

GENETIKAI VIZSGÁLATOK KRÓNIKUS HASNYÁLMIRIGY-GYULLADÁSBAN: KOHORSZ- ÉS METAANALÍZIS

Doktori értekezés



Csurka-Takáts Amanda

Gyógyszertudomány Doktori Iskola

A doktori iskola vezetője: Dr. Pintér Erika

Témavezető: **Dr. Hegyi Eszter**

Transzlációs Medicina Intézet

Általános Orvostudományi Kar

Pécsi Tudományegyetem, Pécs, Magyarország

Pécs, 2025

1. Bevezetés

1.1. A krónikus hasnyálmirigy-gyulladás genetikája

A krónikus hasnyálmirigy-gyulladás (CP) a hasnyálmirigy visszafordíthatatlan gyulladással járó betegsége, amelyet fibrózis és az exokrin és endokrin szövetek elvesztése jellemez [Kleeff et al. 2017]. A fájdalom, az emésztési zavarok és a testsúlycsökkenés a CP fő tünetei, amelyek jelentősen rontják az életminőséget és a várható élettartamot. A betegség világszerte körülbelül 50/100 000 embert érint, és a férfiaknál gyakoribb, mint a nőknél. A krónikus hasnyálmirigy-gyulladáshoz vezető kóroki mechanizmus összetett, a környezeti kockázati tényezők, mint például az alkoholfogyasztás vagy a dohányzás, és a genetikai kockázati tényezők együttesen járulnak hozzá a betegség kialakulásához [Gupte et al. 2018]. Az akut pancreatitis (AP), a rekurrens AP (RAP) és a CP egy betegségspektrumot alkotnak [Yadav és Lowenfels, 2013]. Az AP RAP-ba, majd végül CP-be való átalakulását gyakran krónikus alkoholfogyasztás vagy genetikai kockázati tényezők okozzák. A RAP és a CP genetikai kockázata átfed egymással, míg az AP genetikai vizsgálatának eredménye nehezen értelmezhető ebben a kontextusban, mivel a RAP és a CP esetek kizárásához szükséges utánkövetés sokszor nem megfelelő [Mayerle et al. 2019].

Az örökletes hasnyálmirigy-gyulladás (HP) egy ritka, autoszomális domináns genetikai rendellenesség, amelyet először 1952-ben írtak le [Comfort és Steinberg 1952], azonban az ezt okozó génmutációt a humán kationos tripszinogént kódoló szerin proteáz 1 (*PRSSI*) génben csak négy évtizeddel később fedezték fel [Whitcomb et al. 1996]. Ez a felfedezés rávilágított a tripszin fontosságára a CP patogenezisében. Az elmúlt 20 évben több genetikai asszociációs tanulmány azonosított több különböző génmutációt, amelyek hozzájárulnak a betegség kialakulásához. A legfontosabb érintett gének a szerin proteáz inhibitor Kazal-típus 1 (*SPINK1*), a kimotripszin C (*CTRC*), a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor

(*CFTR*), a karboxipeptidáz A1 (*CPA1*) és a karboxil-észter lipáz (*CEL*) [Mayerle et al. 2019]. Funkcionális vizsgálatok alapján ezeknek a fehérjekódoló géneknek a változásait három különböző patológiás útvonalba sorolták, amelyek a betegség kialakulásához és előrehaladásához vezetnek [Hegyi és Sahin-Tóth 2018, Sahin-Tóth 2017, Mayerle et al. 2019]. A tripszin-dependens útvonalban a tripszinogén korai, hasnyálmirigyen belüli tripszinné aktiválása játszik kulcsfontosságú patogén szerepet; a misfolding-dependens útvonalban az emésztőenzimek helytelen feltekerődése (misfolding) endoplazmatikus retikulum stresszhez vezet; a duktális útvonalban a részt vevő *CFTR*, claudin-2 (*CLDN2*), a tranziens receptor potenciál vanilloid alcsalád 6. tagja (*TRPV6*) és valószínűsíthetően a kalcium-érzékelő receptor (*CASR*) variánsai hozzájárulnak a hasnyálmirigynedv szekréciójának zavarához [Hegyi és Sahin-Tóth 2018, Sahin-Tóth 2017, Mayerle et al. 2019]. A CP genetikai kockázati tényezőinek azonosításában elért jelentős előrelépés ellenére a kutatók számos esetben nem találtak genetikai variánsokat az ismert rizikogénekben. Ezért elkerülhetetlenül felmerül a gondolat, hogy más, korábban nem detektált génváltozások is hatással lehetnek a CP patomechanizmusára.

1.2. A kalcium-érzékelő receptor (*CASR*) szerepe a krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban

A kalcium-érzékelő receptor egy C családba tartozó G-fehérjéhez kapcsolt receptor. Nagymértékben expresszálódik a mellékpajzsmirigyekben, és érzékeli az extracelluláris Ca^{2+} koncentráció csökkenését, ami a paratiroid hormon (PTH) felszabadulásához vezet. A *CASR* szabályozza a csont- és ásványianyag-anyagcserét, valamint a vizelettel történő Ca^{2+} kiválasztást a paratiroid hormon szekréciójának befolyásolásával. A PTH elősegíti a D-vitamin fiziológiásan aktív formájának előállítását is. A *CASR* mutációk hiperkalcémia rendellenességeket, mint például a familiáris hipokalciuriás hiperkalcémia (FHH), a neonatális

súlyos hiperparatireózis (NSHPT), az elsődleges hiperparatireózis (PHPT), vagy hipokalcémia rendellenességeket okozhatnak, mint például az autoszomális domináns hipokalcémia (ADH) [Hannan et al. 2018].

A szérum kalciumszint emelkedése aktiválja a receptort, ami intracelluláris jelátvitelt indít el, gátolva a paratiroid hormon szekrécióját és a kalcium reszorpcióját. A szérum kalciumszint csökkenése feloldja ezeket a gátlásokat, ami emelkedett PTH-szekréciót és fokozott kalciumreszorpciót eredményez a vesékben. A mellékpajzsmirigyekben történő PTH-szabályozáshoz hasonlóan a *CASR* expressziója az emlőepitéliumban negatívan szabályozza a PTH-kapcsolódó peptid szekrécióját, amely a tejtermeléshez kalciumot mobilizálhat a csontokból. A *CASR* heterozigóta inaktíváló mutációi FHH-t, egy autoszomális domináns rendellenességet okozhatnak, amelyet a szérum kalciumszint emelkedése és a vizeletben kiválasztott kalcium mennyiségének csökkenése jellemez [Hannan et al. 2018, Lee és Shoback 2018]. A *CASR* mutációk újszülöttkori súlyos hyperparathyreoidizmust is kiválthatnak, jellemzően recesszív rendellenességként. Ezzel szemben a *CASR* mutációk ritkán fordulnak elő felnőttkori hyperparathyreoidizmusban. A parathyroid adenomákban a *CASR* csökkent expressziója valószínűleg magyarázza a betegségben megfigyelt fokozott PTH szekréciót és hiperkalcémiát. Végül, a *CASR* aktiváló mutációi autoszomális domináns hipokalcémiával társulnak [Hannan et al. 2018].

A *CASR* az emberi hasnyálmirigy-vezeték sejtjeiben is expresszálódik, ahol monitorozza és szabályozza a hasnyálmirigynedv Ca^{2+} koncentrációját. Magas Ca^{2+} koncentráció esetén a *CASR* a csatornák elektrolit és folyadék szekrécióját indítja el, ezáltal elősegítheti a hasnyálmirigy-vezetékben a kőképződés megelőzését. Ezért a *CASR* mutációi a hasnyálmirigy-gyulladás lehetséges kockázati tényezői [Rác et al. 2018].

1.2.1. *CASR* genetikai asszociációs vizsgálatok a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás esetében

Az elmúlt években a *CASR* mutációk szerepe a CP kialakulásában egyre inkább előtérbe került, több kutatócsoport is vizsgálta ezt a kérdést. Muddana és munkatársai elemezték a *CASR* mutációkat az amerikai populációban, és megállapították, hogy a p.R990G polimorfizmus összefüggésbe hozható a CP-vel. Ezenkívül a *CASR* p.R990G polimorfizmussal rendelkező alanyoknál a CP kockázata moderált vagy súlyos alkoholfogyasztás esetén megnövekedett [Muddana és munkatársai, 2008]. Az amerikai tanulmánytól eltérően egy francia kohorszban Masson és munkatársai nem azonosították a *CASR* p.R990G-t a hasnyálmirigy-gyulladás kockázati tényezőjeként, de megállapították, hogy egy másik *CASR* polimorfizmus, a p.A986S összefüggésbe hozható a betegséggel, de csak homozigóta formában [Masson és munkatársai 2015]. Sofia et al. új generációs szekvenálás (NGS) segítségével vizsgálták olasz populációban, és csak két ritka variánst tudtak azonosítani [Sofia et al. 2016]. Összefoglalva mindössze három eset-kontroll tanulmány vizsgálta a *CASR* mutációkat a CP-ben, és eredményeik ellentmondásosak, így a *CASR* variánsok szerepe a CP patogenezisében továbbra is vitatott.

1.3. A kimotripszin C (*CTRC*) szerepe a krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban

A CP gyakran genetikai hajlam hátterében alakul ki [Kleeff et al. 2017]. Számos hajlamosító gént azonosítottak, és ezek közül sok esetben kimutatták, hogy befolyásolják az emésztő proteáz prekursor tripszinogén aktiválódását az aktív formájává, a tripszinné [Hegyi és Sahin-Tóth 2017]. A tripszinogén patológiás, intrapancreátikus aktiválódása autoaktiváció révén történhet, amely reakció során a tripszin aktiválja a tripszinogént. A hasnyálmirigy a tripszinogén autoaktivációja és a tripszin aktivitása ellen védő védekező mechanizmusok közé tartozik a szerin proteáz inhibitor Kazal-típus 1 (*SPINK1*) és a kimotripszin C (*CTRC*) szerepe.

Ezek a fehérjék könnyen lebontják a tripszinogént, és ezáltal gátolják annak aktiválódását [Hegyi és Sahin-Tóth 2017, Witt et al. 2000, Rosendahl et al. 2008]. A humán kationos tripszinogént kódoló szerin proteáz 1 (*PRSSI*) gén funkcionővekedéssel járó mutációi, valamint a *SPINK1* és *CTRC* gének funkciót csökkentő mutációi stimulálják a tripszinogén autoaktivációját és növelik a CP kockázatát [Hegyi és Sahin-Tóth 2017]. A leggyakoribb *PRSSI* mutációk az autoaktivációt a *CTRC*-függő tripszinogén lebontásának blokkolásával stimulálják [Hegyi és Sahin-Tóth 2017, Szabó és Sahin-Tóth 2012]. A genetikai változások ugyanakkor védő szerepet is betölthetnek, mint például a humán anionos tripszinogént kódoló *PRSS2* gén p.G191R variánsa [Witt et al. 2006]. Ez a variáns az anionos tripszinogén autodegradációját okozza, és ezáltal csökkenti a CP kockázatát. Hasonlóképpen, a kimotripszin B1-B2 (*CTRB1-CTRB2*) lokuszban előforduló gyakori inverzió növeli a *CTRB2* expresszióját, ami az anionos tripszinogén hatékonyabb lebontásához és a CP kockázatának csökkenéséhez vezet [Rosendahl et al. 2018].

