

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B (Allg. Innere Medizin sowie
Gastroenterologie und Stoffwechselkrankheiten)

- kommissarische Leiterin: Prof. Dr. med. Karin Hengst -

Morphologie und Aktivitätsbeurteilung der hereditären Pankreatitis durch die A121T Mutation des kationischen Trypsinogens

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Melanie Wirtz
aus Bünde
2015

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz
1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Tobias Meister
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dirk Domagk
Tag der mündlichen Prüfung:
24.04.2015

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B (Allg. Innere Medizin sowie
Gastroenterologie und Stoffwechselkrankheiten)

-kommissarische Leiterin: Prof. Dr. K. Hengst-
Referent: Priv.-Doz. Dr. T. Meister
Koreferent: Prof. Dr. D. Domagk

ZUSAMMENFASSUNG

Morphologie und Aktivitätsbeurteilung der hereditären Pankreatitis durch die
A121T Mutation des kationischen Trypsinogens

Wirtz, Melanie

Die hereditäre Genese spielt bei der chronischen Pankreatitis mit nur ca. 2% Anteil an den Erkrankungen insgesamt eine untergeordnete Rolle. Dennoch haben die Beurteilungen von verschiedenen Mutationen sowie ihre geänderten biochemischen Eigenschaften und Enzymkinetik entscheidende Erklärungsmodelle für die Pathogenese der chronischen Pankreatitis geliefert.

Diese Dissertation beschreibt anhand von humanen Proben eines Indexpatienten eine morphologische Beurteilung der durch die noch wenig beschriebene A121T Mutation des kationischen Trypsinogens hervorgerufenen Pankreatitis. Hierbei werden humane Proben des Indexpatienten mit Geweben von chronischen Pankreatitiden andere Genese und von Adenokarzinomen verglichen.

Darüber hinaus sollte die Frage beantwortet werden, inwiefern die A121T Mutation einen Einfluss auf die katalytische Aktivität des mutierten Trypsins hat. Durchgeführte Enzymaktivitätsmessungen an homogenisiertem Material zeigten jedoch keine Unterschiede in der Aktivität des mutierten Trypsins im Vergleich zum Wildtyp.

Tag der mündlichen Prüfung:

24.04.2015

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Morphologie und Aktivitätsbeurteilung der hereditären Pankreatitis durch die A121T Mutation des kationischen Trypsinogens

in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B (Allg. Innere Medizin sowie Gastroenterologie und Stoffwechselkrankheiten)

unter Anleitung von: Priv.-Doz. Dr. med Tobias Meister

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Anschrift: Melanie Wirtz

Münster, den 24.04.2015

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Anatomie und Physiologie des Pankreas.....	1
1.2 Epidemiologie und Einteilung der Pankreatitis	2
1.3 Pathophysiologie und Klinik der chronischen Pankreatitis	3
1.4 Hereditäre Formen der Pankreatitis	8
1.4.1 CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) Mutationen.....	9
1.4.2 Mutationen im Spink1 (Serinproteaseninhibitoren vom Kazal Typ 1 Gen).....	10
1.4.3 Mutationen im kationischen Trypsinogen (PSSR1).....	11
2 Zielsetzung dieser Dissertation	22
3 Material.....	24
3.1 Geräte.....	24
3.2 Substrate, Enzyme, Antikörper.....	25
3.2.1 Substrate für die Trypsinaktivitätsmessungen	25
3.2.2 Enzyme.....	25
3.2.3 Antikörper	25
3.3 Puffer, Medien und Lösungen	26
3.4 Chemikalien	27
4 Methoden	29
4.1 Gewinnung des pankreatischen Gewebes.....	29
4.2 Herstellung von Pankreashomogenaten	29
4.3 Immunfluoreszenz.....	30

4.4 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)	31
4.5 Western Blot.....	32
4.6 Immunodetektion nach dem Western Blot	33
4.7 Trypsinaktivitätsmessungen	34
5 Ergebnisse	40
5.1 Morphologische Beurteilung des Pankreasgewebes.....	41
5.2 Nachweis der Expression von Trypsin und GAPDH.....	44
5.3 Etablierung des Trypsinaktivitätsassays	47
5.4. Trypsinaktivitätsmessungen	50
6 Diskussion	53
6.1 Morphologische Beurteilung des Pankreasgewebes.....	53
6.2 Nachweis der Expression von Trypsin und GAPDH.....	57
6.3 Etablierung des Trypsinaktivitätsassays	59
6.4. Trypsinaktivitätsmessungen	60
7 Zusammenfassung und Ausblick.....	63
8 Literaturverzeichnis	65
9 Abkürzungsverzeichnis	75
10 Danksagung	77
11 Lebenslauf	78

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie des Pankreas

Das Pankreas ist nach der Leber die zweitgrößte Drüse und die wichtigste Verdauungsdrüse des menschlichen Körpers. Das Organ befindet sich im Retroperitoneum im Oberbauch.

Es wird in drei Anteile den Pankreaskopf, -korpus und –schwanz eingeteilt. Der breiteste Teil ist der Kopf, welcher die Mündung des Ausführungsgangs enthält und an das Duodenum angrenzt. Der Korpus bezeichnet das Mittelstück und der Schwanz das sich verjüngende Pankreas, das Richtung Milzhilus zieht [88].

Für die Genese der Pankreatitis wichtig ist, dass sich längs durch das Organ ein Hauptausführungsgang für die produzierten Sekrete zieht, welcher an der Papilla Vateri meist zusammen mit dem Ausführungsgang der Leber in das Duodenum mündet.

Histologisch betrachtet besteht das Pankreas zu 98% [81], aus Azinuszellen, welche die exokrine Funktion, d. h. die Produktion von Verdauungssäften übernehmen. Hauptaufgabe hierbei sind die Produktion der Verdauungsenzyme: Amylase (für die Kohlenhydratverdauung), Lipase (für die Fettverdauung), und Trypsin, Cathepsin B, Chymotrypsin (sogenannte Peptidasen für die Proteinverdauung). Des Weiteren wird durch die Azinusdrüsen Hydrogencarbonat produziert, welches für die Neutralisierung der Magensäure und die Gewährleistung eines leicht basischen Milieus im Duodenum essentiell ist [32].

Darüber hinaus nimmt das Pankreas eine wichtige endokrine Funktion wahr. Die Langerhansschen Inseln, die ca. 2% des Pankreasgewebes ausmachen und in solitären Zellnestern im ganzen Organ auftreten, sind der einzige Produktionsort des Insulins, eines lebenswichtigen Hormones zur Regulation des Kohlenhydrat- und Glucosestoffwechsels.

1.2 Epidemiologie und Einteilung der Pankreatitis

Die Bauchspeicheldrüsenentzündung (Pankreatitis) ist eine häufige Erkrankung des Gastrointestinaltraktes.

Es handelt sich in den meisten Fällen um eine aseptische Entzündung, d. h. die Entzündungsreaktion wird nicht primär durch eine Infektion durch Bakterien ausgelöst.

Den unterschiedlichen Genesen der Erkrankung ist meist eine Obstruktion des Ductus pancreaticus gemeinsam, welcher zur lokalen oder generalisierten Entzündungsreaktion führt.

Ursachen einer solchen Obstruktion können angeborene Fehlbildungen, wie zum Beispiel das Pankreas anulare oder das Pankreas divisum sein. In beiden Fällen ist eine fehlende embryonale Verschmelzung der zwei Pankreasganganlagen mit unzureichender Drainierung des Pankreassekretes in das Duodenum Grund für die Gangobstruktion und die konsekutive Entzündung. Am häufigsten ist jedoch eine Verlegung des gemeinsamen Ausführungsgangs des Gallengangs und des Ductus pancreaticus durch einen Gallenstein Ursache für eine dann akute Pankreatitis. In diesem Fall wird sie als biliäre Pankreatitis bezeichnet. Ein weiterer häufiger Auslösefaktor für eine Pankreatitis ist überhöhter Alkoholkonsum [4, 66,100].

Bei der Erkrankung muss zwischen zwei verschiedenen zeitlichen Verlaufsformen unterschieden werden.

Bei der akuten Pankreatitis tritt eine akute Gewebsschädigung binnen weniger Tage auf. Hauptursachen dafür sind die bereits oben erwähnte biliäre Pankreatitis (ca. 55%) und die toxische Pankreatitis durch erhöhten Alkoholkonsum (ca. 35%) [40].

Seltenere Ursachen für eine akute Pankreatitis sind Medikamenten-nebenwirkungen (z.B. Antihypertonika, Antibiotika oder Zytostatika), Virusinfektionen (z. B. Mumps), stumpfe Bauchtraumen oder auch eine hereditäre Genese (s.u.)

Die chronische Verlaufsform verläuft langsamer, kann sich jedoch in rezidivierenden Schüben von akuten Pankreatitiden manifestieren. Hauptursache ist mit ca. 80% der chronische Alkoholabusus, ca. 15% der Fälle

sind idiopathisch. Weniger als 5% der Erkrankungen sind auf seltenere Ursachen wie die Hypertriglyzeridämien oder eine hereditäre Genese zurückzuführen [40]. Die häufigere akute Verlaufsform hat eine Inzidenz von 5-10 pro 100.000 Menschen in den westlichen Industrieländern [83].

Die chronische Pankreatitis ist seltener als die akute Verlaufsform und tritt in Westeuropa mit einer Inzidenz von 3,5 - 4 pro 100.000 Einwohner pro Jahr auf. Durch ihre jahrelange Persistenz ist die Prävalenz mit 10-15 pro 100.000 Menschen entsprechend höher [23, 93]. 90 % der Patienten mit chronischer Pankreatitis sind Männer zwischen 30-60 Jahren. Dies ist durch den Alkoholabusus als Hauptursache zu erklären [2, 3, 73].

Bei der akuten Verlaufsform unterscheidet man ferner zwischen der häufigeren (80-85%) und milder verlaufenden ödematösen Form sowie der selteneren nekrotisierenden Pankreatitis (15-20%). Letztere kann je nach Ausmaß der Nekrose mit Letalitätsraten von 15-50 % einhergehen [39, 69].

Sowohl die akute, als auch die chronische Verlaufsform erfordern häufig eine intensivmedizinische Behandlung, da beide eine Vielzahl von Komplikationen hervorrufen können. Bei der akuten Verlaufsform stehen vital gefährdende Komplikationen, wie bakterielle Infektion der entstandenen Nekrosen mit Sepsisgefahr, hypovolämischem Schock (Ausbildung von Schockorganen, z.B. Lunge, Niere), Abszessen oder Gefäßarrosionen im Vordergrund [73].

Die chronischen Form, die häufig mit einer Vielzahl von Schüben einhergeht, steht die kontinuierliche Zerstörung des Organs im Mittelpunkt. Durch die Entzündungsreaktionen entstehen postinflammatorische Fibrosen und Verkalkungen. Des Weiteren können Pseudozysten, Stenosen des Pankreasgangsystems oder Fistelbildungen hinzukommen, welche das Auftreten weiterer Entzündungsschübe fördern können [29, 39].

1.3 Pathophysiologie und Klinik der chronischen Pankreatitis

Die Erkrankung ist definiert als eine entzündlich-fibrosierende Erkrankung mit bindegeweblichem Ersatz des Drüsenparenchyms und Entwicklung von Gangveränderungen als Folge wiederholter autodigestiver Nekrosen und/oder

autoimmunbedingter Entzündungsprozesse [7]. Die Fibrosierung des Organs tritt dabei herdförmig auf.

Die wichtigste Ursache für die chronische Pankreatitis ist der Alkoholabusus von mehr als 20g/Tag bei Frauen bzw. mehr als 40g/Tag bei Männern. Dieser ist für ca. 80% der Erkrankungen verantwortlich [2,3, 39].

Aufgrund des steigenden Alkoholkonsums ist auch die Inzidenz der chronischen Pankreatitis in den letzten Jahren gestiegen [49].

Weitere seltenere Ursachen einer chronischen Entzündung sind hereditäre Formen (s. 1.3), die Autoimmunpankreatitis, deren Entität jedoch noch umstritten ist [49], die partielle Fehlanlage des Pankreas, das sogenannte Pankreas divisum, Erkrankungen, die mit einer Hyperkalzämie einhergehen, z.B. der Hyperparathyreoidismus und die Post-ERCP Pankreatitis, welche akut auftritt jedoch auch chronifizieren kann [106]. Diese Ursachen machen zusammen ca. 10% der Fälle von chronischer Pankreatitis aus [49].

Des Weiteren kann auch eine chronische Pankreatitis ebenso wie eine akute durch verschiedene Medikamente ausgelöst werden. Beispiele für diese auslösenden Medikamente sind Diuretika, β -Blocker, ACE-Hemmer oder Methyl-Dopa [39].

Etwa 10 % der Erkrankungen sind idiopathisch, also nicht auf eine der bekannten Ursachen zurückzuführen.

Die Pathogenese der Erkrankung ist bis heute unklar. Die Theorie, dass es zu einer vorzeitigen Aktivierung der vom Pankreas sezernierten Enzymvorstufen oder Proenzymen, den sogenannten Zymogene und im Anschluss daran zu einem Selbstverdau des Organs kommt, wurde bereits 1896 von Chiari postuliert [10].

Fast 100 Jahre später wurde die Vermutung auf die Hypothese konkretisiert, dass eine übermäßige Trypsinaktivität innerhalb des Pankreas auslösend für den Entzündungsprozess ist [90].

Diese These wird unterstützt durch die molekulargenetischen Veränderungen, welche in den letzten 15 Jahren im Rahmen der Erforschung der hereditären Pankreatitiden identifiziert wurden.

Bei diesen molekulargenetischen Veränderungen spielt das Enzym Trypsin eine zentrale Rolle, welche besonders durch seine Stellung innerhalb der Enzymkaskade des Pankreas geprägt wird [87].

Man unterscheidet drei verschiedene Formen des humanen Trypsins, die unterschiedlich hohe Anteile am Trypsin-Gesamtgehalt ausmachen: das kationische Trypsin (40%, auch Trypsin-1), das anionische Trypsin (ca. 60%, auch Trypsin 2) und Mesotrypsin (<1%, auch Trypsin 4) [80].

Die kationische und anionische Form des Trypsin weisen die Aktivität auf, erstere zeichnet sich jedoch durch eine höhere Selbstaktivierungs- und geringere Inaktivierungsrate aus [14,15].

Trypsin bezeichnet die aktive Form des Enzyms. Es wird zunächst als Prätrypsinogen, am rauen endoplasmatischen Retikulum produziert. Hierbei wird das 15 Aminosäuren lange N-terminale ER-Signalpeptid abgetrennt und das Molekül als Trypsinogen, der inaktiven Enzymvorstufe oder sogenanntes Zymogen in den Zymogengranula gespeichert. Diese gehen ursprünglich vom Golgi-Apparat der Zelle aus und ihr Inhalt durchläuft eine Kondensation und Konzentration auf dem Weg zum apikalen Teil der Azinuszelle [67].

Durch die Abspaltung eines 8 Aminosäuren langen Oligopeptids, dem Aktivierungspeptid, wird Trypsinogen in aktives Trypsin überführt. Diese Aktivierung findet normalerweise erst im Darmlumen durch die dort produzierte Enteropeptidase (alt: Enterokinase) statt [29].

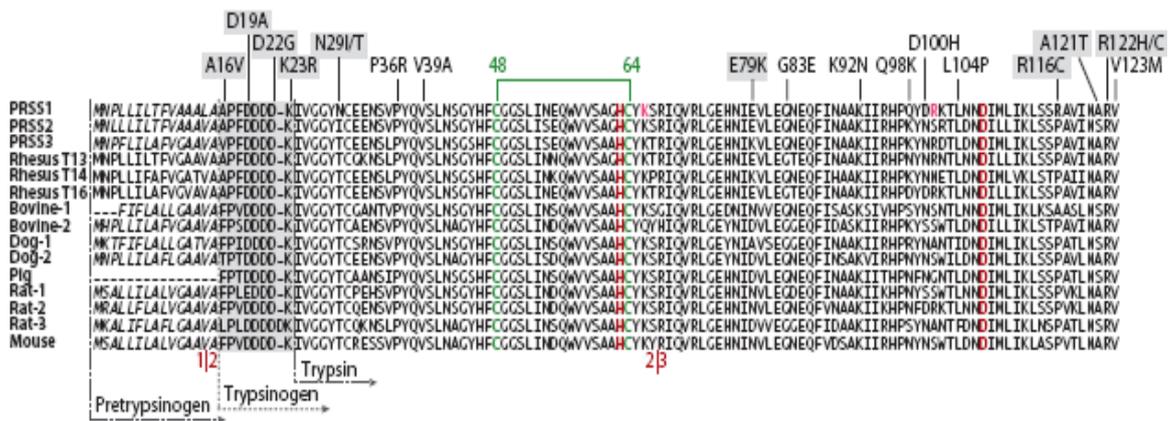


Abb.1 Aminosäuresequenzen der verschiedenen Vorstufen des kationischen Trypsinogens. Oben aufgeführt die bisher beschriebenen Punktmutationen, die mit hereditären Pankreatitiden assoziiert werden. Grau unterlegt die 8 Aminosäuren, die das Aktivierungspeptid bilden [11].

Aktives Trypsin ist in der Lage, sich selbst so wie alle anderen Vorstufen der sezernierten Proteasen zu aktivieren. Daher stellt dieses Enzym eine wichtige Schaltstelle in der Enzymkaskade dar.

Es existieren verschiedene Mechanismen das Pankreas vor einer innerhalb des Organs auftretenden frühzeitigen Aktivierung des Trypsins zu schützen. Einer davon ist die bereits oben erwähnte physiologische Aktivierung durch Enteropeptidase außerhalb des Organs. Weitere Mechanismen sind die Autolysen aktivierter Proteasen durch Trypsin selbst und die Komplexierung aktivierte Trypsinmoleküle durch intrapankreatische Inhibitoren, z.B. durch Serinprotease-Inhibitor, Kazal-Typ 1 (SPINK1) [74].

Als erste genetische Veränderung wurde eine Punktmutation R122H im Bereich des kationischen Trypsins (PSSR1) im Jahr 1996 beschrieben [99]. Für diese Veränderung konnte als erste nachgewiesen werden, dass sie ursächlich für das Auftreten einer hereditären Pankreatitis verantwortlich ist.

Durch Mutationen im kationischen Trypsinogen Gen (PRSS1) (s. 1.4.3.), kann es zu einer verlängerten Halbwertszeit des aktivierten Trypsins kommen, das neben sich selbst auch in der Lage ist, andere Proteasen zu aktivieren. Darüber hinaus konnte eine erleichterte Aktivierbarkeit durch Abspaltung des

Aktivierungspeptides nachgewiesen werden. Auf diese Mechanismen wird im nächsten Kapitel noch ausführlicher eingegangen.

Histologisch gesehen kommt es zu einer chronischen, entzündlich fibrosierenden Erkrankung der Bauchspeicheldrüse, die durch wiederholte Schübe zu einer Schädigung des interstitiellen, duktales und azinösen Gewebes führt.

Exemplarisch werden die Gewebeveränderungen bei der alkoholtoxischen Form beschrieben, da diese am häufigsten ist und den wenigen bekannten Fälle der hereditären Form der alkoholtoxischen morphologisch ähnelt (soweit dies aufgrund der niedrigen Fallzahlen beurteilbar ist) [45,49].

In der Frühphase der Erkrankung kommt es auf der einen Seite zu akuten Veränderungen, d. h. zu Fettgewebnekrosen unterschiedlicher Größe, die auch zu Pseudozysten führen können, auf der anderen Seite auch zu chronischen Veränderungen, d. h. einer peri- und interlobulären Fibrose.

In der fortgeschrittenen Phase bilden sich infolge der Fibrosierung unregelmäßige Ganglumina. Diese führen zu einem Sekretstau, der in die Präzipitation von kalkreichen Konkrementen, den sogenannten Calculi, und Proteinablagerungen mündet. Von diesen Veränderungen sind sowohl die kleinen Gänge, als auch der Ductus pancreaticus betroffen [7].

Desweiteren führt der Übergang der Fibrose auf den intralobulären Bereich zu einem Untergang der Azinuszellen. Auch die Inseln des Pankreas sind in dieser Phase mit betroffen und zeigen unregelmäßige Größen- und Verteilungsmuster [7, 49]. Es kann auch eine intrainsuläre Fibrose auftreten [45].

Klinisch imponiert die Krankheit oft oligosymptomatisch, wobei die progrediente Zerstörung des Pankreasgewebes im Vordergrund steht. Charakteristisch sind schubweise auftretenden Schmerzen, die als tiefsitzende Oberbauchschmerzen beschrieben werden und oft gürtelförmig in den Rücken ausstrahlen [39].

