

A KRÓNIKUS PANKREATITISZ GENETIKAI HÁTTERÉNEK VIZSGÁLATA

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Berke Gergő



Témavezető: Dr. Hegyi Eszter

Programvezető: Prof. Dr. Hegyi Péter

Doktori iskola vezető: Prof. Dr. Pintér Erika

Pécsi Tudományegyetem

OGYDHT Pécs

2025

I. BEVEZETÉS

A hasnyálmirigy gyulladásoz megbetegedezei egy betegségekkontinuumot képviselenek, melyet először egy akut epizód (akut pankreatitisz; AP) majd visszatérő akut epizódok (rekurrens akut pankreatitisz; RAP) végül krónikus pankreatitisz (KP) jellemez [1]. A krónikus pankreatitisz a hasnyálmirigy idült gyulladása, melyet a szerv visszafordíthatatlan morfológiai és funkcionális károsodása kísér. A betegek nagy részénél a tünetek középpontjában hasi fájdalom, malabszorpció és következetes testsúlyvesztés állnak, jelentősen csökkentve az életminőséget.

A KP kialakulását jelenleg multifaktoriálisnak tekintik, ahol a genetikai eltérések és a környezeti hatások összjátéka vezet a betegség kifejlődéséhez. Egy kiemelkedően jelentős etiológiai tényező, mely a megbetegedeések több mint 50%-ában hozzájárul a kialakuláshoz, a krónikus, nagy mennyiségű alkoholfogyasztás (alkoholos KP; AKP). A KPesetek körülbelül egyharmada idiopáthiás, azaz egyértelmű kiváltó ok nem azonosítható. Amikor a betegek családjának több generációjában is előfordul a betegség, hereditér krónikus pankreatitiszről beszélünk (HP), mely magas penetranciájú, betegséget okozó génvariánsokkal hozható összefüggésbe. Mostanra azonban egyértelművé vált a tény, hogy a genetikai eltéréseknek ezeken az eseteken túl a sporadikus KP kialakulásában is megkérdőjelezhetetlen szerepe van [2].

I/1. Genetikai rizikófaktorok krónikus pankreatitiszben

A KP hereditér formája, mint autoszómális domináns öröklődésű betegség már a múlt század közepén ismert volt [3]. Az első génvariánszt 1996-ban azonosították Whitcomb és mtsai., mely a kationos tripszinogént kódoló *PRSSI*-ben volt megtalálható [4]. Ez a felfedezés egyrészt megerősítette a tripszinogén központi szerepét a KP pathogenezisében, másrészt elindította a betegség genetikai hátterének feltérképezését célul kitűző kutatások sorát, melyek ma is tartanak. Kandidát gén vizsgálatok, valamint teljes genom asszociációs vizsgálatok

(genome wide association study; GWAS) segítségével azóta több olyan gén került azonosításra, melyeknek variánsai növelik a betegség kialakulásának rizikóját [5]. A variánsok funkcionális vizsgálata 3 lehetséges útvonalat tárt fel, amelyen keresztül a KP kialakulásához hozzájárulnak, ezek a i) tripszin dependens, a ii) misfolding dependens és a iii) duktális útvonal [5]. Habár az eddig felfedezett gének vitathatatlan rizikófaktorok, melyek fokozzák a betegség kialakulásának esélyét, csupán az idiopáthiás esetek egy részénél kerülnek azonosításra, a többi esetben feltehetően más, eddig még nem ismert variánsok játszhathatnak szerepet. Ennek okán nagy hangsúly kerül a betegség genetikai hátterének és pathomechanizmusának kutatására, mely magába foglalja: i) a további genetikai rizikófaktorok azonosítását; ii) a genetikai rizikófaktorok hatásának pontos meghatározását; iii) a genetikai és környezeti rizikófaktorok interakciójának leírását.

I/2. A tripszin dependens útvonal

A tripszin-dependens útvonal központi lépése a korai, pankreáson belüli tripszinogén aktiváció [6]. Ennek megakadályozására a pankreász két védelmi mechanizmussal is rendelkezik. Az első védelmi vonal az emésztőenzimekkel együtt szekretált szerin proteáz inhibitor Kazal típus 1 (SPINK1) [7] nevű proteáz inhibitor, mely az aktiválódott tripszinhez kapcsolódva azt funkciójában gátolni képes. Amennyiben az aktív tripszin mennyisége meghaladja az inhibitorét, életbe lép a második védelmi vonal, amely az inaktív kimotripszinogén C (CTRC) tripszin általi aktiválásával kezdődik [8]. A duodénumban a CTRC elsősorban mint emésztőenzim funkcionál. A pankreáson belül azonban a CTRC elsődleges szerepe a tripszinogén degradációjának elősegítése, mely a további tripszinogénmolekulák aktivációját előzi meg. Azon mutációk, melyek a SPINK1 vagy a CTRC szekrécióját vagy funkcióját csökkentik, szintén hajlamosítanak KP kialakulására.

I/2.1. Kimotripszin C (CTRC) szerepe pankreatitiszben

Az első bizonyíték a patogén *CTRC* variánsok KP-ban betöltött szerepére 2008-ban került publikálásra Rosendahl és mtsai. által, ahol egy multicentrikus tanulmányban több mint 1300 beteg és 2800 kontroll egyén bevonásával vizsgálták azokat [9]. A vizsgálat leírt számos misszensz variánst, melyek KP betegek körében gyakoribbak voltak, mint az általános populációban, továbbá számos fontos megállapítást tett a *CTRC* gén genetikai eltéréseiről: i) a patogén missense *CTRC* variánsok fő hatása a csökkent enzimaktivitás vagy szekréció, ami gyengíti a hasnyálmirigyben a tripszinogén autoaktivációja elleni védelmet; ii) az olyan heterozigóta misszensz *CTRC* variánsok, amelyek viszonylag gyakran fordulnak elő a betegek körében (globális hordozói gyakoriság >1%), körülbelül 3–7-szeresére növelik a betegség kialakulásának kockázatát; iii) ezek a variánsok hasonló mértékben emelik a kockázatot mind alkoholos, mind idiopátiás KP-ben; iv) a variánsok átlagosan a betegek legfeljebb 5%-ában fordulnak elő.

I/2.2. Kimotripszin C (*CTRC*) p.Gly60= polimorfizmus

A 2008-ban megjelent *Nature Genetics* tanulmány, mely először írta le a *CTRC* variánsok KP-ban betöltött szerepét, csupán a misszensz variánsokra fókuszált, a talált szinonim mutációkat nem említette meg [9]. Elsőként Masson és mtsai. (2008) írták le a c.180C>T (p.Gly60=, rs497078) variánst a *CTRC* gén 3-as exonjában, mely francia KP betegek és egészséges kontrollok közt 11.9% és 4.3% gyakorisággal fordult elő [10]. A c.180C>T familiáris KP-vel asszociált (OR 2.46), ellenben idiopátiás és hereditár KP-val nem. Később Derikx és mtsai. (2009), valamint Paliwal és mtsai. (2013) szintén azonosították a variánst trópusi KP betegekben [11, 12]. Paliwal és mtsai. (2013) leírták, hogy a betegséggel való asszociáció magasabb volt a homozigóta (OR 9.89) mint a heterozigóta (OR 2.46) variáns esetében. Masamune és mtsai. (2013) valamint Zou és mtsai. (2018) ázsiai populációkban vizsgálták a variánst, mely a korábbiaktól eltérően jelentősen ritkábban fordult elő [13, 14]. A variáns betegséggel való asszociációja később konfirmálva lett több, más nemzetiségű populációban is: Larusch és mtsai. (2015) által az USA-ban, Grabarczyk és mtsai. (2017) által Lengyelországban, valamint

egy GWAS tanulmány (2018) által, mely több eltérő európai kohorszot tartalmazott [15-17]. A lengyel tanulmány érdekessége, hogy pediátriai kohorszot elemzett, melyben a homozigóta variánsok jelentősen magasabb százalékban fordultak elő (14.7%; OR 23). Mind Grabarczyk és mtsai. (2017), mind Rosendahl és mtsai. (2018) megfigyelték, hogy a c.180C>T variáns kapcsoltan öröklődik a c.493+52G>A (rs545634) intronikus variánssal. Habár a p.Gly60= asszociációja a KP-val megkérdőjelezhetetlen, két okból is érdekes a variáns: az első, hogy szinonim mutációról lévén szó nem változtatja meg az aminosavsorrendet, így a mutáció mechanizmusa nem egyértelmű és biokémiai, valamint sejtbiológiai módszerekkel nehezen vizsgálható. Másodsorban mivel a variáns gyakori és a KP rizikóját kis mértékben fokozza, kellően nagy kohorszra van szükség hatásának vizsgálatához, mely nem feltétlen adott minden kutatócsoportnak. Ezen második pont az feltehetően az oka annak, hogy miért különböznek nagymértékben az irodalomban megtalálható p.Gly60= esélyhányadosok.

