



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

Die Rolle der Lipasen bei der Entstehung der chronischen Pankreatitis

Denise A. N. Epple

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Heiko Witt
2. Prof. Dr. Helmut Friess
3. Prof. Dr. Roland M. Schmid

Die Dissertation wurde am 06.10.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.05.2023 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	4
Abbildungen	5
Tabellen.....	6
1 Einleitung	7
1.1 Chronische Pankreatitis.....	7
1.2 Krankheitsmodell der hereditären chronischen Pankreatitis	8
1.3 Genetischer Hintergrund der chronischen Pankreatitis.....	10
1.3.1 Kationisches (PRSS1) und anionisches Trypsinogen (PRSS2).....	10
1.3.2 Serinproteaseinhibitor Kazal Typ 1 (SPINK1)	10
1.3.3 Chymotrypsin C (CTRC).....	12
1.3.4 Carboxypeptidase A1 (CPA1).....	12
1.3.5 Chymotrypsin B (CTRB1/CTRB2).....	13
1.3.6 Chymotrypsin-like Elastase 3B (CELA3B)	14
1.3.7 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR).....	15
1.3.8 Claudin 2 (CLDN2)	16
1.3.9 Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily Member 6 (TRPV6).....	17
1.3.10 Calcium-sensing-Rezeptor (CASR)	18
1.4 Die Rolle der Lipasen bei chronischer Pankreatitis.....	19
1.4.1 Carboxylester-Lipase (CEL).....	19
1.4.2 Pankreatische Phospholipase A2 (PLA2G1B).....	21
1.4.3 Pankreatische Lipase (PNLIP).....	22

1.5	Fragestellung	23
2	Studienkollektiv und Materialien	25
2.1.	Studienteilnehmer	25
2.2	Verbrauchsmaterialien	26
2.3	Geräte und Software.....	27
3	Methoden.....	28
3.1	DNA-Extraktion	28
3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
3.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	30
3.3.1	Herstellung der Gel-Matrix.....	30
3.3.2	Elektrophorese und Silberfärbung	31
3.4	Verdau	32
3.5	Sequenzierung.....	32
3.6	Schmelzkurven-Analyse	34
3.7	Statistik	36
4	Ergebnisse	37
4.1	<i>CEL-HYB</i> bei Patienten mit chronischer Pankreatitis	37
4.2	<i>PLA2G1B</i> -Varianten	39
4.3	<i>PNLIP</i> -Missense-Mutationen	39

5	Diskussion.....	41
5.1	<i>CEL-HYB</i> bei Patienten mit idiopathischer/hereditärer und alkohol-induzierter chronischer Pankreatitis	41
5.2	<i>PLA2G1B</i> -Varianten bei chronischer Pankreatitis	45
5.3	<i>PNLIP</i> -Missense-Varianten bei chronischer Pankreatitis.....	45
5.4	Rolle der Lipasen.....	47
6	Zusammenfassung	51
7	Abstract	53
8	Literaturverzeichnis.....	55
9	Publikationen	72
10	Danksagung	73

Abkürzungen

AAP	Antarktische alkalische Phosphatase
APS	Ammoniummoersulfat-Lösung
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
CLDN2	Claudin 2
CASR	Calcium-sensing-Rezeptor
CEL	Carboxylester-Lipase
CELA3B	Chymotrypsin-like-Elastase 3B
CEL-HYB	Carboxylester-Lipase Hybrid-Allel
CELP	Carboxylester-Lipase Pseudogen
CEL-WT	Carboxylester-Lipase Wildtyp
CF	Zystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CPA1	Carboxypeptidase A1
CPA2	Carboxypeptidase A2
CPB1	Carboxypeptidase B
CTRB1/2	Chymotrypsinogen B1 und B2
CTRC	Chymotrypsinogen C
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FHH	familiäre hypokalzurische Hyperkalzämie
g	Gramm
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells)
LC3-II	Mikrotubulus-assoziierte Protein Leichtkette 3 (microtubule-associated protein light chain)
m	milli (10 ⁻³)
min	Minuten
MODY8	Maturity-onset Diabetes of the Young
MORC4	MORC family CW-type zinc finger 4

DIOS	distales intestinales Obstruktionssyndrom
sek	Sekunden
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism)
SPINK1	Serinproteaseinhibitor Kazal Typ 1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PLA2G1B	Phospholipase A2 Gruppe IB
PNLIP	Pankreatische Lipase
PRSS1	kationisches Trypsinogen
PRSS2	anionisches Trypsinogen
PRSS3	Mesotrypsinogen
RNA	Ribonukleinsäure
TRPV6	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member
VNTR	variable Anzahl von sich wiederholenden Tandems (variable number of tandem repeats)

Abbildungen

Abbildung 1	Modell der hereditären chronischen Pankreatitis	Seite 9
Abbildung 2	Struktur von CEL und CELP	Seite 19
Abbildung 3	Hypothetischer Entstehungsmechanismus der beiden Hybrid-Allele	Seite 21
Abbildung 4	Schematische Darstellung des Duplikations-Hybrid-Allels und des Deletions-Hybrid-Allels	Seite 21
Abbildung 5	Beispiel für eine Schmelzkurven-Analyse für das primäre CEL-HYB-Screening	Seite 36
Abbildung 6	Modell der hereditären chronischen Pankreatitis mit einer Übersicht aller bisher bekannten und der beiden neu identifizierten Risikogene	Seite 48

Tabellen

Tabelle 1	PCR-Primer für die Validierung der positiven Proben für <i>CEL-HYB</i>	Seite 29
Tabelle 2	PCR-Primer für <i>CEL</i> (Exon 1-10)	Seite 29
Tabelle 3	PCR-Primer für <i>PLA2G1B</i>	Seite 29
Tabelle 4	PCR-Primer für <i>PNLIP</i>	Seite 29
Tabelle 5	Sequenzierungsprimer und Annealing-Temperaturen für die Validierung des <i>CEL-HYB</i>	Seite 33
Tabelle 6	Sequenzierungsprimer und Annealing-Temperaturen für <i>CEL</i> Exon 1-10	Seite 33
Tabelle 7	Sequenzierungsprimer und Annealing-Temperaturen für <i>PLA2G1B</i>	Seite 34
Tabelle 8	Sequenzierungsprimer und Annealing-Temperaturen für <i>PNLIP</i>	Seite 34
Tabelle 9	Verteilung der heterozygoten <i>CEL-HYB</i> -Träger bei deutschen Patienten mit nicht alkoholischer und alkoholischer chronischer Pankreatitis und Kontrollen	Seite 37
Tabelle 10	<i>CEL</i> -Varianten in der Region von Exon 1 bis 10 bei deutschen Patienten mit nicht-alkoholischer chronischer Pankreatitis und Kontrollen	Seite 38
Tabelle 11	<i>PLA2G1B</i> -Varianten bei Kontrollpersonen und Patienten mit chronischer Pankreatitis	Seite 39
Tabelle 12	<i>PNLIP</i> -Varianten bei Patienten und Kontrollpersonen mit chronischer Pankreatitis	Seite 39
Tabelle 13	Übersicht der bekannten und der beiden neu identifizierten azinären Risikogene für chronische Pankreatitis	Seite 49
Tabelle 14	Übersicht der bekannten duktaalen Risikogene für chronische Pankreatitis	Seite 50

1 Einleitung

1.1 Chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis ist eine Erkrankung der Bauchspeicheldrüse, bei der es durch anhaltende oder rezidivierende Entzündungsprozesse zu einem fibrotischen Umbau des Drüsenparenchyms kommt. Hieraus kann eine Insuffizienz der exokrinen und/oder endokrinen Drüsenfunktion resultieren. Der klinische Verlauf während eines akuten Schubs kann von einer leichten, ödematös-interstitiellen bis hin zu einer hämorrhagisch-nekrotisierenden Inflammation reichen (Witt, 2002).

Morphologisch findet sich im fortgeschrittenen Krankheitsstadium eine unregelmäßige Sklerosierung des Organs mit herdförmiger, segmentaler oder diffuser Zerstörung des Parenchyms. Im pankreatischen Gangsystem lassen sich häufig auch Dilatationen, Strikturen sowie intraduktale Konkremente in Form von Proteinausfällungen nachweisen (Lankisch & Layer, 2000).

Klinisch präsentiert sich die chronische Pankreatitis beim Erwachsenen durch rezidivierende oder persistierende abdominelle Schmerzen, die meistens im Oberbauch lokalisiert sind und gürtelförmig in den Rücken ausstrahlen können. Im Kindesalter sind dauerhafte Schmerzzustände selten, hier treten die Schmerzen meistens akut und rezidivierend auf und sind vornehmlich epigastrisch lokalisiert. Weitere häufige Symptome sind Übelkeit und Erbrechen. Im Endstadium kann es außerdem durch den Mangel an Verdauungsenzymen zu Steatorrhoe und durch den fortschreitenden Verlust von Inselzellen zu einem pankreopriven Diabetes mellitus kommen.

