyer und meinen Töchtern Imke und Feline. Ohne ihr Verständnis wäre meine Arbeit nicht möglich gewesen. Ihre Gegenwart war und ist nicht nur stimulierend sondern verdeutlicht mir stets die vielen wertvollen Aspekte des Lebens.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern und Doktoranden, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren. Für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit - auch über die Grenzen einzelner Fachgebiete und Universitäten hinweg - möchte ich mich besonders bei folgenden Personen bedanken: Prof. Dr. S.C. Bischoff, K. Borchert, Dr. Roland Jacobs, Prof. Volker Keim, PD Dr. Matthias Stoll, PD Dr. Manfred Stuhrmann, PD Dr. Christian Strassburg, Dr. Niels Teich, Dr. A. Vogel

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich – Dr. med. Johann Ockenga, geb. 18.05.1964 - , dass

keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,

weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;

die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,

der Bewerberin oder dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

....

Datum Unterschrift