I/3. A misfolding dependens útvonal

2009-ben egy új pathomechanizmus vált ismertté, amikor KP betegekben több olyan *PRSSI* variáns (p.R116C; p.C139S) került azonosításra, melyek funkcionális vizsgálata az azelőtt ismertektől eltérő eredményre vezetett [18]. Egyik variánsra sem voltak igazak a tripszin-dependens útvonal klasszikus jellemzői (fokozott autoaktiváció, csökkent CTRC-dependens degradáció). Ehelyett a tripszinogén szekréciója a transzfektált HEK 293T sejtekből ~80%-al csökkent, a fehérjék intracellulárisan, inszolubilis formában beragadtak és a sejtekben megnőtt a immunoglobulin-kötő fehérje (BiP, melyet kódoló gén a heat shock protein family A (Hsp70) member 5; *HSPA5*) és XBP1s (spliced X-box binding protein-1) fehérje szintje. Ezek a megfigyelések a hibásan feltekeredett fehérjék endoplazmatikus retikulumon (ER) belüli felhalmozódására utaltak, mely az ER stressz állapota. Hosszan tartó ER stressz, melyet a sejt nem tud leküzdeni, a kóros fehérje válasz (unfolded protein response; UPR) PERK

(double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)–like ER kinase) útvonalán keresztül végső soron apoptózist indukál és a sejt halálához vezet [19].

Az évek során számos más misfolding variáns került azonosításra KP betegek között, melyek nem, vagy ritkábban fordulnak elő az általános népesség körében [20]. Ezen variánsok a tripszin-dependens útvonal variánsainál ritkábbak, a genetikailag érintett betegpopuláció ~10%-ban fordulnak elő, de a betegséggel nagyon erősen asszociálnak. Azon variánsok, melyekre a misfolding fenotípus jellemző (az érintett fehérjék jelentősen csökkent mértékben szekretálódnak a sejtekből, míg sejten belül inszolubilis és proteáz-szenzitív formában megtalálhatóak) [20], általában az acinus sejtek által nagymértékben termelt emésztőenzimekben fordulnak elő, mint a karboxipeptidáz A1 (CPA1) [21] és a karboxil-észter lipáz (CEL) [22].

I/3.1. Karboxil-észter lipáz (*CEL*)

A CEL egy emésztőenzim, mely részt vesz a táplálékkal felvett zsírok, koleszterin-észterek, valamint zsírdékony vitaminok emésztésében és felszívódásában [23]. A pankréász által szekretált fehérjék közel 4%-át teszi ki. A *CEL* gén 11 exonból áll, melyből az utolsó ismétlődő szakaszokat (variable number of tandem repeats; VNTR) tartalmaz [24]. Az első 5 VNTR ismétlődésben előforduló nukleotid deléciók a monogénes diabétesz egyik formáját (maturity onset diabetes of the young type 8; MODY8) okozzák [25], mely utóbbi időben mint a KP egyik formája kerül említésre. A deléció egy korai STOP kodonon keresztül ismétlődő cisztein aminosavak megjelenésével jár, melyek a fehérjét hajlamosá teszik a kóros feltekeredésre. Számos egyéb frameshift mutáció is leírásra került a *CEL* VNTR régiójában, azonban pathogenicitásukat illetően kevésről rendelkezünk egyértelmű bizonyítékokkal.

I/3.2. Karboxil-észter lipáz hibrid allél 1 (*CEL-HYB1*)

A *CEL* gén a genomban tandem módon helyezkedik el az öt követő pszeudogénjével (carboxyl ester lipase pseudogene, *CELP*) [26]. Ahogy a neve is mutatja, a *CELP* nem kódol működőképes fehérjét, mivel csak a *CEL* gén első

(1') és nyolcadiktól a tizenegyedikig (8'-11') terjedő exonjait tartalmazza, az mRNS-e pedig feltételezhetően egy korai STOP kodon miatt korán lebomlik. Mivel a *CEL* és *CELP* egymáshoz közel helyezkednek el, és szekvenciájuk nagyfokú hasonlóságot mutat, hajlamosak átrendeződésekre. 2015-ben egy norvég kutatócsoport önkéntes véradók mintáiban a *CEL* gént vizsgálta genetikai eltérések után kutatva, és egy hibrid allélt azonosítottak, amelyet később *CEL-HYB1*-nek neveztek el. Az allél a *CEL* 10-es intronja és a szomszédos *CELP* exonhatárok közötti nem-allélikus homológ rekombináció révén keletkezett [26]. A hibrid gén a *CEL* 1-10 exonját továbbá a *CELP* 11' exonját tartalmazza, így jóval rövidebb C terminális régióval rendelkezik egy korai STOP kodonnak köszönhetően. A hibrid gént transzfektált sejtekben expresszáva a *CEL-HYB1* fehérje hibás feltekeredésre utaló jelenségeket mutatott: csökkent szekréció, sejten belüli retenció, valamint ER stressz [27]. Az ezt követő eset-kontroll vizsgálat familiáris KP betegekben szignifikáns *CEL-HYB1* dúsulást mutatott (14%) az egészséges kontrollcsoporthoz képest (1%), ami arra utalt, hogy a *CEL-HYB1* erős kockázati tényező lehet KP esetén (OR 15,5) [26]. Az ezt követő, három európai (két német és egy francia) kohorszban végzett megerősítő vizsgálatok kisebb, de továbbra is szignifikáns dúsulást mutattak (OR 5,2) [26]. Az ezt követő vizsgálatok azonban összetettebb képet festettek. Először is kiderült, hogy a *CEL-HYB1* kelet-ázsiai populációkban egyáltalán nem fordul elő, helyette egy másik hibrid allél, a *CEL-HYB2* volt megtalálható [28]. A *CEL-HYB2* allél, amelyben a *CEL* exonjai (1-9) a *CELP* 10'-11' exonjaival fuzionálnak, nem asszociált KP-vel, melynek valószínűsíthető oka a képződő mRNS nonszensz-mediált lebomlása [28, 29]. Másodsorban, egy lengyel pediátriai KP kohorszon végzett vizsgálat nem talált statisztikailag szignifikáns kapcsolatot a *CEL-HYB1* és a KP között, bár a KP esetekben az allél előfordulása kétszer gyakoribb volt, mint a kontrolloknál [30, 31]. Az asszociáció hiányának oka feltételezhetően az, hogy a kontrollcsoportban az allél gyakorisága (2,4%) a korábbi vizsgálatokban találtaknál (0,7-1%) jóval magasabb volt. Végül, de nem utolsósorban, egy újabb tanulmány leírta, hogy a *CEL-HYB1* allél három különböző haplotípusként fordul

elő, amelyeket a 488. és 548. pozíciójában található izoleucin (Ile) és treonin (Thr) határoznak meg [27]. Figyelemre méltó módon a Thr488–Thr548 haplotípus hasonló gyakorisággal fordult elő *CEL-HYB1*-pozitív KP betegekben (34/55) és kontrollokban (18/20), míg a Thr488–Ile548 haplotípust kizárólag KP betegekben találták meg (20/55). Az Ile488–Thr548 haplotípus a másik kettőnél jelentősen ritkább volt, de előfordult mind betegekben (1/55), mind kontrollokban (2/20).

II. CÉLKITŰZÉSEK

1. A *CTRC c.180C>T (p.Gly60=)* variáns vizsgálata krónikus pankreatitiszben.

- Megvizsgálni a p.Gly60= variáns gyakoriságát és meghatározni a rizikófokozódás nagyságát magyar KP populációban.
- Egy globális, szisztematikus metaanalízis segítségével meghatározni a variáns heterozigóta és homozigóta formája által közvetített rizikófokozódás mértékét.

2. A karboxil-észter lipáz hibrid allél (*CEL-HYB1*) haplotípusainak vizsgálata krónikus pankreatitiszben.

- Megvizsgálni a *CEL-HYB1* allél KP-ban betöltött szerepét magyar populációban egy eset-kontroll vizsgálat segítségével és meghatározni a jelenlévő haplotípusokat.
- Analizálni abetegséggel asszociált *CEL-HYB1* haplotípusok előfordulási gyakoriságát és hatásnagyságát német, francia és lengyel minták vizsgálatával.