Die Inzidenz der Erkrankung im Erwachsenenalter beträgt weltweit zwischen 1,6-23 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner (Hoffmeister et al., 2012). Diese Daten können jedoch nicht auf das Kindesalter übertragen werden, da bei ca. 70-80% aller erwachsenen Patienten in den westlichen Ländern ein langjähriger Alkoholabusus vorliegt und dieser Pathomechanismus im Kindesalter keine bzw. nur extrem selten eine Rolle spielt. Neben dem Alkoholabusus als wichtigste Ursache für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis sind auch noch weitere auslösende Faktoren bekannt,

wie anatomische Anomalien, die zystische Fibrose und Systemerkrankungen. Diese sind jedoch eher selten und bei ca. 10-30% aller Patienten kann keine auslösende Ursache gefunden werden, was als idiopathische chronische Pankreatitis bezeichnet wird.

1952 beschrieben Comfort und Steinberg zum ersten Mal ein familiär gehäuftes Auftreten der chronischen Pankreatitis (Comfort & Steinberg, 1952). Diese sogenannte hereditäre Form der Pankreatitis ist durch eine positive Familienanamnese, wiederkehrende Pankreatitisschübe seit der Kindheit, eine gleiche Geschlechtsverteilung und das Fehlen prädisponierender Faktoren gekennzeichnet und folgt einem autosomal dominanten Erbgang (Perrault, 1994). Neuere genetische Untersuchungen legen nahe, dass einem erheblichen Prozentsatz der Fälle von idiopathischer Pankreatitis eine genetische Ursache zugrunde liegen könnte (Teich et al., 2006).

1.2 Krankheitsmodell der hereditären chronischen Pankreatitis

Bereits 1896 vermutete Hans Chiari, dass die Pankreatitis aus einer Selbstverdauung des Organs resultiere (Chiari, 1896). Vor allem die vorzeitige Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin scheint hierbei eine elementare Rolle zu spielen, da Trypsin sowohl sich selbst als auch alle anderen proteolytischen Vorläuferenzyme aktivieren und somit die pankreatische Enzymkaskade initiieren kann (Steer & Meldolesi, 1987).

Es gibt mehrere Mechanismen, mit denen sich das Pankreas vor einer Selbstzerstörung durch die Verdauungsenzyme schützt. Neben einer niedrigen Kalziumkonzentration und einem sauren pH-Wert in den Granula erfolgt die Synthese und Sekretion der Enzyme in Form von inaktiven Vorstufen (Zymogene), die erst im Duodenum aktiviert werden, wo die Enteropeptidase Trypsinogen zu Trypsin umwandelt. Trypsinogen kommt im Pankreassaft in drei verschiedenen Isoformen vor, die anhand ihrer elektrophoretischen Eigenschaften kationisches Trypsinogen (PRSS1), anionisches Trypsinogen (PRSS2) und Mesotrypsinogen (PRSS3) genannt werden. Das kationische Trypsinogen macht ca. 2/3 und das anionische Trypsinogen ca. 1/3 des Gesamttrypsinogens aus, Mesotrypsin hingegen wird nur in geringen

Mengen sezerniert (Scheele et al., 1981). Kationisches Trypsinogen lässt sich im Vergleich zu den anderen beiden Formen leichter autoaktivieren und ist gegenüber Inaktivierung resistenter (Colomb et al., 1978)(Whitcomb et al., 1996).

Auch unter physiologischen Bedingungen können geringe Mengen des Trypsinogens bereits im Pankreas autoaktiviert werden. In diesem Fall wird die Autodigestion auf zwei Arten verhindert. Zum einen werden Trypsin und auch andere Proteasen durch Trypsin selbst und trypsinähnliche Enzyme wie Chymotrypsin C (CTRC) gehemmt (Szmola & Sahin-Tóth, 2007). Zum anderen wurde bereits 1948 durch Kazal und Mitarbeiter gezeigt, dass der Serinproteaseinhibitor Kazal Typ 1 (SPINK1) Trypsin inaktivieren kann (Kazal et al., 1948).

Es wird daher angenommen, dass die Pankreatitis zum Teil aus einem Ungleichgewicht der intrapankreatischen Proteasen und ihrer Inhibitoren resultiert.

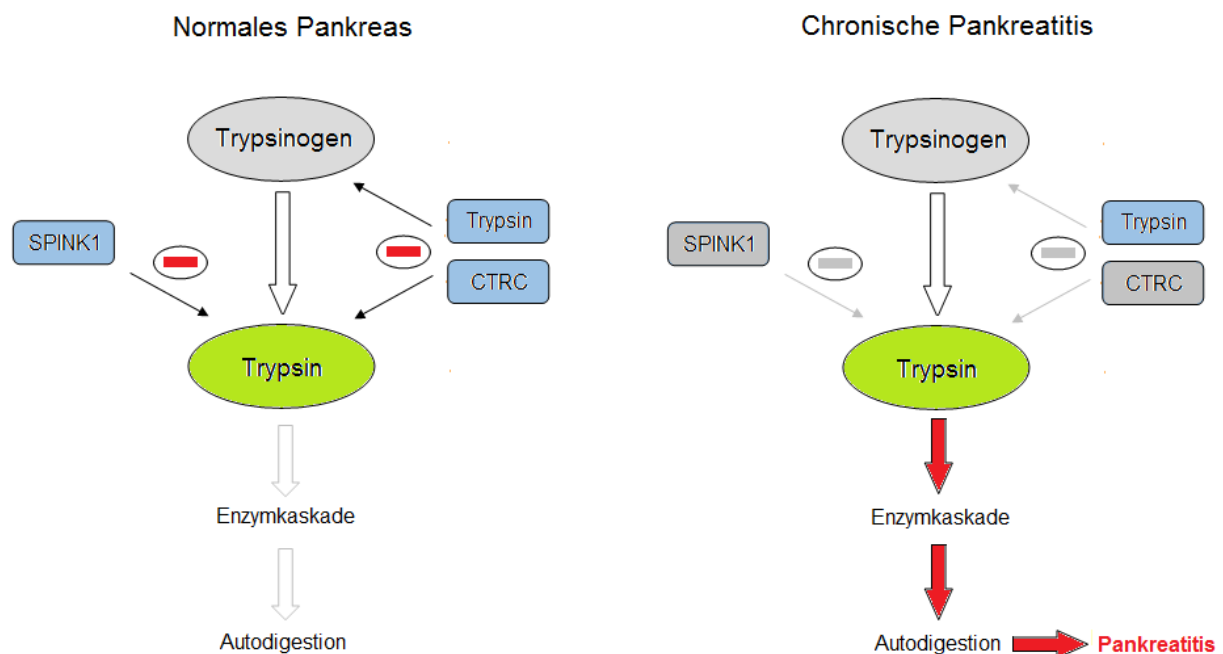


Abbildung 1: Modell der hereditären chronischen Pankreatitis. Im gesunden Pankreas verhindern SPINK1 durch Inhibierung der Trypsin-Aktivität und CTCR durch Trypsin- und Trypsinogen-Spaltung die Initiierung der Enzymkaskade. Bei Mutationen im Trypsinogen (PRSS1), SPINK1 oder CTCR kommt es zu einer vermehrten Trypsin-Aktivität und dadurch zur Autodigestion und Pankreatitis (nach Rosendahl et al.2008).

1.3 Genetischer Hintergrund der chronischen Pankreatitis

Bisher konnten verschiedene Gene identifiziert werden, deren Mutationen unterschiedlich stark mit der Entstehung einer chronischen Pankreatitis assoziiert sind.

1.3.1 Kationisches (PRSS1) und anionisches Trypsinogen (PRSS2)

Bereits 1996 gelang es, eine Mutation im *PRSS1*-Gen zu identifizieren, die zu chronischer Pankreatitis führen kann (Whitcomb et al., 1996). Es handelte sich um einen Arginin-Histidin-Austausch an Position 122 des Proteins (p.R122H), der zu einer erhöhten Autoaktivierung und zu einem verminderten Abbau des kationischen Trypsinogens führt (Sahin-Tóth & Tóth, 2000). Seither konnten noch weitere *PRSS1*-Mutationen nachgewiesen werden (Gorry et al., 1997)(Teich et al., 1998)(Witt et al., 1999), die alle gemeinsam haben, dass sie zu einer vermehrten Trypsinogen-Aktivierung oder auch zu einer vermehrten Trypsin-Stabilisierung führen. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Trypsin-Aktivität im Pankreas, die ein Risiko für Autodigestion und Pankreatitis darstellt.

Auch bei der Untersuchung von *PRSS2* konnte eine genetische Variation gefunden werden. Doch im Gegensatz zu den Mutationen im *PRSS1* trat die genetische Variation, die zu einem Glycin-Arginin-Austausch an Position 191 führt (p.G191R), signifikant gehäuft bei den gesunden Kontrollpersonen auf, was einen protektiven Effekt der Mutation nahe legt.