A *CTRC*-t 2008-ban azonosították hasnyálmirigy-gyulladás rizikógénként [Szabó és Sahin-Tóth 2012, Masson 2008], és a kutatások máig számos misszensz mutációt és mikrodeléciót írtak le CP-s betegekben [Derikx et al. 2009, Paliwal et al. 2012, Masamune et al. 2012, Schubert et al. 2014, LaRusch et al. 2015, Koziel et al. 2015, Sofia et al. 2016, da Costa et al. 2016, Grabarczyk et al. 2017, Phillips et al. 2018, Zou et al. 2018, Cichoż-Lach et al. 2019, lásd még www.pancreasgenetics.org]. Ezeknek a variánsoknak a többsége csak néhány esetben volt kimutatható, és csak négy variánsnál találtak statisztikailag szignifikáns összefüggést a CP-vel: a c.738_761del24 (p.K247_R254del) és a c.760C>T (p.R254W) variánsokat elsősorban európai kohorszokban találták, körülbelül 1-2%-os hordozói gyakorisággal, míg a c.217G>A (p.A73T) és c.703G>A (p.V235I) variánsokat indiai kohorszokban mutatták ki, 1-5%-os hordozói gyakorisággal. Az esélyhányados (OR) értékek alapján ítélve, ezeknek a *CTRC* variánsoknak a hatásnagysága változó volt, többnyire 3-10-szeres tartományban, azonban

hatástalanságot és 19-es OR-értéket is leírtak. Funkcionális vizsgálatok kimutatták, hogy ez a négy variáns különböző mechanizmusok révén okozta a CTRC funkcióvesztését, ideértve a sejtekből történő szekréció csökkenését, a katalitikus aktivitás csökkenését és a tripszin általi lebontás iránti fokozott érzékenységet [Rosendahl et al. 2008, Beer et al. 2012, Szmola és Sahin-Tóth 2010]. Továbbá kimutatták, hogy a p.A73T variáns endoplazmatikus retikulum (ER) stresszt indukál [Beer et al. 2012, Szmola és Sahin-Tóth 2009]. Hasonló funkcionális rendellenességeket figyeltek meg számos ritka *CTRC* variáns esetében [Rosendahl et al. 2008, Beer et al. 2012, Szmola és Sahin-Tóth 2009, Szabó et al. 2015].

Az alacsony gyakoriságú misszensz és mikrodélciós variánsok mellett egy gyakori haplotípus (kb. 30% hordozói gyakoriság CP-esetekben), amelyet az exon 3-ban található c.180C>T (p.G60=) variáns és az intron 5-ben található c.493+52G>A variáns alkotnak, körülbelül kétszeresére növeli a CP kockázatát heterozigóta formában, és akár tízszeresére is homozigóta hordozókban [Rosendahl et al. 2018, Masson et al. 2008, Derikx et al. 2009, Paliwal et al. 2012, Masamune et al. 2012, LaRusch et al. 2015, Grabarczyk et al. 2017]. Legutóbbi metaanalízisünkben bizonyítottuk, hogy a funkcióvesztéssel járó heterozigóta misszensz *CTRC* variánsok átlagosan körülbelül ötszörösére növelték a CP kockázatát [Berke et al. 2023]. A funkcionális hatás és a haplotípuson belüli betegségeleváns variáns továbbra is tisztázatlan; azonban felvetődött a hipotézis, hogy a *CTRC* expresszió csökkenése valószínűleg a pre-mRNS splicing megváltozása miatt következik be [Hegyí és Sahin-Tóth 2017, Berke et al. 2023]. Az alacsony frekvenciájú misszensz és mikrodélciós *CTRC* variánsokkal ellentétben a p.G60= haplotípus variánsok nem változtatják meg a *CTRC* aminosav-szekvenciáját, és nem okozhatnak enzimaktivitás-változásokat a többi variánsra leírt mechanizmusok egyikével sem.

2. Célkitűzés

1. cél: *A CASR polimorfizmusok szerepének vizsgálata krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban.*

Mivel a CASR polimorfizmusok szerepe a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásában vitatott volt, elhatároztuk, hogy egyértelművé tesszük a gyakori CASR variánsok és a CP közötti összefüggést egy etnikailag homogén magyar CP kohorsz elemzésével, Sanger-szekvenálás és TaqMan genotipizálás segítségével.

2. cél: *A misszensz CTRC variánsok szerepének vizsgálata krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban.*

Annak érdekében, hogy értékeljük azon CTRC variánsok kockázati hatását, amelyek (i) megváltoztatják a CTRC aminosav-szekvenciáját, (ii) viszonylag gyakoriak (>1% hordozói gyakoriság CP-esetekben), (iii) legalább két független kohorszban reprodukálható összefüggést mutattak a CP-vel, és (iv) kísérletileg bizonyítottan a CTRC funkciójának elvesztését okozzák, szisztematikus, átfogó metaanalízist végeztünk.

3. Anyag és módszer

3.1. A CASR polimorfizmusok szerepének vizsgálata a krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban

3.1.1. Nómenklatúra

A nukleotidok számozása a kódoló DNS számozását tükrözi, az ATG transzlációs iniciációs kodon első nukleotidját +1-nek jelölve a CASR referenciaszekvenciában (genomiális referencia: NC_000003.12, Homo sapiens 3. kromoszóma, GRCh38.p13 elsődleges összeállítás; mRNS referencia: NM_000388.4). Az aminosavak számozása a CASR elsődleges transzlációs termékének iniciátor metioninjával kezdődik.

3.1.2. A vizsgált alanyok

A névtelenített genomikus DNS-mintákat az Országos Pankréász Regiszterből szereztük be (etikai jóváhagyás: TUKEB 22254-1/2012/EKU, biobanki jóváhagyás: IF702-19/2012). A

vizsgálati alanyokat 2012 és 2018 között 11 magyar vizsgálati központból vontuk be, és mindannyian a Helsinki Nyilatkozat etikai irányelveinek megfelelően adták beleegyezésüket. A direkt DNS-szekvenálással elemzett feltáró kohorsz 261 CP-s betegből (106 nem-alkoholos és 155 alkoholos beteg) és 224 kontrollból állt. A TaqMan SNP genotipizálással elemzett kibővített vizsgálati kohorsz további 76 CP-s beteget (36 nem-alkoholos és 40 alkoholos beteg) és 616 kontrollt tartalmazott. Összesen 337 egymástól független CP-s beteg (átlagos életkor a toborzáskor $56,4 \pm 12$ év), köztük 142 nem alkoholos CP-s és 195 alkoholos CP-s beteg, valamint 840 kontrollszemély (átlagos életkor a toborzáskor $39,3 \pm 14,6$ év) vett részt a vizsgálatban, akik nem szenvedtek hasnyálmirigy-betegségben. A CP diagnózisa a CP-re jellemző visszatérő akut hasnyálmirigy-gyulladás vagy visszatérő hasi fájdalom előzményein és/vagy a CP-vel összeegyeztethető kóros képalkotó vizsgálati eredményeken, például hasnyálmirigy-meszesedésen, vezeték-táguláson vagy vezeték-rendellenességeken alapult, exokrin hasnyálmirigy-elégtelenséggel vagy cukorbetegséggel együtt, vagy ezek nélkül.

3.1.3. DNS szekvenálás

Az exon 7-et a szomszédos intron 6 és 3' UTR régiókkal együtt 3 primerpár segítségével amplifikáltuk. A polimeráz láncreakciót (PCR) 0,5 U HotStarTaq DNS-polimeráz (Qiagen), 0,2 mM dNTP, 0,5 μ M primerek, 10x PCR puffer (Qiagen) és 10–50 ng genomikus DNS-minta felhasználásával végeztük 25 μ L térfogatban. A reakció 15 perces kezdeti hőaktiválással indult 95 °C-on, amelyet 35 ciklus követett 30 másodperces denaturálással 94 °C-on, 30 másodperces annealinggel 61,1 °C-on (amplikon 1 és 2) vagy 53,2 °C-on (amplikon 3), és 40 másodperces (amplikon 1 és 2) vagy 50 másodperces (amplikon 3) elongáció 72 °C-on; végül 5 perces végső elongáció 72 °C-on. A PCR-termékeket 2%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A PCR-amplikonokat (5 μ L) 1 μ L FastAP hőérzékeny lúgos foszfáttal és 0,5 μ L exonukleáz I-vel (Thermo Fisher Scientific) kezeltük 15 percig 37 °C-on, majd a reakciót a minták 85 °C-ra történő 15 perces melegítésével állítottuk le. A Sanger-szekvenálást a forward (amplikon 1

és 3) és a reverz (amplikon 2) PCR-primerek szekvenálási primerekként történő felhasználásával végeztük.

3.1.4. TaqMan SNP genotipizálás

TaqMan SNP genotipizáló próbákat alkalmaztunk a p.A986S és p.R990G *CASR* variánsok vizsgálatára a kibővített vizsgálati kohorszban (teszt azonosító: *CASR* rs1801725_7504853_20 és *CASR* rs1042636_7504854_20) egy StepOne Real-Time PCR rendszer (Applied Biosystems by Life Technologies) segítségével. A 20 µL-es reakció TaqPath ProAmp Master Mix (2x), TaqMan SNP genotipizáló próba (20x) és 10-20 ng genomikus DNS-mintából állt. A ciklus feltételei a következők voltak: 30 másodperces tartási szakasz 60 °C-on, majd 10 perces tartási szakasz 95 °C-on; 50 ciklus 15 másodperces denaturálás 92 °C-on és 1 perc annealing 60 °C-on; és végül 30 másodperces tartási szakasz 60 °C-on. Az allélikus diszkriminációs grafikonokat a StepOne szoftver segítségével értékeltük. Az eredmények megerősítésére az összes homozigóta mintát és 4-6 heterozigóta, illetve vad típusú mintát szekvenáltunk minden lemezről.