Der Verlauf der chronischen Pankreatitis lässt sich in drei Stadien einteilen [68]:

I es treten typische Schmerzattacken auf, endokrine und exokrine Pankreasfunktion sind normal

II Schmerzen werden seltener, Verkalkungen des Pankreas sind bereits in der Abdomen Übersichtsaufnahme sichtbar

III Schmerzattacken verschwinden, die Erkrankung wird als „ausgebrannt“ bezeichnet, es kommt zur globalen Pankreasinsuffizienz

Die Endstrecke einer chronischen Pankreatitis besteht demnach im Ausfall der exokrinen und in 30% der Fälle auch der endokrinen Funktion, d. h. einem Diabetes mellitus [39].

Dieser Endzustand erfordert die Substitution von Verdauungsenzymen, eventuell den fettlöslichen Vitaminen A, D, E und K und im Falle des Diabetes mellitus auch Insulin. Weitere Komplikationen sind die Ausbildung von Pseudozysten, Milz- und Pfortaderthrombosen. Des Weiteren ist das Risiko für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms im Vergleich zur Normalbevölkerung wesentlich erhöht.

1.4 Hereditäre Formen der Pankreatitis

Die hereditäre Form der Pankreatitis ist erstmalig im Jahr 1952 durch Comfort und Steinberg beschrieben worden [105].

Wie bereits oben erwähnt, gehört die hereditäre Form der Pankreatitis zu den seltenen Ursachen einer chronischen Pankreatitis. Es wird angenommen, dass ca. 2% der chronischen Pankreatitiden auf eine hereditäre Ursache zurückzuführen sind [87].

Die hereditäre Form der chronischen Pankreatitis verläuft langsamer als die alkoholische bedingte, wobei es auch Unterschiede zwischen den einzelnen genetischen Veränderungen gibt. Die Progredienz der Erkrankung bei Mutationen im PRSS1 ist schwächer als bei denen im SPINK₁ (Serin Peptidase Inhibitor, Kazal Typ 1) [46].

Weniger als 2% der Patienten mit chronischer Pankreatitis weisen eine positive Familienanamnese auf. Davon entfallen ca. 10-30% auf Mutationen im kationischen Trypsinogen und ca. 5% auf die des Spink₁ Gens. Letztere kommen jedoch auch in bis zu 6% der Fälle bei alkoholisch bedingter Pankreatitis vor, bei dieser Genese treten auch in 7% CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) - Mutationen auf [94].

Trotz dieses geringen Anteils waren die Auslösemechanismen der hereditären Pankreatitis in den vergangenen 15 Jahren intensiver Gegenstand der

Forschung, da man sich auf diesem Wege erhofft, Fragen der zum großen Teil unbekannt Pathogenese der chronischen Pankreatitis ohne genetisch veränderte Enzyme beantworten zu können.

Den genetischen Veränderungen, welche eine hereditäre Pankreatitis auslösen können, gemeinsam ist, dass sie zu einem vermehrten Auftreten von intrapancreatisch aktivem Trypsin führen.

Dies wird durch eine erleichterte Aktivierbarkeit, eine geringere Autolyse oder verminderte Inhibierbarkeit des Trypsins hervorgerufen.

Als erste genetische Veränderung konnte Mitte der 1990er Jahre ein verändertes Trypsinmolekül des kationischen Trypsinogens (PRSS1) als Auslöser für hereditäre Pankreatitiden beschrieben werden [98, 99].

Für diese Veränderung konnte als erste nachgewiesen werden, dass sie ursächlich für das Auftreten einer hereditären Pankreatitis verantwortlich ist. Dies ist die häufigste Mutation, die R122H Mutation im PRSS1. Es sind im Verlauf der letzten 15 Jahre aber weitere Mutationen beschrieben worden, z. B. A16V, D22G, K23R, N29I, N29T oder R122C [26, 34, 95, 101, 103].

Weitere Mutationen betreffen den intrapancreatischen Trypsininhibitor Spink1 (s.1.4.2) und den CFTR (s.1.4.1), ein Rezeptor, welcher eine der häufigsten Erbkrankheiten in Deutschland auslöst, die Mukoviszidose oder zystische Fibrose.

1.4.1 CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) Mutationen

Bei dem CFTR-Gen handelt es sich um einen Genlocus, der für einen transmembranen Chloridkanal kodiert und sich auf dem langen Arm des Chromosom 7 (7q31) befindet [85, 107].

Mutationen dieses Gens können bei homozygotem oder auch heterozygotem Auftreten für eine klinisch manifeste zystische Fibrose verantwortlich sein.

Die zystische Fibrose ist die häufigste schwere angeborene Stoffwechselerkrankung in Deutschland. Sie tritt mit einer Häufigkeit von 1:2000 auf und wird autosomal rezessiv vererbt [63].

Es sind bereits über 1000 verschiedene Mutationen des CFTR Gens beschrieben worden. Die häufigste ist die $\Delta F508$, sie ist bei 66% der deutschen Patienten ursächlich und führt zu einer Deletion eines Basentriplets [108].

Klinisch stehen bei der Erkrankung eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung mit chronischen Infektionen und eine exokrine Pankreasinsuffizienz im Vordergrund. Eine chronische Pankreatitis wird bei ein bis zwei Prozent der Betroffenen mit normaler Pankreasfunktion, seltener bei Patienten mit Pankreasinsuffizienz beobachtet [3, 20, 86].

Letztere wird hauptsächlich durch eine erhöhte Viskosität des Pankreassekretes hervorgerufen. Es wird vermutet, dass die durch diese erhöhte Viskosität auftretende Gangobstruktion neben weiteren Mechanismen zu einer Absenkung des pH-Wertes im Pankreasgangsystem und damit zu einer vorzeitigen Aktivierung von Verdauungsenzymen führt [18, 64, 102].

Es ist jedoch festgestellt worden, dass Patienten mit idiopathischer chronischer Pankreatitis signifikant häufiger Mutationen im CFTR-Gen aufweisen als die Normalbevölkerung [13, 84].

Des Weiteren wurde die Dysfunktion des Chlorid Kanals bei Patienten mit Pankreas divisum beschrieben, die ebenfalls häufiger an einer chronischen Pankreatitis erkranken [33].

1.4.2 Mutationen im Spink1 (Serinproteaseninhibitoren vom Kazal Typ 1 Gen)

Bei Spink1 handelt es sich um einen Serin-Peptidase-Inhibitor, Kazal Typ 1, genannt Spink1, einen spezifischen intrapankreatischen Trypsininhibitor, auch als pankreatischer sekretorischer Trypsin-Inhibitor (PSTI) bezeichnet. Dieser tritt auch in verschiedenen anderen Organen, z.B. den Nieren oder Ovarien auf und fungiert auch als Akut-Phaseprotein [59,85]. Das Genprodukt des Spink1 ist der wichtigste intrapankreatische Inhibitor des aktivierten Trypsins [86, 94].

Der Genlocus befindet sich auf dem Chromosom 5 und besteht aus 4 Exons. [41]. Der Inhibitor besitzt ein Lysinmolekül im aktiven Zentrum, welches eine kovalente Bindung zu dem katalytischen Serin der Protease eingeht und diese somit, allerdings nur temporär, inaktiviert [55].

Im Jahr 2000 wurde erstmals beschrieben, dass eine Assoziation zwischen der Mutation im Spink1 und der chronischen Pankreatitis besteht [104].

Bei dieser Mutation konnte jedoch im Gegensatz zu den Mutation im PSSR1 lediglich eine Assoziation zur hereditären Pankreatitis nachgewiesen werden und kein kausaler Zusammenhang. Ähnlich wie bei den Mutationen im kationischen Trypsinogen wird auch in diesen Fällen eine erschwerte Inaktivierung des aktivierten Trypsins angenommen. Die häufigste Mutation ist der Austausch von Asparagin gegen Serin an Position 34 im Protein (N34S). Diese kann homo- oder heterozygot auftreten, ohne dass ein klinischer Unterschied beschrieben werden konnte [70,104]. Da sich die Mutation sieben Aminosäurepositionen von dem aktiven Zentrum des Enzymes entfernt befindet, wird eine reduzierte Inhibitor Kapazität infolge der Mutation angenommen. Diese Ergebnisse sind bisher nicht vollständig belegt, da sich verschiedene Ergebnisse hinsichtlich der Assoziation der Spink1 Mutation und der chronischen Pankreatitis zeigen [12,53]. Die Progredienz der Erkrankung ist schneller als bei Mutationen im kationischen Trypsinogen, jedoch langsamer als bei der alkoholisch bedingten Pankreatitis. Unklar ist zurzeit noch, ob diese Mutation ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für die Ausbildung eines Pankreaskarzinoms einhergeht.

1.4.3 Mutationen im kationischen Trypsinogen (PSSR1)

Der lange Arm des Chromosoms 7 (7q35) konnte 1996 als Genlocus für eine Punktmutation im kationischen Trypsinogen beschrieben werden [98].

Whitcomb et al konnten zeigen, dass die Mutation im kationischen Trypsinogen aus zwei Gründen einen sensiblen Bereich der Enzymkaskade des Pankreas erfasst. Einerseits stellt das kationische Trypsinogen die größte Menge des produzierten Trypsinogens, und andererseits nimmt das Enzym Trypsin eine Schlüsselposition in der Enzymkaskade des Pankreas ein [35, 99].

Aktiviertes Trypsin ist in der Lage, sich selbst, aber auch alle anderen pankreatogen produzierten Zymogene zu aktivieren. Bei Zymogenen handelt es sich um inaktive Enzymvorstufen, die zum Schutz des Pankreas vor einem Selbstverdau in dieser Form in den Ductus pancreaticus sezerniert werden. Physiologischerweise erfolgt die Aktivierung dieser Vorstufen durch die

Abspaltung eines Aktivierungspeptides erst durch die intestinale Enterokinase im Duodenum [56]. Das aktive Trypsin steht demnach am Anfang dieser Kettenreaktion und ist durch nachfolgend beschriebenen nachgewiesenen genetische Veränderungen verdächtig, für eine frühzeitige intrapankreatische Zymogenaktivierung verantwortlich zu sein [32].

Als erstes wurde 1996 die häufigste und klinisch wichtigste Mutation R122H beschrieben, diese konnte damals bei 5 Familien nachgewiesen werden [99]. (s. 1.3.3.1)

Die zweihäufigste Mutation im PSSR1, die für ca. 25% der hereditären Pankreatitiden verantwortlich ist [48], ist die N29I Mutation, bei der es sich um eine Punktmutation handelt, hier von Adenin zu Thymin, wodurch in dem Codon 29 ein Austausch der Aminosäure Asparagin gegen Isoleucin resultiert [83].

Diese Mutation wird in älterer Literatur durch die Verwendung des Chymotrypsinnummerierungssystems auch noch fehlerhaft als N21I bezeichnet (siehe auch 1.3.3.1)

Es sind seitdem einige weitere Mutationen des kationischen Trypsinogen beschrieben worden z. B. A16V, D22G, K23R, N29I, N29T oder R122C [34, 26, 95, 101, 103] darunter auch die A121T Mutation, auf die im Abschnitt 1.3.3.2 genauer eingegangen wird.

Die häufigsten Mutationen des PSSR1-Gens (R122H und N29I) werden autosomal dominant vererbt und weisen eine unvollständige Penetranz von ca.40-80% auf. Desweiteren ist die Intensität und Schwere der Erkrankung selbst innerhalb einer Familie sehr variabel. Wahrscheinlich besteht eine leichte geschlechtsspezifische Manifestation auf der Seite des männlichen Geschlechtes [57, 60].

Zurzeit gibt es verschiedene Hypothesen, inwiefern die beschriebenen Mutationen zur Entwicklung einer chronischen Pankreatitis führen können. Diskutiert werden als Schlüsselmechanismen der verzögerte Abbau aktivierten Trypsins, die gestörte Hemmung des aktivierten Trypsins oder eine erleichterte Aktivierung des Trypsinogens [77,78, 94].

Für einzelne Mutationen konnten bereits einige der aufgeführten Mechanismen nachgewiesen werden, dies wird in den Beschreibungen der jeweiligen Mutation noch ausführlicher erklärt.

Bezüglich des klinischen Vergleiches zwischen Patienten mit einer R122H und der N29I Mutation gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben. Zunächst wurde postuliert, dass Patienten mit der R122H Mutation einen klinisch schwereren Verlauf aufweisen und im Durchschnitt auch früher erkranken als Patienten mit der N29I Mutation (Erkrankungsalter 10 Jahre im Vergleich zu 14 Jahre) [24, 78, 100].

Allerdings finden sich auch Angaben, dass sich kein Unterschied bezüglich der klinischen Manifestation der Mutation sowie des medianen Erkrankungsalters zeige und letzteres in beiden Fällen bei 13 Jahren liege [94].

Die hereditäre Pankreatitis ist nach der zystischen Fibrose die zweithäufigste Ursache für die chronische Pankreatitis im Kindesalter [45]. Klinisch ist eine Abgrenzung von einer anderen Genese der Erkrankung nicht möglich. Die Untersuchungen ergaben außerdem, dass ca. 4% der Probanden mit hereditären Veränderungen das Vollbild der Erkrankung mit globaler Pankreasinsuffizienz zeigten, über 50% der Probanden hatten nur minimale Beschwerden [94].

Eine weitere Folge hereditären Pankreatitis ist das stark erhöhte Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken. Das ist bereits bei der ethyltoxischen Pankreatitis um das 20-fache im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht. Bei hereditär bedingter Pankreatitis steigt das relative Risiko auf das 50-fache verglichen mit einer Kontrollgruppe [75, 94]. In anderen Publikationen wird das kumulative Risiko eines 70-Jährigen mit ca. 70% angegeben. Des Weiteren wurde beschrieben, dass sich dieses Risiko noch weiter erhöht, falls die Vererbung über die väterliche Linie stattfindet. In diesem Falle läge das Risiko eines 70 Jährigen bereits bei 75%. Inwiefern diese Patienten ohne klinische Beschwerden generell bezüglich des Auftretens eines Pankreaskarzinoms gescreent werden sollen, ist noch unklar [57].

Eine genetische Beratung mit eventuell angeschlossener molekulargenetischer Untersuchung sollte im Verdachtsfall auf eine hereditäre Genese angeboten werden. Dieser Verdacht ist gegeben, wenn die Familienanamnese positiv mit

zwei Betroffenen in drei Generationen und das Erkrankungsalter unterhalb des 40. Lebensjahres liegt. So können alle Patienten mit Mutationen im kationischen Trypsinogen und fast alle mit Mutationen in Spink1 erfasst werden [94].

1.3.3.1 Die R122H Mutation im PSSR1 Gen

Bei der Mutation R122H, die mit ca. 70% für den größten Anteil der hereditären Pankreatitiden verantwortlich ist [24, 48], handelt es sich um eine Punktmutation im dritten Exon des kationischen Trypsinogens. Hier hat ein Austausch der Base Guanin zu Adenin (CGC>CAC) stattgefunden. Der Änderung dieses Codons folgt ein veränderter Aminosäureeinbau, so dass an Position 122 der Aminosäuresequenz Arginin gegen Histidin ausgetauscht ist [104].

Diese Mutation ist zunächst als Arg117His oder R117H beschrieben worden. Gemäß einheitlicher internationaler Bezeichnungen durch Verwendung des Trypsinogennummerierungssystems anstatt des Nummerierungssystems für Chymotrypsin wird seit 2000 die Bezeichnung R122H verwendet. [44]

Die veränderte Aminosäuresequenz befindet sich nicht im aktiven Zentrum des Enzyms oder an der Bindungsstelle für den pankreatischen sekretorischen Trypsin Inhibitor (PSTI), so dass nicht von einer Beeinflussung dieser Strukturen ausgegangen wurde. Entsprechend konnte in mehreren *In-vitro*-Versuchen bestätigt werden, dass weder die R122H noch die N29I Mutation zu einer veränderten katalytischen Aktivität des kationischen Trypsins führen. [77,78]

Bekannt war zu diesem Zeitpunkt, dass sich im Bereich der Position 122 eine Autoschnittstelle für Trypsin befindet, da an dieser Stelle die Verbindung von zwei Domänen des Moleküls erfolgt. Bereits Mitte der 1980er Jahre konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Verbindung zwischen Position 122 und 123 um die wichtigste Autoschnittstelle des Enzyms handelt, bei deren Durchtrennung es, sofern auch die entsprechende Disulfidbrücke unterbrochen wird, eine Inaktivierung des Enzymes resultiert [37, 38, 76]. Serinproteasen wie Trypsin spalten Proteine an Positionen, die mit Arginin oder Lysin besetzt sind. [32] Es ist also davon auszugehen, dass durch die R122H Mutation diese Autoschnittstelle verschwindet und Trypsin verlängert aktiviert bleibt.

Diese These konnte durch *In-vitro*-Experimente zunächst an tierischen Trypsinmolekülen bestätigt werden. Dies gelang durch Inkubation der unterschiedlichen Trypsinmoleküle unter verschiedenen Bedingungen (pH 5 und pH 8, sowie der An- und Abwesenheit von Calcium) und der kontinuierlichen Messung der Trypsinaktivität. Diese sinkt durch die Autoaktivierung bei der R122H Mutation langsamer als beim Wildtyp. Dieser Effekt ist am stärksten bei pH 8 und Ca^{2+} -haltigem Milieu ausgeprägt [77,78, 96].

Diskutiert wurde ebenfalls inwiefern auch die Mutation N29I über denselben Pathomechanismus wie die Mutation R122H eine hereditäre Pankreatitis auslösen könnte. Durch eine Verschiebung einer Glutaminsäure näher an die Autoschnittstelle könnte die Mutation N29I diese ebenfalls beeinflussen (Ausbildung einer Salzbrücke). Neuere Erkenntnisse legen nahe, dass die N29I Mutation die Struktur des Aktivierungspeptides beeinflusst und somit auch die Zymogenaktivierung von Trypsinogen zu Trypsin. [77, 100]

Da gezeigt werden konnte, dass die N29I Mutation keinen Einfluss auf die Stabilität des mutierten Trypsins hat, wurde vermutet, dass es sich bei der erhöhten Stabilität des mutierten Trypsins nicht um den Hauptmechanismus der hereditären Pankreatitis handelt, sondern eher eine Veränderung der Zymogenaktivierung den entscheidenden Einfluss ausübt. [77]

Sahin Tóth et al. konnten dann im Jahr 2000 mit rekombinantem humanen Trypsinogen zeigen, dass sowohl die N29I als auch die R122H Mutation zu einer erhöhten Zymogenaktivierungsrate verglichen mit dem Wildtyp führen. Seither wird diese erhöhte Aktivierungsrate als initialer Schritt bei der Auslösung der hereditären Pankreatitis angesehen [78].

Dieser Effekt zeigte sich besonders in Abwesenheit von Ca^{2+} und konnte sowohl bei pH 5 als auch bei pH 8 nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte sich, dass die Autoaktivierungsrate bei der Mutation R122H stärker erhöht ist und die Aktivierung schneller abläuft als bei der Mutation N29I [78].

Die Höhe des Ca^{2+} Spiegels innerhalb der Zellen hat Anteil an der Regulation der Trypsinaktivität. Es ist essentiell für die katalytische Aktivität des Enzyms und unterstützt darüber hinaus die Schutzmechanismen vor vorzeitiger Aktivierung.

Unter Ca^{2+} freien Bedingungen ist die Zymogenaktivierung gehemmt und die Autolyse an der Autoschnittstelle 122 erleichtert, so dass das aktuell nicht benötigte Enzym degradiert werden kann [79].

Die Abbildung 2 zeigt eine enge Lagebeziehung der Ca^{2+} zur Autoschnittstelle an Position 122 einerseits und dem aktiven Zentrum andererseits. Es konnte noch nicht abschließend geklärt werden, welchen Effekt die Bindung von Calcium Ionen auf die Tertiärstruktur des Trypsins hat. Spektroskopische und radiologische Untersuchungen konnten einen stabilisierenden Einfluss und eine kompaktere räumliche Struktur durch das Calcium Ion nachweisen [8, 31,89]. Somit konnte eine höhere Flexibilität des calciumfreien Trypsinmoleküls nachgewiesen werden und kombiniert mit der Vermutung das wenig flexible Moleküle schlechter proteolysiert werden [68], ergibt sich die Erklärung, dass es aufgrund der Verminderung der Flexibilität die Bindung von Ca^{2+} zu einer verminderten Autolyse des Trypsinmoleküls führt.

Gerade unter Ca^{2+} freien Bedingungen konnte in *In-vitro*-Tests mit den mutierten Enzymen gezeigt werden, dass die Regulationsrolle des Ca^{2+} gestört wird. In Abwesenheit von Ca^{2+} ist die Aktivität und Zymogenaktivierung des Trypsins gehemmt und die Autolyse erleichtert. Hierdurch kommen die Mutationen zum Tragen, da sie diese Schritte durch die Erhöhung der Aktivierungsraten und Hemmung der Autolyse die entgegengesetzte Richtung fördern und somit innerhalb der pankreatischen Azinuszellen zu einer vorzeitigen Trypsinaktivierung führen.