Nach Aktivierung des rekombinanten R191-Proteins zeigte sich ein vollständiger Verlust der enzymatischen Trypsin-Aktivität, da durch die Mutation eine neue Spaltungsstelle entsteht, die das Enzym deutlich anfälliger für autokatalytische Spaltung macht (Witt et al., 2006).

1.3.2 Serinproteaseinhibitor Kazal Typ 1 (SPINK1)

Der Serinproteaseinhibitor Kazal Typ 1 (SPINK1) wird von den Azinuszellen des Pankreas sezerniert und kann durch Komplexbildung mit dem aktiven Zentrum von

Trypsin selbiges inhibieren (Laskowski & Wu, 1953). Dadurch soll die durch Trypsin katalysierte vorzeitige Aktivierung der Enzymkaskade im Pankreas und somit die Autodigestion verhindert werden. SPINK1 konnte erstmals 1948 von Kazal und seinen Mitarbeitern bei einem Nebenschritt zur kommerziellen Insulingewinnung aus dem Rinderpankreas isoliert werden (Kazal et al., 1948). Er wird vor allem im Pankreas exprimiert, kann jedoch auch im Gastrointestinaltrakt und in zahlreichen anderen Geweben wie Leber, Harnblase, Ovarien und Brustdrüsen nachgewiesen werden. Daher wird vermutet, dass SPINK1 neben seiner Funktion als intrapankreatischer Trypsin-Inhibitor auch die gastrointestinale Epithelschicht vor Autodigestion durch intraluminale Proteasen schützt und möglicherweise auch eine Rolle bei der Wundheilung spielt (Marchbank et al., 1998).

Im Jahr 2000 gelang es erstmals, Mutationen im *SPINK1*-Gen zu identifizieren, die mit chronischer Pankreatitis assoziiert sind (Witt et al., 2000). Am häufigsten konnte eine Punktmutation im Exon 3 nachgewiesen werden, die zu einem Asparagin-Serin-Austausch an Position 34 des Proteins führt (p.N34S). Es wird jedoch angenommen, dass ein heterozygoter Vorliegen der N34S-Variante alleine nicht zur Entstehung einer Pankreatitis ausreicht, da auch ca. 1-2 % der Bevölkerung heterozygote Träger dieser Mutation sind. Vermutlich kommt es erst in Kombination mit weiteren Genveränderungen oder Umweltfaktoren zum Ausbruch der Erkrankung. Obwohl schon lange vermutet wurde, dass die N34S-Mutation zu einem Verlust der Inhibitor-Funktion von SPINK1 führt, konnte der genaue Pathomechanismus lange nicht identifiziert werden. Erst seit kurzem gibt es Daten, die die Vermutung nahe legen, dass die N34S-Variante zu einer verminderten SPINK1-Expression führt (É. Kereszturi & Sahin-Tóth, 2017).

Inzwischen konnten noch weitere *SPINK1*-Mutationen nachgewiesen werden, die jedoch im Vergleich zur N34S-Variante deutlich seltener auftreten und zum Teil verminderte SPINK1-Expression oder -Sekretion zur Folge haben (M. H. M. Derikx et al., 2015). Außerdem konnte gezeigt werden, dass *SPINK1*-Mutationen auch eine Rolle bei der Entstehung von alkohol-induzierter chronischer Pankreatitis (Witt et al., 2001) und tropischer kalzifizierender Pankreatitis (Chandak et al., 2002) spielen.

1.3.3 Chymotrypsin C (CTRC)

Chymotrypsin C (CTRC) ist ein Enzym, das ausschließlich im Pankreas als inaktive Vorstufe (Chymotrypsinogen) synthetisiert wird und nach Aktivierung Trypsin und alle Trypsinogen-Isoformen (kationisches Trypsinogen, anionisches Trypsinogen, Mesotrypsinogen) mit hoher Spezifität spalten kann (Szmola & Sahin-Tóth, 2007). Durch die Spaltung von intrapancreatisch aktiviertem Trypsin beugt Chymotrypsin C so der Autodigestion vor. In Gegenwart hoher Kalziumkonzentrationen, wie sie im Duodenum vorkommen, wirkt Chymotrypsin C wiederum als Trypsinogen-Aktivator. Bei abfallender Kalziumkonzentration im Jejunum und Ileum dagegen wird Trypsin durch Chymotrypsin C degradiert (Szmola & Sahin-Tóth, 2007).

Da Trypsin eine Schlüsselrolle in der Initiierung der pankreatischen Enzymkaskade spielt und Mutationen, die zu einer erhöhten Trypsin-Aktivität führen, nachweislich zur Entstehung einer Pankreatitis beitragen können, war es naheliegend, dass auch Chymotrypsin C ein vielversprechendes Kandidatengen darstellt. Tatsächlich gelang es 2008, mehrere Varianten im *CTRC* zu identifizieren, die mit Pankreatitis assoziiert sind (Rosendahl et al., 2008). Am häufigsten traten zwei Mutationen im Exon 7 auf (p.R254W und p.K247_R254del), die signifikant gehäuft bei Patienten mit idiopathischer chronischer und alkohol-induzierter Pankreatitis zu finden waren. In der funktionellen Untersuchung der gefundenen Mutationen konnten ein Funktionsverlust, eine verminderte Synthese oder eine gestörte Sekretion von Chymotrypsin C als mögliche Pathomechanismen nachgewiesen werden. Der dadurch fehlende protektive Effekt auf die vorzeitige Trypsin-Aktivierung erklärt das erhöhte Risiko für die Entstehung einer Pankreatitis.

1.3.4 Carboxypeptidase A1 (CPA1)

Die Carboxypeptidase A1 (CPA1) gehört zu den pankreatischen Metalloproteasen, die die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen vom C-terminalen Ende der Peptide aus katalysieren. Zu der Gruppe der Carboxypeptidasen zählen drei verschiedene Unterformen, die Carboxypeptidase A1 (CPA1) und A2 (CPA2), die aromatische Aminosäuren spalten, sowie die Carboxypeptidase B (CPB1), die basische

Aminosäuren spaltet (Vendrell et al., 2000). Die Carboxypeptidase A1 wird ausschließlich im Pankreas gebildet und als inaktive Vorstufe (Procarboxypeptidase A1) sezerniert. Die Aktivierung erfolgt durch Trypsin im Duodenum. Procarboxypeptidase A1 stellt nach Trypsinogen das am zweithäufigsten synthetisierte Enzym des Pankreassekrets dar (Scheele et al., 1981).

Im Jahr 2013 fanden Witt und Mitarbeiter mehrere *CPA1*-Mutationen, die gehäuft bei Patienten mit chronischer Pankreatitis auftraten (Witt et al., 2013). Besonders häufig konnten diese Mutationen bei sehr jungen Patienten nachgewiesen werden, vor allem in der Gruppe der bis 10-Jährigen. Da es keinen bekannten Einfluss von CPA1 auf die Trypsin-Aktivität gibt, wurde im Folgenden untersucht, wie CPA1-Varianten zur Entstehung von Pankreatitis führen können. Funktionelle Analysen ergaben, dass die am häufigsten gefundene CPA1-Variante in den Azinuszellen von Ratten intrazelluläre Schäden verursacht, die wahrscheinlich auf die Ansammlung von Proteinen mit fehlerhafter Faltung im endoplasmatischen Retikulum (ER) zurück zu führen sind. Die Tatsache, dass CPA1 eines der meistsezernierten Enzyme im Pankreassekret ist, unterstützt die These, dass ER-Stress einen Effekt auf die Entstehung einer Pankreatitis haben können.

1.3.5 Chymotrypsin B (CTRB1/CTRB2)

Chymotrypsin B (CTRB1/CTRB2) gehört wie Chymotrypsin C zur Familie der Serinproteasen und wird ausschließlich im Pankreas exprimiert. Nach Sezernierung als inaktives Chymotrypsinogen wird es im Dünndarm durch Trypsin aktiviert. Intrapankreatisch inaktiviert Chymotrypsin B und insbesondere die Isoform CTRB2 aktiviertes Trypsin und beugt so einer Autodigestion vor. 2018 gelang es Rosendahl und Mitarbeitern, in einer genomweiten Assoziationsstudie zu Patienten mit alkoholischer chronischer Pankreatitis eine Assoziation mit einer 16,6kb-Inversion im *CTRB1-CTRB2*-Locus zu identifizieren (Rosendahl et al., 2018). Die Assoziation konnte auch für Patienten mit nicht-alkoholischer chronischer Pankreatitis bestätigt werden. Die Inversion verändert das Expressionsverhältnis der CTRB-Isoformen zugunsten von CTRB2 und begünstigt somit die protektive Inaktivierung von Trypsin, was die höhere Frequenz der Inversion in den Kontrollpopulationen erklärt (Rosendahl

et al., 2018). Andere seltene genetische Varianten im *CTRB1-CTRB2*-Locus konnten nicht in Zusammenhang mit alkoholischer oder nicht-alkoholischer Pankreatitis gebracht werden (Seltsam et al., 2020).