3.1.5. Statisztikai elemzés

Az esetek és a kontrollok közötti allélgyakoriságok és a genotípuseloszlások közötti különbségek szignifikanciáját Fisher's exact próba segítségével, a GraphPad Prism9 szoftverrel értékeltük. A $p < 0,05$ értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

3.2. A misszensz *CTRC* variánsok szerepének vizsgálata a krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban

3.2.1. Protokoll regisztráció

A jelen munka a szisztematikus review-k és metaanalízisek preferált jelentési elemeiről szóló irányelvnek (PRISMA) [Moher et al. 2009] megfelelően készült. A metaanalízis protokollját előzetesen regisztráltuk a PROSPERO adatbázisban, a CRD42018111537 regisztrációs szám

alatt.

3.2.2. Keresési stratégia

2022. április 5-én három adatbázisban (MEDLINE a PubMed Centralon keresztül, Embase és Cochrane Central Register of Controlled Trials) végeztünk szisztematikus keresést a következő keresési kulcsszavakkal: pancreatitis AND (CTRC OR „Chymotrypsin C” OR Caldecrin OR „Elastase 4” OR ELA4 OR CLCR) AND (polymorphism OR polymorphisms OR variant OR variants OR mutation OR mutations) OR „p.A73T” OR „p.V235I” OR „p.K247_R254del” OR „p.R254W”. Szűrőket nem alkalmaztunk. Kiegészítő adatforrásként a genetikai kockázati tényezőket tartalmazó www.pancreasgenetics.org adatbázist használtuk.

3.2.3. A tanulmányok kiválasztása és az adatok kinyerése

A következő alacsony gyakoriságú *CTRC* variánsokat vizsgáló genetikai asszociációs eset-kontroll tanulmányokat vettük figyelembe: p.A73T, p.V235I, p.K247_254del és p.R254W. A kezdeti keresés során azonosított cikkeket egy hivatkozáskezelő programba importáltuk (EndNoteX7.4; Clarivate Analytics, Philadelphia, PA). Az adatbázisok közötti átfedések és a duplikált referenciák eltávolítása után a fennmaradó találatokat két szerző függetlenül átvizsgálta a cím, az absztrakt és a teljes szöveg alapján. Az eltéréseket a levelező szerző orvosolta. A megfelelő eredeti tanulmányok adatait egy előre meghatározott Excel táblázatba gyűjtöttük. A következő adatokat vontuk ki: első szerző, publikálás éve, alapvető demográfiai adatok (etnikai hovatartozás, életkor), a hasnyálmirigy-gyulladás típusa, az esetek és kontrollok száma, a tanulmányban elemzett *CTRC*-variánsok hordozói frekvenciája, valamint a genetikai szűrés módszere. A tanulmányok vizsgált populációja közötti átfedés gyanúja esetén a végső elemzésbe a legtöbb résztvevővel rendelkező tanulmányokat vontuk be. A nulla eseményt tartalmazó tanulmányokat kizártuk a statisztikai elemzésből.

3.2.4. Minőségellenőrzés

A bevont eset-kontroll tanulmányok minőségének értékeléséhez a Newcastle-Ottawa Skála (NOS) módosított változatát használtuk [Lo et al, 2014].

3.2.5. Statisztikai elemzés

A különböző *CTRC* variánsok hatását a 95%-os konfidencia intervallummal (CI) számított összesített esélyhányados (OR) alapján értékeltük. Der-Simonian Laird becsléssel random-hatás modellt alkalmaztunk. A heterogenitást I^2 -teszttel ($p \geq 0,1$) vizsgáltuk. Érzékenységi elemzéseket (leave-one-out módszer) is végeztünk. A publikációs torzítást „funnel plotok” vizuális ellenőrzésével és Egger-teszttel zártuk ki. A statisztikai elemzéseket Stata 15 (Stata Corp) szoftverrel végeztük.

4. Eredmények

4.1. A *CASR* polimorfizmusok szerepének vizsgálata krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban

4.1.1. A humán *CASR* 7. exonjának DNS-szekvencia-elemzése egy feltáró kohorszban

Annak vizsgálatára, hogy a *CASR* gyakori variánsai megváltoztatják-e a CP kockázatát, először 261 CP-s beteg (106 nem alkoholos CP és 155 alkoholos CP) és 224 kontrollszemély esetében szekvenáltuk a *CASR* 7. exonját és a szomszédos 6. intront, valamint a 3' UTR régió egy részét az Országos Pankréász Regiszterből származó minták segítségével. Két gyakori misszensz variánst (allélgyakoriság >5%) azonosítottunk, a c.2956G>T (p.A986S) és c.2968A>G (p.R990G); valamint három alacsony gyakoriságú variánst (allélgyakoriság 1-5%), amelyek

között volt egy misszensz variáns, a c.3031C>G (p.Q1011E), egy nonszensz variáns, a c.2610G>A (p.E870=) és egy 3' UTR variáns, a c.*60T>A, amely a p.Q1011E-vel volt kapcsoltságban (Linkage Disequilibrium). Ezenkívül 8 ritka variánst (allélgyakoriság <1%) találtunk, amelyek közül 7-et egy-egy alanyban mutattunk ki. A ritka variánsok között 3 misszensz variáns volt; a c.1895G>A (p.G632D) variánst egy CP-betegben mutattuk ki, míg két korábban már jelentett misszensz variáns, a c.1775A>G (p.N592S) és a c.2405A>G (p.N802S) a kontrollokban volt jelen. Az új p.G632D variánst egy 37 éves, nem alkoholista férfi betegnél találtuk, akit 37 éves korában diagnosztizáltak CP-vel. Az anamnézis szerint nem dohányzott, és nem hordozott patogén *SPINK1* variánsokat. Teljes szérumszintje a normál tartományban volt (2,39 mmol/L). A p.N592S és p.N802S variánsok hordozóinak szérumszintje nem volt elérhető.

A „PredictSNP Consensus classifier for prediction of disease-related mutations” eszközzel végzett *in silico* elemzés a p.G632D és p.N802S variánsokat potenciálisan betegséget okozóként, a p.N592S variánst pedig jóindulatúként osztályozta.

Az allélgyakoriságot figyelembe véve a variánsok eloszlása CP-betegek és kontrollok között nem mutatott szignifikáns különbséget. A gyakori misszensz variánsok p.A986S és p.R990G, valamint az alacsony gyakoriságú variáns p.Q1011E genotípuseloszlását domináns és recesszív öröklődési modellekkel is értékeltük, de CP-betegek és kontrollok között nem találtunk szignifikáns különbséget (Exon 7 / c.2956G>T / GG: OR = -, 95% CI = -, p-érték = -; 7. exon / c.2956G>T / GT: OR = 1,03, 95% CI = 0,79-1,34, p-érték = 0,89; 7. exon / c.2956G>T / TT: OR = 1,19, 95% CI = 0,52-1,92, p-érték = 0,68; 7. exon / c.2956G>T / T: OR = 1,03, 95% CI = 0,82-1,30, p-érték = 0,81; 7. exon / c.2968A>G / AA: OR = -, 95% CI = -, p-érték = -; 7. exon / c.2968A>G / AG: OR = 1,13, 95% CI = 0,78-1,62, p-érték = 0,57; 7. exon / c.2968A>G / GG: OR = -, 95% CI = -, p-érték = -; 7. exon / c.2968A>G / G: OR = 1,05, 95% CI = 0,75-1,49, p-érték = 0,79). Ebben az elemzésben a homozigóta p.A986S variáns nem szignifikáns

feldúsulását figyeltük meg a betegeknél (3,4%) a kontrollokhoz (0,9%) képest. Ugyanakkor a kontrollpopulációban eltérést figyeltünk meg a Hardy-Weinberg-egyensúlytól (HWE), valószínűleg a korlátozott mintanagyság miatt.

4.1.2. TaqMan SNP genotipizálás a p.A986S és p.R990G variánsok esetében egy kibővített kohorszban

Mivel a homozigóta p.A986S variáns és a p.R990G variáns korábban CP-vel való összefüggéséről számoltak be [Muddana et al. 2008, Masson et al. 2015], kiterjesztettük tanulmányunkat, és TaqMan SNP genotipizálással megvizsgáltuk ezt a két variánst további 76 CP-betegben (36 nem alkoholos és 40 alkoholos eset) és 616 kontrollban. A direkt szekvenálás és TaqMan SNP genotipizálás eredményeit együttevén, a gyakori p.A986S és p.R990G variánsok allél- és genotípus-gyakoriságát 337 CP betegben (142 nem alkoholos CP és 195 alkoholos CP) és 840 kontrollban határoztuk meg. Egyik variáns sem állt összefüggésben a CP-vel (Exon 7 / c.2956G>T / GG: OR = -, 95% CI = -, p-érték = -; 7. exon / c.2956G>T / GT: OR = 1,11, 95% CI = 0,76-1,6, p-érték = 0,63; 7. exon / c.2956G>T / TT: OR = 1,58, 95% CI = 0,63-4,06, p-érték = 0,37; 7. exon / c.2956G>T / T: OR = 1,13, 95% CI = 0,82-1,55, p-érték = 0,46; 7. exon / c.2968A>G / AA: OR = -, 95% CI = -, p-érték = -; 7. exon / c.2968A>G / AG: OR = 0,92, 95% CI = 0,53-1,58, p-érték = 0,89; 7. exon / c.2968A>G / GG: OR = -, 95% CI = -, p-érték = -; 7. exon / c.2968A>G / G: OR = 0,88, 95% CI = 0,52-1,47, p-érték = 0,70). Érdemes megjegyezni, hogy a kombinált eredményekben nem volt észlelhető a homozigóta p.A986S variáns jelentős feldúsulása a betegeknél a kontrollokhoz képest (2,7% szemben 2,3%-kal; OR=1,19, 95% CI 0,52-1,92, p=0,68). A nem alkoholos CP és az alkoholos CP alcsoportok elemzése szintén nem mutatott ki betegségkapcsolatot (7. exon / c.2956G>T / GG: OR = -, 95% CI = -, p-érték = -; 7. exon / c.2956G>T / GT: OR = 0,97, 95% CI = 0,70-1,35, p-érték = 0,87; 7. exon / c.2956G>T / TT: OR = 0,91, 95% CI = 0,33-2,57, p-érték > 0,99; 7.

exon / c.2956G>T / T: OR = 0,97, 95% CI = 0,72–1,29, p-érték = 0,88; 7. exon / c.2968A>G / AA: OR = -, 95% CI = -, p-érték = -; 7. exon / c.2968A>G / AG: OR = 1,28, 95% CI = 0,83–1,97, p-érték = 0,29; 7. exon / c.2968A>G / GG: OR = -, 95% CI = -, p-érték = -; 7. exon / c.2968A>G / G: OR = 1,19, 95% CI = 0,77–1,78, p-érték = 0,44).