Es handelt sich bei der Mutation R122H um eine „*gain of function mutation*“ [78], d. h. es findet ein Zugewinn der enzymatischen Eigenschaften statt. Da sich dieses auch in heterozygoten Allelträger manifestiert, erklärt dieses Modell auch das dominante Vererbungsmuster der Mutation R122H. Betrachtet man die Schutzmechanismen des Pankreas, bleibt erwähnenswert, dass der PSTI (s.o.) Inhibitor in der Lage ist, auch das mutierte Trypsin zu inaktivieren, allerdings nur bis zu einer Höhe von 20% der möglichen Gesamtaktivität des insgesamt intrazellulär vorhandenen Trypsinogens.

Falls die Aktivität diesen Wert übersteigt, d. h. mehr als 20% des vorhanden Trypsinogens in Trypsin umgewandelt wurden, greift als weiterer

Schutzmechanismus die Autoinaktivierung an der Autoschnittstelle bei Position 122, was bei dem mutierten Enzym (R122H) nicht mehr möglich ist [54,71,92,105]. Das Überschreiten des hemmenden Einflusses des PTSl könnte den schubweisen Verlauf der hereditären Pankreatitis erklären. Ein neuer Schub tritt auf, wenn das hemmende Potential des PTSl Inhibitors überschritten wird [99].

Transgene Mausmodelle haben inzwischen gezeigt, dass Mäuse, die die R122H Mutation tragen, zwar innerhalb einer Versuchslaufzeit von 18 Monaten keine spontane Pankreatitis entwickeln, jedoch spontane Azinuszellverletzungen aufweisen. Zusätzlich zeigen sie bei Cerulein-induzierter Pankreatitis höhere Serumamylase und -lipasewerte und eine histologisch schwerere Entzündungsreaktion als Vergleichstiere [5,82].

1.3.3.2 Die neu beschriebene A121T Mutation im PSSR1 Gen

Zu den weiteren Mutationen, die im kationischen Trypsinogen beschrieben wurden, zählt auch die Mutation A121T, bei der es ebenfalls durch eine Punktmutation zu einem Austausch der Base Guanin durch Adenin im 121. Codon des dritten Exons des kationischen Trypsinogens kommt. Diese Veränderung liegt also eine Position vor der Autoschnittstelle in der Primärstruktur des Trypsinogens. Diese Punktmutation resultiert in einem Austausch der Aminosäure Alanin durch Threonin und wird nach dem Einbuchstabencode mit A121T benannt [24].

Die Mutation befindet sich nach Röntgenstrahlanalysen auf der Oberfläche des Trypsinmoleküls in großer Entfernung zum katalytischen Zentrum des Enzyms. Allerdings zeigte sich eine räumliche Nähe zur Bindungstasche für Ca^{2+} , es liegt zwischen dieser Tasche und der Region, die in das Aktivierungspeptid übergeht. (s. Abb. 2) [24].

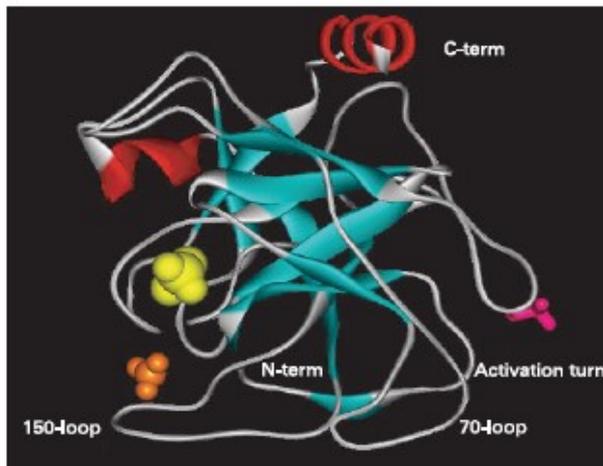


Abb. 2: 3D Modell des Trypsinogens nach Röntgenstrahlanalyse: Serin gebundenes Isopropylphosphat im aktiven Zentrum (gelb), phosphoryliertes Tyrosin 151 (orange), Helices (rot), β -Faltblattstruktur (hellblau), Loops (weiß), A121T (violett) in der Nähe des 70-loop (Ca^{2+} Bindungstasche) und des Aktivierungspeptides [24].

Diese neue Mutation wurde erstmals 2008 von Felderbauer et al. bei einem Indexpatienten beschrieben. Genetische Untersuchungen innerhalb der Familie dieses Patienten zeigten 4 weitere Patienten mit dieser Mutation. Allerdings zeigten nur 2 weitere klinisch symptomatische Verläufe mit Episoden von Oberbauchschmerzen. Nur bei dem Indexpatienten konnte eine chronische Pankreatitis nachgewiesen werden [24].

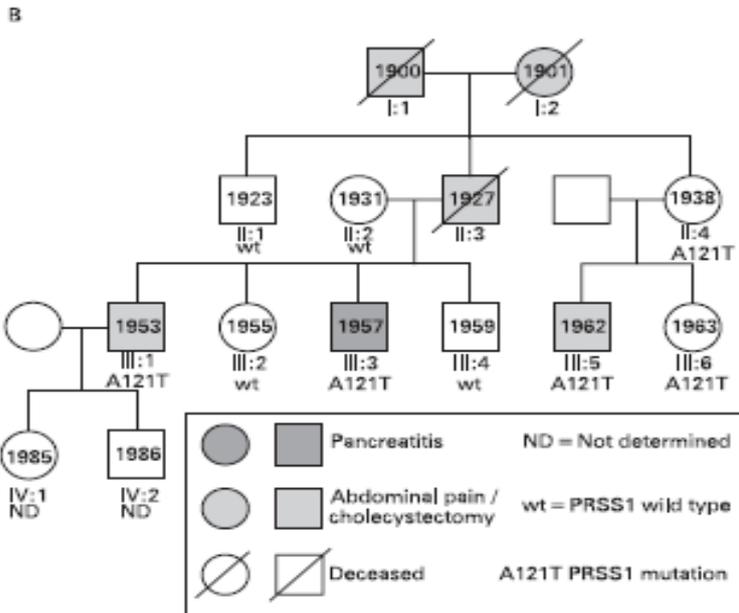


Abb. 3: Familienstammbaum der Familie des Indexpatienten (III:3), [24]

Weitere mögliche Mutationen, wie andere Mutationen im PSSR1 (z. B. N29I, R122H) oder Mutationen im Spink₁ konnten bei dem Indexpatienten und Familienmitgliedern als Ursache für diese Form der hereditären Pankreatitis ausgeschlossen werden [24].

Außer in dieser Familie wurde die A121T Mutation 2008 noch bei einer chinesischen Familie beschrieben. In dieser Familie hat der Indexpatient einen Sohn, der die Mutation trägt, jedoch nicht erkrankt ist. Der Vater des Indexpatienten war erkrankt, konnte jedoch nicht mehr molekulargenetisch untersucht werden [56].

Obwohl eine Aussage bezüglich des Vererbungsmusters bei nur wenigen betroffenen Familien schwierig ist, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hier um eine milder verlaufende Form der hereditären Pankreatitis handelt. In dieser Familie liegt die Penetranz der Erkrankung bei 20%, wobei es abzuwarten gilt, ob noch bei zwei weiteren Familienmitglieder mit chronischen Oberbauchschmerzen die Diagnose der chronischen Pankreatitis gestellt werden kann, da dies bisher nur bei dem Indexpatienten der Fall war. Des Weiteren liegt das Erkrankungsalter wesentlich höher als bei den zuvor beschriebenen Mutationen, bei denen die Patienten bereits im Kindesalter erkranken. Der

Indexpatient hatte die erste Episode Oberbauchschmerzen im Alter von 32 Jahren, wenn auch die Diagnose erst 10 Jahre später gestellt wurde.

Da sich diese neue Mutation N-terminal eine Position vor der häufigsten Mutation R122H befindet und auch weitere seltenere Mutationen (z.B. R122C, V123M) für diesen „hot spot“ beschrieben worden sind, wurde diskutiert inwiefern sie einen Einfluss auf die Stabilität des Trypsins oder die Aktivierung des Trypsinogens hat. Durch *In-vitro*-Experimente konnten Felderbauer et al. zeigen, dass Oligopeptide des Trypsinogens (Aminosäuren 118-127) mit der Mutation A121T signifikant schneller von normalem Trypsin gespalten wurden als die Wildtyp-Sequenz.

Die Reaktionskinetik war bei pH 5 und in Abwesenheit von Ca^{2+} um 80% gegenüber dem Wildtyp gesteigert. Unter Ca^{2+} freien Bedingungen waren sowohl die Autolyseraten des Wildtypes als auch der Mutation A121T erheblich reduziert, so dass von einer Ca^{2+} abhängigen Reaktion auszugehen ist. Ebenso zeigte sich eine pH Abhängigkeit mit einem erleichterten Reaktionsablauf bei pH 5 verglichen mit pH 8.

Wie zu erwarten war, zeigte das Oligopeptid mit der Mutation R122H eine signifikant geringere Reaktion als der Wildtyp [24,78].

Bei der Mutation A121T handelt es sich demnach zum um eine „*loss of function*“ Mutation, da das mutierte Trypsin schneller abgebaut wird. Diese ist die erste derartige Mutation, die im Rahmen der hereditären Pankreatitis beschrieben wird. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, inwiefern sowohl eine „*gain of function*“ Mutation, wie sie die Mutation R122H darstellt, als auch eine „*loss of function*“ Mutation, wie A121T, zu einer hereditäre Pankreatitis als gemeinsamer Endstrecke führen können [24].

Des Weiteren wird erneut die Rolle des Trypsins in den Azinuszellen diskutiert. Fraglich ist, inwiefern die Gefahr der Zerstörung der Zellstruktur durch vorzeitig aktiviertes Trypsin oder der Schutz durch Trypsin und anderer Proteasen durch die Autolyse des aktivierten Trypsins im Vordergrund steht [24].

Die Stellung des Trypsins innerhalb der intrapancreatischen Enzymkaskade ist ebenso umstritten.

Nach der klassischen Vorstellung steht das Trypsin am Beginn dieser Kaskade und setzt diese durch Aktivierung anderer Proteasen und Selbstaktivierung in

Gang. Durch seine Eigenschaft der Autolyse und den beschriebenen Veränderungen bei hereditärer Pankreatitis stellt sich die Frage, welchen Stellenwert die limitierende Position des Trypsins am Ende der Enzymkaskade besitzt.

Bei der A121T Mutation handelt es sich um eine „*loss of function Mutation*“, welche bezüglich der Autolyse eine genau entgegengesetzte Funktionsänderung des Wildtypes des Trypsins im Vergleich zu den am häufigsten Mutation N29I und R122H, welche die hereditäre Pankreatitis hervorrufen, auszulösen scheint. Da bisher nur wenige Mutationsträger weltweit bekannt sind, ist die klinische Relevanz dieser Mutation noch nicht sicher abzuschätzen. Die Penetranz der Erkrankung scheint niedriger und das Erkrankungsalter scheint höher zu liegen, als bei den durch die häufigeren Mutationen verursachten hereditären Pankreatitiden.

Diese Entdeckung wirft grundlegende Fragen über die Stellung des mutierten Enzyms in der Enzymkaskade des Pankreas auf, inwiefern die verlängerte Aktivitätszeit, die verkürzte oder beides zu den Initialschritten einer chronischen Pankreatitis gehört.

2 Zielsetzung dieser Dissertation

Die auslösenden Mechanismen einer akuten sowie einer chronischen Pankreatitis sind noch nicht ausreichend verstanden. Als molekulargenetische Zielstruktur konnte bei hereditären Pankreatitiden das mutierte Trypsin als Auslöser der Erkrankung identifiziert werden.

Durch die Entdeckung der molekulargenetischen Hintergründe von hereditären Pankreatitiden erhofft man sich, über die Charakterisierung der mutierten Proteine, die veränderten Eigenschaften zu erkennen und so auch die Pathophysiologie anderer Pankreatitisformen zu verstehen.

Dabei werden die erleichterte Aktivierbarkeit von Zymogenen zu katalytisch aktiven Enzymen sowie der verminderte Abbau von aktiven Enzymen im Pankreas postuliert.

Bereits für mehrere Mutationen, vor allem denen des kationischen Trypsinogens, des PSSR1 Genes, sind solche molekularbiologischen Veränderungen schon in ausführlichen *In-vitro*-Charakterisierungen der veränderten Trypsinmoleküle gezeigt worden.

Diese Dissertation beschäftigt sich mit einer neu beschriebenen Mutation, der A121T Mutation, welche sich nur eine Aminosäureposition vor der am häufigsten auftretenden Mutation R122H und somit an einem Mutations-Hotspot innerhalb des Trypsinmoleküls befindet [24, 90].

Diese ist bisher nur in 2 Familien mit hereditären Pankreatitiden in Deutschland und China beschrieben worden [4, 24, 56, 90].

Mit dieser Arbeit soll die Frage beantwortet werden, welchen Einfluss diese Punktmutation auf das Trypsinmolekül hat.

Da bisher noch sehr wenig über diese Mutation bekannt ist, sollte mit dieser Dissertation zunächst geklärt werden, ob die Mutation eine Veränderung auf grundlegende Bereiche hat, auf die bei den bisher bekannten Mutationen keine Veränderungen festgestellt werden konnten.

Dies beinhaltet die histopathologische Beurteilung, der durch die Mutation hervorgerufene Entzündung und die intrazelluläre Speicherung des mutierten Trypsins.

Des Weiteren soll untersucht werden, ob die neu beschriebene Mutation einen Einfluss auf die Expression des Trypsins hat.

Abschließend soll die Frage beantwortet werden, ob der Aminosäureaustausch eine Veränderung der katalytischen Aktivität des Enzyms nach sich zieht.

Eine Besonderheit dieser Untersuchungen und Analysen ist, dass humanes Pankreasgewebe mit der Mutation, welches intraoperativ entnommen wurde, zugegriffen werden konnte.

Hierzu liegen zum Vergleich mehrere Gewebe des Wildtyps des Trypsins vor und darüber hinaus und Pankreasgewebe des bisher einzigen in Europa bekannten erkrankten Mutationsträgers.

Somit ist das Ziel dieser Dissertation eine grundlegende Charakterisierung einer neu beschriebenen Mutation anhand von humanen Geweben und *In-vivo*-Experimenten, im Vergleich zu den bisher vorliegenden Ergebnissen der *In-vitro*-Analysen dieser und den häufigeren Mutationen.

3 Material

3.1 Geräte

Nitrozellulose Membran	RPN303D ECL Hybond, Amersham, Little Chalfont, Großbritannien
Glasplatten (für Gelelektrophorese)	Biorad, München
Gelelektrophoreseapparatur	Biorad, München
Stromversorgung	Power Pac 300, Bio Rad, München
Heizblock	MBT 250, Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Mikroskop	Olympus EX 41, Modell Bx 41 TF, Olympus, Hamburg
Vortexer	Minishaker MS 2, Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen
Fluorometer	Fluostar No 413-0580 BMG Labtechnologies, Offenburg
Pipetten	1-1000µl, Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme	High performance eluminescence (ECL) film, Product Code 28906841, 35x43cm, Amersham, Little Chalfont, Großbritannien
Röntgenfilmentwickler	Optimax X-Ray Film Processor, Modell 1170010-650610289, Protec, Oberstenfeld
Schüttler	Vibrax VXR Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen
Waagen	AC 211S MN 26 und WAC 6043-d 95052, Satorius, Göttingen
Whatman Papier	Absorbent Protection Shields, Cat. No. 230916, Benchkete, Whatman International Ltd., Maidstone, Großbritannien

Westernblotkammer	Trans-Blot SD Semi-Dry, Biorad, München
Well-Platte	Art. 655261, PS Microplatte 96 Well, unsteril, flat bottom, transparent, Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zentrifuge	Centrifuge 5417R, Rotor F45-230-11, Eppendorf, Hamburg

3.2 Substrate, Enzyme, Antikörper

3.2.1 Substrate für die Trypsinaktivitätsmessungen

Rhodamin 110	bis(CBZ- Isoleucyl-L-propyl-L-arginine amide), dihydrochloride, IPA, R6505 Molecular Probes,
--------------	--

3.2.2 Enzyme

Trypsin, bovine	T8003 8550 U/mg, Sigma-Aldrich, München
Trypsin, bovine	T1426, 12 400 U/mg, Sigma-Aldrich, München
Enteropeptidase (Enterokinase)	porcine, E0632, 0,5 U/mg, Sigma-Aldrich, München

3.2.3 Antikörper

3.2.3.1 primäre Antikörper

Immunfluoreszenz:

Anti-Trypsin (mouse)	MAB1482, Chemicon, Schwalbach/Ts.
Anti-Cathepsin B (chicken)	hergestellt von Ralf Nihues, gerichtet gegen NGSRPPCTGEGDTP
Anti- α -Catherin (rabbit)	C2081, Sigma-Aldrich, München

Anti- β -Catherin (rabbit)	C2206, Sigma-Aldrich, München
Anti-E-Catherin (mouse)	Cat 610182, Transduction Laboratories, Erembodegem, Belgien

Western Blot:

Anti GAPDH (rabbit)	9485-100, abcam, Cambridge, GB
Anti Trypsin (mouse)	s. o

3.2.3.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Chicken Cy 3 (rabbit)	Code 303-165-003, Jackson Immuno Research/Dianova, Newmarket, Großbritannien
Anti-Mouse Cy3 (rat)	Peroxidase (mit Tyramidverstärkung), K400 Envision, Dako, Hamburg
Anti-Mouse Cy3 (goat)	Code 115-165-100, Jackson Immuno Research/Dianova, Newmarket, GB
Anti-Mouse HRP (donkey)	Donkey NA 931V, Amersham, Little Chalfont, Großbritannien
Anti-Rabbit HRP (sheep)	Sheep, Lot 208572, NA 934V Amersham, Little Chalfont, Großbritannien

3.3 Puffer, Medien und Lösungen

BSA 10%	BSA-C 10% Bovine Serum Albumine, 900.099, Aurion, Seligenstadt
DAPI-Färbelösung	0.0001 % (w/v) DAPI in 1x PBS , D9542, Sigma-Aldrich, München
Laemmli-Probenpuffer (2x)	125 mM Tris pH 6.8, 20 % (v/v) Glycerin, 0.2 (w/v) Bromphenolblau, 4 % (w/v) SDS, 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol
NET	150 mM Natriumchlorid, 5 mM Na-EDTA 50 mM Tris pH 7.5, 0.5 % (v/v) Triton-

NET-Gelatine 0,2%	X-100 150 mM Natriumchlorid, 5 mM Na-EDTA, 50 mM Tris pH 7.5, 0.5 % (v/v) Triton-X-100, 0,2% Gelatine (w/v)
Ponceau Lösung	0.2 % (w/v) Ponceau S, 2 % (w/v) Trichloressigsäure
1x PBS (phosphate buffered saline)	137 mM Natriumchlorid, 27 mM Kaliumchlorid, 81 mM Natriumhydrogenphosphat, 15 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7.4
Stuffmark II AC1D1C	BUF 027C, Serotec, Düsseldorf
Tris Puffer	0,5 M Tris, pH 6,8 (Sammelgel) 1,5 M Tris, pH 8,8 (Trenngel) 0,1 M Tris, 0,005 M Kalziumchlorid, pH 8 (für Trypsinaktivitätsmessungen)
Tris-Glycin SDS Puffer	248 mM Tris pH 8.0, 1.918 M Glycin, 1 % (w/v) SDS
Transblot SDS Puffer	48 mM Tris-Base, 39mM Glycin, 0,0375% SDS(w/v), 20% Methanol
Vectashield	Mounting Medium, Cat. H-1000 Vector Laboratories, Burlingome, USA

3.4 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid	30% (37,5 :1),Cat. 161-0158, Bio Rad, München
Entwickler Lösung (Röntgenfilme)	Dx 21A, Dx 21B, Dx 21C (Mischung nach Herstellerangaben), Typon, Krauchthal, Schweiz

Fixierer Lösung (Röntgenfilme)	Hx21, Fx 21 (Mischung nach Herstellerangaben), Typon, Krauchthal, Schweiz
β -Mercaptoethanol	28625, Serva, Heidelberg
Molecular Weight Standard	Mischung aus folgenden Kits MW.SDS.70L Kit und MW.SDS.200 Kit Sigma-Aldrich, München Inhalt: Trypsin Inhibitor, Soybean (5 mg/vial), 20,1 kDa, T 9767 α -Lactalbumin, Bovine Milk (5 mg/vial) 14,2 kDa, L 6385 Carbonic Anhydrase, 29 kDa, C 2273 Albumin, Egg (Ovalbumin, [25 mg/vial]), 45 kDa, A 7642 Albumin, Bovine Plasma (25 mg/vial), 66 kDa, A7517 Phosphorylase B, Rabbit Muscle (0.5 mg/vial), 97,4 kDa, p 4649 β -Galaktosidase, Escherichia coli (0.5 mg/vial), 116 kDa, G 8511 Myosin, Rabbit Muscle (0.5 mg/vial), 205 kDa, M 3889
SDS 10%	Art. No. CN 30.3, Roth, Karlsruhe
Temed (Tetramethylethyldiamin)	Art. 2367.3, Roth, Karlsruhe
Trypsin Inhibitor (Soybean)	T9128, Sigma-Aldrich, München
Western Blotting Detection Reagent	Cat. No. RPN2106, Amersham, Little Chalfont, Großbritannien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich, München erworben.