1.3.6 Chymotrypsin-like Elastase 3B (CELA3B)

2019 wurde eine Mutation in der Chymotrypsin-ähnlichen Elastase 3B (CELA3B) als neuer genetischer Risikofaktor für eine Pankreatitis beschrieben (Moore et al., 2019). CELA3B ist ein Verdauungsenzym, das ausschließlich und sehr stark in der Bauchspeicheldrüse exprimiert wird. Moore und Mitarbeiter identifizierten mittels Exomsequenzierung eine Missense-Mutation in *CELA3B*, c.268>T (p.R90C), in einer Familie mit chronischer Pankreatitis (Moore et al., 2019). Die Autoren postulierten einen autosomal-dominanten Erbgang. Allerdings wurden in dieser Studie nur zwei Patienten genetisch untersucht. Das Arginin im Codon 90 ist spezifisch für CELA3B, alle anderen humanen Elastasen haben an der entsprechenden Position ein Leucin. Die Überexpression von p.R90C und der revertanten p.R90L-Variante in HEK293T-Zellen führte zu erhöhten Spiegeln an sezerniertem sowie intrazellulärem CELA3B, während die Einführung der Mutationen p.L90C und p.L90R in *CELA3A* die Expression verringerte. Beide Mutanten wurden auch schneller durch Trypsin aktiviert. Darüber hinaus entwickelten *CELA3B* p.R89C- und p.R89L-Knock-in-Mäuse nach Caerulein-Provokation eine schwerere Pankreatitis (Moore et al., 2019). Eine französische Studie untersuchte 644 CP-Patienten auf *CELA3B*-Varianten und fand die revertante Variante c.269>T (p.R90L) bei vier Patienten, aber nicht bei 566 Kontrollen (Masson et al., 2021). In einer jüngst publizierten internationalen Studie ließ sich bei keinem Patienten eine Mutation im Codon 90 nachweisen. Allerdings fand sich sowohl in der deutschen Entdeckungskohorte wie auch in der europäischen Replikationskohorte eine signifikante Anreicherung einer Spleißstellen-Mutation (c.129+1G>A) bei Patienten (Tóth et al., 2022). Funktionell bewirkt diese Mutation einen *bona fide* Funktionsverlust, da die Position +1 bei Eukaryoten hochkonserviert ist. Inwieweit sowohl eine Funktionsvermehrung wie auch ein Funktionsverlust zur Pankreatitis disponiert, bleibt Gegenstand künftiger Untersuchungen.

1.3.7 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)

Die zystische Fibrose (CF) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung, die in Deutschland mit einer Inzidenz von etwa 1:3300 auftritt (Naehrlich et al., 2013). Bereits 1989 konnte gezeigt werden, dass ein Defekt des *CFTR*-Gens (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) ursächlich für die Erkrankung ist (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989). Bis heute wurden bereits mehr als 1900 verschiedene Mutationen des *CFTR*-Gens beschrieben, die zu einem solchen Defekt führen können. Die mit Abstand am häufigsten vorkommende Mutation ist p.F508del, eine Deletion von 3 Basen, die zum Verlust eines Phenylalanins im Codon 508 führt und ca. 70 % aller Allele bei Patienten mit zystischer Fibrose ausmacht (F.M. Müller, J.Bend, 2013). Der Gendefekt führt zu einem Funktionsverlust des gleichnamigen Chlorid-Ionen-Kanals in der Zellmembran und dadurch zu einer Viskositätserhöhung der Sekrete verschiedener Drüsenzellen. Klinisch manifestiert sich die zystische Fibrose typischerweise durch eine chronische Inflammation mit rezidivierenden Infektionen der Lunge, woraus langfristig häufig ein Lungenemphysem und eine fortschreitende respiratorische Insuffizienz resultieren. Bei den meisten Patienten finden sich außerdem eine exokrine Pankreasinsuffizienz mit Maldigestion und Steatorrhoe und im Verlauf eine endokrine Pankreasinsuffizienz mit einem CF-assoziierten Diabetes mellitus. Des Weiteren können ein distales intestinales Obstruktionssyndrom (DIOS), Gallensteine, eine Leberzirrhose und bei Männern auch eine Infertilität aufgrund einer obstruktiven Azoospermie auftreten (Farrell et al., 2008).

Etwa 1-2 % aller Patienten mit zystischer Fibrose entwickeln im Verlauf ihrer Erkrankung eine Pankreatitis. Allerdings sind hiervon fast ausschließlich Patienten betroffen, die pankreassuffizient sind. In dieser Gruppe beträgt die Prävalenz einer Pankreatitis 10-15 %. Das liegt vermutlich daran, dass es bei den Patienten mit einer frühen Pankreasinsuffizienz bereits in utero zu einer rasch fortschreitenden Zerstörung und Atrophie der Azinuszellen im Pankreas kommt und diese Patienten keine Symptome einer Pankreatitis entwickeln können. Die Tatsache, dass bei den meisten Patienten mit zystischer Fibrose bereits bei Diagnosestellung eine Pankreasinsuffizienz vorliegt, erklärt die niedrige Gesamtprävalenz für Pankreatitis (Durno et al., 2002).

1998 beschrieben zwei Arbeitsgruppen den Zusammenhang von *CFTR*-Mutationen und chronischer Pankreatitis (Cohn et al., 1998; Sharer et al., 1998). Beide konnten nachweisen, dass vor allem heterozygote *CFTR*-Varianten gehäuft bei Patienten mit idiopathischer chronischer Pankreatitis vorkommen. Es wird vermutet, dass ein Funktionsverlust des CFTR zu einem erniedrigten duktalem pH-Wert im Pankreas führt, was den intrazellulären Transport der Zymogengranula behindert und die Löslichkeit der hochkonzentrierten, intraluminalen Proteine verringert. Dadurch könnte eine intrapankreatische Aktivierung der Enzyme begünstigt und somit die Entstehung einer chronischen Pankreatitis gefördert werden (Durno et al., 2002).

2013 beschäftigten sich Rosendahl *et al.* mit der Rolle einer Kombination von genetischen Mutationen in verschiedenen Genen bei der Pathogenese von chronischer Pankreatitis (Rosendahl et al., 2013). Patienten mit chronischer Pankreatitis wurden auf das gleichzeitige Vorliegen von Varianten in *CFTR*, *SPINK1*, *CTRC* und *PRSS1* untersucht. Die Arbeitsgruppe kam zu dem Ergebnis, dass eine Häufung verschiedener *CFTR*-Varianten weniger relevant ist als bis dahin angenommen. Ein deutlicher Zusammenhang konnte jedoch für das gleichzeitige Auftreten heterozygoter Varianten in verschiedenen Genen nachgewiesen werden, was auch als Trans-Heterozygotie bezeichnet wird. Dieses Ergebnis verdeutlicht die Komplexität der verschiedenen genetischen Einflüsse, die bei der Entstehung von chronischer Pankreatitis eine Rolle spielen.

1.3.8 Claudin 2 (CLDN2)

Claudine sind eine Familie von Proteinen, die neben Occludin den wichtigsten Bestandteil der Verbindungen zwischen Epithelzellen („tight junctions“) darstellen. Dadurch bilden sie eine Diffusionsbarriere, die den parazellulären Transport von Molekülen reguliert. Jedes der Claudine besitzt ein organspezifisches Expressionsmuster, das die Eigenschaften der jeweiligen Barriere bestimmt. Im Pankreas wird Claudin 2 (CLDN2) hauptsächlich in den duktalem Epithelzellen exprimiert (Rahner et al., 2001). Im Schweinemodell lässt sich im Verlauf einer akuten Pankreatitis jedoch auch eine erhöhte Expression in den azinären Zellen nachweisen (Meriläinen et al., 2008).

In einer genomweiten Assoziationsstudie konnten zwei Einzelnukleotidpolymorphismen, rs12688220 und rs7057398, im X-chromosomalen *CLDN2-MORC4*-Locus identifiziert werden, die mit chronischer Pankreatitis assoziiert sind (Whitcomb et al., 2012). Die Assoziation war besonders signifikant für männliche Patienten mit alkohol-induzierter chronischer Pankreatitis. Bei den betroffenen Patienten konnte sowohl eine erhöhte Claudin-2-Expression in den azinären Zellen des Pankreas als auch insgesamt nachgewiesen werden. Der genaue Pathomechanismus für die Entstehung einer Pankreatitis bleibt jedoch unklar. Auch in anderen Studien konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (M. H. Derikx et al., 2015) (Masamune et al., 2015).