4.2. A misszensz *CTRC* variánsok szerepének vizsgálata krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban

4.2.1. A vizsgálat felépítése

Négy olyan variánst találtunk, amely megfelelt a beválasztási kritériumoknak: három misszensz mutációt és egy mikrodeléciót: p.A73T, p.V235I, p.R254W és p.K247_R254del. Átfogó adatbázis-keresést végeztünk, és összegyűjtöttük az összes publikált eset-kontroll tanulmányt, amely ezek közül a variánsok közül bármelyiket tartalmazta. A tanulmányok kiválasztásához alkalmazott protokoll eredményeként 14 cikket azonosítottunk [Rosendahl et al. 2008, Masson et al. 2008, Derikx et al. 2009, Paliwal et al. 2012, Masamune et al. 2012, Schubert et al. 2014, LaRusch et al. 2015, Koziel et al. 2015, Sofia et al. 2016, da Costa et al. 2016], amelyek alkalmasnak bizonyultak a metaanalízisbe való felvételre.

Mind a négy *CTRC* variáns világszerte kimutatható volt, azonban földrajzi/etnikai eloszlásukban különböztek. Így a p.A73T és p.V235I variánsokat leggyakrabban dél-ázsiai kohorszokban jelentették, míg a p.K247_R254del és p.R254W variánsokat jellemzően európai származású alanyokban találták. Tekintettel a rendelkezésre álló tanulmányok viszonylag kis számára, úgy döntöttünk, hogy a kiválasztott *CTRC* variánsok globális metaanalízisét regionális vagy etnikai alcsoportok nélkül végezzük el.

Elemzésünkbe mind az alkoholos CP, mind a nem alkoholos CP kohorszokat, például az idiopátiás, örökletes, familiáris és trópusi CP-t is bevontuk. Ha külön jelentették, a RAP-eseteket a CP-esetekkel egyesítettük, míg az akut hasnyálmirigy-gyulladásos eseteket kizártuk.

A kissé inkonzisztens osztályozás és/vagy jelentés miatt a különböző CP-kohorszok al csoport-elemzése csak az alkoholos CP esetében volt lehetséges. Egy adott publikációban szereplő különböző CP- kohorszokat (pl. alkoholos és nem alkoholos) összevontuk, ha azokat ugyanazzal a kontrollcsoporttal hasonlítottuk össze. Bizonyos tanulmányok alkoholos és trópusi CP- kohorszát külön kezeltük, ha a összehasonlításhoz különböző kontrollcsoportokat használtak.

4.2.2. Asszociáció elemzés

Az összes 4 elemzett *CTRC* variáns szignifikánsan gyakrabban fordult elő CP-ben szenvedő betegeknél, mint a kontrollcsoportokban. Az OR értékek alapján megítélt hatásméretetek a 4 variáns esetében hasonlóak voltak, és 2,6 és 6,5 között mozogtak. Hasonló OR értékeket számítottak a p.V235I (OR 4,5, 95% CI 2,2-9,1) és a p.K247_R254del (OR 5,4, 95% CI 2,6-11,0) variánsok esetében, míg a p.A73T (OR 6,5, 95% CI 2,4-17,8) enyhén magasabb, a p.R254W (OR 2,6, 95% CI 1,6-4,2) pedig enyhén alacsonyabb kockázattal járt. A p.A73T, p.V235I, p.K247_R254del és p.R254W globális hordozói gyakorisága CP-ben 2,4%, 1,2%, 1,1% és 1,0% volt, míg a legmagasabb jelentett hordozói gyakoriság CP-ben 5,6%, 4,9%, 5,3% és 4,6% volt.

A hordozók túlnyomó többsége heterozigóta *CTRC* variánsokkal rendelkezett, míg a homozigóta és több heterozigóta variánst is hordozó esetek (compound heterozigóta) ritkák voltak. Amikor az összes homozigóta és a compound heterozigóta *CTRC*-variánsokat is hordozókat együtt vettük figyelembe (n=13) a kontrollokkal szemben, a metaanalízis 10,8-as OR-értéket eredményezett (95% CI 2,4-49,6), ami magasabb kockázati hatást jelez, mint külön-külön bármelyik heterozigóta *CTRC*-variáns esetében. Azonban a kis esetszám és a variánsok önkényes összevonása korlátozza ennek a becslésnek a használhatóságát.

A *CTRC*-variánsok alkoholos CP-ben betöltött szerepének vizsgálatához metaanalízist végeztünk a p.K247_R254del és p.R254W variánsokra, amelyeket néhány tanulmányban

alkoholos CP-vel összefüggésben mutattak ki. A p.A73T és p.V235I variánsokra vonatkozóan nem álltak rendelkezésre adatok. A számításához összehasonlítottuk az alkoholos CP-es eseteket az egészséges kontrollokkal. Megerősítettük a p.K247_R254del (OR 5,4, 95% CI 1,4-21,5) és a p.R254W (OR 2,4, 95% CI 1,2-4,6) variánsok betegséggel való asszociációját, amelyek hatásának mértéke hasonló volt az általános CP-csoportban megfigyelthez.

4.2.3. A p.K247_R254del variáns és a gyakori c.180C>T (p.G60=) haplotípus közötti kapcsolat vizsgálata

A Magyar Hasnyálmirigy Kutatócsoport által közzé nem tett *CTRC*-szekvenálási adatok áttekintése során megállapítottuk, hogy három, heterozigóta mikrodeléciós variánst hordozó betegnél a gyakori p.G60= variáns is jelen volt, köztük kettő esetben homozigóta formában. A két variáns kapcsolatának megállapításához újra elemeztük Rosendahl és munkatársai (2008) tanulmányában szereplő 12 német származású alany genetikai adatait, valamint Grabarczyk és munkatársai (2017) tanulmányában szereplő 11 lengyel származású alany adatait. Két, Németországban szekvenált, török és szerb származású, nem publikált esetet is bevontunk a vizsgálatba. Összességében a 28 vizsgált alany közül 27 hordozta mindkét variánst, és 9 esetben a p.G60= variáns homozigóta volt.

A minőségértékelés és a publikációs torzítás a teljes doktori disszertációban szerepel.

5. Eredmények értékelése

5.1. A *CASR* polimorfizmusok szerepének vizsgálata krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban

A kalcium-érzékelő receptor egy dimer, G-proteinnel kapcsolt transzmembrán receptor, amely nagy mennyiségben expresszálódik a mellékpajzsmirigyekben és a vesékben, ahol a szisztémás kalcium-homeosztázist szabályozza [Hannan et al. 2018, Leach et al. 2020].

A CASR szisztémás, „kalcitropikus” szerepe mellett számos szövetben expresszálódik, ahol különböző sejtes folyamatok helyi szabályozásában vesz részt. Patkányok hasnyálmirigyében a CASR-t az acinus-, duktális- és szigetsejtekben találták meg, és kimutatták, hogy a receptor aktiválása duktális hidrogén-karbonát szekréciót indukál [Bruce et al. 1999]. A CASR expresszióját az emberi hasnyálmirigy összes sejtípusában dokumentálták, beleértve a hasnyálmirigy belsejében található idegeket és vérereket is [Rácz et al. 2002]. Ezenkívül kimutatták, hogy az emberi hasnyálmirigy-adenokarcinóma sejtvonal, a Capan-1 funkcionális CASR-t expresszál [Rácz et al. 2002]. Ezen megfigyelések alapján felvetődött, hogy a CASR a CFTR aktiválása révén növeli a duktuszok folyadék szekrécióját, és így szabályozza a hasnyálmirigynedv kalciumkoncentrációját [Sahin-Tóth 2020]. Meg kell azonban jegyezni, hogy a CASR pontos szerepére vonatkozó bizonyítékok a hasnyálmirigyben korlátozottak, és hiányoznak a hasnyálmirigy-specifikus *CASR*-delécióval vagy mutációval rendelkező állatmodellek. A legerőteljesebb indikáció arra, hogy a *CASR* mutációk szerepet játszhatnak a hasnyálmirigy-gyulladásban, az FHH-ban viszonylag gyakori hasnyálmirigy-gyulladás előfordulása [Pearce et al. 1996]. Kis számú FHH-betegnél dokumentálták az *SPINK1* és *CASR* mutációk transz-heterozigóta előfordulását [Felderbauer et al. 2003, Felderbauer et al. 2006, Murugaian et al. 2008, Rajesh et al. 2009, Baudry et al. 2010]. Ugyanakkor valószínűnek tűnik, hogy az FHH-val összefüggő hasnyálmirigy-gyulladás inkább a hiperkalcémia, mint a hasnyálmirigyben a *CASR* mutációk inaktiválásának helyi hatásai miatt alakul ki.

A hiperkalcémia a hasnyálmirigy-gyulladás jól ismert kockázati tényezője. A hiperparatireózis és a rosszindulatú daganatokhoz társuló hiperkalcémia két gyakran előforduló állapot, amelyekben a hasnyálmirigy-gyulladás gyakran társul a szérum kalciumszint emelkedésével [Bai et al. 2012, Misgar et al. 2020, Imam et al. 2021]. Fontos megjegyezni, hogy patkányokon végzett kísérleti tanulmányok is kimutatták, hogy a hiperkalcémia hasnyálmirigy-gyulladást okozhat [Frick et al. 1994, Mithöfer et al. 1995, Frick et al. 1995]. A *SPINK1* variánsok a CP

független kockázati tényezői, amelyek gyakran más genetikai és környezeti kockázati tényezőkkel kölcsönhatásba lépve elősegítik a betegség kialakulását és progresszióját. Ezért nem meglepő, hogy egyes hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedő FHH-betegeknél is előfordulhatnak *SPINK1* mutációk.

A gyakori *CASR*-variánsok CP-kockázatban betöltött szerepét tekintve a humán genetikai asszociációs vizsgálatok ellentmondásos eredményeket hoztak. Ezért a jelen tanulmányban egy magyar nem alkoholos és alkoholos CP-esetekből álló kohorszban vizsgáltuk a gyakori 7. exonon található *CASR*-variánsok CP-kockázatban betöltött szerepét.

Elemzésünk korlátozó tényezője a betegcsoportok viszonylag kis mérete volt. Öt *CASR* variánst azonosítottunk, amelyek populációs gyakorisága meghaladta az 1%-ot, de egyik sem mutatott összefüggést a CP-vel. Allél- vagy genotípus-eloszlás figyelembevételével, illetve a nem alkoholista és alkoholista betegek alcsoportjának elemzésében sem figyeltünk megdúsulást. A *SPINK1* mutáció státuszát nem elemeztük, de megjegyezzük, hogy a *SPINK1* p.N34S és c.194+2T>C variánsok ritkák ebben a magyar CP-kohorszban [Hegyi et al. 2016].