III. MÓDSZEREK

III/1. A *CTRC c.180C>T (p.Gly60=)* variáns vizsgálata krónikus pankreatitiszben

III/1.1. Vizsgálati alanyok és genotipizálás

A magyarországi kohorsz DNS mintái Sanger-féle szekvenálással lettek analizálva, összesen 291 KP-s beteget (átlagéletkor a tanulmányba bevonáskor

55.7±11.7) vontunk be a vizsgálatba, ebből 124 beteg betegsége alkoholos eredetű (alkoholos KP; AKP) és 167 nem-alkoholos eredetű (nem-alkoholos KP; NAKP). Kontrollként 349 pankréász betegségben nem szenvedő egyént analizáltunk (átlagéletkor a tanulmányba bevonáskor 49.1±12.1). További genotípus adatok a c.180C>T variánst illetően Rosendahl és mtsai. (2018) [15] GWAS eredményeiből kerültek bevonásra.

III/1.2. Metaanalízis

Két szerző egymástól függetlenül végezte a szisztematikus keresést négy adatbázisban (MEDLINE - Pubmed, Embase, Scopus, and CENTRAL - Cochrane Library) PICO formátumban megfogalmazott keresőkulcs alapján. A beválogatott cikkek által idézett, és azokat idéző közlemények keresése szintén megtörtént (MEDLINE - Pubmed és Google Scholar segítségével). A többlépcsős szűrés a megfelelő tanulmányok kiválasztására (genetikai eset-kontroll vizsgálatok, ahol adekvát módon definiált KP betegekben és egészséges kontrollokban vizsgálták a c.180C>T (p.Gly60=) *CTRC* variánst), valamint a beválogatott cikkek minőségellenőrzése modifikált Newcastle-Ottawa skála (NOS) segítségével, valamint a Hardy-Weinberg egyensúly megítélése (χ^2 teszt) két szerző által egymástól függetlenül történt. A szerzők közötti ellentmondások egy harmadik szerző bevonásával kerültek feloldásra.

III/1.3. Statisztika

A c.180C>T *CTRC* variáns minor T alléljának, a TT (TT vs. CC) és a CT (CT vs. CC) genotípusának hatása összesített esélyhányadosok (OR) és 95%-os konfidencia intervallumok (CI) meghatározásával történt a random effektus modellt (Der-Simonian Laird) alkalmazva. A tanulmányok közti heterogenitás az I^2 ($p \geq 0.1$) statisztika kiszámolásával és χ^2 próbával történt. Szenzitivitás analízis az egyes tanulmányok kihagyása általi újraszámolással valósult meg („leave one out” módszer).

III/1.4. Allélspecifikus vizsgálatok

A c.180C>T variáns *CTRC* expresszióra gyakorolt hatása heterozigóta hordozók deidentifikált humán pankreász cDNA mintáinak segítségével történt. A vad típusú allél és a mutáns allél egymáshoz viszonyított arányát restriktációs fragmens hossz-polimorfizmus (RFLP) esszével határoztuk meg. A minták PCR amplifikációját és FauI enzimmel való emésztését követően egy kapilláris elektroforézis rendszer segítségével került sor az emésztett és emésztetlen termékek mennyiségi meghatározására.

III/2. A karboxil-észter lipáz hibrid allél (*CEL-HYBI*) haplotípusainak vizsgálata krónikus pankreatitiszben

III/2.1. Vizsgálati alanyok

A vizsgálatba 319 KP-s beteget, melyből 134 NAKP-s (átlagéletkor a tanulmányba bevonáskor 58.66 ± 13.6), 185 AKP-s (átlagéletkor a tanulmányba bevonáskor 55.52 ± 9.9), továbbá 618 pankreász betegség nélküli kontroll egyént (átlagéletkor a tanulmányba bevonáskor 40.98 ± 14.7) vontunk be. A haplotípus eloszlás meghatározása érdekében további *CEL-HYBI* hordozókat analizáltunk Németországból (29 beteg és 13 kontroll), Franciaországból (17 beteg és 9 kontroll), valamint Lengyelországból (6 beteg és 8 kontroll).

III/2.2. A *CEL-HYBI* allél detektálása és a haplotípus meghatározása

A *CEL-HYBI* allélt a kohorszokban Fjeld és mtsai. (2015) [26] által közölt LighCycler alapú esszével szűrtük CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System segítségével. A pozitív mintákat long-range duplex PCR segítségével verifikáltuk. A haplotípusok meghatározása érdekében a mintákat allélspecifikus PCR amplifikációt követően Sanger szekvenálással vizsgáltuk.

III/2.3. A *CEL* c.1463T>C (p.Ile488Thr) variáns vizsgálata

A mintákat RFLP esszé segítségével genotipizáltuk a p.Ile488Thr *CEL* variánusra. A 10-es exon és az azt körülölelő régiók PCR amplifikációját követően az amplikonokat DpnII enzim segítségével emésztettük (New Englands Biolabs), az

emésztett termékeket 2%-os agarózgélen vizualizáltuk. A p.Ile488Thr pozitív mintákat Sanger szekvenálással verifikáltuk.

III/2.4. Funkcionális vizsgálatok

Az identifikált haplotípusok hatását HEK 293T sejtek tranziens transzfekciójával vizsgáltuk korábban leírt módszerek alapján [27]. Teljes RNS izolációt és azok reverz transzkripcióját követően a *HSPA5* szinteket kvantitatív PCR segítségével határoztuk meg.

IV. EREDMÉNYEK

IV/1. A *CTRC* c.180C>T (p.Gly60=) variáns vizsgálata krónikus pankreatitiszben

IV/1.1. Eset-kontroll vizsgálatok

Először a c.180C>T *CTRC* variáns előfordulását vizsgáltuk magyar 291 KP-s (124 NAKP-s és 167 AKP-s) betegben, illetve 349 egészséges kontrollban. A c.180T allél szignifikánsan gyakrabban fordult elő KP-s betegekben (18,7%) a kontrollokhoz (10,2%) képest (OR 2,04; 95% CI 1,47-2,81). A genotípuseloszlást vizsgálva a homozigóta c.180TT genotípus a KP betegek 3,8%-ban és a kontrollok 0,3%-ban volt jelen, míg a heterozigóta c.180CT genotípus a betegek 29,9%-ban és a kontrollok 19,8%-ban. A vad típusú c.180CC genotípushoz képest a c.180CT és c.180TT genotípusok esélyhányadosa 15,9 (95% CI 2,04-124,18) és 1,82 (95% CI 1,26-2,63) volt, mutatva a homozigóta forma erősebb hatását. NAKP-s és AKP-s betegek alcsoportanalízise hasonló allélfrekvencia eloszlást eredményezett a csoportokban (19,4 és 18,3%). Genotípus eloszlás tekintetében azonban a homozigóta c.180TT genotípus gyakoribb volt NAKP-s betegekben (5,7%) mint AKP-s betegekben (2,4%). Korábban az irodalomban leírták az intronikus c.493+52G>A variáns kapcsolt öröklődését a vizsgált c.180C>T variánsal [15, 17, 32, 33]. Ez a kapcsoltság a mi kohorszunkban is fellelhető volt (D' 0,98, r^2 0,94). 11 homozigóta c.180TT betegből 10 volt homozigóta a

c.493+52G>A variánsra, míg minden homozigóta c.493+52G>A hordozó a c.180C>T variánsra is homozigóta volt. Az analízisünk kiterjesztése érdekében Rosendahl és mtsai. (2018) [15] segítségével felhasználtuk a több európai kohorszt vizsgáló (2336 KP-s beteg melyből 544 NAKP-s és 1729 AKP-s, továbbá 5768 kontroll egyén) GWAS analízis adatai közül a c.180C>T variánsra vonatkozó genotípus adatokat. Ezen betegek között a c.180C>T variáns minor allélfrekvenciája 16,6% volt, míg a kontrollok között csak 9,7% (OR 1,85; 95% CI 1,68-2,05). A genotípus eloszlás vizsgálatakor a homozigóta c.180TT genotípus a KP-s betegek 2,9%-ban és a kontrollok 1,2%-ban volt megtalálható, míg a heterozigóta c.180CT genotípus a betegek és kontrollok között 27,4%-ban és 17,1%-ban volt jelen. A c.180CC genotípushoz képest a homozigóta c.180TT esélyhányadosa 2,9 volt (95% CI 2,06-4,07), míg a heterozigóta c.180CT formáé 1,89 (95% CI 1,68-2,11), megerősítve a homozigóta forma erősebb hatását. Az allélfrekvencia eloszlása alsoport analízis során NAKP-s (18,5%) és AKP-s (16,1%) csoportok között itt sem mutatott jelentős különbséget, azonban a magyar kohorszhoz hasonlóan a homozigóta c.180TT genotípus itt is magasabb százalékban fordult elő NAKP-s betegekben (4,6%) azAKP-s betegekhez képest (2,4%).