1.3.9 Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily Member 6 (TRPV6)

Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily Member 6 (TRPV6) ist ein epithelialer Calcium(Ca^{2+})-Kanal, der zu einer Untergruppe („V“ für Vanilloid) der Familie der TRP (Transient Receptor Potential) Kanäle gehört. TRPV6 wird von zahlreichen Geweben exprimiert, beim Menschen findet er sich vor allem im Darm, in der Niere, in der Placenta und in exokrinen Organen wie Pankreas, Speicheldrüse oder Prostata. Im Pankreas wird TRPV6 hauptsächlich in den duktalem Epithelzellen exprimiert. Durch seine hohe Selektivität für Ca^{2+} -Ionen spielt TRPV6 eine essentielle Rolle bei der intestinalen Ca^{2+} -Resorption, der renalen Ca^{2+} -Reabsorption sowie dem Erhalt einer niedrigen Ca^{2+} -Konzentration in bestimmten Organen (Yelshanskaya et al., 2021) (Khattar et al., 2022).

Es ist bekannt, dass eine hohe Ca^{2+} -Konzentration im Pankreas durch eine vorzeitige Trypsinogen-Aktivierung zur Entstehung einer Pankreatitis führen kann (Krüger et al., 2000)(Gerasimenko et al., 2014). 2020 konnte eine internationale Studie nachweisen, dass *TRPV6*-Varianten, die zu einem Funktionsverlust des Kanals führen, mit nichtalkoholischer chronischer Pankreatitis assoziiert sind. Im Tiermodell zeigte sich, dass Mäuse mit einer homozygoten *TRPV6*-Mutation nach Gabe von Caerulein einen schwereren Verlauf der Pankreatitis mit ausgeprägteren histologischen

Veränderungen und Pankreasfibrose aufwiesen als Wildtypmäuse (Masamune et al., 2020).

1.3.10 Calcium-sensing-Rezeptor (CASR)

Der Calcium-sensing-Rezeptor (CASR) ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der eine Schlüsselrolle bei der Bestimmung und Regulation des extrazellulären Kalziumspiegels spielt. Er wird vor allem in der Nebenschilddrüse und in der Niere exprimiert, wo er die Parathormon-Sekretion und die renale Kalziumausscheidung steuert, findet sich aber auch in zahlreichen anderen Organen. Im Pankreas kommt CASR hauptsächlich in den dukталen Zellen vor und reguliert vermutlich über Bikarbonatsekretion die Kalziumkonzentration der Pankreassekrete (Bruce et al., 1999)(Rácz et al., 2002).

Heterozygote Mutationen des Rezeptors, die einen Funktionsverlust zur Folge haben, führen zur familiären hypokalzurischen Hyperkalzämie (FHH), die mit moderat erhöhten Serum-Calciumspiegeln, einer verminderten renalen Calciumausscheidung und normal bis leicht erhöhten Parathormonspiegeln einhergeht (Hannan et al., 2010). Obwohl Hyperkalzämie ein bekannter Risikofaktor für die Entstehung einer Pankreatitis ist, tritt diese bei der FHH nur in seltenen Fällen auf. 2003 untersuchten Felderbauer und Mitarbeiter eine Familie mit FHH und chronischer Pankreatitis und fanden eine Transheterozygotie für die *CASR*-Mutation p.L173P und für *SPINK1* p.N34S (Felderbauer et al., 2003). Bei der Analyse von 19 Familien mit chronischer Pankreatitis konnte die Gruppe einen weiteren Patienten identifizieren, der neben *SPINK1* p.N34S auch eine *CASR*-Mutation (p.R896H) trug (Felderbauer et al., 2006). In einer indischen Studie mit 35 Patienten mit tropischer chronischer Pankreatitis (TCP) und 35 Kontrollen wurden 4 verschiedene *CASR*-Mutationen bei 5 Patienten nachgewiesen. Bei 6 % der Patienten lag gleichzeitig noch eine *SPINK*-Mutation (p.N34S) vor. In der Kontrollgruppe fanden sich keine Mutationen (Murugaian et al., 2008). Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass *CASR*-Mutationen vor allem bei Trägern einer *SPINK*-Variante zur Entstehung einer Pankreatitis beitragen könnten. Mehrere internationale Gruppen untersuchten daraufhin größere Patientenkollektive mit chronischer Pankreatitis und fanden verschiedene *CASR*-Mutationen, die jedoch

alle nicht signifikant gehäuft bei den Patienten im Vergleich zu den Kontrollen auftraten (Masson et al., 2015)(Ewers et al., 2021)(Takáts et al., 2021). Insgesamt konnte eine klare Assoziation von *CASR*-Mutationen mit chronischer Pankreatitis somit bisher nicht nachgewiesen werden und die Rolle von *CASR* bleibt unklar.

1.4 Die Rolle der Lipasen bei chronischer Pankreatitis

Da die Mutationen, die bisher in Zusammenhang mit der Entstehung von chronischer Pankreatitis gebracht werden konnten, vor allem Enzyme aus dem Proteasen-/ Antiproteasen-System betreffen, sollte sich diese Arbeit mit drei Genen beschäftigen, die für pankreatische Lipasen kodieren. Für alle drei Gene liegen verschiedene *in vitro*- und / oder *in vivo*-Daten vor, die auf einen Zusammenhang hinweisen, und sie somit zu plausiblen Kandidatengenen machen.

1.4.1 Carboxylester-Lipase (CEL)

Die Carboxylester-Lipase (CEL, auch Gallensalz-aktivierte-Lipase (BAL) genannt) wird hauptsächlich in den Azinuszellen des Pankreas und in der laktierenden Brustdrüse gebildet (Lombardo, 2001; Nilsson et al., 1990). Das Enzym wird durch Gallensalze im Duodenum aktiviert und ist an der Aufspaltung und Resorption von Cholesterinestern und fettlöslichen Vitaminen beteiligt. Am Genort von CEL auf Chromosom 9q34.2 befindet sich neben *CEL* auch noch das *CEL*-Pseudogen *CELP*. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Genen besteht darin, dass bei *CELP* Exon 2-7 fehlen und sich ein Stop-Codon im zweiten Exon befindet (Abbildung 2). Ansonsten sind sich die beiden Genomsequenzen sehr ähnlich (Lidberg et al., 1992; Madeyski et al., 1998).

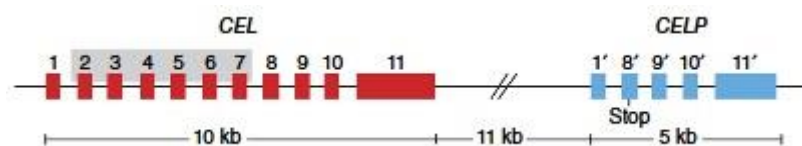


Abbildung 2: Struktur von *CEL* und *CELP*. Im Unterschied zu *CEL* fehlen bei *CELP* Exon 2-7 und im zweiten Exon von *CELP* befindet sich ein Stop-Codon (Fjeld et al. 2015).

Das letzte der 11 *CEL* Exone verfügt über eine variable Anzahl von sich wiederholenden Tandems (VNTR-Regionen), die aus nahezu identischen 33 Basenpaar-Segmenten bestehen (Lidberg et al., 1992; Nilsson et al., 1990). Die Anzahl der Segmente variiert zwischen 7 und 23, wobei 16 Wiederholungen bei den bisher untersuchten Populationen am häufigsten vorkamen (Lindquist et al., 2002; Ragvin et al., 2013). In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass Deletionen in der VNTR-Region von *CEL* zu einer erblichen Form von Diabetes mellitus führen können, die auch als MODY8 (maturity onset diabetes of the young) bezeichnet wird (Raeder et al., 2006, 2014). Hierbei handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung des Pankreas, die sich in Form von Diabetes und exokriner Insuffizienz präsentiert und bei der es zu morphologischen Veränderungen des Drüsenparenchyms kommt. Daher liegt die Vermutung nahe, dass *CEL* auch eine Rolle bei der Entstehung von chronischer Pankreatitis spielen könnte.

Es ist bekannt, dass die Konstellation eines Gens und einer benachbarten homologen Sequenz zu Neuordnungen in der DNA führen kann. Hieraus entstehen durch Fusion gelegentlich Gene, die in ihrer Funktion verändert und mit Erkrankungen assoziiert sind (Lupski, 1998). Eine norwegische Arbeitsgruppe befasste sich daher intensiv mit der *CEL-CELP*-Region und fand ein Duplikations-Hybrid-Allel, das offenbar aus einer nicht-allelischen homologen Rekombination entstanden sein musste (Abbildung 3) (Fjeld et al., 2015). Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu *CELP* war allerdings nicht zu erwarten, dass dieses Hybrid-Allel für ein funktionelles Protein kodieren würde.