Arra a következtetésre jutottunk, hogy a korábban jelentett összefüggések a gyakori *CASR* variánsok és a CP között valószínűleg tévesek voltak, véletlen és/vagy többszörös tesztelés miatt. Ez a következtetés összhangban áll ezeknek a variánsoknak a jelentett funkcionális tulajdonságaival. Így a transzfektált HEK 293 sejtekben a p.A986S és p.Q1011E variánsok pontosan úgy viselkedtek, mint a vad típusú *CASR*, míg a p.R990G variáns enyhén fokozott funkciót mutatott [Vezzoli et al. 2007]. A p.R990G variáns funkciógyarapodásos fenotípusa magyarázhatja annak összefüggését az elsődleges hiperkalciuriával [Vezzoli et al. 2007], de nehéz összeegyeztetni a hasnyálmirigy-gyulladással. Végül egy új misszensz variánst találtunk egy CP-betegben (p.G632D) és két korábban már jelentett ritka misszensz variánst a kontrollokban (p.N592S, p.N802S). A p.G632D és p.N802S variánsok funkcionálisan károsnak bizonyultak. A p.N802S variánst valóban FHH-val társított inaktiváló mutációként

írták le [Lia-Baldini et al. 2013]. A betegcsoportban nem figyelhető meg ritka misszensz variánsok felhalmozódása. Azonban elemzésünk az exon 7-re korlátozódott, ezért nem lehet közvetlen összehasonlítást tenni a Férec-csoport releváns eredményeivel [Masson et al. 2015]. Eredményeink közzétételével egy időben egy német csoport is bemutatta adatait a három *CASR* polimorfizmusról (p.A986S, p.R990G és p.Q1011E) német és francia CP-s betegeknél [Ewers et al. 2021]. Hasonlóan a mi eredményeinkhez, ők sem találtak szignifikáns összefüggést a három gyakori *CASR* polimorfizmus és a CP között. A funkcionális vizsgálatok hasonló vagy kissé magasabb aktivitást mutattak a három p.A986S, p.R990G és p.Q1011E variáns esetében a vad típushoz képest, ami összhangban áll ezeknek a variánsoknak a pankreatitisszel való korrelációjának hiányával.

Az intracelluláris kalcium jelátvitel kritikus szerepet játszik a hasnyálmirigy fiziológiájában, és a rendellenes kalcium jelátvitel a hasnyálmirigy-gyulladás jellegzetes tünete. Az extracelluláris kalciumszint változásai erőteljes hatással lehetnek a kalcium jelátvitelre, és közvetlenül elősegíthetik az emésztő proteázok aktiválódását. A *CASR* mellett a legújabb genetikai tanulmányok más kalciumcsatornákra és receptorokra is összpontosítottak [Kaune et al. 2020, Masamune et al. 2020, Zou et al. 2020, Burgos et al. 2021]. Míg a *GPRC6A* és *STIMI* kapcsán elért érdekes előzetes eredmények további megerősítést várnak [Kaune et al. 2020, Burgos et al. 2021], a konstitutív kalciumcsatornát kódoló *TRPV6* gén meggyőzően azonosítható, mint nagy hatással bíró CP rizikógén [Sahin-Tóth 2020, Masamune et al. 2020, Zou et al. 2020]. A *TRPV6* funkcióvesztéses mutációi szoros összefüggésben állnak a CP-vel, nagy hatásmérettel. A *TRPV6* mind az acinus, mind a duktális sejtekben expresszálódik. A *TRPV6* mutációk betegséget okozó mechanizmusa eddig tisztázatlan maradt. Mivel a duktális epitéliumban magasabb expressziós szinteket jelentettek, a *TRPV6* gént előzetesen a CP duktális patológiai útvonalához sorolták [Sahin-Tóth 2020]. Feltételezhető, hogy a *TRPV6* a *CASR*-ral együtt szabályozhatja a hasnyálmirigynedv kalciumkoncentrációját. A két molekula

közötti funkcionális interakcióra egy közelmúltbeli példát a bélhámiban írtak le, ahol a bazolaterális membránban a CASR aktiválása csökkenti a TRPV6-függő bél kalciumfelszívódást [Lee et al. 2019]. Jelenlegi adataink alapján azonban valószínűbb, hogy a TRPV6 a hasnyálmirigyben a CASR-től függetlenül működik.

Összefoglalva, eredményeink azt mutatják, hogy a *CASR* gyakori variánsai nem módosítják a CP kockázatát, és klinikai környezetben nem tekinthetők genetikai kockázati tényezőknek. Ugyanakkor nem zárhatjuk ki, hogy a *CASR* működését befolyásoló ritka mutációk hozzájárulhatnak a betegség kialakulásához.

5.2. A misszensz *CTRC* variánsok szerepének vizsgálata krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban

A jelen tanulmány célja az volt, hogy formális becslést kapjunk a funkcióvesztéses *CTRC* variánsok hordozóinál a CP kockázatáról. Ennek érdekében metaanalízist végeztünk a publikált tanulmányokból, amelyek négy alacsony gyakoriságú variáns (>1%) eloszlását értékelték a betegek és a kontrollok között. Ezt a négy variánst, köztük három misszensz mutációt és egy mikrodeleciót választottuk, mert genetikai összefüggésüket a CP-vel reprodukálhatóan dokumentálták, és kísérleti tanulmányok megerősítették, hogy a variánsok a *CTRC* funkciójának elvesztését okozzák. Így ezeknek a variánsoknak a CP-kockázatra gyakorolt hatásának mértéke általánosan alkalmazható más ritka vagy egyedüli *CTRC* misszensz mutációkra is. A gyakran előforduló *CTRC* rizikóvariáns c.180C>T (p.G60=) nem került be a tanulmányba, mert nem változtatja meg a *CTRC* aminosav-szekvenciáját, és funkcionális hatása a *CTRC*-re még nem tisztázott.

Figyelembe véve a metaanalízisre alkalmas publikációk viszonylag kis számát, az etiológiára vonatkozó standardizált kohorszdefiníciók hiányát, valamint a homozigóta és compound heterozigóta variánsokat hordozók változó jelentését, úgy döntöttünk, hogy „globális” elemzést

végzünk, amelyben minden CP-kohorsz szerepel, és a hordozói gyakoriságot (nem pedig az allélokot vagy genotípusokat) vesszük figyelembe. Megjegyezzük azonban, hogy ez a globális CP-kohorsz főként heterozigóta *CTRC*-variáns hordozókat képvisel, akik nem alkoholos CP-ben szenvednek. Ezzel a megközelítéssel a metaanalízis kimutatta, hogy a *CTRC* variánsok az OR értékek alapján becslve 3-7-szeresére növelték a CP kockázatát. A homozigóta vagy compound heterozigóta variánsokat hordozók ritkák voltak, de úgy tűnt, hogy jelentősebben, körülbelül 11-szeresére növelték a kockázatot, amit a becslés alsó határértékének tartunk. Az alkoholos CP esetek al csoport-elemzése hasonló kockázatnövekedést mutatott, mint a globális CP kohorszban. A közelmúltban Chen és munkatársai (2021) vizsgálták a gének és az alkohol interakcióját a CP-ben, és magasabb kockázatot jelentettek a c.760C>T (p.R254W) variáns esetében alkoholos (OR=2,87) és nem alkoholos CP (OR=1,98) esetén. Úgy véljük, hogy ez egy téves eredmény lehet, mivel a vizsgált esetek száma kisebb volt, mint a mi tanulmányunkban. Fontos megjegyezni, hogy ugyanebben a cikkben a 2., 3. és 7. exonban található ritka patogén *CTRC* variánsok kumulatív elemzése nem mutatott különbséget az alkoholos és nem alkoholos CP csoportok között (OR=4,25, illetve 4,05), alátámasztva azt a feltevést, hogy a *CTRC* variánsok hasonló kockázati hatást gyakorolnak e két CP etiológiára [Chen és munkatársai 2021]. A *CTRC*-vel ellentétben az *SPINK1* variánsok kisebb hatást gyakorolnak az alkoholos, mint a nem alkoholos CP-re, míg a funkciót növelő *PRSSI* variánsok szinte soha nem fordulnak elő alkoholos eredetű betegségben [Hegyi és Sahin-Tóth 2017, Chen et al. 2021].

A p.A73T, p.V235I, p.K247_R254del és p.R245W variánsok funkcionális következményeit korábban transzfektált HEK 293T sejtekkel és adenovírussal transzdukált AR42J sejtekkel végzett sejt kultúra-kísérletekben jellemezték [Rosendahl et al. 2008, Beer et al. 2012, Szabó et al. 2015]. Ezenkívül a *CTRC* variánsok enzimatis aktivitását tisztított *CTRC* fehérjével tesztelték. Ezen vizsgálatok alapján a p.A73T és p.K247_R254del variánsokat magas

kockázatú variánsoknak, a p.V235I és p.R245W variánsokat pedig közepes-alacsony kockázatú variánsoknak minősítették [Beer et al. 2012]. A p.K247_R254del variáns teljes funkcióvesztést mutatott, mivel nem rendelkezett proteázaktivitással, és a tripszin gyorsan lebontotta. Hasonlóképpen, szinte teljes (80-90%-os) funkcióvesztést figyeltek meg a p.A73T variáns esetében, amely csak kevésbé szekretálódott a sejtekből. Ezenkívül a p.A73T variáns endoplazmatikus retikulum (ER) stresszt indukált, ami arra utal, hogy a mutáció által indukált hibás feltekereődés és intracelluláris retenció magyarázhatja a hibás szekréciónak. Továbbra sem világos, hogy az ER stressz hozzájárul-e a CP kockázatához a p.A73T variáns hordozóinál. A p.A73T és p.K247_R254del variánsokkal ellentétben azt találtuk, hogy a p.V235I és p.R245W variánsok funkcionális hibája kevésbé volt szembevetendő.

A p.V235I variáns szinte ugyanolyan jól szekretálódott a HEK 293T sejtekből, mint a vad típusú CTRC, és a tisztított fehérje körülbelül 70% enzimaktivitást mutatott egy kis peptid szubsztráton. Azonban, amikor ezt a variánst tripszinogén lebontási kísérletekben tesztelték, csak körülbelül 50% aktivitást mutatott a vad típusú CTRC-hez képest. A p.R254W variáns szekréciónak csökkent (a vad típus 50%-ára) a HEK 293T sejtekből, míg az AR42J sejtekből történő szekréciónak szinte normális volt (80%). A tisztított p.R254W fehérje teljes aktivitást mutatott egy kis peptid szubsztráton, de tripszinogén-lebontó képességét eddig még nem tesztelték. A p.R254W variáns szintén hajlamos volt a magas koncentrációjú tripszin által okozott lebomlásra. Összességében a rendelkezésre álló bizonyítékok arra utalnak, hogy a p.V235I variáns körülbelül 50%-os funkcióvesztést okoz, míg a p.R254W variáns funkcionális károsodásának mértéke továbbra is nehezen meghatározható, de viszonylag kicsinek tűnik.