IV/1.2. Metaanalízis

Kvantitatív szintézishez a magyar és a GWAS eredetű adatokat [15], továbbá 5 korábban publikált tanulmány adatait használtuk fel [11, 12, 14, 16, 17]. Összesen 5379 KP-s beteg és 9675 egészséges kontroll adatait analizáltuk annak érdekében, hogy meghatározzuk a c.180C>T *CTRC* variáns minor c.180T alléljának, a c.180TT (TT vs. CC) és a c.180CT (CT vs. CC) genotípusainak hatását. Az így kapott összesített kohorszban a minor c.180T allél szignifikánsan gyakrabban fordult elő a KP-s betegek (14,2%) körében, mint kontrolloknál (8,7%)(OR 2,18; 95% CI 1,72-2,75). A genotípusok frekvenciáját tekintve az összesített kohorszban a homozigóta c.180TT és a heterozigóta c.180CT genotípus KP betegek körében 3,9% és 22,9% volt, míg egészséges kontrollokban 1,2% illetve

15,5%. Következésképpen a genotípusokat érintő esélyhányados jelentősen magasabb volt a homozigóta genotípus esetén (OR 5,29; 95% CI 2,63-10,64), mint a heterozigóta genotípus esetén (OR 1,94; 95% CI 1,57-2,38) a vad típusú c.180CC genotípushoz viszonyítva. Szenzitivitás vizsgálat (leave-one-out módszer) alátámasztotta az eredményeinket. A nagyfokú heterogenitás miatt alcsoportelemzést végeztünk, immáron csak európai etnikumú kohorszokat bevonva az analízisbe. Ebben a csoportban a c.180T minor allél szintén felülreprezentált volt a KP-s betegek körében (16,8%) a kontrollokhoz képest (9,9%), 1,77-es esélyhányadost eredményezve (95% CI 1,59-1,98). A tanulmányok közötti heterogenitás ezúttal alacsony volt (I^2 21,4%). A genotípusok hatását vizsgálva mind a homozigóta mind a heterozigóta genotípus gyakoribb volt a betegek körében (4,6% and 27,7%) mint a kontrollok között (1,4% and 17,8%). A c.180CC genotípushoz viszonyítva az esélyhányadosok a homozigóta forma esetén 3,31 (95% CI 1,92-5,71), míg a heterozigóta forma esetén 1,65 (95% CI 1,38-1,98) voltak. Megjegyzendő azonban, hogy a tanulmányok között közepes mértékű heterogenitás volt jelen. A c.180C>T *CTRC* variáns szerepének vizsgálatához alkoholos eredetű betegségben egy második alcsoport analízist végeztünk, immáron csak a magyar, illetve a pán-európai GWAS AKP és NAKP kohorszoknak adatait alapul véve. Allélfrekvenciát illetően a minor c.180T allél szignifikánsan gyakrabban fordult elő mind az AKP (OR 1,8; 95% CI 1,62-2) mind a NAKP (OR 2,1; 95% CI 1,83-2,47) csoportokban. Genotípusokat vizsgálva megállapítottuk, hogy a homozigóta c.180TT genotípus erősebb hatást gyakorolt NAKP kialakulására (OR 5,1; 95% CI 3,34-7,9), mint az AKP esetében (OR 2,5; 95% CI 1,71-3,62). Ezzel ellentétben a heterozigóta c.180CT forma hasonló mértékben fordult elő mindkét populációban (NAKP esetén OR 1,94; 95% CI 1,62-2,34; AKP esetén OR 1,88; 95% CI 1,67-2,12). A modifikált NOS skála alapján a metaanalízisbe beválogatott cikkek minősége kiváló volt. A Hardy-Weinberg egyensúlytól két esetben találtunk eltérést [10, 15]. A pán-európai GWAS tanulmányban (Rosendahl és mtsai., 2010) [15] ez megmagyarázható a Wahlund effektus segítségével [34], hiszen a tanulmányba

bevett kohorszok egyesével vizsgálva mind Hardy-Weinberg ekvilibriumban vannak. A francia tanulmány (Masson és mtsai, 2008) [10] esetében azonban nincs egyértelmű magyarázat ennek hiányára, azonban a szenzitivitás vizsgálat nem mutatta a kohorsz nagyfokú eltérését a többi tanulmányban vizsgáltaktól.

IV/1.3. A c.180C>T variáns hatása *CTRC* mRNS expresszióra

Tíz pankreász szövetből nyert cDNS mintában vizsgáltuk a c.180C>T *CTRC* variáns mRNS expresszióra gyakorolt hatását. Elsőként a cDNS minták PCR amplifikációját követően Sanger szekvenálásnál kapott elektroferogramm csúcsok magasságát hasonlítottuk össze a c.180 pozícióban. Itt a mutáns c.180T csúcs alacsonyabb volt, mint a vad típusú c.180C csúcs, amit ugyanezen betegektől nyert genomi DNS szekvenálása esetén nem tapasztaltunk. Az eredmény kvantifikálása érdekében egy RFLP esszé segítségével meghatároztuk a csökkenés mértékét, ami a c.180T allél esetén a teljes *CTRC* mRNS mennyiség 40.7±2%-a (átlag±szórás, n=10) volt a várt 50% helyett (p<0.0001). Ez heterozigóta formában az eredeti 100%-os szint 84,3%-ra, míg homozigóta forma esetén 68,6%-ra való csökkenését jelenti.

IV/2. A karboxil-észter lipáz hibrid allél (*CEL-HYBI*) haplotípusainak vizsgálata krónikus pankreatitiszben

IV/2.1. A *CEL-HYBI* asszociációja krónikus pankreatitisszel Magyarországon

A *CEL-HYBI* allélt 319 magyar KP betegben (185 alkoholos és 134 nem alkoholos), valamint 618 etnikailag azonos, pankreász betegségtől mentes kontrollban vizsgáltuk. A *CEL-HYBI* allél szignifikánsan gyakrabban fordult elő a betegek körében (hordozó frekvencia 9/319 vs. 5/618; OR 3,6; 95% CI 1,2-10,7; P=0,024). Alcsoportvizsgálat nem talált jelentős különbséget AKP (6/185, 3,2%) és NAKP (3/134, 2,2%) csoportok közötti előfordulásban. Az NAKP csoportban a szignifikancia elmaradása valószínűsíthetően a betegek alacsonyabb számának tudható be. Mindegyik *CEL-HYBI* pozitív egyén heterozigóta volt. A *PRSSI* gén

2-es és 3-as exonjának, *SPINK1* 3-as exonjának, *CTRC* 2-es, 3-es, 7-es exonjának, *CPAI* 7-es, 8-as és 10-es exonjának, valamint a *CFTR* 4-es és 11-es exonjának szekvenálásakor nem találtunk egyéb KP rizikót fokozó variánsokat, eltekintve a gyakran előforduló c.180C>T (p.Gly60=) szinonim variánstól. Ez 2/9 betegben (1 homozigóta és 1 heterozigóta), valamint 3/5 kontrollban (mind heterozigóta) volt megtalálható.

IV/2.2. *CEL-HYBI* haplotípus vizsgálata

Haplotípuseloszlás vizsgálatának céljából a *CEL-HYBI* allél 10-es és 11'-es exonjait megszekvenáltuk minden magyarországi hordozó egyénben. A várttól eltérően, mindegyik beteg és kontroll minta a Thr488-Thr548 *CEL-HYBI* haplotípust tartalmazta. Annak érdekében, hogy ezt összehasonlíthassuk más kohorszok eloszlásával, a korábban azonosított német, francia és lengyel *CEL-HYBI* hordozók [26, 30] mintáit szekvenálással vizsgáltuk. A német (14/29) és lengyel (2/6) betegek körülbelül harmada hordozta a Thr488-Ile548 haplotípust, míg a francia betegek (17/17) mindegyike Thr488-Thr548 haplotípusú volt. Mind a német (n=13), a lengyel (n=8), és francia (n=9) kontrollok Thr488-Thr548 haplotípussal rendelkeztek. A Thr488-Ile548 haplotípus, hasonlóan a korábbi vizsgálatokhoz [27], most sem került azonosításra. A 29 német betegből 21 esetében a családi anamnézis elérhető volt, ezek közül 8 betegnél volt legalább egy érintett egyén a családban. Érdekességképp, a Thr488-Ile548 haplotípus hatszor fordult elő ebben a csoportban (6/8), míg a negatív családi anamnézissel rendelkezők között csak 23%-ban (3/13). A korábban leírt Ile488-Thr548 haplotípust [27, 35] nem azonosítottuk egy *CEL-HYBI* hordozóban sem.