Im Gegensatz dazu erschien es jedoch wahrscheinlich, dass das verbleibende Produkt, das neben dem Duplikations-Hybrid-Allel entstehen würde, nämlich das Deletions-Hybrid-Allel, für ein neues *CEL-CELP* Fusions-Protein kodieren könnte (Abbildung 4). Es würde die enzymatische Struktur von *CEL* enthalten, jedoch mit einer andersartigen und kürzeren VNTR-Region, die von *CELP* abstammt.

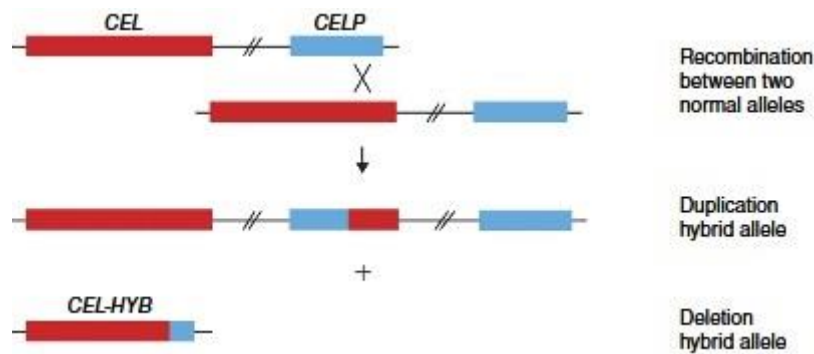


Abbildung 3: Hypothetischer Entstehungsmechanismus der beiden Hybrid-Allele durch nicht-allelische Rekombination von *CEL* und *CELP* (Fjeld et al. 2015).

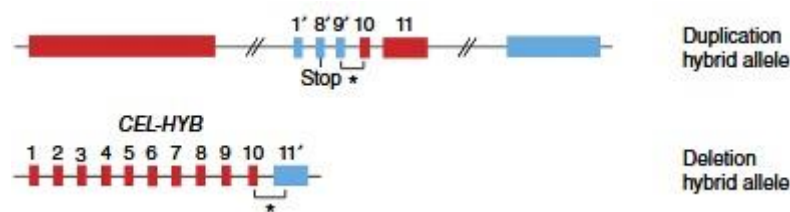


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Duplikations-Hybrid-Allels und des Deletions-Hybrid-Allels (*CEL-HYB*) (Fjeld et al. 2015).

Aufgrund dieser Erkenntnisse stellt die Untersuchung der Rolle des Deletions-Hybrid-Allels (*CEL-HYB*) bei der Entstehung von chronischer Pankreatitis einen interessanten Arbeitsansatz dar.

1.4.2 Pankreatische Phospholipase A2 (PLA2G1B)

Ein weiteres Enzym aus der Gruppe der Lipasen ist die Phospholipase A2, Gruppe IB, (PLA2G1B). Sie katalysiert die hydrolytische Spaltung von Phospholipiden am zweiten Kohlenstoffatom. Hierbei wird neben weiteren Abbauprodukten von Membran-Phospholipiden auch Arachidonsäure freigesetzt, die nach mehreren Reaktionsschritten in Eicosanoide wie Prostaglandine oder Leukotriene umgewandelt werden kann. PLA2G1B liegt im Pankreas als inaktive Vorstufe vor und wird im Duodenum durch Trypsin aktiviert (Murakami & Kudo, 2002).

In mehreren Studien wurde die Rolle von Phospholipasen bei der Pathogenese der Pankreatitis untersucht. 1999 injizierten Yoshikawa und Mitarbeiter einer Gruppe Ratten ein Trypsin-Taurocholat-Gemisch, wodurch eine akute Pankreatitis induziert wurde. Im Anschluss wurde ein Teil der Ratten mit einem Inhibitor der Typ-II-Phospholipase behandelt, der deren katalytische Aktivität hemmt. Die Gruppe Ratten, die den Inhibitor erhalten hatten, zeigte gegenüber der Kontrollgruppe ein signifikant besseres Überleben sowie signifikant niedrigere Serum-Amylase- und Serum-Lipase-Werte (Yoshikawa et al., 1999).

2005 verglichen Kihara und seine Mitarbeiter eine Gruppe von C57 BL/6J-Mäuse, die natürlicherweise einen knock-out aller *PLA2*-Gene aufweisen, mit einer Gruppe von Wildtyp-Mäusen. Beide Gruppen erhielten eine cholinarme, mit 0,5 % Ethionin angereicherte Diät (CDE-Diät), die jeweils zu einer akuten Pankreatitis führte. Nach einem Beobachtungszeitraum von drei Tagen zeigten die C57 BL/6J-Mäuse gegenüber den Wildtyp-Mäusen ein signifikant besseres Überleben sowie signifikant niedrigere Serum-PLA2- und Serum-Amylase Werte. Auch in der histologischen Untersuchung des Pankreas zeigten sich bei den C57 BL/6J-Mäusen deutlich milder ausgeprägte Veränderungen (Kihara et al., 2005).

Diese Daten legen nahe, dass eine Inhibition bzw. ein Ausschalten der pankreatischen Phospholipase A2 einen protektiven Effekt auf den Verlauf einer schweren akuten Pankreatitis hat, womit auch *PLA2G1B* ein plausibles Kandidatengen darstellt.

1.4.3 Pankreatische Lipase (PNLIP)

Die pankreatische Lipase (PNLIP) spaltet im Darmlumen langkettige Triglyzeride zu freien Fettsäuren und Monoacylglyceriden, die dann von den Enterozyten aufgenommen und dem lymphatischen Kreislauf zugeführt werden können. Somit ist die pankreatische Lipase essentiell für die Verdauung von Fetten aus der Nahrung (Lowe et al., 1989). Die pankreatische Lipase wird jedoch durch hohe Konzentrationen von Gallensäure inaktiviert und benötigt das Co-Enzym Co-Lipase, um ihre katalytische Wirkung zu entfalten. Die Co-Lipase bildet mit der pankreatischen Lipase einen Komplex, durch den es zur Freilegung des katalytischen Zentrums der

pankreatischen Lipase kommt und wodurch die Bindung an die Substrate sowie die Spaltung der Triglyzeride ermöglicht wird (Borgström & Erlanson, 1973)(Rehner & Daniel, 2010).

Die pankreatische Lipase stellt außerdem einen wichtigen Laborparameter für die Diagnostik einer akuten Pankreatitis oder eines akuten Schubs einer chronischen Pankreatitis dar. Stark erhöhte Serumwerte (zwei- bis dreifach oberhalb der Norm) in Kombination mit akuten abdominellen Schmerzen sprechen mit einer Sensitivität und Spezifität von 95 % für das Vorliegen einer akuten Pankreatitis (Keim et al., 1998).

Bisher sind drei Mutationen im *PNLIP*-Gen bei Patienten mit hereditärem Lipasemangel beschrieben worden: p.W102X, p.R188C und p.T221M (Behar et al., 2014) (Gottesman-Katz et al., 2020). Beim kongenitalen Lipasemangel handelt es sich um eine seltene Erkrankung, die zu Steatorrhoe und verminderter Resorption von Fetten aus der Nahrung führt. Funktionelle Daten weisen darauf hin, dass die p.T221M-Variante zu einer verminderten Sekretion des Enzyms aufgrund von fehlerhafter Faltung führt (Szabó et al., 2015). Außerdem könnte die Akkumulation des fehlerhaften Enzyms zu Schäden in den Azinuszellen des Pankreas führen.

Daten, die *PNLIP* in Verbindung mit Pankreatitis bringen, gab es bisher nicht. Da die pankreatische Lipase jedoch ausschließlich im Pankreas synthetisiert wird und dort in großen Mengen vorkommt, liegt auch hier die Vermutung nahe, dass es einen Zusammenhang mit der Entstehung von Pankreatitis geben könnte.

1.5 Fragestellung

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass vielen Fällen idiopathischer Pankreatitis eine genetische Ursache zugrunde liegt. Nach heutigem Kenntnisstand liegt bei ca. der Hälfte der Patienten mit idiopathischer chronischer Pankreatitis eine prädisponierende Genmutation vor (Hoffmeister et al., 2012). Das bedeutet jedoch auch, dass bei der anderen Hälfte der Patienten bisher keine Ursache identifiziert werden konnte. Es ist davon auszugehen, dass noch zahlreiche weitere Gene existieren, die bei der Entstehung von chronischer Pankreatitis eine Rolle spielen. Ziel

dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob *CEL*-, *PLA2G1B*- oder *PNLIP*-Varianten eine Rolle bei der Entstehung von idiopathischer oder hereditärer chronischer Pankreatitis spielen.