Az OR értékek összehasonlításakor a mutánsok funkcionális tulajdonságaival, a magas kockázatú CTRC variánsok p.A73T (OR 6,5) és p.K247_R254del (OR 5,4) közötti különbség az alacsony kockázatú variánsához, a p.R254W-hez (OR 2,6) képest nyilvánvaló, és alátámasztja metaanalízisünk eredményeinek érvényességét. Érdekes módon a p.V235I (OR

4,5) variáns kiugró értéknek számít ebben a besorolásban, mivel kockázati hatása a kísérletileg dokumentálnál erősebb funkcionális hibára utal. Megjegyezzük azonban, hogy az eddig publikált funkcionális elemzések hatóköre korlátozott, és a p.V235I variáns más, még nem tesztelt mechanizmusok, pl. az mRNS expresszió vagy a splicing befolyásolása révén is okozhatja a CTRC funkcióvesztését. Az esélyhányadosok és a CTRC variánsok funkcióvesztése közötti tökéletlen korreláció ellenére jelenlegi tanulmányunk szilárd alapértéket állapít meg a heterozigóta CTRC null variánsok hatásmértékére vonatkozóan, amely körülbelül 5-6-szoros CP-kockázat-növekedést jelent. Mint fentebb megjegyeztük, a homozigóta és a compound heterozigóta CTRC variánsok együttes jelenléte várhatóan lényegesen magasabb kockázatot jelent, azonban a rendelkezésre álló adatok korlátozottak.

A tanulmány váratlan „bónusz” megfigyelése a p.K247_R254del mikrodélciós variáns és a gyakori p.G60= haplotípus közötti kapcsoltság disequilibrium. Annak ellenére, hogy több laboratórium is jelentette mindkét variánst a kohorszában, ezek közötti összefüggést eddig még soha nem írták le. A CTRC variánsokkal rendelkező betegek genetikai tanácsadói ezt az új információt figyelembe kell vegyék a CP általános kockázatának meghatározásakor. Bár a p.G60= haplotípus körülbelül kétszeresére növeli a CP kockázatát, ezt a hatást semlegesíti a mikrodélció jelenléte ugyanazon allélon, és a teljes kockázatot kizárólag a heterozigóta mikrodélciós variáns jelenléte határozza meg. Továbbá, ha heterozigóta mikrodélció fordul elő p.G60= homozigotizással együtt, akkor a kombinált betegségkockázat becslésekor csak egy p.G60= allélt kell figyelembe venni.

A jelen tanulmány korlátja az elemzés globális jellege, amely elrejtethet bizonyos etiológiákhoz, földrajzi vagy demográfiai jellemzőkhöz kapcsolódó magasabb vagy alacsonyabb hatásméreteket. E tekintetben érdemes megjegyezni, hogy a p.A73T és p.V235I variánsok Indiában gyakoriak, míg a p.K247_R254del és p.R254W variánsok elsősorban Európából kerültek leírásra. Az elemzés korlátozása indiai és európai kohorszokra adott variánsok

esetében magasabb OR értékeket eredményezhet, mint a globális megközelítés. Hasonlóképpen, a *CTRC* variánsok hatása gyermekkorban kialakuló CP esetében nagyobb lehet, mint felnőttkorban kialakuló CP esetében, amint azt egy lengyel tanulmány is sugallja [Zou et al. 2018]. Ezen megoldatlan kérdések ellenére metaanalízisünk erőteljesen alátámasztja azt a feltételezést, hogy a *CTRC* variánsok viszonylag erős kockázati tényezők a CP esetében, és indokolja a klinikumban a betegek rutin genetikai szűrését.

6. Konklúziók

Célkitűzésünk az volt, hogy feltárjuk a kalcium-érzékelő receptor (*CASR*) és a kimotripszin C (*CTRC*) komplex szerepét a hasnyálmirigy-gyulladásban, megvizsgálva genetikai variációikat és a krónikus hasnyálmirigy-gyulladással való lehetséges összefüggéseiket. Eredményeink értékes betekintést nyújtanak a CP genetikai hátterébe, hangsúlyozva a genetikai tényezők és a hasnyálmirigy-betegségek mechanizmusai közötti bonyolult kapcsolatot.

A *CASR* variánsok, különösen az exon 7-ben találhatóak vizsgálata nem tárt fel jelentős összefüggést a CP-vel magyar kohorszunkban. Ez az eredmény ellentmond a korábbi jelentéseknek, amelyek a gyakori *CASR* variánsok és a CP kockázata közötti összefüggésre utaltak. Funkcionális vizsgálatokkal alátámasztott elemzésünk szerint a gyakori *CASR* variánsok valószínűleg nem járulnak hozzá jelentősen a CP-re való hajlamhoz, ami hangsúlyozza a közölt összefüggések alapos vizsgálatának fontosságát a félrevezető következtetések elkerülése érdekében.

A *CTRC* funkcióvesztéses variánsaira vonatkozó metaanalízisünk átfogó értékelést nyújt az ezeket a variánsokat hordozó betegek CP-kockázatáról. A heterozigóta hordozók esetében megfigyelt 3-7-szeres CP-kockázat-növekedés, valamint a homozigóta vagy compound heterozigóta hordozók esetében még ennél is kifejezettebb, 11-szeres kockázat-növekedés alapján a *CTRC* variánsok a CP jelentős kockázati tényezőinek tekinthetők. Ez az elemzés

cáfolja azt a feltételezést, hogy a *CTRC* variánsok eltérő hatást gyakorolnak az alkoholos és nem alkoholos CP-re, és arra utal, hogy ezek a variánsok különböző etiológiák esetén is konzisztens kockázattal járnak.

Tanulmányunk kiemeli a specifikus *CTRC* variánsok funkcionális következményeit is, amelyek közül a p.A73T és p.K247_R254del variánsok magas kockázatúak, míg a p.V235I és p.R245W variánsok közepes-alacsony kockázatúak. A megfigyelt esélyhányadosok és ezeknek a variánsoknak a funkcionális jellemzői közötti korreláció alátámasztja metaanalízisünk érvényességét, és értékes információkkal szolgál a klinikusok számára a *CTRC*-mutációk potenciális súlyosságáról.

Ezenkívül a p.K247_R254del mikrodélációs variáns és a gyakori p.G60= haplotípus közötti váratlan kapcsoltságú disequilibrium fontos újabb szempontot ad a kockázatértékelési folyamathoz. A genetikai tanácsadóknak figyelembe kell venniük ezeket a szempontokat, hogy pontosabb kockázati előrejelzéseket tudjanak adni a *CTRC* variánsokkal rendelkező betegeknek. Összefoglalva, tanulmányunk jelentősen hozzájárul a *CASR* variánsok szerepének tisztázásához a CP-ben, valamint a *CTRC* variánsok kockázatértékeléséhez a CP-ben. Míg a gyakori *CASR* variánsok nem játszanak szerepet a CP-re való hajlamosságban, a *CTRC* variánsok erős kockázati tényezőként jelennek meg. Ez a munka alátámasztja a hasnyálmirigy-betegségek genetikai alapjainak folyamatos kutatásának fontosságát, megnyitva az utat a klinikumban a pontosabb diagnosztika és a személyre szabott beavatkozások előtt.

7. Új tudományos eredmények

1. A három vizsgált *CASR* egyponthoz tartozó nukleotid-polimorfizmus (p.A986S, p.R990G és p.Q1011E) jelen van a magyar populációban.
2. A három vizsgált *CASR* egyponthoz tartozó nukleotid-polimorfizmus (p.A986S, p.R990G és p.Q1011E) nem áll összefüggésben a krónikus hasnyálmirigy-gyulladással.

Magyarországon.

3. A vizsgált funkcióvesztéses *CTRC* variánsok (p.A73T, p.V235I, p.K247_R254del és p.R245W) körülbelül 3-7-szeresére növelik a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás kockázatát heterozigóta hordozók esetében, míg homozigóta vagy compound heterozigóta hordozók esetében a kockázat körülbelül 11-szeresére nő. A kockázat növekedése hasonló az alkoholos és nem alkoholos krónikus hasnyálmirigy-gyulladás esetében, és a kockázat mértéke a variánsok között a funkcionális károsodás mértékétől függően változik.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Hegyi Eszternek, és Dr. Sahin-Tóth Miklósnak, akik lehetőséget teremtettek számomra a kutatásra, Dr. Hegyi Péter intézetvezetőnek, valamint minden kollégámnak és társszerzőmnek, akik segítettek nekem a munka elvégzésében. Hálás vagyok a családomnak, akik támogattak, amikor megkezdtem a doktori tanulmányaimat. A leghálásabb mindenekelőtt Istennek és a férjemnek, Dr. Csurka Tamásnak vagyok.

9. Hivatkozások

1. Bai, H. X., Giefer, M., Patel, M., Orabi, A. I., & Husain, S. Z. (2012). The association of primary hyperparathyroidism with pancreatitis. *Journal of clinical gastroenterology*, 46(8), 656.
2. Baudry, C., Rebours, V., Houillier, P., Hammel, P., Ruszniewski, P., & Levy, P. (2010). Recurrent acute pancreatitis caused by association of a novel mutation of the calcium-sensing receptor gene and a heterozygous mutation of the SPINK1 gene. *Pancreas*, 39(3), 420-421.
3. Beer, S., Zhou, J., Szabó, A., Keiles, S., Chandak, G. R., Witt, H., & Sahin-Tóth, M. (2012). Comprehensive functional analysis of chymotrypsin C (CTRC) variants reveals distinct loss-of-function mechanisms associated with pancreatitis risk. *Gut*, gutjnl-2012.
4. 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*, 23(5), 481-490.
5. Beyer, G., Habtezion, A., Werner, J., Lerch, M. M., & Mayerle, J. (2020). Chronic pancreatitis. *The Lancet*, 396(10249), 499-512.
6. Bruce, J. I., Yang, X., Ferguson, C. J., Elliott, A. C., Steward, M. C., Case, R. M., & Riccardi, D. (1999). Molecular and functional identification of a Ca²⁺ (polyvalent cation)-sensing receptor in rat pancreas. *Journal of Biological Chemistry*, 274(29), 20561-20568.
7. Burgos, M., Philippe, R., Antigny, F., Buscaglia, P., Masson, E., Mukherjee, S., Dubar P, Le Maréchal C, Campeotto F, Lebonvallet N, Frieden M, Llopis J, Domingo B, Stathopoulos PB, Ikura M, Brooks W, Guida W, Chen JM, Ferec C, Capiod T, & Mignen, O. (2021). The p. E152K-STIM1 mutation