4 Methoden

4.1 Gewinnung des pankreatischen Gewebes

Bei allen verwendeten Proben handelte es sich um humanes Bauchspeicheldrüsengewebe, welches aus unterschiedlichen therapeutischen Gründen von dem Zentrum für Pankreaschirurgie aus Bochum entnommen wurde.

Je nach Erkrankung des Patienten wurden die Gewebeproben einer der folgenden drei Gruppen zugeteilt. Gruppe A entsprach gesundem Gewebe, Gruppe B dem von Patienten mit chronischer Pankreatitis und Gruppe C enthielt Tumorgewebe. Der Indexpatient mit der A121T Mutation wurde jeweils außerhalb dieser Gruppen einzeln betrachtet und mit der Abkürzung I bezeichnet.

Aufgrund der Tatsache, dass man aus ethischen Gründen kein humanes Pankreasgewebe von vollständig gesunden Personen chirurgisch entnehmen kann, handelte es sich bei der Gruppe A um Gewebe, welches bei an Karzinomen des Pankreas erkrankten Patienten als nicht befallen und morphologische unauffällig eingestuft wurde.

Nach der intraoperativen Gewebeentnahmen wurden die Proben in flüssigem Stickstoff bei -270 °C schockgefroren und anschließend bei -80 °C zwischengelagert. Für die Immunfluoreszenzanalyse (4.3) wurden einige der Pankreasgewebeproben in Paraffin eingebettet und in 4 mm Schnitten auf Objektträgern verteilt. Für die Detektion von Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) und Trypsin (4.4-4.6) sowie die Trypsinaktivitätsmessungen (4.7) wurden Homogenate dieser Pankreasgewebeproben hergestellt.

4.2 Herstellung von Pankreashomogenaten

Teile der Gewebeproben wurden in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff versetzt und zu einem feinen Puder zerrieben. Das Puder wurde mit 1 ml eisgekühlten PBS gemischt und mit Hilfe eines Homogenisators nach Potter der

Weite S mit zehn Schüben weiter homogenisiert. Das Homogenat wurde mit einem Ultraschallstab (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danburg USA) bei einem Tastverhältnis von 35% zweimal 30 Sekunden behandelt, hierbei wurde das Homogenat auf Eis gekühlt. Das Homogenat wurde für 5 min bei 16000 g und 4°C zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R), der Überstand abgenommen, aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Homogenat wurde abschließend bei -80°C gelagert.

Als Puffer für die Homogenate wurde 1x PBS verwendet. Es erfolgte kein Zusatz von Proteaseinhibitoren, da diese für die Messung der Trypsinaktivität kontraproduktiv gewesen wären.

In den Pankreashomogenaten wurden nach der Testmethode nach Bradford die Proteinmengen bestimmt.

4.3 Immunfluoreszenz

Zur Vorbereitung der Immunfluoreszenz wurden diese Gewebeschnitte (s. 4.1) zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe (Xylol 100%, Ethanol 100%, Ethanol 70% für jeweils 2x 5 Minuten) entparaffiniert. Zur Demaskierung, d. h. zum Öffnen des Gewebes, wurden die Schnitte in Stuffmark II (AC1D1C, Serotec) 10 min im Schnellkochtopf bei höchstmöglichem Druck gekocht. Die anschließende Abkühlung der Schnitte erfolgte in 1x PBS bei Raumtemperatur. Zur Blockade der unspezifischen Antikörperbindungsstellen wurden die Schnitte für 30 min mit 5% bovinem Serumalbumin (BSA-C, Aurion) inkubiert. Ein zur Erkennung des darzustellenden Moleküls geeigneter primärer Antikörper wurde über Nacht bei 4°C auf den Schnitten belassen und anschließend zusätzlich für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Neben dem zu untersuchen Schnitt wurde als Negativkontrolle ein vergleichbarer Schnitt auf demselben Objektträger nur mit steriler PBS Lösung inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der primäre Antikörper mit sechs Waschschritten à 5 min mit 1x PBS wieder entfernt.

Der sekundäre Antikörper, der gegen den F_c-Teil des primären Antikörper gerichtet und an den Fluorophor wie z. B. Cy3 gekoppelt war, wurde für eine

Stunde bei Raumtemperatur sowohl auf die Positivkontrolle als auch auf die Negativkontrolle aufgetragen. Er wurde dann wie der primäre Antikörper durch die entsprechenden Waschschriffe wieder entfernt.

Zur Anfärbung der Zellkerne wurden die Schnitte anschließend mit einer 1:10000 Verdünnung des DNA Farbstoffes DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) für jeweils 10 s inkubiert. Dieser wurde ebenfalls mit sechs Waschriffen à 5 min mit 1x PBS entfernt.

Nach Entfernung des 1x PBS wurden die Gewebeschnitte unter Verwendung des Mediums Vectashield (Vector Laboratories) luftdicht mit Nagellack auf Objektträgern fixiert. Nach diesem abschließenden Schritt konnte die Betrachtung mittels des Fluoreszenzmikroskopes durchgeführt werden.

4.4 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) diente der Auftrennung von Proteinen gemäß ihrer Größe in einem Polyacrylamidgel. Der Zusatz von SDS (Sodiumdodecylsulfat) dient dabei der Denaturierung der Proteine, der Zerstörung der Tertiär- und Quartärstruktur und sorgt für ein konstantes Masse-Ladungsverhältnis. Den Proteinproben wird zur Reduktion von Disulfidbrücken β -Mercaptoethanol zugesetzt. Durch die Beladung mit negativen Ladungen durch SDS wandern die Proteine im aufgebauten Spannungsfeld in Richtung der Anode [72].

Das Polyacrylamidgel bestand aus einem Sammel- und einem Trenngel. Proteinproben wurden im Sammelgel zunächst in einer schmalen Bande konzentriert und anschließend im Trenngel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

Das Trenngel hatte folgende Zusammensetzung: 7,5 ml 1,5 M Tris, pH 8,8; 8,33 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30% (37,5: 1); 3,97 ml Aqua dest. ; 0,1 ml SDS 10%, als Polymerisationsinitiatoren: 0,1 ml Ammoniumpersulfat 10%; 10 μ l Temed und enthielt demnach 12% Acrylamid/Bisacrylamid. Ein 12%iges Polyacrylamidgel eignete sich gut für die Auftrennung der in den Proben (s. „Herstellung der

Proben“) zu untersuchenden Proteinen Trypsin und GAPDH, die eine Molekülgröße von 29 und 42 kDa besitzen.

Nach der Polymerisierung wurde ein 10%iges Sammelgel auf das Trenngels geschichtet (Zusammensetzung: 1,25 ml 0,5 M Tris, pH 6,8; 1 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30% (37,5: 1); 7,6 ml Aqua dest., 0,1 ml SDS 10%, 0,1 ml Ammoniumpersulfat; 10 µl Temed).

Mit einem Taschenkamm wurden in diesem Sammelgel zehn Taschen geformt. In die äußeren Taschen wurde zur Beurteilung der Größe der entstehenden Banden eine Mischung aus zwei Molekulargewichtsstandard Kits von Sigma Aldrich (s. 3 Material) auf getragen. Dieser wies zwei Banden bei 29 und 45 kDa auf und eignete sich somit gut zum Größenvergleich mit den gesuchten Proteinen.

Die aufgetragene Proteinmenge war von Probe zu Probe (siehe „Herstellung der Proben“) unterschiedlich, da diese sehr unterschiedliche Proteingehalte aufwiesen. In Etablierungsversuchen ist versucht worden, die Auftragungsmengen so aneinander anzupassen, dass Banden vergleichbarer Intensität entstanden. Die Proben wurden im Verhältnis 1:10 von der Ursprungsprobe in Laemmli-Puffer (2x), welcher bereits β -Mercaptoethanol enthielt, und Aqua dest. verdünnt. Vor dem Auftragen in die Geltaschen wurden alle Proben sowie der Molekulargewichtsstandard 5 min auf 100°C erhitzt und für 10 s zentrifugiert. Die Gelelektrophorese erfolgte mit Tris-Glycin Puffer (Zusammensetzung: 248 mM Tris pH 8,0, 1.918 M Glycin, 1 % (w/v) SDS) unter konstanter Spannung (150 V) für ca. 80 min, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

4.5 Western Blot

Der Western Blot ist eine etablierte Methode, um eine zuvor durch eine Gelelektrophorese aufgetrennte Proteinmischung dauerhaft auf einer Nitrozellulosemembran zu fixieren [62].

Dies erfolgte nach der „semidry“ Methode unter Verwendung des Transblot-SDS (Zusammensetzung: 48 mM Tris-Base, 39 mM Glycin, 0,0375% SDS (w/v), 20%

Methanol) und Whatmanpapier in der Blotkammer Trans-Blot SD Semi-Dry von Biorad.

Der Blot wurde bei konstanter Stromstärke (300 mA) über 60 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde die Membran für ca. 1 min in Ponceau-Lösung gefärbt, bis die Banden des Molekulargewichtsstandards sichtbar wurden und eingezeichnet werden konnten. Die Ponceaufärbung wurde durch vorsichtiges Waschen mit Aqua dest. und NET (Zusammensetzung: 150 mM Natriumchlorid, 5 mM Na-EDTA, 50 mM Tris pH 7.5, 0.5% (v/v) Triton-X-100) wieder entfernt, die beschriftete Membran wurde in NET Lösung bei 4°C gelagert.

4.6 Immunodetektion nach dem Western Blot

Die Nitrozellulosemembran wurde zur Blockade der unspezifischen Antikörperbindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 0,2% Gelatine in NET inkubiert.

Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper (1:10 000 verdünnt in 0,2% Gelatine/NET) auf einem Schüttler bei 4°C über Nacht inkubiert. Der primäre Antikörper wurde mit drei Waschschritten mit NET von jeweils 5 min Inkubationszeit wieder entfernt.

Der für den primären Antikörper spezifische sekundäre Antikörper (1:20 000 verdünnt in 0,2% Gelatine/NET) wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler auf der Membran belassen und dann mit drei jeweils 5 min dauernden Waschschritten wieder entfernt.

Der verwendete Antikörper war an das Enzym „Horseradish Peroxidase“ (HRP) gekoppelt. Bei Inkubation mit dem Detektionsreagenz (ECL Western Blotting Detection Reagenz, Amersham) katalysierte die HRP die Umsetzung des enthaltenen Substrats. Das oxidierte Substrat fluoreszierte und konnte mit Hilfe von Röntgenfilmen detektiert werden.

Der sekundäre Antikörper wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler auf der Membran belassen und dann mit drei jeweils fünf Minuten dauernden Waschperioden wieder entfernt.

Die Nitrozellulosemembran wurde hierzu für 5 min in 1x PBS inkubiert und im folgenden Schritt für eine Minute in der frisch angesetzten 1:1 Mischung des ECL Western Blotting Detection Reagenz 1+2 (Amersham) belassen.

Dieser Schritt lieferte das Substrat für die Lichtreaktion, ab hier fanden die Arbeitsschritte in der Dunkelkammer statt.

Die Membran wurde auf beschichtetem Whatmanpapier in Folie verpackt und für die jeweiligen Belichtungszeiten (in aufsteigender Zeitlänge von 2 s, 5 s, 10 s, 15 s, 1 min, 5 min, 10 min, 20 min) auf einen Röntgenfilm gelegt.

Der auf diese Weise belichtete Film wurde abschließend mit einem Röntgenfilmentwickler (Optimax X-Ray Film Processor, Protec) entwickelt.

Die Röntgenfilme mit den geeignetsten Belichtungszeiten wurden eingescannt und die Bandenintensität mittels der Software Bioprofil von Biolight semiquantitativ densitometrisch ausgewertet.

4.7 Trypsinaktivitätsmessungen

Die Enzymaktivität von Trypsin in den Pankreashomogenaten (siehe 4.2) wurde quantifiziert.

Dabei wurde sich des Prinzips der Fluoreszenzauslöschung oder des sogenannten *quenching* (engl. auslöschen) bedient. Hierzu wurde das synthetische Substrat Rhodamin 110 IPA (bis(CBZ- amide), dihydrochloride, Molecular Probes) benutzt. Die Abkürzung IPA steht für die Aminosäuresequenz, welche durch das zu untersuchende Enzym gespalten wird. In diesem Fall war diese Sequenz Isoleucyl-L-propyl-L-arginine, welche nach dem Arginin durch Trypsin gespalten wird. Die Besonderheit dieses synthetischen Substrates ist, dass beide Spaltprodukte, welche nach der enzymatischen Reaktion entstehen, an ein fluoreszenzaktives Molekül gebunden sind. D.h. dieses Molekül ist entweder in der Lage ein Fluoreszenzsignal zu emittieren, in diesem Fall wird es als Fluorophor bezeichnet oder ein emittiertes Signal aufzunehmen, d.h. auszulöschen und in diesem Fall wird es als Quencher bezeichnet [47, 60, 65, 68].

Falls dieses Substrat noch intakt ist, also noch nicht enzymatisch gespalten wurde, findet keine Emission eines Fluoreszenzsignals statt, da sich der Fluorophor und der Quencher in ausreichender räumlicher Nähe befinden, dass das von Fluorophor emittierte Signal durch den Quencher aufgenommen werden kann. Es kommt also zur Fluoreszenzauslöschung oder *Quenching*.

Nach der abgelaufenen Spaltung ist diese räumliche Nähe nicht mehr gegeben, so dass es zur messbaren Emission des Fluoreszenzsignals kommt. Diese ist proportional zur Anzahl der gespaltenen Substrate und spiegelt somit die enzymatische Aktivität des Enzyms wieder.

Die Trypsinaktivität konnte so indirekt fluorometrisch bestimmt werden.

Alle Messungen wurden bei 37°C und pH 8 durchgeführt. Unter den jeweiligen Bedingungen ist jeder Messwert dreifach bestimmt worden, d. h. jede Probe wurde dreimal auf benachbarte Wells einer Platte pipettiert, um evtl. Schwankungen ausgleichen zu können.

Es sind verschiedene Versuchsbedingungen zum Einsatz gekommen (s. Tabelle 1). Zunächst ist die katalytische Aktivität im Homogenat ohne weitere Zusätze mit Ausnahme des Substrates und dem Tris-Puffer bestimmt worden.

Des Weiteren wurden unter denselben Bedingungen die Werte nach einer 30 minütigen Inkubationszeit mit dem Enzym Enteropeptidase (Enterokinase) bestimmt. Dieses katalysierte physiologisch die Abspaltung des Aktivierungspeptides und wandelte so inaktives Trypsinogen in aktives Trypsin um. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um festzustellen, wie viel zusätzliche katalytische Aktivität sich durch andernfalls inaktiv vorliegendes Trypsinogen in den Homogenaten befand.

Außerdem fanden Messungen sowohl ohne, als auch mit durchgeführter Enteropeptidaseaktivierung in Anwesenheit eines Trypsininhibitors statt. Die Messungen wurden zusätzlich mit einem spezifischen Trypsin Hemmstoff (Soybean Inhibitor) durchgeführt, so dass sich aus der Differenz der Messungen mit und ohne Inhibitor ersehen ließ, welcher Anteil der katalytischen Aktivität auf Trypsin/Trypsinogen zurückzuführen ist.

Ein kurzer Exkurs zu Trypsin Inhibitoren aus den Keimen von Hülsenfrüchten. Es werden zwei verschiedene Trypsin Inhibitoren der Sojabone (*soybean*) unterschieden: Bowman-Birk (BBI) und Kunitz Typ [52, 106].

Ersterer hemmt Trypsin und Chymotrypsin, bei letzterem findet eine deutlich stärkere Hemmung des Trypsins statt, er ist demnach spezifischer für Trypsin.[106] Es handelt sich bei der Inhibition um eine kompetitive Hemmung, bei der der Hemmstoff wie das Substrat an das aktive Zentrum des Trypsins bindet und dieses so blockiert [27,28].

Bei diesen Messungen waren zwei verschiedenen Blanks (oder Blindwerte) zum Einsatz gekommen, um die Hintergrundfluoreszenz von den übrigen Messwerten subtrahieren zu können.

Als erster Blank ist die gleiche Mischung aus dem Substrat und Tris-Puffer eingesetzt worden, wie für die Proben, welche ohne den Trypsininhibitor gemessen wurden (80 µl 1x Tris-Puffer, 20 µl Substrat IPA).

Da der Trypsininhibitor eine Eigenfluoreszenz zeigte, musste für die Messwerte mit dem Inhibitor ein zweiter Blank eingesetzt werden. Dieser wurde ebenfalls im gleichen Mischungsverhältnis wie in den Proben mit Zusatz des Inhibitors verwendet (70 µl 1x Tris-Puffer, 20µl Substrat IPA, 10 µl Trypsininhibitor). Dieser Blank wurde von den Proben Messwerten, welche mit Trypsininhibitor gemessen wurden, subtrahiert.

Dementsprechend erfolgte die Berechnung der spezifischen Aktivität von Trypsin gemäß folgender Rechnung:

$$F_{0I} - F_{+I} = \Delta F$$

Fluoreszenz der Probe ohne Inhibitor = F_{0I}

Fluoreszenz der Probe mit Inhibitor = F_{+I}

Für die Bestimmung dieser Hintergrundfluoreszenz sind verschiedene Blanks (Blindwerte) pro Wellplatte bestimmt worden. Als erster Blank ist eine Mischung aus dem verwendeten Substrat und dem Tris-Puffer (s. 4.7.) eingesetzt worden.

Dieser wurde wie die Proben in drei Replikaten aufgetragen. Der gemittelte Wert dieses Blanks wurde von allen Proben, welche ohne Inhibitor gemessen wurden als Hintergrundaktivität subtrahiert.

Als zweiter Blank wurde eine Mischung eingesetzt in der sich zusätzlich zu den Reagenzien im ersten Blank der verwendete Trypsininhibitor befand.

Es wurde ein zusätzlicher Blank eingesetzt, da sich bei vorherigen Messungen bei den Messwerten mit Inhibitor eine höhere Hintergrundfluoreszenz zeigte als bei Messungen ohne Inhibitor.

Dieser zweite Blank wurde als Subtrahend für die Messungen, welche mit Inhibitor durchgeführt wurden, genutzt, um die Hintergrundfluoreszenz von den Messwerten abzuziehen.

Innerhalb der Fluoreszenzentwicklung über die Messzeit wurde bei jeder Probe der lineare Bereich bestimmt.

Pro Probe lagen demnach nach Mittelung der Dreifach-Bestimmung vier verschiedene Messwerte vor:

- 1) Aktivität ohne Inhibitor und ohne Enteropeptidase Aktivierung
- 2) Aktivität mit Inhibitor und ohne Enteropeptidase Aktivierung
- 3) Aktivität ohne Inhibitor und mit Enteropeptidase Aktivierung
- 4) Aktivität mit Inhibitor und mit Enteropeptidase Aktivierung

Für diese vier Versuchsbedingungen mit entsprechenden Blanks wurde jeweils eine separate 96-Well Platte verwendet.

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis, um das Risiko eines Aktivitätsverlustes durch Autodegradation möglichst gering zu halten.

Das Gesamtvolumen pro Well der 96 Well-Platten betrug bei allen Messungen 100µl.

Die verschiedenen Versuchsbedingungen setzten sich wie folgt zusammen:

Tabelle 1: Versuchsbedingungen zur Messung der Trypsinaktivität in Pankreashomogenaten.

	Ohne Inhibitor	mit Inhibitor
Ohne Enteropeptidase	Versuchsbedingung 1 10 µl Probe (Verdünnung 1:5) 20 µl Substrat IPA (50 mM) 50 µl Tris-Puffer (2x) 0 µl Trypsininhibitor (0,2 mg/ml) 20 µl Aqua dest.	Versuchsbedingung 2 10 µl Probe (Verdünnung 1:5) 20 µl Substrat IPA (50 mM) 50 µl Tris-Puffer (2x) 10 µl Trypsininhibitor (0,2 mg/ml) 20 µl Aqua dest.
mit Enteropeptidase	Versuchsbedingung 3 10 µl Probe (Verdünnung 1:20) 20 µl Substrat IPA (50 mM) 50 µl Tris-Puffer (2x) 0 µl Trypsininhibitor (0,2 mg/ml) 10 µl Enteropeptidase (200 mU/ml) 10 µl Aqua dest.	Versuchsbedingung 4 10 µl Probe (Verdünnung 1:20) 20 µl Substrat IPA (50 mM) 50 µl Tris-Puffer (2x) 10 µl Trypsininhibitor (0,2 mg/ml) 10 µl Enteropeptidase (200 mU/ml) 0 µl Aqua dest.