IV/2.3. A *CEL* c.1463T>C (p.Ile488Thr) variáns hatása Magyarországon

Mivel mindkettő azonosított patogén *CEL-HYBI* allél tartalmazta a Thr488-at, megvizsgáltuk, van-e a mutációnak genetikai hatása a rekombinációt nem tartalmazó *CEL* génben. RFLP esszé segítségével a *CEL-HYBI* allélt nem tartalmazó egyéneket vizsgálva a p.Ile488Thr variáns 1/309 KP betegnél (0.3%)

és 2/611 kontrollnál (0.3%) fordult elő. Tehát a Thr488 jelenléte a *CEL* génben ritka és nem mutat asszociációt a betegséggel (OR 1, 95% CI 0,1-11, $P=0,993$).

IV/2.4. A *CEL-HYBI* haplotípusok funkcionális analízise

Egy korábbi tanulmány, amely a Thr488-Ile548 és Thr488-Thr548 haplotípusok hatását vizsgálta transzfektált sejtekben, hasonló mértékű szekréciós defektust, intracelluláris aggregációt és ER stresszt indukáló hatást írt le [27]. Ugyanazokat az expressziós konstruktokat alkalmazva újrazsolgáltuk a *CEL-HYBI* haplotípusok hatását a *HSPA5* (BiP) ER chaperon tekintetében, tranziensen transzfektált HEK 293T sejteken. A korábban használt Western blot helyett kvantitatív PCR-t alkalmaztunk, mivel a módszer érzékenyebb kisebb különbségek kimutatását tekintve. Az üres vektorral transzfektált sejtekhez képest mindkét *CEL-HYBI* haplotípus növelte a *HSPA5* expresszióját. Mind 1 μg mind 4 μg expressziós plazmidot használva a Thr488-Ile548 szignifikánsan magasabb *HSPA5* expresszió növekedést eredményezett a Thr488-Thr548 haplotípushoz képest, de az eltérés mértéke csekély volt.

V. MEGBESZÉLÉS

A krónikus pankreatitisz egy relapszáló-remittáló komplex gyulladós betegség, mely a környezeti rizikófaktorokon kívül széles palettájú genetikai rizikófaktorokkal is rendelkezik [5]. Ebben a tézisben ezen genetikai elváltozások közül kettőt elemeztünk, a gyakori *CTRC* c.180C>T (p.Gly60=) variánst és az ennél ritkábban előforduló karboxil-észter lipáz hibrid allél 1-et (*CEL-HYBI*).

V/1. A *CTRC* c.180C>T (p.Gly60=) variáns vizsgálata krónikus pankreatitiszben

A vizsgálat célja a *CTRC* c.180C>T variáns hatásának meghatározására volt egy átfogó szisztematikus analízis segítségével. Egy korábbi tanulmányunkban más, a betegek körében relatíve gyakori (>1%) misszensz variánsok és egy mikrodeléció prevalenciáját és hatását vizsgáltuk [36]. Azt találtuk, hogy a

hordozófrekvencia ezen variánsok tekintetében 1% és 2,4% között mozog, 2,6-tól 6,5-ig terjedő esélyhányadosokkal. Összesítve úgy tűnik, hogy a betegek ~4%-ban hordoznak heterozigóta formában ilyen misszensz *CTRC* variánsokat, ami átlagosan egy 5x-ös KP rizikófaktorozást eredményez. Ezzel szemben a gyakori c.180C>T (p.Gly60=) *CTRC* variáns szinonim, így az aminosavsorrendet nem változtatja meg. Annak érdekében, hogy ezen variáns hatásáról egy tisztább képet kapjunk, először egy eset-kontroll vizsgálatot végeztünk magyar kohorszban. Az analízishez szintén felhasználtunk egy 2018-ban publikált GWAS [15] adatait. A következő lépésben mind a korábban publikált mind az új adatokat felhasználva metaanalízis segítségével határoztuk meg a variáns hatását. Allélfrekvencia tekintetében a c.180>T szignifikánsan gyakrabban fordult elő KP betegek körében (~14%) mint kontrolloknál (~9%), a KP rizikóját pedig körülbelül kétszeresen fokozta. A genotípusokat megvizsgálva, a homozigóta c.180TT körülbelül ötszörösére fokozta a KP rizikóját, míg a heterozigóta c.180CT forma csupán kétszeresére. Azonban az analízis végeztével észrevettünk egy jelentősebb mértékű heterogenitást az egyes tanulmányok között, mely általában különböző alcsoportok jelenlétét sugallja. Ez genetikai tanulmányok között nem ritka, hiszen különböző etnikumú kohorszok különböző genetikai háttérrel rendelkezhetnek. Ennek kiküszöbölése érdekében meghatároztuk a rizikófaktorozás mértékét csak európai etnikai háttérrel rendelkező kohorszok esetében. Bár ez a konfidencia intervallumot szűkítette, nem szabad elfeledkezni arról, hogy más rizikófaktorok jelenléte is hozzájárulhatott a különbséghez, hiszen a c.180C>T variáns önmagában nem okozza a betegség kialakulását.

A korábbi tanulmányunkhoz hasonlóan, ahol a misszensz *CTRC* variánsok hasonló mértékben növelték az alkoholos és nem-alkoholos eredetű betegség rizikóját [36], a heterozigóta c.180CT genotípus is azonos mértékben fordult elő a két populációban. A c.180C>T variáns hatása, amivel hozzájárul a KP kialakulásához eddig nem volt ismert. Ebben a tanulmányban humán pankreász mintákból származó cDNS preparátumok segítségével megállapítottuk, hogy a minor c.180T allél expressziója a vad típusú c.180C allélhoz képest csökkent.

Megjegyzendő azonban, hogy a variáns kapcsoltan öröklődik az intronikus c.493+52G>A variánssal. Egyelőre nem tisztázott, hogy mely variáns felelős a csökkent mRNS szintért.

V/2. A karboxil-észter lipáz hibrid allél (*CEL-HYBI*) haplotípusainak vizsgálata krónikus pankreatitiszben

Ebben a tanulmányban a *CEL-HYBI* allél KP-val fennálló asszociációját szeretnénk volna vizsgálni magyar populációban, valamint karakterizálni a különböző haplotípusok betegség kialakulására kifejtett hatását. Mivel korábbi tanulmányok nem vizsgálták a haplotípusokat, új replikációs vizsgálatok és a már közölt eredmények reanalízisére volt szükség. Vizsgálatunkban a *CEL-HYBI* allél jelentős emelkedését tapasztaltuk KP betegek körében a kontroll populációhoz képest, mind AKP mind NAKP esetében. Az összesített esélyhányados (OR 3,6) hasonló volt más, jelentős rizikófaktorozást eredményező génelterésekhez, mint a misszensz *CTRC* variánsok vagy a heterozigóta *CFTR* p.Phe508del variáns [5]. Az eredményeink alátámasztják, hogy a *CEL-HYBI* allél fontos rizikófaktora a KP-nek. A haplotípusok vizsgálatakor azonban meglepő módon egyedül a Thr488-Thr548 haplotípus került azonosításra, mely korábbi vizsgálatok alapján nem asszociál a betegséggel [27]. Ennek tisztázása érdekében minden elérhető *CEL-HYBI* allélt a már korábban közölt német, francia és lengyel kohorszokból megszekvenáltunk [26, 30]. Meglepetésünkre, körülbelül a német betegek fele, és a lengyel betegek harmada a Thr488-Ile548 haplotípust tartalmazta, míg francia hordozókban egyedül a Thr488-Thr548 haplotípus volt fellelhető. Ahogy az korábban is leírásra került, kontroll egyénekbenn a Thr488-Ile548 haplotípus nem volt megtalálható, sugallva az allél potenciális betegség kiváltó mivoltát. Minthogy a magyar és francia kohorszokban kizárólag a Thr488-Thr548 haplotípus volt jelen, ezen allél betegséggel való asszociációja tisztázottá vált, ámbar a hatása valóban kisebb, mint a Thr488-Ile548 haplotípusé.