- deregulates Ca²⁺ signaling contributing to chronic pancreatitis. *Journal of Cell Science*, 134(3), jcs244012.
8. Chen, J. M., Herzig, A. F., Génin, E., Masson, E., Cooper, D. N., & Férec, C. (2021). Scale and scope of gene-alcohol interactions in chronic pancreatitis: a systematic review. *Genes*, 12(4), 471.
 9. Cichoż-Lach, H., Michalak-Wojnowska, M., Lis-Janczarek, E., Wojcierowski, J., & Hydzik, M. (2019). Do CTRC mutations affect the development of alcoholic chronic pancreatitis and its course among Poles: Preliminary study. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 28(3), 307-312.
 10. Comfort, M. W., & Steinberg, A. G. (1952). Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology*, 21(1), 54-63.
 11. da Costa, M. Z. G., Pires, J. G. L., Nasser, P. D., da Silva Ferreira, C., de Sá Teixeira, A. C., Paranaçuá-Vezozzo, D. C., Guarita, D. R., Carrilho, F. J., & Ono, S. K. (2016). Frequency of Tabagism and N34S and P55S Mutations of Serine Peptidase Inhibitor, Kazal Type 1 (SPINK1) and R254W Mutation of chymotrypsin C (CTRC) in patients with chronic pancreatitis and controls. *Pancreas*, 45(9), 1330-1335.
 12. 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.
 13. Ewers, M., Canaff, L., Weh, A. E., Masson, E., Eiseler, K., Chen, J. M., Rebours, V., Bugert, P., Michl, P., Rosendahl, J., Férec, C., Goltzman, D., & Witt, H. (2021). The three common polymorphisms p. A986S, p. R990G and p. Q1011E in the calcium sensing receptor (CASR) are not associated with chronic pancreatitis. *Pancreatology*, 21(7), 1299-1304.
 14. Felderbauer, P., Hoffmann, P., Einwächter, H., Bulut, K., Ansorge, N., Schmitz, F., & Schmidt, W. E. (2003). A novel mutation of the calcium sensing receptor gene is associated with chronic pancreatitis in a family with heterozygous SPINK1 mutations. *BMC gastroenterology*, 3(1), 1-8.
 15. Felderbauer, P., Klein, W., Bulut, K., Ansorge, N., Dekomien, G., Werner, I., Epplen JT, Schmitz F, & Schmidt, W. E. (2006). Mutations in the calcium-sensing receptor: a new genetic risk factor for chronic pancreatitis?. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 41(3), 343-348.
 16. Frick, T. W., Mithöfer, K., Fernández-del Castillo, C., Rattner, D. W., & Warshaw, A. L. (1995). Hypercalcemia causes acute pancreatitis by pancreatic secretory block, intracellular zymogen accumulation, and acinar cell injury. *The American journal of surgery*, 169(1), 167-172.
 17. Frick, T. W., Wiegand, D., Bimmmer, D., Castillo, C. F. D., Rattner, D. W., & Warshaw, A. L. (1994). A rat model to study hypercalcemia-induced acute pancreatitis. *International journal of pancreatology*, 15, 91-96.
 18. Grabarczyk, A. M., Oracz, G., Wertheim-Tysarowska, K., Anna Kujko, 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.
 19. Gupte, A., Goede, D., Tuite, R., & Forsmark, C. E. (2018). Chronic pancreatitis. *Bmj*, 361.
 20. Halangk, W., Kruger, B., Ruthenbürger, M., Stürzebecher, J., Albrecht, E., Lippert, H., & Lerch, M. M. (2002). Trypsin activity is not involved in premature, intrapancreatic trypsinogen activation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 282(2), G367-G374.
 21. Hannan, F. M., Kallay, E., Chang, W., Brandi, M. L., & Thakker, R. V. (2019). The calcium-sensing receptor in physiology and in calcitropic and noncalcitropic diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(1), 33-51.
 22. Hegyi, E., Geisz, A., Sahin-Tóth, M., Derikx, M. H., Németh, B. C., Balázs, A., Balázs A, Hritz I, Izbéki F, Halász A, Párniczky A, Takács T, Kelemen D, Sarlós P, Hegyi P, & Czako L; Hungarian Pancreatic Study Group. (2016). SPINK1 promoter variants in chronic pancreatitis. *Pancreas*, 45(1), 148-153.
 23. Hegyi, E., & Sahin-Tóth, M. (2017). Genetic risk in chronic pancreatitis: the trypsin-dependent pathway. *Digestive diseases and sciences*, 62(7), 1692-1701.
 24. Hegyi, E., Tóth, A. Z., Vincze, Á., Szentesi, A., Hegyi, P., & Sahin-Tóth, M. (2019). Alcohol-dependent effect of PRSS1-PRSS2 haplotype in chronic pancreatitis. *Gut*, gutjnl-2019.
 25. Imam, Z., Hanna, A., Jomaa, D., Khasawneh, M., Abonofal, A., & Murad, M. H. (2021). Hypercalcemia of malignancy and acute pancreatitis. *Pancreas*, 50(2), 206-213.
 26. Kassell, B., & Kay, J. (1973). Zymogens of Proteolytic Enzymes: These enzyme precursors, formerly thought to be inert substances, have inherent proteolytic activity. *Science*, 180(4090), 1022-1027.
 27. Kaune, T., Ruffert, C., Hesselbarth, N., Damm, M., Krug, S., von Widdern, J. C., Emmanuelle Masson b c, Jian-Min Chen b, Vinciane Rebours d, Louis Buscaill e, Claude Férec b c, Robert Grützmann f, Rene H.M. te Morsche g, Joost PH. Drenth g, Giulia Martina Cavestro h, Raffaella Alessia Zuppardo h, Adrian Saftoiu i, Ewa Malecka-Panas j, Stanislaw Gluszek k, Peter Bugert l, Lerch, M. M., Sendler, M., Weiss, F. U., Zou, W. B., Deng, S. J., Liao, Z., Scholz, M., Kirsten, H., Hegyi, P., Witt, H., Michl, P., Griesmann, H., & Rosendahl, J. (2020). Analysis of GPRC6A variants in different pancreatitis

- etiologies. *Pancreatology*, 20(7), 1262-1267.
28. Kleeff, J., Whitcomb, D. C., Shimosegawa, T., Esposito, I., Lerch, M. M., Gress, T., Mayerle, J., Drewes, A. M., Rebours, V., Akisik, F., Muñoz, E. D., & Neoptolemos, J. P. (2017). Chronic pancreatitis. *Nature reviews Disease primers*, 3(1), 1-18.
 29. Kooistra, A. J., Mordalski, S., Pándy-Szekeres, G., Esguerra, M., Mamyrbekov, A., Munk, C., Keserű, G. M., & Gloriam, D. E. (2021). GPCRdb in 2021: integrating GPCR sequence, structure and function. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D335-D343.
 30. Koziel, D., Gluszek, S., Kowalik, A., Chlopek, M., & Pieciak, L. (2015). Genetic mutations in SPINK1, CFTR, CTRC genes in acute pancreatitis. *BMC gastroenterology*, 15, 1-9.
 31. LaRusch, J., Lozano-Leon, A., Stello, K., Moore, A., Muddana, V., O'connell, M., Diergaard, 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.
 32. Leach, K., Hannan, F. M., Josephs, T. M., Keller, A. N., Møller, T. C., Ward, D. T., Kallay E., Mason, R. S., Thakker, R. V., Riccardi, D., Conigrave, A. D., & Bräuner-Osborne, H. (2020). International union of basic and clinical pharmacology. CVIII. Calcium-sensing receptor nomenclature, pharmacology, and function. *Pharmacological Reviews*, 72(3), 558-604.
 33. Lee, J. J., Liu, X., O'Neill, D., Beggs, M. R., Weissgerber, P., Flockerzi, V., Chen, X. Z., Dimke, H., & Alexander, R. T. (2019). Activation of the calcium-sensing receptor attenuates TRPV6-dependent intestinal calcium absorption. *JCI insight*, 4(11).
 34. Lee, J. Y., & Shoback, D. M. (2018). Familial hypocalciuric hypercalcemia and related disorders. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 32(5), 609-619.
 35. Lia-Baldini, A. S., Magdelaine, C., Nizou, A., Airault, C., Salles, J. P., Moulin, P., Delemer, B., Aitouares, M., Funalot, B., Sturtz, F., & Lienhardt-Roussie, A. (2013). Two novel mutations of the calcium-sensing receptor gene affecting the same amino acid position lead to opposite phenotypes and reveal the importance of p. N802 on receptor activity. *European journal of endocrinology*, 168(2), K27-K34.
 36. Lo, C. K. L., Mertz, D., & Loeb, M. (2014). Newcastle-Ottawa Scale: comparing reviewers' to authors' assessments. *BMC medical research methodology*, 14, 1-5.
 37. Masamune, A., Kotani, H., Sörgel, F. L., Chen, J. M., Hamada, S., Sakaguchi, R., Masson, E., Nakano, E., Kakuta, Y., Niihori, T., Funayama, R., Shirota, M., Hirano, T., Kawamoto, T., Hosokoshi, A., Kume, K., Unger, L., Ewers, M., Laumen, H., Bugert, P., Mori, M. X., Tsvilovskyy, V., Weißgerber, P., Kriebs, U., Fecher-Trost, C., Freichel, M., Diakopoulos, K. N., Berninger, A., Lesina, M., Ishii, K., Itoi, T., Ikeura, T., Okazaki, K., Kaune, T., Rosendahl, J., Nagasaki, M., Uezono, Y., Algül, H., Nakayama, K., Matsubara, Y., Aoki, Y., Férec, C., Mori, Y., Witt, H., & Shimosegawa, T. (2020). Variants that affect function of calcium channel TRPV6 are associated with early-onset chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 158(6), 1626-1641.
 38. Masamune, A., Nakano, E., Kume, K., Kakuta, Y., Ariga, H., & Shimosegawa, T. (2012). Identification of novel missense CTRC variants in Japanese patients with chronic pancreatitis. *Gut*, gutjnl-2012.
 39. 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, 83-91.
 40. Masson, E., Chen, J. M., & Férec, C. (2015). Overrepresentation of rare CASR coding variants in a sample of young French patients with idiopathic chronic pancreatitis. *Pancreas*, 44(6), 996-998.
 41. Mayerle, J., Sendler, M., Hegyi, E., Beyer, G., Lerch, M. M., & Sahin-Tóth, M. (2019). Genetics, cell biology, and pathophysiology of pancreatitis. *Gastroenterology*, 156(7), 1951-1968.
 42. Misgar, R. A., Bhat, M. H., Rather, T. A., Masoodi, S. R., Wani, A. I., Bashir, M. I., Wani, M. A., & Malik, A. A. (2020). Primary hyperparathyroidism and pancreatitis. *Journal of Endocrinological Investigation*, 43, 1493-1498.
 43. Mithöfer, K., Fernández-Del Castillo, C., Frick, T. W., Lewandrowski, K. B., Rattner, D. W., & Warshaw, A. L. (1995). Acute hypercalcemia causes acute pancreatitis and ectopic trypsinogen activation in the rat. *Gastroenterology*, 109(1), 239-246.
 44. Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G., & PRISMA Group*. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Annals of internal medicine*, 151(4), 264-269.
 45. Muddana, V., Lamb, J., Greer, J. B., Elinoff, B., Hawes, R. H., Cotton, P. B., Anderson, M. A., Brand, R. E., Slivka, A., & Whitcomb, D. C. (2008). Association between calcium sensing receptor gene polymorphisms and chronic pancreatitis in a US population: role of serine protease inhibitor Kazal 1 type and alcohol. *World Journal of Gastroenterology*, 14(28), 4486.
 46. Murugaian, E. E., Premkumar, R. M. R., Radhakrishnan, L., & Vallath, B. (2008). Novel mutations in