Verwendete Lösungen

Standards

Trypsin-Standards wurden mit humanem Trypsin (Sigma Nummer, Lot 104K7575, 12,400 U/mg) mit 1 mg/ml in einer Lösung von 1 mM HCl angesetzt und anschließend mit dem auch für die Verdünnung der Proben verwendete Tris-Puffer (s. unten), auf 6,2 mU/mg, 3,1 mU/mg und 1,55 mU/mg verdünnt.

Tris-Puffer

0,1 M Tris, 0,005 M CaCl₂, pH 8

Substrat

Das Substrat wurde von der Ursprungslösung mit einer Konzentration von 30 mM unter Verwendung des oben genannten Tris-Puffers auf eine Konzentration 50 μ M verdünnt.

Proben

Die Originalproben (s. 4.2) sind in zwei verschiedenen Verdünnungen gemessen worden. Da nach der oben beschriebenen Enteropeptidaseaktivierung wesentlich höhere Fluoreszenzemissionsraten zu erwarten waren, sind hier höhere Verdünnungen eingesetzt worden (Versuch 3+4), als bei den Messungen ohne Enteropeptidaseaktivierung (Versuch 1+2), um nicht frühzeitig im Bereich maximal messbarer Fluoreszenz des Fluorometers zu messen.

Bei den Messungen ohne Enteropeptidaseaktivierung (Versuch 1+2) sind Verdünnungen von 1:5 der Originalprobe und mit der Enteropeptidaseaktivierung (Versuch 3+4) Verdünnungen von 1:20 eingesetzt worden. Die Verdünnung erfolgte jeweils mit eisgekühltem Tris-Puffer.

Trypsin-Inhibitor

Der verwendete Trypsininhibitor wurde nach Herstellerangaben in Aqua dest. gelöst und mit einer Konzentration von 0,2 mg/ml benutzt.

Enteropeptidase

Die verwendete Enteropeptidase wurde in einer Konzentration von 200mU/ml verwendet.

Die Anregung des Fluorophors fand bei einer Wellenlänge von 485 nm statt. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 520 nm bestimmt.

5 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war der morphologische und funktionelle Vergleich zwischen Wildtyp-Trypsin und A121T -Trypsin.

Als Besonderheit ist dabei der In-vivo-Vergleich an humanem Gewebe herauszustellen.

Es lagen verschiedene Gewebeproben vor, welche in Erkrankungsgruppen eingeteilt wurden, um eine bessere Vergleichbarkeit und Übersicht zu erhalten.

Die Gruppen wurden jeweils mit dem Gewebe des Indexpatienten, welcher die A121T Mutation trägt, verglichen.

Die Gruppeneinteilung wurde wie folgt vorgenommen:

Gruppe A Gesundes Gewebe

Gruppe B Pankreatitistgewebe

Gruppe C Tumorgewebe

I Indexpatient (A121T Träger)

Bei Gruppe A handelt es sich um mikroskopisch unauffälliges Gewebe von Patienten, welche aufgrund eines Pankreaskarzinoms operiert worden sind.

Die Ergebnisse dieser Dissertation setzen sich aus drei Teilen zusammen. Der erste Teil ist deskriptiv und behandelt den morphologischen Vergleich der verschiedenen Gruppen anhand von lichtmikroskopischen als auch fluoreszenzmikroskopischen Bildern.

Der zweite Teil beschäftigt sich mit den Unterschieden der Trypsinmoleküle der einzelnen Gruppen und vergleicht deren Wanderungseigenschaften im Western Blot und die Erkennung von Domänen durch spezifische Antikörper.

Der dritte Teil dient dem funktionellen Vergleich der Trypsine der jeweiligen Gruppen. Hier wurden in zwei Schritten die Enzymaktivitäten der Gruppen und die Aktivierbarkeit durch Enteropeptidase verglichen.

5.1 Morphologische Beurteilung des Pankreasgewebes

Zur morphologischen Beurteilung des verwendeten Pankreasgewebes wurde von den erstellten Gewebeschnitten neben den Immunfluoreszenzfärbungen auch Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

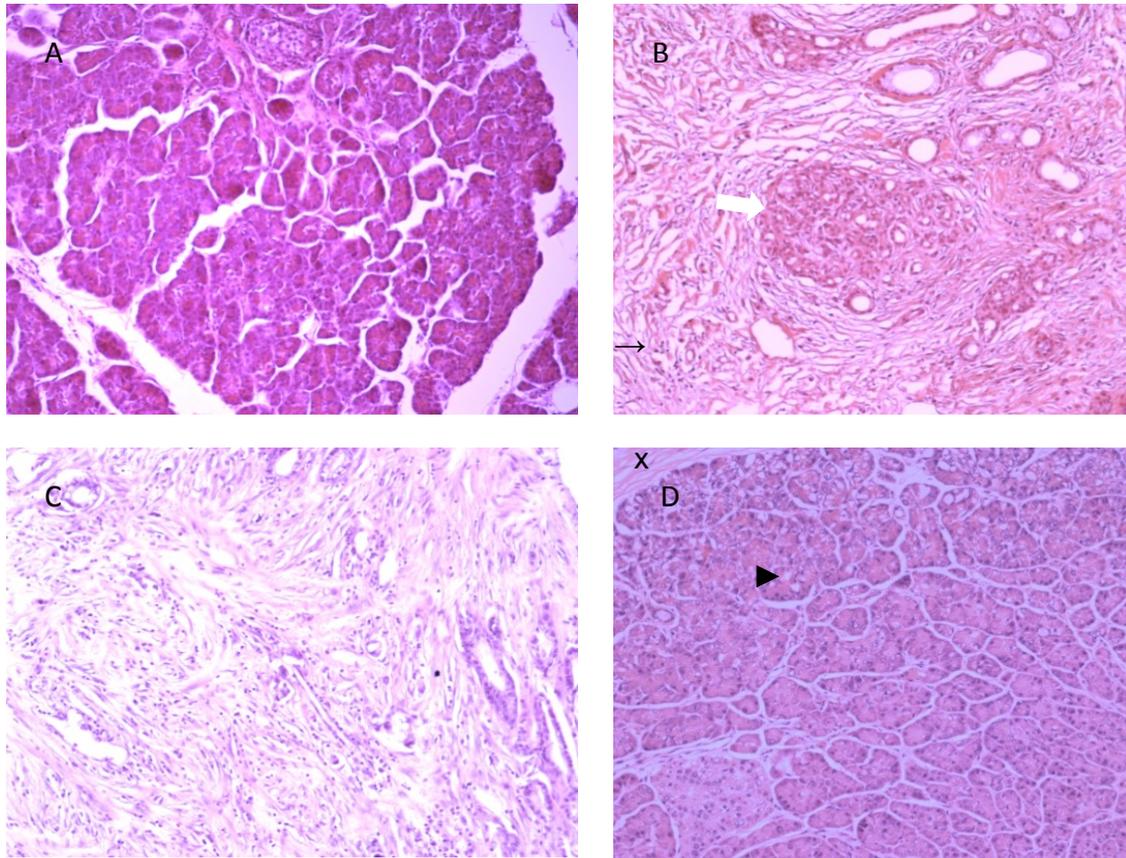


Abb. 4 Exemplarische HE (Hämatoxylin-Eosin) Färbungen der Pankreas Gewebeschnitte in 10x Vergrößerung. A gesundes Gewebe (Gruppe A), B Pankreatitisgewebe (Gruppe B), C Tumorgewebe (Gruppe C), D Gewebe des Indexpatienten mit A121T Mutation (I)

Durch die Kombination der beiden Färbestoffe werden unterschiedliche Zellbestandteile gemäß ihrem Protonierungsgrad gefärbt. Basische Komponenten, wie z. B. DNA oder Ribosomen, werden durch Hämatoxylin blau gefärbt, während saure Strukturen, wie z. B. Proteine des Zytosols, durch Eosin rot gefärbt werden.

Die Abbildung 4A zeigt normales exokrines Pankreasgewebe, welches eine physiologische Azinuszellstruktur aufweist. Die Zellen zeigen eine basale Basophilie und eine apikale Eosinophilie bedingt durch die dort vorhandenen Zymogengranula [42].

Die verbreitert erscheinenden interzellulär Spalten sind fixationsbedingt.

Abbildung 4B zeigt exemplarisch Gewebe eines Patienten mit einer chronischen Pankreatitis. Man erkennt intralobuläre Fibrosezonen und kaum noch azinäre Zellen. In der Mitte des Ausschnittes ist eine Insel von übrig gebliebenen pankreatischen Drüsenzellen erkennbar, welche aber auch schon morphologisch verändert sind (siehe weißer, dicker Pfeil). Im unteren Randbereich des Ausschnittes ist eine leukozytäre Infiltration des Gewebes erkennbar (siehe →).

In Abbildung 4C ist ein Adenokarzinom des Pankreas gefärbt. Adenokarzinome des Pankreas gehen meist von duktalem Zellen der Pankreasausführungsgänge aus und zerstören durch infiltratives Wachstum die Azinuszellstruktur. In diesem Bildausschnitt sind keine morphologisch normal ausgebildeten pankreatischen Drüsenzellen mehr erkennbar. Im rechten Teil des Bildausschnittes sind noch atypisch geformte Drüsenabschnitte des neoplastischen Gewebes feststellbar. Die neoplastischen Zellen induzieren die Bildung von extrazellulärer fibrotischer Matrix, welche ubiquitär in der Abbildung zu erkennen ist. Dieser Vorgang, der bei Karzinomen des Pankreas häufig vorkommt, wird als Desmoplasie bezeichnet [7, 76].

In Abbildung 4D wird Pankreasgewebe des Indexpatienten mit der A121T Mutation dargestellt. Die Drüsenstruktur des Pankreas ist weitestgehend erhalten. Im oberen linken Bildausschnitt finden sich vermehrt intrazelluläre Fettvakuolen (siehe ►). Des Weiteren zeigt sich eine ödematöse Schwellung der Azinuszellen. In der oberen linken Ecke ist eine vermehrt Bindegewebsbildung sichtbar (siehe X)

Dementsprechend befinden sich die beiden hier dargestellten chronischen Pankreatitiden in unterschiedlichen Erkrankungsstadien. Allerdings lassen sich im Fall des Indexpatienten keine morphologischen Auffälligkeiten finden, welche nicht in der Literatur für die chronischen Pankreatitiden anderer Genese beschrieben werden.

In Abbildung 4D wird ein früheres Stadium der Pankreatitis als in Abbildung 4B. dargestellt. Es sind bis auf den oberen linken Bildrand (siehe X, Abb. 4D) keine Fibrosezonen erkennbar. Die Läppchenstruktur ist noch weitestgehend intakt. Einige der Azinuszellen zeigen bereits intrazelluläre Fettvakuolen, die bei allen Formen der chronischer Pankreatitis auftreten können, jedoch auch in Mausmodellen bezüglich hereditären Pankreatitiden beschrieben werden und welche als erste Anzeichen für Zellnekrosen interpretiert werden [5, 55].

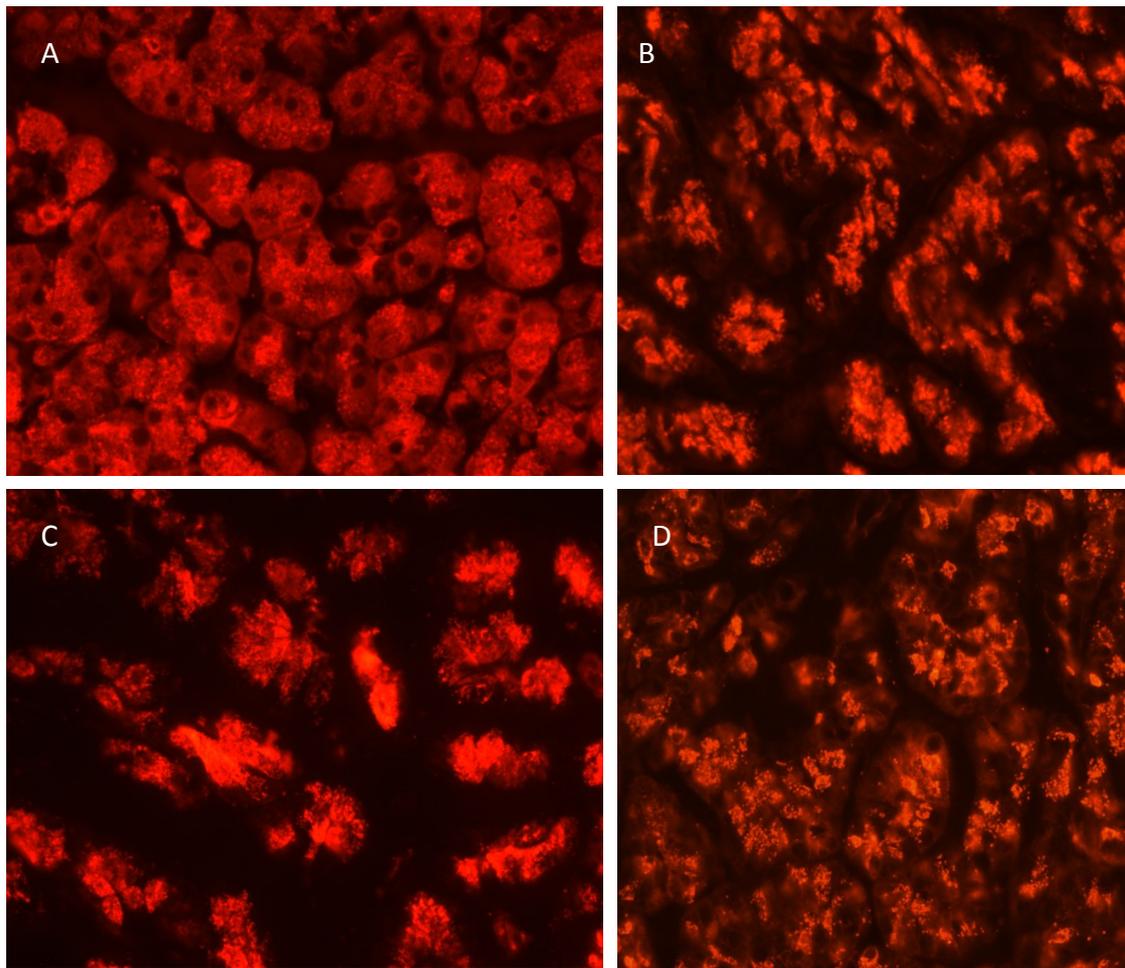


Abb. 5 Exemplarische Immunfluoreszenzfärbungen von Trypsin. Die Detektion erfolgte mit einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper. 40x Vergrößerung. A gesundes Gewebe, B Pankreatitisgewebe, C Tumorgewebe, D Gewebe des Indexpatienten mit A121T Mutation.

In den Immunfluoreszenzaufnahmen (Abbildung 5) ist die intrazelluläre Speicherung von Trypsinogen dargestellt worden. Diese erfolgt in sogenannten

Zymogengranula, welche sich am apikalen Pol der Zelle sammeln, um ihren Inhalt je nach Bedarf in das Lumen der Ausführungsgänge des Pankreas abgeben zu können. Diese feingranulierte Struktur der Zymogengranula ist auf allen vier Immunfluoreszenzbildern erkennbar. In Abbildung 5A kann man durch die nahezu vollständige Ausfüllung des Zytoplasmas mit Zymogengranula mit Aussparung der Zellekerne gut die azinuszellreiche Struktur physiologischen Pankreasgewebes erkennen.

Sowohl in Abbildung 5B als auch in Abbildung 5D, welche beide eine chronische Pankreatitis zeigen, lässt sich bereits eine verminderte Anzahl an Azinuszellen erkennen. In Zusammenschau mit den mit HE gefärbten Schnitten (Abbildung 4) ist hier davon auszugehen, dass der Freiraum zwischen den Zellen mit Zymogengranula durch Bindegewebe ersetzt worden ist.

In Abbildung 5C lässt sich im Vergleich zu 5B und 5D eine weiter reduzierte Anzahl an Azinuszellen sehen, da Tumorzellen aufgrund ihres duktaalen Ursprungs nicht in der Lage sind intrazellulär Trypsinogen zu produzieren oder zu speichern. Hier kann es sich bei dem Teil des Gewebes, welches kein Fluoreszenzsignal emittiert, um neoplastische Zellverbände oder um eine durch den Tumor induzierte Fibrose des Gewebes handeln.

5.2 Nachweis der Expression von Trypsin und GAPDH

Zum qualitativen und quantitativen Nachweis der Expression von Trypsin in den Pankreashomogenaten wurde ein Western Blot durchgeführt. Zur Kontrolle, inwiefern äquivalente Proteinmengen aufgetragen, wurden gleichzeitig Trypsin und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) detektiert.

Bei dem Protein GAPDH handelt es sich um ein Enzym der Glykolyse. Da diese in allen Zellen durchgeführt werden kann, ist es ein ubiquitär und konstitutiv vorhandenes Protein, und kann als Parameter für die insgesamt aufgetragene Proteinmenge herangezogen werden. Aufgrund seiner konstitutiven Expression wird GAPDH auch als *Housekeeping-Gene* bezeichnet.

Die Proteine GAPDH und Trypsin besitzen eine molekulare Größe von 42 kDa bzw. 29 kDa. Dementsprechend handelt es sich in den in den nachfolgenden

Abbildungen bei der oberen Bande um GAPDH und bei der unteren Bande um Trypsin.

Die folgende Abbildung mittels Western Blot zeigt den Vergleich der untersuchten Proben, welche nach Gruppen aufgeteilt wurden.

Wie bereits eingangs des Ergebnisteiles erwähnt, wurden die Proben in drei Erkrankungsgruppen eingeteilt.

Gruppe A Gesundes Gewebe

Gruppe B Pankreatitisgewebe

Gruppe C Tumorgewebe

I Indexpatient (A121T Träger)

Der Indexpatient wurde hier mit der Gruppe der Patienten mit chronischer Pankreatitis betrachtet.

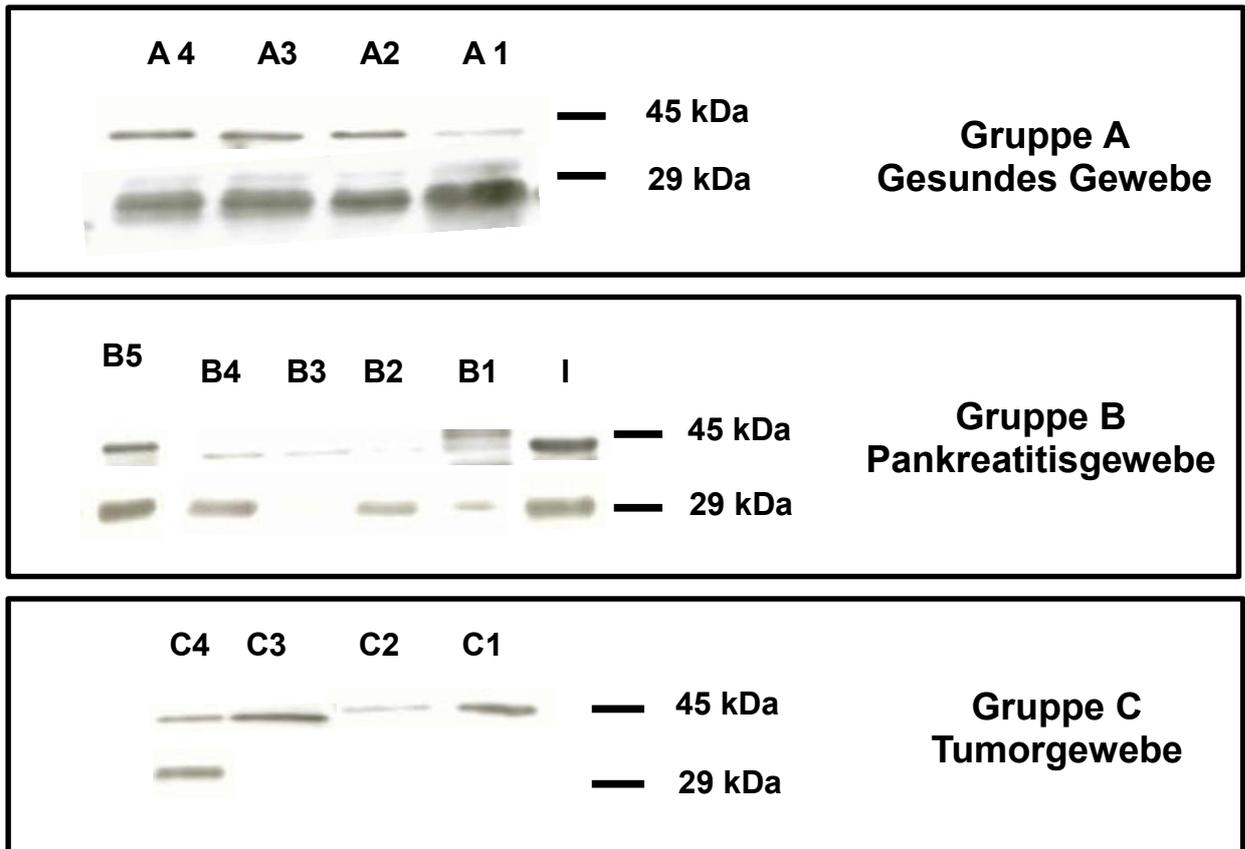


Abb. 6 Western Blot mit Darstellung der GAPDH und Trypsin

A Gruppe A gesundes Gewebe, A1-A4 sind die verwendeten Proben innerhalb dieser Gruppe. **B** Gruppe B Pankreatitisgewebe, B1-B5 sind die verwendeten Proben innerhalb dieser Gruppe, I ist das Gewebe des Indexpatienten mit A121T Mutation. **C** Tumorgewebe, C1-C4 sind die verwendeten Proben innerhalb dieser Gruppe

Zur besseren Vergleichbarkeit sind in Abbildung 6 für alle Proben die gleichen Belichtungszeiten dargestellt.