Számos tanulmány talált olyan családfákat, ahol a pankreatitisz a *CEL-HYBI* alléllal együtt fordult elő [26, 30, 37]. Fjeld és mtsai. (2015) a saját kohorszukban

15-ös esélyhányadost írtak le familiáris KP betegek körében [26]. Hasonlóképpen, familiáris lengyel KP betegeknel a *CEL-HYBI* allél frekvenciája relatíve magas volt (3/20) [30]. Elképzelhető, sőt valószínű, hogy ezen betegek a Thr488-Ile458 haplotípust hordozták, ami megmagyarázná a talált magas penetranciát. A korábban reportált Ile488-Thr548 haplotípust [27] nem sikerült azonosítanunk egyetlen *CEL-HYBI* hordozóban sem, mely felveti a lehetőségét a haplotípus nem létezésének annak ellenére, hogy egy közelmúltban megjelent USA tanulmány, mely pankreász tumoros betegeket vizsgált, leírta a haplotípust a kontroll populációban 12/1045 (1,1%) [35]. Ez a látszólag ellentmondó eredmény felhívja a figyelmet a lehetséges technikai hibákra, amik a nagymértékben komplex *CEL* lókuszt vizsgálataánál előfordulhatnak.

A nagyfokú eltérés a két *CEL-HYBI* haplotípus között nem egyértelmű. A *CEL-HYBI* egy misfolding variánsként van számontartva, azonban ilyen tekintetben a Thr488-Thr548 és a Thr488-Ile548 haplotípusok között az eltérés minimális [27]. Ezt mi is megerősítettük, mivel mindkét haplotípus markáns ER stresszt okozott transzfektált sejtekben, azonban a Thr488-Ile548 haplotípus hatása csak kismértékben volt erősebb. Hogy mily módon vezet egy ilyen kis hatás ennyire eltérő klinikai fenotípushoz, az egyelőre megoldatlan. Közelmúltban megjelent tanulmányok szerint, melyek a misfolding *CPA1* variánsokat vizsgálták, kis funkcionális hatások is vezethetnek eltérő klinikai eredményhez. Fontos azonban megemlíteni, hogy a humán pankreászban a különböző haplotípusok eltérő mRNS szinteket eredményezhetnek, melyek befolyásolhatják a toxikus fehérjetermékek szintjét [27]. A vad típusú *CEL*-ben a p.488-as pozícióban Ile található, míg a két patogén *CEL-HYBI* haplotípus itt Thr-t tartalmaz. Ennek kapcsán megvizsgáltuk a p.Ile488Thr jelenlétét a kohorszunkban, amely ritka volt (0,3%) és egyenlően oszlott el KP betegek és kontrollok között. Ez arra utal, hogy a Thr488 kizárólag a *CEL-HYBI* kontextusában válik patogénné.

VI. KONKLÚZIÓK

Ezen munka első felében egy eset-kontroll vizsgálat segítségével igazoltuk, hogy a c.180C>T *CTRC* variáns mind az AKP mind az NAKP rizikóját fokozza. Ezután metaanalízis segítségével meghatároztuk a c.180C>T variáns globális frekvenciáját és a rizikófokozódás mértékét KP esetén. A c.180CC genotípushoz képest a homozigóta c.180TT genotípus körülbelül ötszörös rizikófokozódást eredményez (OR=5,29; 95% CI 2,63-10,64), míg ez a heterozigóta c.180CT genotípus esetén kétszeres (OR=1,94; 95% CI 1,57-2,38). Az analízisünket európai etnikumú kohorszokra szűkítve az esélyhányadosok a homozigóta c.180TT forma esetén háromszoros (OR=3,31; 95% CI 1,92-5,71), míg a heterozigóta c.180CT forma esetén másfélszeresek voltak (1.65; 95% CI 1.38-1.98). Végül előzetes bizonyítékot szolgáltatottunk arra vonatkozóan, hogy a minor c.180T allél expressziója a gyakoribb c.180C-hez képest csökkent. A tézis második felében megállapítottuk, hogy a Thr488-Thr548 *CEL-HYBI* haplotípus 3,6-szorosra emeli a KP rizikóját magyar populációban (OR=3,6; 95% CI 1,2-10,7), bebizonyítva a haplotípus patogén mivoltát. Az elérhető *CEL-HYBI* pozitív európai mintákat megvizsgálva azt találtuk, hogy míg a Thr488-Thr548 haplotípus Európában elterjedt, addig a Thr488-Ile548 haplotípus regionálisan behatároltan fordul elő, hatása azonban jelentősen erősebb. A magyar kohorszot a *CEL* p.Ile488Thr variánsra analizálva azt találtuk, hogy ez a variáns ritka és nem asszociál KP-val (OR 1, 95% CI 0,1-11), így valószínűsíthető, hogy nem ez a variáns áll a *CEL-HYBI* allél patogenicitásának hátterében.

Következtetésképp elmondhatjuk, hogy mind a *CTRC* c.180C>T (p.Gly60=) variáns, mind a *CEL-HYBI* hibrid allél bizonyított rizikófaktora a krónikus pankreatitisznek, és amikor etiológia megállapítása céljából genetikai vizsgálat történik mindenképp része kell legyenek a vizsgált eltéréseknek.

VII. REFERENCIÁK

1. Yadav, D., & Lowenfels, A. B. (2013). The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*, *144*(6), 1252–1261.
2. Takács, T., Czakó, L., Dubravcsik, Z., Farkas, G., Hegyi, P., Hritz, I., Kelemen, D., Lásztity, N., Morvay, Z., Oláh, A., Pap, Á., Párniczky, A., Patai, Á., Sahin-Tóth, M., Szentkereszti, Z., Szmola, R., Tiszlavicz, L., Szűcs, Á., & Magyar Hasnyálmirigy Munkacsoport (2015). Krónikus pancreatitis. A Magyar Hasnyálmirigy Munkacsoport bizonyítékon alapuló kezelési irányelvei [Chronic pancreatitis. Evidence based management guidelines of the Hungarian Pancreatic Study Group]. *Orvosi hetilap*, *156*(7), 262–288.
3. COMFORT, M. W., & STEINBERG, A. G. (1952). Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology*, *21*(1), 54–63.
4. Whitcomb, D. C., Gorry, M. C., Preston, R. A., Furey, W., Sossenheimer, M. J., Ulrich, C. D., Martin, S. P., Gates, L. K., Jr, Amann, S. T., Toskes, P. P., Liddle, R., McGrath, K., Uomo, G., Post, J. C., & Ehrlich, G. D. (1996). Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nature genetics*, *14*(2), 141–145.
5. Mayerle, J., Sandler, M., Hegyi, E., Beyer, G., Lerch, M. M., & Sahin-Tóth, M. (2019). Genetics, Cell Biology, and Pathophysiology of Pancreatitis. *Gastroenterology*, *156*(7), 1951–1968.e1.
6. Hegyi, E., & Sahin-Tóth, M. (2017). Genetic Risk in Chronic Pancreatitis: The Trypsin-Dependent Pathway. *Digestive diseases and sciences*, *62*(7), 1692–1701.
7. Pubols, M. H., Bartelt, D. C., & Greene, L. J. (1974). Trypsin inhibitor from human pancreas and pancreatic juice. *The Journal of biological chemistry*, *249*(7), 2235–2242.
8. Szmola, R., & Sahin-Tóth, M. (2007). Chymotrypsin C (caldecrin) promotes degradation of human cationic trypsin: identity with Rinderknecht's enzyme Y. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(27), 11227–11232.
9. Rosendahl, J., Witt, H., Szmola, R., Bhatia, E., Ozsvári, B., Landt, O., Schulz, H. U., Gress, T. M., Pfützner, R., Löhr, M., Kovacs, P., Blüher, M., Stumvoll, M., Choudhuri, G., Hegyi, P., te Morsche, R. H., Drenth, J. P., Truninger, K., Macek, M., Jr, Puhl, G., ... Sahin-Tóth, M. (2008). Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nature genetics*, *40*(1), 78–82.