Für *CEL* wurden 510 Patienten mit idiopathischer oder hereditärer chronischer Pankreatitis auf das Vorliegen des Hybrid-Allels *CEL-HYB* getestet. Das Patientenkollektiv wurde mit 2362 gesunden Kontrollpersonen verglichen. Des Weiteren wurden 352 Patienten mit alkohol-induzierter chronischer Pankreatitis untersucht. Als Screening-Methode auf *CEL-HYB* wurde eine Schmelzkurvenanalyse mit dem Light Cycler 480 durchgeführt. Alle Positiv-Proben wurden anschließend zur Verifizierung noch einer DNA-Sequenzierung nach Sanger unterzogen. Zusätzlich wurden die Exone 1 bis 10 des *CEL* bei 364 Patienten und 238 Kontrollen mittels Sanger-Sequenzierung analysiert.

Für *PLA2G1B* wurde der gesamte kodierende Bereich einschließlich der Exon-Intron-Grenzen mittels PCR und DNA-Sequenzierung nach Sanger nach Varianten abgesucht. Die Analyse erfolgte bei 151 Patienten mit nicht-alkoholischer chronischer Pankreatitis und 186 gesunden Kontrollen.

Auch für die pankreatische Lipase wurden alle 13 Exone von *PNLIP* einschließlich der Exon-Intron-Grenzen mittels PCR und DNA-Sequenzierung nach Sanger analysiert. Hierfür wurden ein Kollektiv von 429 Patientin mit idiopathischer und hereditärer chronischer Pankreatitis sowie 600 gesunde Kontrollpersonen untersucht.

2 Studienkollektiv und Materialien

2.1. Studienteilnehmer

Die Diagnose einer chronischen Pankreatitis basierte auf dem Vorhandensein einer typischen Vorgeschichte einer rezidivierenden Pankreatitis (zwei oder mehr akute Pankreatitis-Attacken) und/oder anderen typischen Befunden bei der Bildgebung wie z.B. Pankreasverkalkungen oder Gangveränderungen. Patienten wurden als nicht-alkoholische (idiopathische/hereditäre) chronische Pankreatitis klassifiziert, wenn Risikofaktoren wie Alkoholmissbrauch oder andere disponierende Faktoren (Hyperkalziämie, Hypertriglyzeridämie) nicht vorlagen. Personen, die über einen regelmäßigen Alkoholkonsum von mindestens 60g pro Tag (Frauen) oder 80g pro Tag (Männer) in der Vorgeschichte berichteten, wurden in die Kohorte mit alkoholischer chronischer Pankreatitis aufgenommen.

Für die *CEL*-Studie wurden 510 Patienten (276 weiblich; mittleres Alter \pm Standardabweichung $17,9 \pm 14,6$ Jahre, Altersspanne 0-71 Jahre), für die *PLA2G1B*-Studie wurden 151 Patienten (91 weiblich; mittleres Alter \pm Standardabweichung $16,8 \pm 14,3$ Jahre, Altersspanne 0-70 Jahre) und für die *PNLIP*-Studie wurden 429 Patienten (237 weiblich; mittleres Alter \pm Standardabweichung $12 \pm 5,9$ Jahre, Altersspanne 0-30 Jahre) eingeschlossen.

Für die *CEL*-Studie wurden zusätzlich 352 Patienten mit alkoholischer chronischer Pankreatitis (30 weiblich; mittleres Alter \pm Standardabweichung $44 \pm 9,6$ Jahre, Altersspanne 24-68 Jahre) analysiert.

Die Ethikkommissionen aller teilnehmenden Studienzentren haben diese Studie genehmigt. Alle Studienteilnehmer gaben nach Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis.

2.2 Verbrauchsmaterialien

DNA-Extraktion und PCR

QIAmp Blood Mini Kit	Quiagen
Mikroschraubröhrchen 1,5 ml	Sarstedt
AmpliAq Gold mit 10x PCR-Puffer & MgCl ₂	Roche Diagnostics
Desoxynucleosid Triphosphate-Set	Rapidozym
HPLC-Wasser	Roth
Bayol F	Serva
96 Multiply PCR Platte	Sarstedt
Adhesive PCR Film	Thermo Scientific

Gelherstellung

Gelbond PAG Film	Biozym
Harnstoff	Merck
Temed	Bio-Rad
Bis-Acrylamid	Bio-Rad
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad
Falcon Pipetten 25 ml	Becton Dickinson
Sicherheitspipettierball	VWR
Einmalwägeschalen	Roth
Abwiegelöffel	Pinti It
Messzylinder 100:2/250:5/500:10/1000:20/2000:50 ml	Brand
BD Falcon Zellkulturflasche 600 ml	VWR
Laborflasche 2000 ml	VWR

Elektrophorese

Bromphenolblau p.a.	Merck
DNA-Leiter	Invitrogen
Essigsäure p.a.	Merck
Silbernitrat p.a.	Merck
Natriumborhydrid p.a.	Merck
Natriumhydroxid p.a.	Merck

Formaldehyd 37%	Merck
TRIS p.a.	Merck
Borsäure p.a.	Merck
EDTA p.a.	Merck

Allgemeine Materialien

Reagiergefäße 1,5/2 ml	Eppendorf
8er-Stripes-Multiplies-µ -Strip 0,2 ml Kette	Sarstedt
Deckelkette 8er-Stripes	Sarstedt
Pipetten	Thermo Scientific
Pipettenspitzen 0,1-10/1-200 µl	VWR
Pipettenspitzen 1-1000 µl	Eppendorf
Multipette plus	Eppendorf
Combitips 1=20/50/100 µl	Eppendorf

2.3 Geräte und Software

Zentrifuge 5430 v4.0 (- 14.000rpm)	Eppendorf
Heraeus Multifuge X3R (- 25314 g)	Thermo Scientific
Mini Centrifuge 26 Joules	VWR
Vortexer MS3 basic	IKA
Heizblock DB-3 Techno Dri	Labtech
Professional Thermocycler	Biometra
Multiphor II Elektrophoresekammern	Pharmacia Biotech
Electrophoresis Power Supply EV23	Consort
Schüttler HS501 digital (Mot 1-300/min)	IKA
Magnetrührer (- 1.200 rpm)	IKA
Präzisionswaage (- 150 g)	Acculab
Schweißgerät	SEVERIN Folio
Gefrierschrank Kombi NoFrost5/-25°C	Liebherr
Trockenschrank	Binder
Light Cycler 480 II	Roche Diagnostics

3 Methoden

3.1 DNA-Extraktion

Die DNA wurde aus den Blutproben mithilfe von Affinitätssäulen und dem QIAmp DNA Mini Kit (Quiagen) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert.

3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein *in-vitro*-Verfahren zur Amplifikation definierter DNA-Abschnitte. Kleine Oligonukleotide (Primer), die zum Anfang bzw. zum Ende des zu amplifizierenden Abschnittes komplementär sind, lagern sich nach Denaturierung der DNA an deren Einzelstränge an (Annealing) und definieren dadurch den Bereich, der vervielfältigt werden soll. Danach kommt es durch die DNA-Polymerase zur Anlagerung komplementärer Basen (Elongation), wodurch aus zwei DNA-Einzelsträngen zwei DNA-Doppelstränge entstehen. Durch die Wiederholung der Zyklen mithilfe periodischer Temperaturveränderungen kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung des definierten DNA-Abschnitts.

Zur Durchführung der PCR wurde ein Reaktionsansatz mit 15,3 µl HPLC-Wasser, 2,0 µl Puffer (10x), 1,2 µl MgCl₂ (25mM), 0,9 µl dNTPs (je 2,5mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,23 µl Vorwärts-Primer (~5µM), 0,23 µl Rückwärts-Primer (~5µM) und 0,14 µl AmpliTaq Gold verwendet. Dieser Ansatz wurde zu je 2 µl DNA-Probe gegeben und zum Schutz vor Verdunstung mit einem Tropfen Öl (Bayol F) überschichtet. Für das Mutations-Screening für *CEL-HYB* wurden im Reaktionsansatz der Vorwärts- und Rückwärts-Primer nicht zu gleichen Teilen hinzugefügt, sondern im Verhältnis 5:1 (0.5 µmol/l Vorwärts-Primer und 0.1 µmol/l Rückwärts-Primer).

Die PCR erfolgte im Thermocycler unter folgenden Bedingungen: Initiales Aufschmelzen der DNA für 12 min bei 95 °C, Denaturierung für 20 sek bei 95 °C, Primeranlagerung für 40 sek bei 60 °C (*CEL*-Hybridallel-Screening und *PLA2G1B*) bzw. 64 °C (*CEL*-Sequenzierung und *PNLIP*) und Elongation für 90 sek bei 72 °C.

Nach 40 Zyklen erfolgte eine letzte Elongation für 2 min bei 72 °C und anschließend eine Abkühlung auf 10 °C.

Die Primer (synthetisiert von TIB MOLBIOL, Berlin) sind in den Tabellen 1-4 aufgeführt.