In Probe B3 aus der Pankreatitis Gruppe (Abbildung 6B) konnte nach 10 s Belichtung kein Trypsin nachgewiesen werden. Erst nach 15 s Belichtung war ein entsprechendes Signal erkennbar (nicht gezeigt).

In den Tumorproben (Abbildung 6C) war Trypsin mit Ausnahme der Probe C4 nicht nachweisbar.

Für die weiteren Versuche wurden ausschließlich Proben verwendet, in denen sowohl Trypsin als auch GAPDH nachgewiesen werden konnten.

Dies war insbesondere bei einigen Proben, welche der Pankreatitisgruppe oder der Tumorgruppe zugeordnet waren, nicht der Fall, so dass davon auszugehen war, dass es sich bei diesen exemplarischen Proben um nahezu vollständig fibrosierte oder neoplastisch verändertes Gewebe handelte, welche keine enzymatische Aktivität mehr besitzen und somit für Enzymaktivitätsmessungen ungeeignet wären.

5.3 Etablierung des Trypsinaktivitätsassays

Die Messung der Trypsinaktivität sollte zur qualitativen Beurteilung der Trypsine der Gewebeproben genutzt werden, in dem sie auf die Trypsinmengen, welche durch den Western Blot detektiert wurden, bezogen werden.

Die Etablierung wurde durchgeführt, um einerseits zu testen, welche der eingesetzten Proteinmengen am geeignetsten waren, um den Fluoreszenzverlauf beurteilen zu können. Die Konzentrationen sollten nicht so hoch sein, dass frühzeitig während der Messreihe der Sättigungsbereich des Fluorometers oder der Enzymkinetik erreicht wird. Andererseits diene die Etablierung der Austestung des Fluoreszenzverhaltens des eingesetzten Trypsininhibitors (s.u.).

Für die Auswertung der Trypsinaktivitätsdaten wurde zunächst die Hintergrundfluoreszenz von den Rohdaten der Fluoreszenzmessungen subtrahiert.

Es wurden zusätzliche Messungen mit einem spezifischen Trypsininhibitor (Trypsin Inhibitor (Soybean) T9128, Sigma-Aldrich, München) angefertigt, da es sich bei den Pankreashomogenaten um eine Mischung aus verschiedenen Proteasen handelt.

Der Einsatz eines spezifischen Trypsininhibitors (s. Abschnitt 4 Methoden) diene der Blockierung des Trypsins, so dass durch die Berechnung der Differenz (ΔF , s.4.7) der Messwerte mit und ohne Inhibitor der Anteil der Substratspaltung berechnet werden kann, welcher nur auf die katalytische Aktivität des Trypsin zurückzuführen ist.

Dementsprechend erfolgte die Berechnung der spezifischen Aktivität von Trypsin.

Exemplarisch für die jeweiligen Gruppen ist der Verlauf der Fluoreszenzemission einer Probe der betreffenden Gruppe in den Abbildungen 7 A-D dargestellt. Schwarze Kreuze markieren den Abschnitt des Kurvenverlaufes, der linear ist und für die Berechnung der Regressionsgraden verwendet wurde.

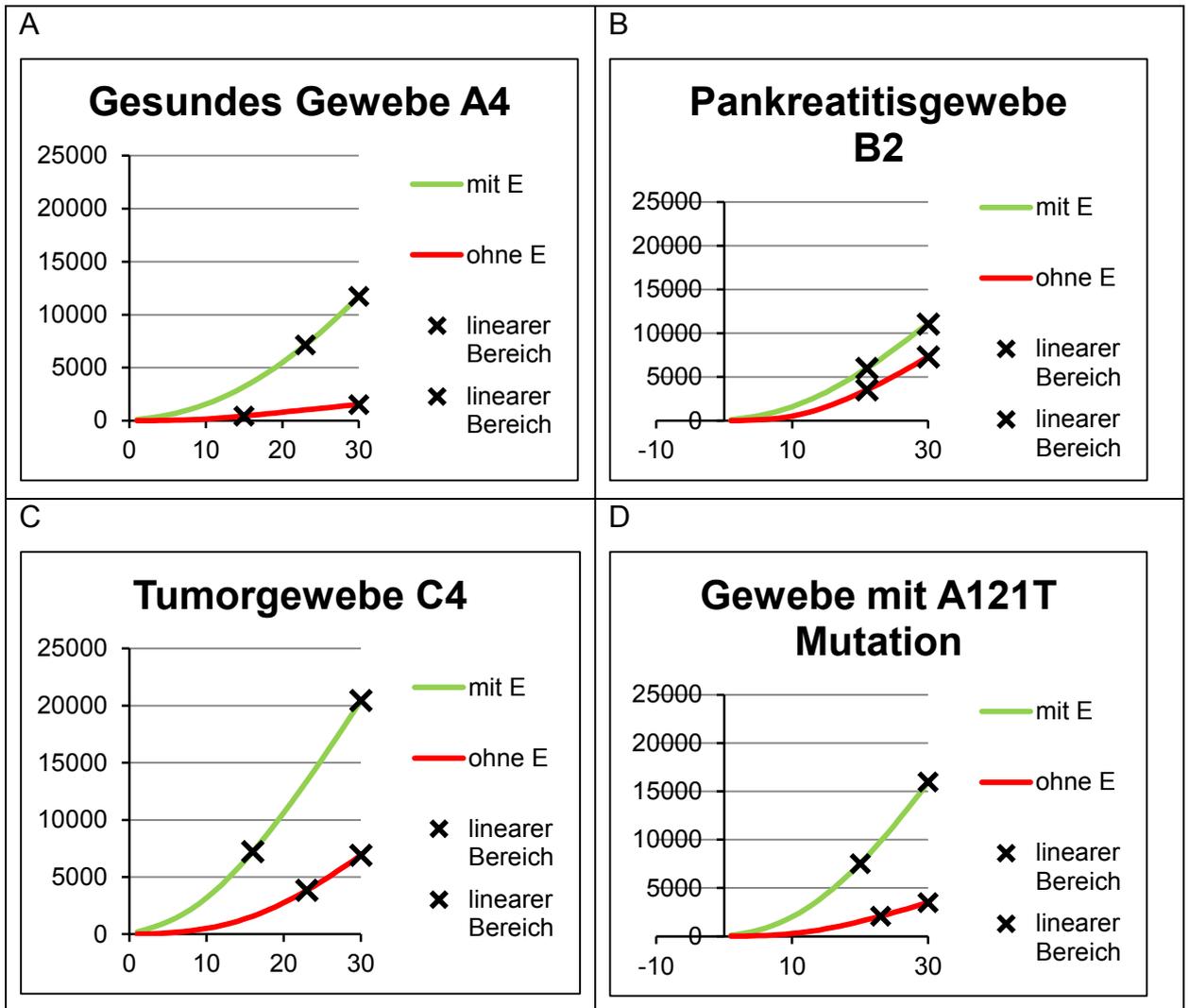


Abb. 7 Exemplarische zeitliche Verläufe der Fluoreszenz während der Trypsinaktivitätsmessung. A gesundes Gewebe (Probe A4), B Pankreatitisgewebe (Probe B2), C Tumorgewebe (Probe C4), D Indexpatienten mit der A121T Mutation mit E nach vorheriger Enteropeptidaseaktivierung. ohne E: ohne Zusatz von Enteropeptidase. Die schwarzen Kreuze markieren den linearen Bereich x-Achse Anzahl der gemessenen Zyklen y-Achse relative Fluoreszenzeinheiten (RFU)

Die hier dargestellten Fluoreszenzverläufe beziehen sich jeweils auf Messreihen, die ohne den Trypsininhibitor gemessen wurden.

Die Graphen zeigen, dass die eingesetzten Proteinmengen geeignet waren, um einen Überblick über die Fluoreszenzentwicklung und somit über die katalytische

Aktivität der Proteasen in dem Homogenaten zu erhalten, da sie nicht zu gering waren um eine Fluoreszenzenzwicklung zu zeigen, und die Messwerte vor Erreichen des Sättigungsniveaus erhoben werden konnten.

Die dargestellten Fluoreszenzverläufe wurden auf 1µg eingesetztes Protein normalisiert.

Innerhalb des Verlaufes zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Trypsinaktivität zwischen den Gruppen bzw. den Erkrankungen der Patienten. Insbesondere zeigt der Indexpatient mit der A121T Mutation einen ähnlichen Verlauf wie die übrigen dargestellten Proben.

Die hier dargestellten Fluoreszenzverläufe entsprechen denen einer einzelnen Probe und stehen exemplarisch für die einzelnen Gruppen. Im folgenden Abschnitt 5.4. wurde auch eine Mittelung der Aktivität pro Gruppe aufgeführt.

5.4. Trypsinaktivitätsmessungen

Die Trypsinaktivitätsbestimmungen wurden durchgeführt, um zu untersuchen, inwiefern sich die Aktivität des Trypsins bei den verschiedenen Erkrankungen im Vergleich zum gesunden Gewebe verhält. Ein besonderer Fokus lag auf der Frage, ob das mutierte Trypsinogen A121T unterschiedliche Aktivitätsraten oder Aktivierungsraten nach Enteropeptidaseinkubation zeigt, im Vergleich mit dem Wildtyp.

Im linearen Bereich wurde die Steigung der Kurve mit einer Regressionsgraden ermittelt. Die Steigung entspricht der Trypsinaktivität der Proben.

Für jede Probe wurden vier Werte für die Aktivität des Trypsins ermittelt:

- Steigungsfaktor ohne Enteropeptidase
- Steigungsfaktor mit Enteropeptidase
- Differenz der Steigungsfaktoren mit und ohne Inhibitor ohne Enteropeptidase (Steigungsfaktor des Kurven ΔF Verlaufes von ΔF ohne Enteropetidase)
- Differenz der Steigungsfaktoren mit und ohne Inhibitor mit Enteropeptidase

(Steigungsfaktor des Kurven ΔF Verlaufes von ΔF mit Enteropetidase)

Die angegebenen Trypsinaktivitätsraten beziehen sich jeweils auf 1 μg eingesetztes Protein um eine Vergleichbarkeit unter den Einzelproben gewährleisten zu können. Die Messwerte wurden mit Hilfe einer posthoc ANOVA nach Tukey auf signifikante Unterschiede der Gruppenmittelwerte überprüft. ($p = 0.05$).

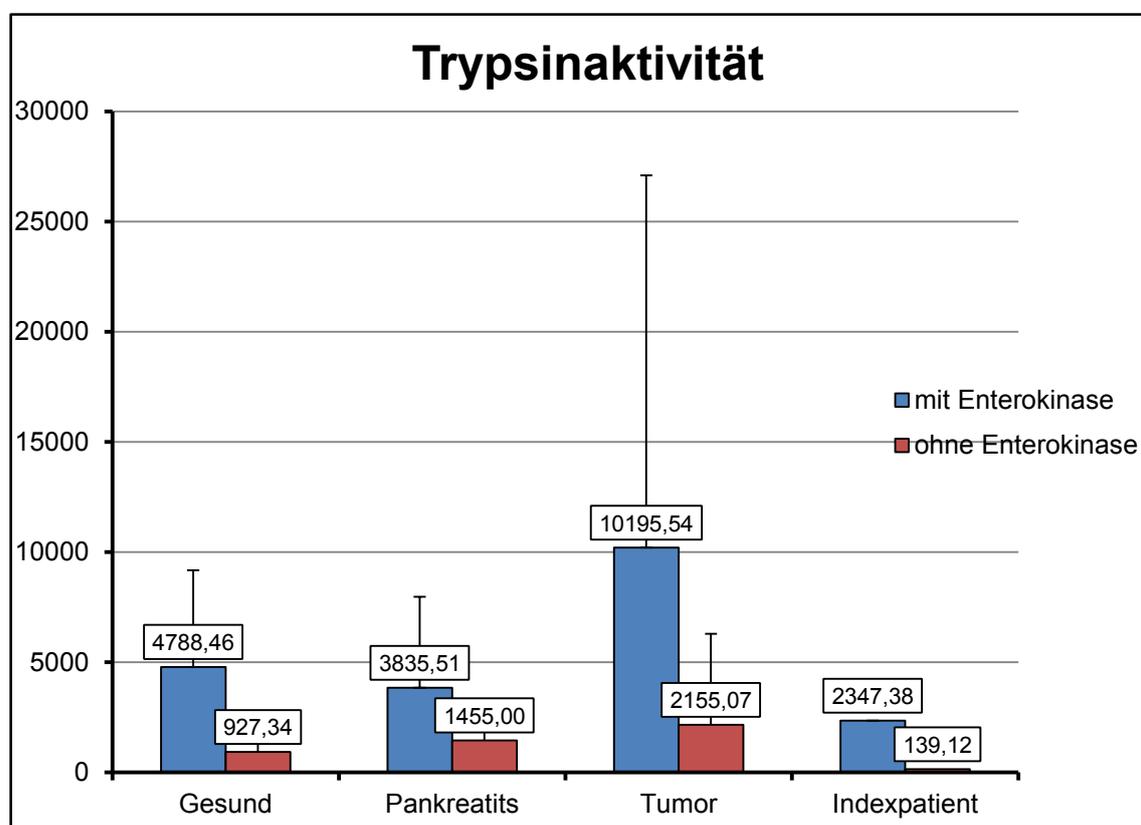


Abb. 8 Mittelwerte der Trypsinaktivität in RFU pro Gruppe/Erkrankung mit Enterokinase (blau) und ohne Enterokinase (rot). Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. Die x-Achse zeigt die Gruppeneinteilung, auf der y-Achse sind relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) aufgetragen. Diese wurden auf 1 μg eingesetztes Protein geeicht. gesund $n=4$, Pankreatitis $n=5$, Tumor $n=4$

Abbildung 8 zeigt die mittlere Trypsinaktivität in den Gruppen A-C (Gesund, Pankreatitis und Tumor) sowie im Indexpatienten und bezieht sich ausschließlich auf die Aktivität ohne den spezifischen Trypsininhibitor.

Aufgrund der Tatsache, dass sich die Steigungsfaktoren bzw. Aktivitätsraten für die Differenz der erhobenen Werte mit und ohne den Inhibitor nicht signifikant von den Werten ohne Inhibitor unterscheiden, wurde auf ihre Darstellung verzichtet.

Die Trypsinaktivitätsraten von Patienten mit einer chronischen Pankreatitis und den Proben mit gesundem Gewebe zeigten keinen signifikanten Unterschied. Auch kann kein signifikanter Unterschied zu den untersuchten Tumorgewebe festgestellt werden. Abbildung 8 zeigt hier zwar eine tendenziell erhöhte Aktivität in den Tumorproben im Vergleich zu den anderen zwei Gruppen, allerdings mit sehr hoher Standardabweichung. Die starke Streuung lässt sich durch die Heterogenität des Tumorgewebes erklären, das Eigenschaften der übrigen Gruppen aufweisen kann, wenn es sich zum Beispiel um randständiges gesundes Gewebe oder um Gewebe mit einer Begleitpankreatitis handelt. Des Weiteren lag bei dieser Gruppe nur eine kleine Anzahl (n=4) an verwendbaren Proben vor, was zusammen mit der weiten Streuung der Messwerte zu einer hohen Standardabweichung geführt hat.

Bei allen Proben zeigte sich erwartungsgemäß eine höhere Aktivitätsrate durch Enterokinaseaktivierung, da ein Großteil des intrapankreatisch vorhandenen Enzym in Form von Trypsinogen inaktiv vorliegt [88].

Bezüglich dieser Steigerung der Aktivitätsraten lag kein signifikanter Unterschied zwischen dem mutierten Trypsin des Indexpatienten und den untersuchten Proben der Gruppe von gesundem Gewebe und dem der chronischen Pankreatitis vor.

6 Diskussion

6.1 Einleitung

Die initialen Mechanismen der chronischen Pankreatitis wurden durch die Entdeckung der hereditären Genese neu diskutiert.

Ergänzend zu den bisher beschriebenen Mutationen wird hier auf die seltene A121T Mutation eingegangen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen einen ersten Überblick über In-vivo-Eigenschaften der A121T Mutation des kationischen Trypsinogens liefern. Dabei liefert sie Daten bezüglich morphologischer Unterschiede zwischen Pankreatitisformen idiopathischer und durch diese Punktmutation bedingter Genese, sowie das intrazelluläre Speicherverhalten des mutierten Trypsinogens und Aussagen zur Enzymkinetik des veränderten Proteins.

6.2 Morphologische Beurteilung des Pankreasgewebes

Die morphologische Darstellung war notwendig, um einen möglichen Einfluss der neu beschriebenen A121T Mutation auf die Morphologie der durch sie verursachten chronischen Pankreatitis zu überprüfen.

Wie im Folgenden weiter ausgeführt wird, zeigten sich weder in der HE Färbung noch in der immunhistochemischen Detektion von Trypsin/Trypsinogen nachweisbaren Unterschiede zwischen der hereditären Pankreatitis bedingt durch die Mutation A121T und anderen Formen der chronischen Pankreatitis.

Jedoch muss erwähnt werden, dass die gewählte Methode keinen Rückschluss auf qualitative Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen zulässt.

Histopathologisch wird die chronische Pankreatitis zunächst als Azinuszellatrophie beschrieben, welche an dem Auftreten von intrazellulären Fettvakuolen erkennbar ist. Diese geht im Verlauf der Erkrankung mit einer interlobulären, später auch einer intralobulären Fibrose einher, welche den Verlust der exokrinen als auch endokrinen Funktion des Organs nach sich zieht [73, 97].

Bei der chronischen Pankreatitis handelt es sich morphologisch betrachtet um eine sehr heterogene Erkrankung, bei der herdförmige Fibrose- und Entzündungsherde auftreten können [7].

Dies bedeutet, dass sich innerhalb desselben Organs verschiedene Erkrankungs- oder Entzündungsstadien befinden und sich mit nicht entzündlich veränderten Gewebe abwechseln können.

Dementsprechend können allein aufgrund des vorliegenden Erkrankungsstadiums keine Aussagen getätigt werden, ob Unterschiede zwischen den zwei Genesen, hereditär durch A121T gegenüber idiopathischer Genese, vorliegen. Darüber hinaus ist eine histologische Darstellung immer eine Momentaufnahme und somit ist mit dadurch keine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Erkrankung möglich.

Die Patienten können zu unterschiedlichen Zeitpunkten erkranken und weisen dann bei ähnlichen Entnahmezeitpunkten des Gewebes unterschiedliche Erkrankungsstadien auf. Darüber hinaus ist ein individueller Verlauf der Erkrankung möglich, allgemein gesehen ist der Verlauf bei der alkoholisch bedingten Pankreatitis schneller progredient als bei der hereditären Pankreatitis [46].

Die Abbildungen 4B und 4D zeigen nach der Beschreibung (s. Abschnitt 5.1) das Gewebe einer Pankreatitis. Bei der Abbildung 4B handelt es sich um exemplarisches Gewebe einer idiopathischen chronischen Pankreatitis und bei Abbildung 4D um Gewebe einer hereditären Pankreatitis, in diesem Fall hervorgerufen durch die A121T Mutation. An den HE-Färbungen des Pankreasgewebes erkennt man, dass es sich bei den Abbildungen 4B und 4D um zwei verschiedene Stadien der chronischen Pankreatitis handelt. Bei Abbildung 4B handelt es sich um eine bereits fortgeschrittene Form. Man erkennt ausgedehnte Fibrosezonen und kaum noch azinären Zellen. Außerdem ist auch eine intralobuläre Fibrose, welche zur Zerstörung der Läppchenstruktur führt, erkennbar. Diese tritt ebenso wie die hier dargestellte Zellarmut erst in fortgeschrittenen Stadien der chronischen Pankreatitis auf [73]. Diese kann so ausgeprägt sein dass vielfach bei Beschreibungen von einer *cirrhosis-like appearance* die Rede ist [52]. In der Mitte des Bildes ist eine Insel Restgewebes

mit azinären Drüsenzellen erkennbar. Man kann jedoch erkennen, dass diese bereits morphologisch verändert sind.

Im unteren Randbereich des Ausschnitts ist eine leukozytäre Infiltration des Gewebes erkennbar (siehe → Abb. 4B). Dies ist ein Parameter für die anhaltende Entzündungsaktivität des Gewebes [73,99].