- the calcium sensing receptor gene in tropical chronic pancreatitis in India. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 43(1), 117-121.
47. Paliwal, S., Bhaskar, S., Mani, K. R., Reddy, D. N., Rao, G. V., Singh, S. P., Thomas, V., & Chandak, G. R. (2012). Comprehensive screening of chymotrypsin C (CTRC) gene in tropical calcific pancreatitis identifies novel variants. *Gut*, gutjnl-2012.
 48. Pearce, S. H. S., Wooding, C., Davies, M., Tollefsen, S. E., Whyte, M. P., & Thakker, R. V. (1996). Calcium-sensing receptor mutations in familial hypocalciuric hypercalcaemia with recurrent pancreatitis. *Clinical endocrinology*, 45(6), 675-680.
 49. Phillips, A. E., LaRusch, J., Greer, P., Abberbock, J., Alkaade, S., Amann, S. T., Anderson, M. A., Baillie, J., Banks, P. A., Brand, R. E., Conwell, D., Coté, G. A., Forsmark, C. E., Gardner, T. B., Gelrud, A., Guda, N., Lewis, M., Money, M. E., Muniraj, T., Sandhu, B. S., Sherman, S., Singh, V. K., Slivka, A., Tang, G., Wilcox, C. M., Whitcomb, D. C., & Yadav, D. (2018). Known genetic susceptibility factors for chronic pancreatitis in patients of European ancestry are rare in patients of African ancestry. *Pancreatology*, 18(5), 528-535.
 50. Racz, G. Z., Kittel, A., Riccardi, D., Case, R. M., Elliott, A. C., & Varga, G. (2002). Extracellular calcium sensing receptor in human pancreatic cells. *Gut*, 51(5), 705.
 51. Rajesh, G., Elango, E. M., Vidya, V., & Balakrishnan, V. (2009). Genotype-phenotype correlation in 9 patients with tropical pancreatitis and identified gene mutations. *Indian Journal of Gastroenterology*, 28, 68-71.
 52. Romac, J. M. J., Ohmuraya, M., Bittner, C., Majeed, M. F., Vigna, S. R., Que, J., Fee, B. E., Wartmann, T., Yamamura K., Liddle, R. A. (2010). Transgenic expression of pancreatic secretory trypsin inhibitor-1 rescues SPINK3-deficient mice and restores a normal pancreatic phenotype. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(4), G518-G524.
 53. 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., Cichoz-Lach, H., Farré, A., Frank, J., Gambaro, G., Gimpfl, S., Grallert, H., Griesmann, H., Grützmann, R., Hellerbrand, C., Hegyi, P., Hollenbach, M., Iordache, S., Jurkowska, G., Keim, V., Kiefer, F., Krug, S., Landt, O., Di Leo, M., Lerch, M. M., Lévy, P., Löffler, M., Löhr, M., Ludwig, M., Macek, M., Malats, N., Malecka-Panas, E., Malerba, G., Mann, K., Mayerle, J., Mohr, S., te Morsche, R. H. M., Motyka, M., Mueller, S., Müller, T., Nöthen, M. M., Pedrazzoli, S., Pereira, S. P., Peters, A., Pfützer, R., Real, F. X., Rebours, V., Ridinger, M., Rietschel, M., Rösmann, E., Saftoiu, A., Schneider, A., Schulz, H. U., Soranzo, N., Soyka, M., Simon, P., Skipworth, J., Stickel, F., Strauch, K., Stumvoll, M., Testoni, P. A., Tönjes, A., Werner, L., Werner, J., Wodarz, N., Ziegler, M., Masamune, A., Mössner, J., Férec, C., Michl, P., Drenth, J. P. H., Witt, H., Scholz, M., & Sahin-Tóth, M. (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.
 54. Rosendahl, J., Witt, H., Szmola, R., Bhatia, E., Özsvári, B., Landt, O., Schulz, H. U., Gress, T. M., Pfützer, R., Löhr, M., Kovacs, P., Blüher, M., Stumvoll, M., Choudhuri, G., Hegyi, P., te Morsche, R. H. M., Drenth, J. P. H., Truninger, K., Macek Jr, M., Puhl, G., Witt, U., Schmidt, H., Büning, C., Ockenga, J., Kage, A., Groneberg, D. A., Nickel, R., Berg, T., Wiedenmann, B., Bödeker, H., Keim, V., Mössner, J., Teich, N., & Sahin-Tóth, M. (2008). Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nature genetics*, 40(1), 78-82.
 55. Sahin-Tóth, M. (2020). Channelopathy of the pancreas causes chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 158(6), 1538-1540.
 56. Sahin-Tóth, M. (2017). Genetic risk in chronic pancreatitis: the misfolding-dependent pathway. *Current opinion in gastroenterology*, 33(5), 390.
 57. Schubert, S., Traub, F., Brakensiek, K., von Kopylow, K., Marohn, B., Maelzer, M., Gaedcke, J., Kreipe, H. & Stuhmann, M. (2014). CFTR, SPINK1, PRSS1, and CTRC mutations are not associated with pancreatic cancer in German patients. *Pancreas*, 43(7), 1078-1082.
 58. Sofia, V. M., Da Sacco, L., Surace, C., Tomaiuolo, A. C., Genovese, S., Grotta, S., Gnazzo, M., Petrocchi, S., Ciocca, L., Alghisi, F., Montemitro, E., Martemucci, L., Elce, A., Lucidi, V., Castaldo, G., & Angioni, A. (2016). Extensive molecular analysis suggested the strong genetic heterogeneity of idiopathic chronic pancreatitis. *Molecular Medicine*, 22(1), 300-309.
 59. Szabó, A., Ludwig, M., Hegyi, E., Szépeová, R., Witt, H., & Sahin-Tóth, M. (2015). Mesotrypsin signature mutation in a chymotrypsin C (CTRC) variant associated with chronic pancreatitis. *Journal of Biological Chemistry*, 290(28), 17282-17292.
 60. Szabó, A., & Sahin-Tóth, M. (2012). Increased activation of hereditary pancreatitis-associated human cationic trypsinogen mutants in presence of chymotrypsin C. *Journal of Biological Chemistry*, 287(24), 20701-20710.
 61. Szmola, R., Bence, M., Carpentieri, A., Szabó, A., Costello, C. E., Samuelson, J., & Sahin-Toth, M.

- (2011). Chymotrypsin C is a co-activator of human pancreatic procarboxypeptidases A1 and A2. *Journal of biological chemistry*, 286(3), 1819-1827
62. Szmola, R., & Sahin-Tóth, M. (2009). Pancreatitis-associated chymotrypsinogen C (CTRC) mutant elicits endoplasmic reticulum stress in pancreatic acinar cells. *Gut*, gut-2009.
 63. Vezzoli, G., Terranegra, A., Arcidiacono, T., Biasion, R., Coviello, D., Syren, M. L., Paloschi, V., Giannini, S., Mignogna, G., Rubinacci, A., Ferraretto, A., Cusi, D., Bianchi, G., & Soldati, L. (2007). R990G polymorphism of calcium-sensing receptor does produce a gain-of-function and predispose to primary hypercalciuria. *Kidney international*, 71(11), 1155-1162.
 64. Whitcomb, D. C., Gorry, M. C., Preston, R. A., Furey, W., Sossenheimer, M. J., Ulrich, C. D., Martin, S. P., Gates Jr., L. K., 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.
 65. Witt, H., Luck, W., Hennies, H. C., Claßen, M., Kage, A., Laß, U., Landt, O., & Becker, M. (2000). Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nature genetics*, 25(2), 213-216.
 66. Witt, H., Sahin-Tóth, M., Landt, O., Chen, J. M., Kähne, T., Drenth, J. P., Kukor, Z., Szepessy, E., Halangk, W., Dahm, S., Rohde, K., Schulz, H. U., Le Maréchal, C., Akar, N., Ammann, R. W., Truninger, K., Bargetzi, M., Bhatia, E., Castellani, C., Cavestro, G. M., Cerny, M., Destro-Bisol, G., Spedini, G., Eiberg, H., Jansen, J. B. M. J., Koudova, M., Rausova, E., Macek Jr, M., Malats, N., Real, F. X., Menzel, H. J., Moral, P., Galavotti, R., Pignatti, P. F., Rickards, O., Spicak, J., Zarnescu, N. O., Böck, W., Gress, T. M., Friess, H., Ockenga, J., Schmidt, H., Pfützer, R., Löhr, M., Simon, P., Weiss, F. U., Lerch, M. M., Teich, N., Keim, V., Berg, T., Wiedenmann, B., Luck, W., Groneberg, D. A., Becker, M., Keil, T., Kage, A., Bernardova, J., Braun, M., Güldner, C., Halangk, J., Rosendahl, J., Witt, U., Treiber, M., Nickel, R., & Férec, C. (2006). A degradation-sensitive anionic trypsinogen (PRSS2) variant protects against chronic pancreatitis. *Nature genetics*, 38(6), 668-673.
 67. Yadav, D., & Lowenfels, A. B. (2013). The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 144(6), 1252-1261.
 68. 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., He, L., Masson, E., Cooper, D. N., Férec, C., Li, Z. S., Chen, J. M., & Liao, Z. (2018). SPINK1, PRSS1, CTRC, and CFTR genotypes influence disease onset and clinical outcomes in chronic pancreatitis. *Clinical and translational gastroenterology*, 9(11).
 69. Zou, W. B., Wang, Y. C., Ren, X. L., Wang, L., Deng, S. J., Mao, X. T., Li, Z. S., & Liao, Z. (2020). TRPV6 variants confer susceptibility to chronic pancreatitis in the Chinese population. *Human Mutation*, 41(8), 1351-1357.

10. Értekezéshez kapcsolódó publikációk

1. Takáts, A., Berke, G., Szentesi, A., Farkas Jr, G., Izbéki, F., Eróss, B., Czakó, L., Vincze Á., Hegyi, P., & Hegyi, E. (2021). Common calcium-sensing receptor (CASR) gene variants do not modify risk for chronic pancreatitis in a Hungarian cohort. *Pancreatology*, 21(7), 1305-1310.
2. Takáts, A., Berke, G., Gede, N., Németh, B. C., Witt, H., Głuszek, 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.