10. Masson, E., Chen, J. M., Scotet, V., Le Maréchal, C., & Férec, C. (2008). Association of rare chymotrypsinogen C (CTRC) gene variations in patients with idiopathic chronic pancreatitis. *Human genetics*, *123*(1), 83–91.
11. Derikx, M. H., Szmola, R., te Morsche, R. H., Sunderasan, S., Chacko, A., & Drenth, J. P. (2009). Tropical calcific pancreatitis and its association with CTRC and SPINK1 (p.N34S) variants. *European journal of gastroenterology & hepatology*, *21*(8), 889–894.
12. Paliwal, S., Bhaskar, S., Mani, K. R., Reddy, D. N., Rao, G. V., Singh, S. P., Thomas, V., & Chandak, G. R. (2013). Comprehensive screening of chymotrypsin C (CTRC) gene in tropical calcific pancreatitis identifies novel variants. *Gut*, *62*(11), 1602–1606.
13. Masamune, A., Nakano, E., Kume, K., Kakuta, Y., Ariga, H., & Shimosegawa, T. (2013). Identification of novel missense CTRC variants in Japanese patients with chronic pancreatitis. *Gut*, *62*(4), 653–654.
14. Zou, W. B., Tang, X. Y., Zhou, D. Z., Qian, Y. Y., Hu, L. H., Yu, F. F., Yu, D., Wu, H., Deng, S. J., Lin, J. H., Zhao, A. J., Zhao, Z. H., Wu, H. Y., Zhu, J. H., Qian, W., Wang, L., Xin, L., Wang, M. J., Wang, L. J., Fang, X., ... Liao, Z. (2018). SPINK1, PRSS1, CTRC, and CFTR Genotypes Influence Disease Onset and Clinical Outcomes in Chronic Pancreatitis. *Clinical and translational gastroenterology*, *9*(11), 204.
15. Rosendahl, J., Kirsten, H., Hegyi, E., Kovacs, P., Weiss, F. U., Laumen, H., Lichtner, P., Ruffert, C., Chen, J. M., Masson, E., Beer, S., Zimmer, C., Seltsam, K., Algül, H., Bühler, F., Bruno, M. J., Bugert, P., Burkhardt, R., Cavestro, G. M., Cichoż-Lach, H., ... all members of the PanEuropean Working group on ACP (2018). Genome-wide association study identifies inversion in the *CTRB1-CTRB2* locus to modify risk for alcoholic and non-alcoholic chronic pancreatitis. *Gut*, *67*(10), 1855–1863.
16. LaRusch, J., Lozano-Leon, A., Stello, K., Moore, A., Muddana, V., O'Connell, M., Diergaarde, B., Yadav, D., & Whitcomb, D. C. (2015). The Common Chymotrypsinogen C (CTRC) Variant G60G (C.180T) Increases Risk of Chronic Pancreatitis But Not Recurrent Acute Pancreatitis in a North American Population. *Clinical and translational gastroenterology*, *6*(1), e68.
17. Grabarczyk, A. M., Oracz, G., Wertheim-Tysarowska, K., Kujko, A. A., Wejnarska, K., Kolodziejczyk, E., Bal, J., Koziel, D., Kowalik, A., Gluszek, S., & Rygiel, A. M. (2017). Chymotrypsinogen C Genetic Variants, Including c.180TT, Are Strongly Associated With Chronic Pancreatitis in Pediatric Patients. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, *65*(6), 652–657.

18. Kereszturi, 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*, *30*(4), 575–582.
19. Hetz, C., Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2020). Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *21*(8), 421–438.
20. Sahin-Tóth M. (2017). Genetic risk in chronic pancreatitis: the misfolding-dependent pathway. *Current opinion in gastroenterology*, *33*(5), 390–395.
21. Sándor, M., & Sahin-Tóth, M. (2024). Functional predictors of pathogenicity of missense *CPA1* variants in chronic pancreatitis. *Gut*, *73*(9), 1589–1590.
22. Johansson, B. B., Fjeld, K., El Jellas, K., Gravdal, A., Dalva, M., Tjora, E., Ræder, H., Kulkarni, R. N., Johansson, S., Njølstad, P. R., & Molven, A. (2018). The role of the carboxyl ester lipase (CEL) gene in pancreatic disease. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*, *18*(1), 12–19.
23. Lombardo, D., Guy, O., & Figarella, C. (1978). Purification and characterization of a carboxyl ester hydrolase from human pancreatic juice. *Biochimica et biophysica acta*, *527*(1), 142–149.
24. Reue, K., Zambaux, J., Wong, H., Lee, G., Leete, T. H., Ronk, M., Shively, J. E., Sternby, B., Borgström, B., & Ameis, D. (1991). cDNA cloning of carboxyl ester lipase from human pancreas reveals a unique proline-rich repeat unit. *Journal of lipid research*, *32*(2), 267–276.
25. Raeder, H., Johansson, S., Holm, P. I., Haldorsen, I. S., Mas, E., Sbarra, V., Nerموen, I., Eide, S. A., Grevle, L., Bjørkhaug, L., Sagen, J. V., Aksnes, L., Søvik, O., Lombardo, D., Molven, A., & Njølstad, P. R. (2006). Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *Nature genetics*, *38*(1), 54–62.
26. Fjeld, K., Weiss, F. U., Lasher, D., Rosendahl, J., Chen, J. M., Johansson, B. B., Kirsten, H., Ruffert, C., Masson, E., Steine, S. J., Bugert, P., Cnop, M., Grützmann, R., Mayerle, J., Mössner, J., Ringdal, M., Schulz, H. U., Sandler, M., Simon, P., Sztromwasser, P., ... Molven, A. (2015). A recombined allele of the lipase gene CEL and its pseudogene CELP confers susceptibility to chronic pancreatitis. *Nature genetics*, *47*(5), 518–522.

27. Cassidy, B. M., Zino, S., Fjeld, K., Molven, A., Lowe, M. E., & Xiao, X. (2020). Single nucleotide polymorphisms in CEL-HYB1 increase risk for chronic pancreatitis through proteotoxic misfolding. *Human mutation*, *41*(11), 1967–1978.
28. Zou, W. B., Boulling, A., Masamune, A., Issarapu, P., Masson, E., Wu, H., Sun, X. T., Hu, L. H., Zhou, D. Z., He, L., Fichou, Y., Nakano, E., Hamada, S., Kakuta, Y., Kume, K., Isayama, H., Paliwal, S., Mani, K. R., Bhaskar, S., Cooper, D. N., ... Liao, Z. (2016). No Association Between CEL-HYB Hybrid Allele and Chronic Pancreatitis in Asian Populations. *Gastroenterology*, *150*(7), 1558–1560.e5.
29. Molven, A., Fjeld, K., & Lowe, M. E. (2016). Lipase Genetic Variants in Chronic Pancreatitis: When the End Is Wrong, All's Not Well. *Gastroenterology*, *150*(7), 1515–1518.
30. Oracz, G., Kujko, A. A., Fjeld, K., Wertheim-Tysarowska, K., Adamus-Białek, W., Steine, S. J., Koziel, D., Gluszek, S., Molven, A., & Rygiel, A. M. (2019). The hybrid allele 1 of carboxyl-ester lipase (CEL-HYB1) in Polish pediatric patients with chronic pancreatitis. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*, *19*(4), 531–534.
31. Hegyi E. (2019). Carboxyl ester lipase (CEL) hybrid genes and chronic pancreatitis. The saga continues. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*, *19*(4), 479–480.
32. Schmidt, A. W., Kühnapfel, A., Kirsten, H., Grallert, H., Hellerbrand, C., Kiefer, F., Mann, K., Mueller, S., Nöthen, M. M., Peters, A., Ridinger, M., Frank, J., Rietschel, M., Soranzo, N., Soyka, M., Wodarz, N., Malerba, G., Gambaro, G., Gieger, C., Scholz, M., ... Rosendahl, J. (2022). Colocalization analysis of pancreas eQTLs with risk loci from alcoholic and novel non-alcoholic chronic pancreatitis GWAS suggests potential disease causing mechanisms. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*, *22*(4), 449–456.
33. Tremblay, K., Dubois-Bouchard, C., Brisson, D., & Gaudet, D. (2014). Association of CTRC and SPINK1 gene variants with recurrent hospitalizations for pancreatitis or acute abdominal pain in lipoprotein lipase deficiency. *Frontiers in genetics*, *5*, 90.
34. Wahlund S. Zusammensetzung von population und korrelationserscheinung vom standpunkt der vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* 1928, 11:65–106.
35. Kawamoto, M., Yoshida, T., Tamura, K., Dbouk, M., Canto, M. I., Burkhart, R., He, J., Roberts, N. J., Klein, A. P., & Goggins, M. (2022). Endoplasmic stress-inducing variants in carboxyl ester lipase and pancreatic cancer risk. *Pancreatology : official*

journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.], 22(7), 959–964.

36. Takáts, A., Berke, G., Gede, N., Németh, B. C., Witt, H., Gluszek, S., Rygiel, A. M., Hegyi, P., Sahin-Tóth, M., & Hegyi, E. (2022). Risk of chronic pancreatitis in carriers of loss-of-function CTRC variants: A meta-analysis. *PLoS one*, 17(5), e0268859.
37. Tjora, E., Gravdal, A., Engjom, T., Cnop, M., Johansson, B. B., Dimcevski, G. G., Molven, A., & Fjeld, K. (2021). Protein misfolding in combination with other risk factors in CEL-HYB1-mediated chronic pancreatitis. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 33(6), 839–843.