In Abbildung 4D wird ein früheres Stadium der Pankreatitis als in Abbildung 4B. dargestellt. Es sind bis auf den oberen linken Bildrand (siehe X, Abb. 4D) keine Fibrosezonen erkennbar. Die Läppchenstruktur ist noch weitestgehend intakt. Einige der Azinuszellen zeigen bereits intrazelluläre Fettvakuolen, die bei allen Formen der chronischen Pankreatitis auftreten können, jedoch auch in Mausmodellen bezüglich hereditären Pankreatitiden beschrieben werden und welche als erste Anzeichen für Zellnekrosen interpretiert werden [5, 55].

Bei dem Indexpatienten führten starke Schmerzen und mehrere Krankheitsschübe trotz des histologisch früheren Krankheitsstadiums zur Resektion des Pankreas.

In Abbildung 4C ist ein Adenokarzinom des Pankreas dargestellt. Adenokarzinome des Pankreas gehen von dukталen Zellen der Pankreasausführungsgänge aus und zerstören durch infiltratives Wachstum die Azinuszellstruktur. In diesem Bildausschnitt sind keine morphologisch normal ausgebildeten pankreatischen Drüsenzellen mehr erkennbar. Die neoplastischen Zellen induzieren die Bildung von extrazellulärer fibrotischer Matrix, welche ubiquitär in der Abbildung zu erkennen ist. Dieser Vorgang, der bei Karzinomen des Pankreas häufig vorkommt, wird als Desmoplasie bezeichnet [7].

Im Rahmen dieser Arbeit, sollte durch die morphologische Darstellung des Pankreasgewebes untersucht werden, ob und inwiefern sich die Pankreatitisgewebe unterschiedlicher Genese (Abb. 4B und 4D) voneinander unterscheiden.

Beide Gewebedarstellungen zeigten typische pathologische Veränderungen, die für chronische Pankreatitiden bekannt sind, wie Reduktion der Azinuszellstruktur und Fibrosierung des Gewebes [7,73]. (vergleiche auch 5 Ergebnisse)

Vorherige histopathologische Beschreibungen von Pankreatitisgewebe aus Patienten mit idiopathischer und hereditärer Pankreatitis mit R122H-Mutation konnten keine morphologischen Unterschiede detektieren [5,25].

In-vivo-Experimente mit transgenen Mäusen zeigten, dass sich bei induzierten Pankreatitiden keine histologischen Unterschiede zwischen Mäusen mit der Mutation R122H und Mäusen mit Wildtyp Trypsinogen zeigten [5,82].

Der Vorteil des Mausmodells liegt hierbei in einem definierten Beginn der Erkrankung und stabilen experimentellen Rahmenbedingungen.

Entsprechende murine experimentelle Modelle gibt es für die A121T Mutation nicht. Felderbauer et al. konnten 2008 bei histologischen Vergleichen zeigen, dass es keine morphologischen Unterschiede zwischen chronisch entzündlichem Gewebe anderer Genese und solchen mit hereditär entzündetem Gewebe gibt. Darüber hinaus konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen Pankreasgewebe mit A121T Mutation und der Mutation R122H festgestellt werden [25, 51].

Die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde durchgeführt, um die Frage zu untersuchen, ob die A121T Mutation einen Einfluss auf die intrazelluläre Speicherung des mutierten Trypsins hat. Die gezeigten Abbildungen lassen erkennen, dass bei beiden Pankreatitisformen, idiopathisch und hereditär (Abb. 5B und 5D), eine Verminderung der Azinuszellzahl auftritt. Wenn diese Tatsache zusammen mit den HE-Färbungen betrachtet wird, ist davon auszugehen, dass diese Azinuszellen durch fibrotisches Gewebe ersetzt wurden.

Abgesehen davon gibt es in keiner der Abbildungen Hinweise darauf, dass das mutierte Trypsin in einer morphologisch anderen Form intrazellulär gespeichert wird als das Wildtyp-Trypsin. Die Zymogengranula sind in allen Abbildung einander ähnlich. Wie bereits Abb. 1 zeigt, handelt es sich bei der A121T Mutation nicht um eine Mutation, welche Einfluss auf die Tertiärstruktur des Trypsinmoleküls besitzt, so dass nicht von einer veränderten intrazellulären Speicherung des mutierten Enzyms auszugehen ist.

Wie in den HE Färbungen der Gewebsschnitte (Abbildung 4) ließ sich auch in der Immunfluoreszenz kein morphologischer Unterschied zwischen der chronischen Pankreatitis und der hereditären Pankreatitis des Indexpatienten nachweisen.

Darüber hinaus ist die immunhistochemische Detektion von Trypsin/Trypsinogen zum Zweck der Beschreibung der chronischen Veränderungen im Pankreas problematisch.

Das legen z. B. Untersuchungen von Aho et al (1983) nahe, die zeigen konnten, dass sich mit der immunhistochemischen Lokalisierung von Trypsin bzw. Trypsinogen keine Unterschiede zwischen normalen und durch chronische Pankreatitis verändertem Gewebe gibt, wie dies im Vergleich zur aktiven Pankreatitis der Fall ist [1].

Bei aktiven Pankreatitiden sind deutliche immunhistochemische Veränderungen erkennbar, wie z. B. starke Anhäufungen von Trypsin innerhalb des Gangsystems des Pankreas oder in Anteilen von Fettgewebnekrosen [50].

6.3 Nachweis der Expression von Trypsin und GAPDH

Mittels Western Blot sollte der quantitative Nachweis des veränderten Trypsins so wie ein Vergleich zu den anderen Gruppen durchgeführt werden.

Der Versuch wurde durchgeführt, um die Expression von Trypsin und GAPDH in den Pankreashomogenaten quantitativ nachzuweisen.

Die Abbildungen 6A-C zeigen die entsprechenden Banden der unterschiedlichen Trypsin und GAPDH Nachweise.

Die Proben mit gesundem Gewebe zeigen verschieden ausgeprägte Trypsinmengen, während sich bei den Proben mit Tumorgewebe in 3 Proben kein Trypsin nachweisen lässt.

Hierbei fällt auf, dass die Expression von Trypsin nur im Falle der Tumorprobe C4 nachzuweisen war. Diese Beobachtung war zu erwarten, da es sich bei Adenokarzinomen des Pankreas um Karzinome duktales Ursprungs handelt die kaum Trypsin produzierende Azinuszellen enthalten.

Allerdings handelt es sich bei den chirurgischen entnommenen Proben nicht ausschließlich um Tumorgewebe, so dass in diesem auch randständige Anteile physiologischen Gewebes oder einer umgebenden Begleitpankreatitis finden können. Somit kann sowohl der positive als auch der negative Nachweis von Trypsin in den Tumorproben erklärt werden.

Um die Trypsinkonzentration der Proben auf die eingesetzte Proteinmenge beziehen zu können, sollte das Verhältnis der Intensität der Trypsinbanden zu der der GAPDH Banden herangezogen werden. Der Western Blot sowie die Detektion der Lumineszenz mit Röntgenfilmen können durch verschiedene Störfaktoren eine Proteinquantifizierung erschweren. Voraussetzung für eine zuverlässige Quantifizierung ist einerseits eine Filmbelichtung im linearen Bereich der Enzymkinetik des ECL Systems. Weiterhin darf die Exposition nicht im Sättigungsbereich des Röntgenfilms liegen. Die Bestimmung dieser Bereiche ist mit dem gewählten System schwierig und erwies sich zusätzlich durch die Heterogenität der eingesetzten Proben als problematisch.

Dieser quantitative Nachweis sollte durchgeführt werden, um die Trypsinmenge mit den gemessenen Trypsinaktivitäten der jeweiligen Probe korrelieren zu können.

So sollte vor allem die Frage beantwortet werden, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den Aktivitätsraten des Wildtyp-Trypsins gegenüber dem mit der Mutation A121T gibt.

Diese Frage konnte nicht beantwortet werden, da sich der quantitative Nachweis aufgrund einer sehr starken Schwankungsbreite innerhalb der Gruppe nicht aussagekräftig durchführen ließ.

Bei den Mutationen der nachfolgenden Aminosäureposition R122H, sowie R122C (bei pH 8) konnte keine Änderung der Aktivitätsrate im Vergleich zu nicht mutiertem Trypsin nachgewiesen werden [77-79, 81].

Allerdings muss bei diesen Untersuchungen betont werden, dass es sich hierbei ausschließlich um Ergebnisse handelt, welche an rekombinante Proteine erhoben wurden. Das heißt es sind im Gegensatz zu den Untersuchungen dieser Arbeit *In-vitro*-Experimente. Hier gab es jedoch die besondere Möglichkeit humanes natives Protein, welches eine Mutation trägt, zu verwenden.

Aufgrund der Tatsache, dass sich alle diese Mutationen außerhalb des aktiven Zentrums des Enzyms befinden, ist diese Beobachtung ein schlüssiges Ergebnis. Dementsprechend liegt die Vermutung nahe, dass die Mutation A121T ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression des veränderten Trypsins hat.

6.4 Etablierung des Trypsinaktivitätsassays

Die Etablierung des Trypsinassays wurde wie bereits unter 5.3 angesprochen durchgeführt, um die geeignete Konzentration für den Einsatz der Proben zu bestimmen und die Hintergrundfluoreszenz durch den verwendeten Trypsininhibitor zu ermitteln.

Dieser wurde eingesetzt, da es sich bei den Proben um Pankreashomogenate handelte und davon auszugehen war, dass es sich um eine Mischung verschiedener Proteasen handelt. Dementsprechend kann die gemessene katalytische Aktivität nicht ausschließlich auf das vorhandene Trypsin zurückgeführt werden.

Im Rahmen der Etablierungsphase konnte durch Messung von reinen (bovinen) Trypsinlösungen mit dem verwendeten spezifischen Trypsininhibitor bestätigt werden, dass dieser Inhibitor in der Lage ist, vorhandenes Trypsin vollständig zu hemmen.

Nach oben aufgeführter Angabe, dass durch den Inhibitor die Aktivität des in der Probe enthaltenen Trypsins vollständig gehemmt wird, ist davon auszugehen, dass die Minderung der Fluoreszenz durch Zugabe des Inhibitors, ΔF , durch die Hemmung der Trypsinaktivität entsteht. Demnach entspricht ΔF der katalytischen Aktivität des enthaltenen Trypsins.

Dieser berechnete Messwert pro Probe wurde noch um den Messwert nach vorheriger Enteropeptidaseaktivierung ergänzt. (s. Tab. 1)

Nach Berechnung der Aktivitäten zeigte sich jedoch, dass sich die Werte der Differenzen, in der Tendenz nicht von den Messungen ohne Inhibitor unterscheiden.

Vermutlich durch die erhöhte Hintergrundfluoreszenz des Inhibitors kam es zu höheren Streuungsraten der Werte, welche in höheren Standardabweichungen resultierten.

Aufgrund der Tatsache, dass es bezüglich des Vergleiches zwischen den untersuchten Gruppen zu keinem Unterschied kam, keine weiteren neuen Signifikanzen auftraten, sind hier ausschließlich gemessene oder errechnete Werte, welche sich auf die Messungen ohne den Trypsininhibitor beziehen, graphisch dargestellt worden.

6.5 Trypsinaktivitätsmessungen

Durch die Durchführung des Trypsinassays konnte gezeigt werden, dass kein signifikanter Unterschied bezüglich der Aktivität des Trypsins zwischen den untersuchten Gruppen beziehungsweise den Erkrankungen der Patienten nachgewiesen werden konnte.

Im Hinblick auf die Fragestellung dieser Dissertation kann herausgestellt werden, dass kein signifikanter Unterschied zu den Homogenaten des Indexpatienten vorhanden war. Dementsprechend liegt gemäß der hier untersuchten Daten keine Änderung der Aktivität des mutierten Trypsins mit der A121T Mutation im Vergleich zum Wildtyp-Trypsin, das heißt im Vergleich zu gesundem Gewebe und dem der chronischen Pankreatitis anderer Ätiologie vor.

Aufgrund der Lage der ausgetauschten Aminosäure abseits des katalytischen Zentrums des Trypsin war ein derartige Beeinflussung des Enzyms auch nicht wahrscheinlich. Bei den unter 1. beschriebenen häufigeren Mutationen (R122H, N29I), welche eine hereditäre Pankreatitis hervorrufen können, konnte ebenfalls keine Änderung der katalytischen Aktivität der mutierten Trypsinmoleküle nachgewiesen werden [77-79].

Bei allen Proben zeigte sich wie erwartet eine signifikant höhere Aktivitätsrate durch Enterokinaseaktivierung. Wie bereits unter 5.4 erläutert, liegt der überwiegende Prozentsatz des intrazellulär und intrapankreatisch gespeicherten Trypsin in der inaktiven Form des Trypsinogen vor. Dementsprechend war zu erwarten, dass es durch vorherige Enteropeptidaseinkubation zu einer Abspaltung des Aktivierungspeptids und somit zu einer Überführung von der inaktiven in die aktive Enzymform kommt. [56]

Wie auch unter physiologischen Bedingungen zu erwarten wäre, steigt durch diese Rekrutierung des aktiven Trypsins die Aktivitätsrate.

Die hier erhobenen Messwerte erwiesen sich deutlich erhöht im Vergleich zu dem Proben der gleichen Gruppe ohne vorherige Enteropeptidaseaktivierung.

In Bezug auf die Enteropeptidaseaktivierung konnte weiterhin gezeigt werden, dass das durch die A121T Mutation veränderte Trypsinogen keine signifikante Änderung der Aktivierbarkeit im Vergleich zum Wildtyp aufweist.

Es fällt jedoch auf, dass die Probe mit der A121T Mutation eine sehr geringe Aktivität ohne Enteropeptidase zeigt im Vergleich zu den anderen Proben.

Die Proben ohne Enteropeptidase zeigen ebenfalls eine geringere katalytische Aktivität, da das Trypsin in geringem Maße in der Lage ist sich selbst zu aktivieren, d. h. das Aktivierungspeptid abzuspalten. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Mutation eventuell einen Einfluss auf die Autoaktivierbarkeit des Enzyms besitzt, diese nämlich reduziert.

Da dieser Effekt, wie auch die unten beschriebene gesteigerte Autolyse durch die A121T Mutation, eine reduzierte Trypsinaktivität nach sich zieht besteht die Frage, ob es sich um einen zusätzlichen „*loss of function*“-Effekt der A121T Mutation handelt.

In Bezug auf höhere Aktivierungsraten konnte bei zuvor erwähnten Mutationen im PSSR1 (R122H, N29I) eine erleichterte Autoaktivierbarkeit nachgewiesen werden. [77-79]

Dementsprechend wird diskutiert, inwiefern es sich hierbei ebenfalls um einen der Initialschritte bei der Auslösung einer hereditären Pankreatitis handelt. (s.u.)

Bezüglich der Autolyse von Trypsin konnten Felderbauer et al. 2008 zeigen, dass es sich bei A121T Mutation um eine sogenannte „*loss-of function*“ Mutation handelt. Diese Bezeichnung wurde gewählt, da sich das veränderte Trypsin überraschenderweise schneller autokatalytisch abbauen kann, als dies bei dem Wildtyp der Fall ist. Bereits für die R122H Mutation konnte gezeigt werden, dass hier der autokatalytische Abbau langsamer abläuft als beim Wildtyp. Dies wurde als „*gain of function*“ Mutation bezeichnet [78].

Bezüglich der „*gain of function*“ Mutation wurde diskutiert, dass eine erleichterte Autoaktivierung zu einer vorzeitigen, d.h. intrapankreatischen Aktivierung kommt. Diese würde physiologischerweise erst im Duodenum auftreten, so dass eine intrapankreatische Aktivierung zum Auslösen einer Enzymkaskade führen würde und somit zu proteolytischer und entzündlicher Aktivität im Pankreas.

Im Vergleich der Veröffentlichungen von Felderbauer und Sahin-Tóth fällt auf, dass es sich in beiden Fällen um *In-vitro*-Versuche handelt und jeweils humanes Trypsin/Trypsinogen verwendet wurde. Während Felderbauer jedoch nur kurze Proteinsequenzen verwendete, welche an Quencher gebunden waren (s.o.), hat Sahin-Tóth ganze rekombinante humane Trypsine verwendet. Darüber hinaus hat er neben dem Einfluss der R122H und der N29I Mutation auf die Autolyse auf Trypsin auch den Einfluss auf die Zymogenaktivierung der mutierten Trypsine untersucht.

Zusammengefasst heißt dies, dass es bei der A121T Mutation Hinweise darauf gibt, dass die aktive Form schneller abgebaut werden kann als der Wildtyp, d.h. höherer autokatalytischer Abbau und die Vermutung, dass es auch eine reduzierte Autoaktivierbarkeit des Zymogens gibt. Beide Veränderungen würden zur Reduktion der Rate des aktiven Enzyms führen.

Wenn sich bei der A121T Mutation durch weitere Versuche zeigen würde, dass eine reduzierte Autoaktivierbarkeit durch die Mutation vorliegt, handelte es sich hierbei um einen zweiten Effekt der genau gegenteilig ist zu den bisher beschriebenen Effekten bei den viel häufiger auftretenden Mutation wie der R122H oder der N29I Mutation.

Hier wirft sich die Frage auf, warum diese scheinbar gegensätzliche Wirkung der jeweiligen Punktmutation dieselbe morphologische Entzündung hervorruft.

Die generelle Frage ist: Welches ist der Initialschritt beim Auftreten einer (hereditären) Pankreatitis? Gibt es einen oder mehrere?

Nach Bekanntwerden der Trypsinmutationen und ihrer Assoziierung mit der hereditären Pankreatitis war zunächst die Meinung vorherrschend, dass die reduzierte Autolyse und eine somit ausgelöste Autodegradation eine entzündliche Erkrankung verursacht.

Da im Verlauf aber immer mehr Mutationen beschrieben wurden, zeigte sich dass es Mutation wie die recht häufig auftretende N29I Mutation gibt, die gar keinen Einfluss auf die Autolyse von Trypsin haben. Es konnte aber ein Effekt aller Mutationen auf die Zymogenaktivierung des mutierten Trypsins nachgewiesen werden [78].

Sahin-Tóth postulierte bereits 2000, dass die gestörte Autolyse keine zentrale Rolle bei der hereditären Pankreatitis spielen kann, da sie bei einigen genetischen Varianten nicht auftritt. Des Weiteren gibt er an, dass die erleichterte Zymogenaktivierung die tatsächliche „*gain of function*“ Mutation ist [78].

Ergänzend hierzu bleibt zu erwähnen, dass auch der Effekt auf die Autolyse einen Einfluss auf die Erkrankung hat, da Patienten mit der R122H Mutation häufig schwere Krankheitsverläufe haben [34,78]

Die A121T Mutation könnte also einen Einfluss auf beide Mechanismen, also Autolyse und Zymogenaktivierung, haben, welcher jedoch genau gegensätzlich zu dem Einfluss der viel beschriebenen R122H Mutation ist.

Eine Hypothese könnte sein, dass es ein sensibles intrapankreatisches Gleichgewicht zwischen trypsinaktivitätshemmenden Faktoren gibt (z.B. Autolyse, verschiedene spezifische Trypsininhibitoren etc.) und aktivierenden Elementen (z.B. Autoaktivierung, Start der Enzymkaskade) gibt und dass hier eingreifende Faktoren das Gleichgewicht stören und beispielsweise eine Gegenregulation hervorrufen. Eine vermehrte Autolyse sowie eine Verstärkung von Aktivierungsmechanismen des Trypsinogens wären die Folge.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Bisher war die Mutation A121T noch nicht gut untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass es keinen Hinweis auf eine Veränderung der Entzündungsmorphologie oder der intrazellulären Speicherung durch das veränderte Trypsinmolekül gibt.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass nach den Ergebnissen dieser Arbeit kein Hinweis auf eine veränderte katalytische Aktivität des mutierten Trypsins vorliegt. Dies konnte allerdings für den physiologisch im Pankreassaft bestehenden pH 8 gezeigt werden, während bei z.B. bei der R122C Mutation eine gesteigerte Aktivität im Bereich pH 5 nachgewiesen werden konnte. [81]

Als Initialschritte für die Auslösung einer Pankreatitis werden verschiedene Schritte diskutiert, welche als gemeinsame Endstrecke die intrapankreatische Enzymaktivierung und die Entstehung einer Pankreatitis haben.

In der Diskussion für diesen Initialschritt sind die erleichterte Aktivierbarkeit des Trypsinogens zu aktivem Trypsin und Verhinderung des autokatalytischen Abbaus des Trypsins und die somit verlängerte Aktivitätszeit genannt.

Einfluss auf die erleichterte Zymogenaktivierung konnte bereits bei den häufigsten Mutationen des PSSR1, R122H und N29I beschrieben werden.

Die Autolyse wird jedoch von einigen Mutationen wie der N29I nicht beeinflusst, so dass die Vermutung nahe liegt, dass es sich hierbei nicht um den zentralen Schritt der Pankreatitis handelt.

Die A121T führt zu einem gesteigerten autolytischen Abbau des mutierten Trypsins und dennoch zu einer Pankreatitis.

Die hier durchgeführten Untersuchungen erlauben keine Aussage über die autolytische Stabilität des mutierten Trypsins oder den gesicherten Einfluss auf die Zymogenaktivierung.

Bei Trypsinaktivitätsassays zeigte sich jedoch eine sehr geringe Trypsinaktivität ohne Enteropeptidaseaktivierung, so dass sich die Vermutung aufwirft, inwiefern die A121T Mutation einen hemmenden Einfluss auf die Autoaktivierung des Trypsinogens besitzt.

8 Literaturverzeichnis

1. Aho HJ, Putzke HP, Nevalainen TJ, Löbel D, Pelliniemi LJ, Dummler W, Suonpää AK, Tessenow W. (1983) Immunohistochemical localization of trypsinogen and trypsin in acute and chronic pancreatitis, *Digestion*;27(1):21-8.
2. Andersen BN, Pedersen NT, Scheel J, Worning H. (1982) Incidence of alcoholic chronic pancreatitis in Copenhagen. *Scand J Gastroentero*: 17; 247-252
3. Ammann R W, Bühler H, Münch R, Freiburghaus AW, Siegenthaler W. (1987) Differences of the natural history of idiopathic (nonalcoholic) and alcoholic chronic pancreatitis. A comparative long-term study of 287 patients. *Pancreas*: 2; 368-377
4. Andersen, B. N., Pedersen, N. T., et al. (1982) Incidence of alcoholic chronic pancreatitis in Copenhagen. *Scand J Gastroenterol* 17:S. 247-52.
5. Archer H et al. (2006) A Mouse model of hereditary pancreatitis generated by transgenic expression of R122H *Gastroenterology* doi: 10.1053
6. Atlas AB, Orenstein SR, Orenstein DM. (1992) Pancreatitis in young children with cystic fibrosis. *J Pediatr*: 120; 756-759,
7. Böcker W, Denk H, Heitz P U (2004) *Pathologie*, 3. Auflage UrbanFischer Verlag, Elsevier GmbH, München
8. Bulaj, G.; Otlewski, J. (1994) Denaturation of free and complexed bovine trypsinogen with the calcium ion, dipeptide Ile-Val and basic pancreatic trypsin inhibitor. *Eur. J. Biochem.* 223, 939–946
9. Bulaj, G.; Otlewski, J. (1995) Ligand-induced changes in the conformational stability of bovine trypsinogen and their implications for the protein function. *J. Mol. Biol.*, 247, 701–716
10. Chiari H, (1896) Überselbstverdauung des menschlichen Pankreas, *Zeitschrift für Heikunde* 17, 69-96
11. Chen J M, Férec C (2009) Chronic Pankreatitis: Genetics and Pathogenesis, *Annual Review Genomics Human Genetic* 10:3.1-3.25

12. Chen JM, Mercier B, Audrézet MP, Férec C. (2000) Mutational analysis of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene in hereditary and sporadic chronic pancreatitis. *J Med Genet*: **37**; 67-69
13. Cohn JA, Friedmann KJ, Noone PJ et al (1998) Relation between of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis, *N Engl J Med* **339**: 653-658
14. Colomb E, Figarella C. (1979) Comparative studies on the mechanism of activation of the two human trypsinogens. *Biochem Biophys Acta*: **571**; 343-351
15. Colomb E, Guy O, Deprez P, Michel R, Figarella C. (1978) The two human trypsinogens: Catalytic properties of the corresponding trypsins. *Biochem Biophys Acta*: **525**
16. Comfort M & Steinberg (1952) A Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis *Gastroenterology* **21**, 54
17. Cruickshank A H, (1986) *Pathology of the pancreas*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg
18. de Angelis C, Valente G, Spaccapietra M, et al. (1992) Histological study of alcoholic, nonalcoholic, and obstructive chronic pancreatitis. *Pancreas*: **7**; 193-196
19. Delaage M, Desnuelle P, Lazdunski M (1967) On the activation of trypsinogen a study of peptide models related on the n-terminal sequence of the zymogen, *Biochimica an Biophysical Research Communications*, **29**
20. del Rosario JF, Putnam PE, Orenstein DM (1995) Chronic pancreatitis in a patient with cystic fibrosis and clinical pancreatic insufficiency. *J Pediatr*: **126**; 951-952
21. De Vonis Bidlingmeyer, U., et al., (1972) Identity of the tryptic and alpha-chymotryptic reactive sites on soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *Biochemistry*, **11(17)**, 3303-3310
22. Durbec JP, Sarles H. Multicenter survey on the etiology of pancreatic diseases. Relationship between the relative risk of developing chronic pancreatitis and alcohol, protein, and lipid consumption. *Digestion* 1978: **18**; 337-350.

23. Etemad B, Whitcomb DC. (2001) Chronic pancreatitis: diagnosis, classification and new genetic developments. *Gastroenterology*; **120**
24. Felderbauer P et al. (2008) A novel A121T mutation in human cationic trypsinogen associated with hereditary pancreatitis: functional data indicating a loss of function mutation influencing the R122 trypsin cleavage site *J Med Genet* **45**, 507-512
25. Felderbauer P, Stricker I, Schnekenburger J, Bulut K, Chromik A M, Belyaev O, Muller C, Uhl W, Tannapfel A, Schmidt W (2008) Histopathological feature of patients with chronic pancreatitis due to mutation in PSSR1: Evaluation of BRAF and KRAS2 mutation, *Digestion*; **78**:60–65
26. Férec C, Raguénès O, Salomon R, et al. (1999) Mutations in the cationic trypsinogen gene and evidence for genetic heterogeneity in hereditary pancreatitis. *J Med Genet*: **36**; 228-232
27. Finkenstadt, W.R., Laskowski, M. Jr (1967) Resynthesis by trypsin of the cleaved peptide bond in modified soybean trypsin inhibitor. *J. Biol. Chem.*, **242(4)**, 771-773
28. Finkenstadt, W.R., Laskowski, M. Jr. (1965) Peptide bond cleavage on trypsin-trypsin inhibitor complex formation *J. Biol. Chem.*, **240**, 962
29. Flasnoeker M, (1999) *Thiemes Innere Medizin: TIM*, Thieme Verlag, Stuttgart
30. Fontana, A.; Fassina, G.; Vita, C.; Dal Zoppo, D.; Zamai, M.; Zambonin, M. (1986) Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin. *Biochemistry* **25**, 1847–1951
31. Gabel, D.; Kasche, V. (1973) Autolysis of beta-trypsin. Influence of calcium ions and heat. *Acta Chem. Scand.* **27**, 1971–1981
32. Gay R, Rothenburger A, Klinke R, Silbernagel S (2005) *Lehrbuch der Physiologie*, Thieme Verlag, Stuttgart; Auflage: 5. A. S.434
33. Gelrud A, Sheth S, Banerjee S et al. (2004), Analysis of cystic fibrosis gene product(CFTR) function in patient with pancreas divisum and recurrent acute pancreatitis, *Am J Gastroenterol* **99**, 1557-1562

34. Gorry et al. (1997) Mutations in the Cationic Trypsinogen are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis *Gastroenterology* **113**, 1063-1068
35. Guy O, Lombardo D, Bartelt DC, Amic J, Figarella C. (1978) Two human trypsinogens: purification, molecular properties and N-terminal sequences. *Biochemistry*: **17**;1669-1675
36. Halangk, W., Kruger, B., et al. (2002) Trypsin activity is not involved in premature, intrapancreatic trypsinogen activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**:S. G367-74
37. Higaki J N & Light, A, (1986) The identification of neotrypsin in samples of bovine trypsinogen, *Anal. Biochem.* **148**,111-120
38. Higaki J N & Light , (1986) A, Independent refolding of domains in the pancreatic serineproteinases *J. Biol. Chem.* **261**, 10606-10609
39. Herold, G., (2006) *Innere Medizin*, S. 437-439
40. Herold G (2010) *Innere Medizin*, Köln, S. 481-490
41. Horii A, Kobayashi T, Tomita N, et al. (1987) Primary structure of human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene. *Biochem Biophys Res Commun*: **149**; 635-641
42. Junqueira L, Carneiro J, Gratzl M (2005) *Histologie*, 6. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg
43. Johnson, C. D. und Hosking, S. (1991) National statistics for diet, alcohol consumption, and chronic pancreatitis in England and Wales, 1960-88. *Gut* **32**:S. 1401-5.
44. Keim V, Mossner J, Teich N, (2000) Trypsinogen mutations in hereditary pancreatitis which nomenclature is convenient, *Gut* **46**: 873
45. Keim V., Tannapfel A., Mössner J., (1998) Hereditäre Pankreatitis: pathogenetische Konzepte und der Nachweis genetischer Veränderungen, *Deutsches Ärzteblatt* 40
46. Keim V, Witt H, Bauer N, Bodeker H, Rosendahl J, Teich N, Mossner, J: (2003) The course of genetically determined chronic pancreatitis. *JOP*, **4**:146-154

47. Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*: **245**; 1073-1080
48. Keresztur E, Szmola R, Kukor Z, Simon P, Weiss F U, Lerch M M, Sahin-Tóth M (2009) Hereditary pancreatitis caused by mutation-induced misfolding of human cationic trypsinogen: A novel disease mechanism, *Human mutation* Vol. 30, **No.4**, 575-582
49. Klöppel, G., Sipos, B. Jüttges, J., (2004) *Das Spektrum der chron. Pankreatitis*, Der Pathologe 1, Springer Verlag 2004
50. Klöppel G, Dreyer T, Willemer S, Kern H F , Adler G (1986) Human acute pancreatitis:its pathogenesis in the light of immunocytochemical and ultrastructural findings in acinar cells, *Virchows Arch [Pathol Anat]* **409**:791-803
51. Klöppel G, Detlefsen S, Feyerabend B (2004): Fibrosis of the pancreas: The initial tissue damage and the resulting pattern. *Virchows Arch*; **445**: 1–8
52. Kunitz, M., (1945) Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean *Science*, **101**, 668
53. Kuwata K, Hirota M, Shimizu H, et al. (2002) Functional analysis of recombinant pancreatic secretory trypsin inhibitor protein with amino-acid substitution. *J Gastroenterol*
54. Laskowski M Jr & Ikunoshin K, (1980) Protein inhibitors of proteinases *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 593-626
55. Laskowski M, Wu F C. (1953) Temporary inhibition of trypsin. *J Biol Chem*: **204**; 797-805
56. Löffler G, Petrides P E, Heinrich P C (2007) *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg
57. Lowenfels AB, Maisonneuve P., DiMagno E et al, (1997) Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer, *J Nat Cancer Inst* **89**: 442-446
58. Lui, Q, Gao F, Ou Q, Zhuang, Z, Lin S, Yang B, Cheng Z (2008) Novel mutation and polymorphism of PRSS1 gene in the Chinese patients with

- hereditary pancreatitis and chronic pancreatitis *Chin Med J*, **121(2)**, 108-111
59. Marchbank T, Freeman TC, Playford RJ. (1998) Human pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Digestion*: **59**; 167-174
 60. Matthew P, Wyllie R, Caulfield M, Steffen R, Kay M. (1994) Chronic pancreatitis in late childhood and adolescence. *Clin Pediatr* 33; 88-94.
 61. Moll K J, Moll M (2005) *Kurzlehrbuch Anatomie*, Elsevier, München; 18. Auflage
 62. Müllhart C, (2003) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, 4. Aufl. Elsevier Verlag, München
 63. Muntau A C (2007) *Intensivkurs Pädiatrie*, Elsevier Verlag, München, 4. Auflage
 64. Nakamura K, Sarles H, Payan H. (1972) Three-dimensional reconstruction of the pancreatic ducts in chronic pancreatitis. *Gastroenterology*: **62**; 942-949
 65. Osterman, H., (2009) *The Next Step in Near Infrared Fluorescence: IRDye QC-1 Dark Quencher*
 66. O'Sullivan, J. N., Nobrega, F. T., et al. (1972) Acute and chronic pancreatitis in Rochester, Minnesota, 1940 to 1969. *Gastroenterology* **62**:S. 373-9.
 67. Pavelka M Roth J (2005) *Funktionelle Ultrastruktur Atlas der Biologie und Pathologie von Geweben, Part 2*, 78-79
 68. Peng, X., Chen, H., Draney, D.R., Volcheck, W.M., (2009) A Non-fluorescent, Broad Range Quencher Dye for FRET Assays, *Analytical Biochemistry*, (Vol. 388), pp. 220–228
 69. Piper W (2006) *Innere Medizin*, Springer Verlag, Berlin; 1. Auflage
 70. Pfützer RH, Barmada NM, Brunskill APJ, et al. (2000) SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology*: **119**; 615-623
 71. Rinderknecht H, (1993) Pancreatic secretory enzymes in *The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease 2nd edn* (eds Go, V.I. et al.) 219-251, Raven Press, New York

72. Rehm H, (2002) Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics, 4. Aufl. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
73. Remmele W (Hrsg.) (1997) Pathologie, 2. Auflage, Band 3, Springer Verlag, Heidelberg
74. Rinderknecht H. (1986) Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Dig Dis Sci* **31**; 314-321
75. Rosendahl J, Bödeker H, Mössner J, Teich N (2007) Hereditary chronic pancreatitis Orphaned Journal of Rare Diseases **2**,10.1186/1750-1172-2-1
76. Röver M, Limited proteolyses in pancreatic chemotrypsin and trypsinogens. *Biochemie* **70**, 1131-1135, 1988
77. Sahin Toth M, Role of Asn21 in zymogene activation and implications in hereditary pancreatitis, *Journal of Biological Chemistry* **30**, 2750-22755, 2000
78. Sahin Tóth M, Tóth M (2000) Gain of function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen *Biochemical and Biophysical research communications* **278**, 286-289
79. Sahin Tóth M, Gráf L, Tóth M (1999) Trypsinogen stabilization by mutation Arg117→His: An unifying pathomechanism of hereditary pancreatitis? *Biochemical and Biophysical research communications* **264**, 505-508
80. Scheele G, Bartelt D, Bieger W (1981) Characterization of human exocrine pancreatic proteins by two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Gastroenterology* **80**: 461-473
81. Schumpelick V, Bleese N, Momser U (2006) *Chirurgie*, Thieme Verlag, Stuttgart; Auflage: 7. Auflage
82. Selig L et al. (2006) Characterization of transgenic mouse expressing R122H human cationic trypsinogen *BMC Gastroenterology* **6**:30 doi 10.1186/1471-230X-6-30

83. Secknus R, Mössner J. (2000) Inzidenz- und Prävalenzveränderungen der akuten und chronischen Pankreatitis in Deutschland. *Chirurg*: **71**; 249-252.
84. Sharer N, Schwarz M, Malone G et al., (1998) Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis, *N Engl J Med* **339**: 645-652
85. Shibata T, Ogawa M, Takata N. (1987) Distribution of pancreatic secretory trypsin inhibitor in various human tissues and its inactivation in the gastric mucosa. *Res Commun Pathol Pharmacol*: **55**; 243-248
86. Shwachman H, Lebenthal E, Khaw W. (1975) Recurrent acute pancreatitis in patients with cystic fibrosis with normal pancreatic enzymes. *Pediatrics*: **55**; 86-94
87. Simon P, Weiss F U, Mayerle J, Kraft M, Lerch M M (2006) Hereditäre Pankreatitis, *Praxis* **95**, 1623-1626
88. Simon P, Weiss F U, Sahin-Toth M, Marina Parry M, Oliver Nayler O, Lenfers B, Schnekenburger J, Mayerle J, Domschke W, Markus M. Lerch M M, (2002) Hereditary Pancreatitis Caused by a Novel PRSS1 Mutation (Arg-122 → Cys) That Alters Autoactivation and Autodegradation of Cationic Trypsinogen, *Journal of biological chemistry* Vol. 277, No 7, pp. 5404–5410
89. Sipos, T.; Merkel, J. R. (1970) An effect of calcium ions on the activity, heat stability and structure of trypsin. *Biochemistry* **9**, 2766–2775
90. Steer M L, Meldolesi J. (1987) The cell biology of experimental pancreatitis. *N Engl J Med* **316**; 144-150
91. Suda K, Takase M, Fukumura Y, Suzuki F, Jim A, Kakinuma C, Tanaka T, Matsugu Y, Miyasaka K, Funakoshi A, (2004) Histopathologic Difference Between Chronic Pancreatitis Animal Models and Human Chronic Pancreatitis, *Pancreas*, Volume 28, Number 3
92. Sweet, R M, Wright H T, Janin J, Chothia C H & Blow D M, (1974) Crystal structure of the complex of porcine trypsin with soybean trypsin inhibitor (Kunitz) at 2,6-Å resolution *Biochemistry* **13**, 4212-4228

93. Tandon RK, Sato N, Garg PK. (2002) Chronic pancreatitis. Asia-Pacific consensus report. *J Gastroenterol Hepatol*; **17**: 508–18
94. Teich N., Keim V., Mössner J., (2005) Chronische Pankreatitis-Klinische Bedeutung genetischer Risikofaktoren, *Der Internist* **46**, Springer Verlag, S. 123-130
95. Teich N, Ockenga J, Hoffmeister A, Manns M, Mössner J, Keim V. (2000) Chronic pancreatitis associated with an activation peptide mutation that facilitates trypsin activation. *Gastroenterology*: **119**; 461-465
96. Várallyay E, Gábor P, Patthy A, Szilágyi L, Gráf L (1998) Two Mutations in rat trypsin confer resistance against autolysis *Biochemical and Biophysical research communications* **243**, 56-60
97. Vonlaufen A, Wilson J S, Apte M V, (2008) Molecular mechanism of pancreatitis: Current opinion, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **23**, 1339-1348
98. Whitcomb D C et al. (1996) A gene for hereditary pancreatitis maps to chromosome 7q35 *Gastroenterology* **110**, 1975-1980
99. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston MA et al., (1996) Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in cationic trypsinogen gene, *Nat Genet* **14**: 141-145
100. Whitcomb D C (1999) Hereditary pancreatitis: new insights into acute and chronic Pancreatitis *Gut*; **45**:317–322
101. Weber P, Keim V, Zimmer KP. (1999) Hereditary pancreatitis and mutation of the cationic trypsinogen gene. *Arch Dis Child*: **80**; 473-474
102. Witt H., (2003) Chronic pancreatitis and cystic fibrosis, *Gut* **52** [Suppl 2], p. 31-41
103. Witt H, Luck W, Becker M. (1999) A signal peptide cleavage site mutation in the cationic trypsinogen gene is strongly associated with chronic pancreatitis. *Gastroenterology*: **117**; 7-10
104. 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* **25**: 213-216, 2000

105. Yamamoto T et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of human secretory trypsin inhibitor (PSTI) cDNA *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132, 605-612, 1985
106. Yamamoto T et al. (1985) Molecular cloning and nucleotide sequence of human secretory trypsin inhibitor (PSTI) cDNA *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132, 605-612
107. Zhou, J.M., et al., (1989) Kinetics of trypsin inhibition by its specific inhibitors. *Biochemistry*, **3**, 1070-1076
108. Zielenski J, Roznahel R, Bozon D, et al. (1991) Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*: **10**; 214-228
109. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (1994). Population variation of common cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat*: **4**; 167-177

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A121T	Austausch von Alanin durch Threonin an 121. Aminosäurenposition des kationischen Trypsinogen
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Temperatur in Grad Celsius
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm
HE	Hämatoxylin-Eosin
IgG	Immunglobulin gamma
kD	Kilodalton
Kg	Kilogramm
TAP	trypsinogen activation peptide
L	Liter
NaCl	Natriumchloridlösung
min	Minute
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PRSS1	kationische Trypsinogen
R122H	Austausch von Arginin durch Histidin an 122. Aminosäurenposition des kationischen Trypsinogen
RNA	Ribonukleinsäure
RFU	relative Fluorometereinheiten
SDS (PAGE)	sodium dodecylsulfate polyacrylamid gel electrophoresis
SPINK ₁	Serin Peptidase Inhibitor, Kazal Typ 1
U	Units, Enzymaktivität

μU

Mikro-Units, Enzymaktivität

μg

Mikrogramm

10 Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. W. Domschke für die Überlassung dieses interessanten Themas.

Ich danke Herrn Dr. Jürgen Schnekenburger für die Unterstützung bei der Durchführung und Korrektur meiner Doktorarbeit, sowie für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und Denken.

Besonders danken möchte ich bei Herrn PD Dr. Tobias Meister für seine persönliche Betreuung während der Doktorarbeit, die Korrektur sowie für die Einführung in die praktischen Tätigkeiten und Zuversicht für das Gelingen dieses Projektes.

Ein persönlicher Dank an meine liebe Freundin Fr. Dr. Alexandra Kroll, deren stetige Unterstützung und viel genutzter Rat mir sehr geholfen haben.

Mein weiterer Dank gilt meiner Familie, die mir das Studium ermöglicht hat und meinem Mann, der mich zu jedem Zeitpunkt ermutigt und unterstützt hat.

11 Lebenslauf