VIII. PUBLIKÁCIÓS LISTA

VIII/1. A PhD tézishez szorosan kapcsolódó közlemények

Berke, G., Beer, S., Gede, N., Takáts, A., Szentesi, A., Hegyi, P., Rosendahl, J., Sahin-Tóth, M., Németh, B. C., & Hegyi, E. (2023). Risk of chronic pancreatitis in carriers of the c.180C>T (p.Gly60=) CTRC variant: case-control studies and meta-analysis. *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*, 23(5), 481–490.
<https://doi.org/10.1016/j.pan.2023.05.013>

IF = 2.8 Q1

Berke, G., Sándor, M., Xiao, X. K., Lowe, M. E., Ewers, M., Eróss, B., Masson, E., Németh, B. C., Vincze, Á., Czakó, L., Rygiel, A. M., Rosendahl, J., Chen, J. M., Witt, H., Hegyi, P., Sahin-Tóth, M., & Hegyi, E. (2024). Carboxyl ester lipase hybrid 1 (CEL-HYB1) haplotypes confer varying risk for chronic pancreatitis. *Scientific reports*, 14(1), 30965. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-82077-4>

IF = 3.8 Q1

VIII/2. A PhD tézis témájához kapcsolódó közlemények

Berke, G., & Sahin-Tóth, M. (2024). Intron-mediated enhancement of SPINK1 expression for pancreatitis therapy. *Gut*, 74(1), e9. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2024-332818>

IF = 23.1 Q1

Stefanovics, R., Sándor, M., Demcsák, A., **Berke, G.**, Németh, B. C., Zhang, W., Abu-El-Haija, M., & Sahin-Tóth, M. (2024). Novel chymotrypsin C (CTRC) variants from real-world genetic testing of pediatric chronic pancreatitis cases. *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*, 24(5), 690–697. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2024.06.003>

IF = 2.8 Q1

Berke, G., Gede, N., Szadai, L., Ocskay, K., Hegyi, P., Sahin-Tóth, M., & Hegyi, E. (2022). Bicarbonate defective CFTR variants increase risk for chronic pancreatitis: A meta-analysis. *PloS one*, 17(10), e0276397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276397>

IF = 3.8 Q1

Takáts, A., **Berke, G.**, Gede, N., Németh, B. C., Witt, H., Gluszek, S., Rygiel, A. M., Hegyi, P., Sahin-Tóth, M., & Hegyi, E. (2022). Risk of chronic pancreatitis in carriers of loss-of-function CTRC variants: A meta-analysis. *PloS one*, 17(5), e0268859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268859>

IF = 3.8 Q1

Takáts, A., **Berke, G.**, Szentesi, A., Farkas, G., Jr, Izbéki, F., Eröss, B., Czakó, L., Vincze, Á., Hegyi, P., Sahin-Tóth, M., & Hegyi, E. (2021). Common calcium-sensing receptor (CASR) gene variants do not modify risk for chronic pancreatitis in a Hungarian cohort. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*, 21(7), 1305–1310. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2021.08.012>

IF = 3.8 Q1

VIII/3. A PhD tézis témájához nem kapcsolódó közlemények

Sindler, D. L., Mátrai, P., Szakó, L., Berki, D., **Berke, G.**, Csontos, A., Papp, C., Hegyi, P., & Papp, A. (2023). Faster recovery and bowel movement after early oral feeding compared to late oral feeding after upper GI tumor resections: a meta-analysis. *Frontiers in surgery*, *10*, 1092303. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2023.1092303>

IF = 1.6 Q2

Csontos, A., Németh, D., Szakó, L., **Berke, G.**, Sindler, D. L., Berki, D., Papp, C., Hegyi, P., Vereczkei, A., & Papp, A. (2024). Intraoperative pyloric drainage is unnecessary during esophagectomies: a meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials. *Pathology oncology research : POR*, *30*, 1611823. <https://doi.org/10.3389/pore.2024.1611823>

IF = 2.2 Q2

A PhD téziszhez szorosan kapcsolódó közlemények impakt faktora: 6,6

Összesített impakt faktor: 47,7

IX. KONGRESSZUSI ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK JEGYZÉKE

APA/JPS/CAP/IAP 2024 Meeting, 2024, Lahaina, HI, US

Berke G, Sahin-Tóth M: Intron-mediated enhancement of SPINK1 expression for pancreatitis therapy – poster presentation

55th Meeting of the European Pancreatic Club, 2023, Alpbach, Austria

Berke G, Hegyi E, et al.: CEL-HYB1 haplotypes confer varying risk for chronic pancreatitis – poster presentation

Third Scandinavian Baltic Pancreas Symposium, 2023, Stockholm, Sweden

Berke G, Hegyi E, et al.: CEL-HYB1 haplotypes confer varying risk for chronic pancreatitis – poster presentation

United European Gastroenterology Week 2022, Vienna, Austria

Berke G, Hegyi E, et al.: The hybrid allele 1 of carboxyl-ester lipase (CEL-HYB1) elevates the risk of chronic pancreatitis in Hungary: a case-control study - oral presentation

54th Meeting of the European Pancreatic Club, 2022, Kyiv, Ukraine

Berke G, Hegyi E, et al.: The hybrid allele 1 of carboxyl-ester lipase (CEL-HYB1) elevates the risk of chronic pancreatitis in Hungary: a case-control study - poster presentation

64th Annual Meeting of the Hungarian Society of Gastroenterology, 2022, Siófok, Hungary

Berke G, Hegyi E, et al.: The hybrid allele 1 of carboxyl-ester lipase (CEL-HYB1) elevates the risk of chronic pancreatitis in Hungary: a case-control study - oral presentation

10th Conference of the Hungarian Pancreatic Study Group, 2022, Vecsés, Hungary

Berke G, Hegyi E, et al.: Risk of chronic pancreatitis in carriers of loss-of-function CTFR variants: A meta-analysis – oral presentation

United European Gastroenterology Virtual Week 2021

Berke G, Hegyi E, et al.: Bicarbonate defective CFTR variants in chronic pancreatitis: A meta analysis - poster presentation

53rd Meeting of the European Pancreatic Club, 2021, Verona, Italy

Berke G, Hegyi E, et al.: Bicarbonate defective CFTR variants in chronic pancreatitis: A meta analysis - oral and poster presentation

63rd Annual Meeting of the Hungarian Society of Gastroenterology, 2021, Siófok, Hungary

Berke G, Hegyi E, et al.: Bicarbonate defective CFTR variants in chronic pancreatitis: A meta analysis - poster presentation

9th Virtual Conference of the Hungarian Pancreatic Study Group, 2020, Hungary

Berke G, Hegyi E, et al.: Clinical significance of bicarbonate defective CFTR variants in pancreatitis – oral presentation

X. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném kifejezni legmélyebb hálámat a témavezetőmnek, **Hegyi Eszternek**, akinek felbecsülhetetlen értékű útmutatása, rendíthetetlen támogatása és megfontolt tanácsai alapvető szerepet játszottak mind a TDK-s, mind a doktori utam során. Bátorítása, szakértelme és a french press-je egyaránt hozzájárultak a kutatásomhoz és tudományos fejlődésemhez, ezért őszinte köszönettel tartozom.

Hálás köszönettel tartozom továbbá **Sahin-Tóth Miklós** professzor úrnak az iránymutatásáért és átgondolt meglátásaiért, amelyek nagymértékben gazdagították a munkámat. Tudása és mentori szerepe inspirációt nyújtott, és jelentősen hozzájárult a dolgozat kialakításához.

Külön szeretném megköszönni mindazoknak, akik **a doktori képzésem során különböző projektekben együttműködtek velem**. Elkötelezettségük és hozzájárulásuk kulcsszerepet játszott a kutatás előrehaladásában.

Végül hálás vagyok a **Transzlációs Medicina Intézetnek**, amiért befogadtak, és biztosították a doktori tanulmányaimhoz szükséges erőforrásokat és támogatást. Kiváltság volt ilyen ösztönző és együttműködő közegben dolgozni, és hálás vagyok azokért a barátságokért és szakmai kapcsolatokért, amelyek ez idő alatt szövődtek.

Ez a munka nem jöhetett volna létre a fent említettek közös erőfeszítései nélkül, és szívből köszönöm mindannyiuk támogatását.