Tabelle 1: PCR-Primer für die Validierung der positiven Proben für *CEL-HYB* (Annealing-Temperatur 64 °C)

Assay	Primer vorwärts	Primer rückwärts
1	5'-GCTGAGGTAGCAGAATTGATTGACC	5'-TCTGAGCTGGCCCTGGGCAC
2	5'-TGCCATAATTTTCAGCCCACCACC	5'-CCCAAAGTCCCTCCACTGGC
3	5'-TGGGCCTCAACTTTGCCATA	5'-GTGAGAAGAGGCTGTGCAGG

Tabelle 2: PCR-Primer für *CEL* (Exon 1-10) (Annealing-Temperatur 64 °C)

Exon	Primer vorwärts	Primer rückwärts
1	5'-GAGGGCCTGCAGCATGCTGC	5'-GAGTGCCCGGGATCTGCTGC
2-4	5'-CCCTGAGCATTGCAGGGCAG	5'-TTGGGGTGAGGGGTGCTGAG
5-7	5'-CAACGTGACCTAGTCTCCTGG	5'-CAAGACCGCAGCTCTGGCAC
8-9	5'-CATGAAGCCAAGTCATCTGCACG	5'-GAAGGTGCAGCACCCAGGA
10	5'-GCTGAGGTAGCAGAATTGATTGACC	5'-GGCTGTGCACGTGCATGGGC

Tabelle 3: PCR-Primer für *PLA2G1B* (Annealing-Temperatur 60 °C)

Exon	Primer vorwärts	Primer rückwärts
1	5'-GTTGCCCAGGCTGCACTTCCTTC	5'-AAGCCCCACTGGGAACCTCG
2	5'-GGTTCCTGGGTCCAACGGTC	5'-CCTTAGCAGATATGCAAGTCC
3	5'-GGTAACAGAGCAACTCTGTCTC	5'-CTCAGCCTTCTGAGCCTCAG
4	5'-CTGGGCATCCTGATGTACTION	5'-AAGAGTAGGCAGAGACCTAG

Tabelle 4: PCR-Primer für *PNLIP* (Annealing-Temperatur 64 °C)

Exon	Primer vorwärts	Primer rückwärts
1-2	5'-ACATGCCACAGACAGGCAC	5'-CCTGAATTCAGCTGCCCTAGC
3	5'-CTTGAGCACCTATAGCCCAAGG	5'-TACCTAAGCTCAGTGCCCTG
4	5'-CACACAAAGCCTTCCATTGTATG	5'-AAGACCTCCAAGCACTGTCC
5	5'-GAGGCTATACCAGTGGACAAGG	5'-ATCTGGAAAACCATGTGTACAGGC
6	5'-GTGTGCGCCACCAAGGCCAG	5'-AGGTAAAACGTAGGGTTGCACC

7-9	5'-GTCCAGTGTGTCCCAGAGTC	5'-AGGAAAGCACACCAGTCATGAG
10	5'-GACAGTGAAGTTGGTGACTIONACTG	5'-GACCCAAACTCCGTTCTGCC
11	5'-CTTTCAAGGATAAATTGTCAGGTTGG	5'-GCGACACAGCGAGACTCCGAC
12	5'-GGACTACCACTGAGTTAGCATGC	5'-CATAGCACGAAGCACAGCTGC
13	5'-AGTGTTCACTGACTGCTCATGAC	5'-CCATGTGAGCCCACCAAGAG

3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist ein Verfahren, bei dem Moleküle aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden können. Je nach Ladung, Molekulargewicht und Faltung wandern die Moleküle unterschiedlich schnell durch das Polyacrylamid-Gel, das aufgrund seiner Poren wie ein Sieb wirkt. PAGE wird häufig zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verwendet. Nach Anfärben der DNA-Fragmente mittels Silberfärbung kann anhand bekannter Größenmarker (DNA-Leiter), die als Referenz dienen, überprüft werden, ob und in welcher Qualität ein gewünschter DNA-Abschnitt amplifiziert wurde.

3.3.1 Herstellung der Gel-Matrix

Für die Herstellung der Polyacrylamid-Gele wurde eine Vorrichtung aus zwei speziell angefertigten Glasplatten verwendet, die als Gussform für das Gel dienten. Für eine bessere Stabilität und eine einfachere Handhabung wurden die Gele auf eine GelBond PAG-Folie gegossen. Dafür wurde eine solche Folie mit der hydrophoben Seite auf eine einfache, mit aqua bidest. beschichtete Glasplatte gelegt und mithilfe eines Gummirollers luftblasenfrei angedrückt. Auf die hydrophile Seite der Folie wurde eine zweite Glasplatte mit U-Rahmen und zwei parallelen Reihen von je 27 rechteckigen Vertiefungen gesetzt, die später die Taschen des Gels darstellen würden. Die beiden Glasplatten wurden mithilfe mehrerer Clamps fest aneinandergedrückt.

Anschließend wurde die Lösung für das Gel hergestellt. Für ein 12 %-Polyacrylamidgel wurden 1,8 g Harnstoff, 6 ml 5x TBE-Puffer und 12 ml Acrylamidlösung (T₃₀C₄) in 30 ml aqua bidest. gelöst und mit 24 µl TEMED und 48 µl 40 %iger Ammoniumpersulfat-

Lösung (APS) vermischt. Der 5x TBE-Puffer bestand aus 107,7 g Tris (890mM), 55 g Borsäure (890mM) und 9,3 g EDTA (25mM), die mit aqua bidest. auf 2000 ml aufgefüllt wurden. Die 40 %ige Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) wurde aus 400 mg APS in 800 µl H₂O hergestellt. Für die T₃₀C₄-Acrylamidlösung wurden 28,8 g Acrylamid und 1,2 g Bis-Acrylamid (Bis) in 100 ml H₂O gelöst.

Zuletzt wurde die Lösung vorsichtig und unter Vermeidung von Luftblasen zwischen die Glaslatte mit den rechteckigen Vertiefungen und die GelBond PAG-Folie gegossen und für 60 min bei Raumtemperatur auspolymerisiert.

3.3.2 Elektrophorese und Silberfärbung

Die auspolymerisierten Gele wurden mit der Folienseite nach unten auf die mit aqua bidest. Befeuchtete Kühlplatte der Elektrophoresekammer gelegt. Anschließend wurden je 4 µl PCR-Produkt in die Geltaschen pipettiert. Die jeweils letzte Tasche einer Reihe wurde mit 4 µl Bromphenolblau und 4 µl 100 bp DNA-Leiter befüllt. Die DNA-Leiter diente als Referenz zur Größenbestimmung der PCR-Produkte, mit dem Bromphenolblau konnte die Wanderung während der Elektrophorese sichtbar gemacht werden. Auf die beiden Ränder des Gels wurde jeweils ein länglich gefaltetes, in Laufpuffer getränktes Papiertuch gelegt, um eine gleichmäßige Verbindung zwischen Elektroden und Gel sicher zu stellen. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer. Die Glasplatte der Elektrophoresekammer wurde dann mit beiden Elektroden parallel zueinander auf die Pufferstreifen gesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 5°C, 1100 Volt, 300 Milliampere und 300 Watt für 50 min.

Zur Auswertung der DNA-Fragmente wurden die Gele einer Silberfärbung unterzogen. Im ersten Schritt erfolgte eine 10-minütige Fixierung der PCR-Produkte (10 % Ethanol, 2 % Essigsäure). Anschließend wurde das Gel kurz mit H₂O gespült und dann für 20 min in 0,2 %iger Silbernitratlösung gefärbt. Nach erneutem Spülen mit H₂O wurde das Gel in einer alkalischen Lösung (1,5 % NaOH, 0,01 % NaBH₄), der 1 ml 37 %ige Formaldehydlösung beigemischt wurde, für 10 min entwickelt. Zur besseren Aufbewahrung wurden die Gele in Plastikfolien eingeschweißt.

3.4 Verdau

Falls in der Elektrophorese die Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnittes nachgewiesen werden konnte, wurden die PCR-Produkte mittels Verdau aufgereinigt. Dafür wurden zu jedem PCR-Produkt jeweils 0,25 µl Antarktische alkalische Phosphatase (AAP), 0,25 µl Exonuklease und 1,5 µl HPLC Wasser hinzugefügt. Die Antarktische alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das 2000 aus einem in der Antarktis lebenden Bakterium isoliert wurde und die Entfernung von 5'-Phosphatgruppen in DNA oder RNA katalysiert. Dadurch werden die aus der PCR übrig gebliebenen dNTPS inaktiviert. Die Exonuklease baut einzelsträngige DNA-Fragmente und damit die PCR-Primer ab. Die Proben wurden im Thermocycler bei 37 °C für 40 min inkubiert. Zuletzt erfolgte eine Enzyminaktivierung bei 85 °C für 20 min.

3.5 Sequenzierung

Zur Sequenzierung der gewünschten DNA-Abschnitte wurde die Kettenabbruch-Methode nach Sanger angewendet (Sanger et al., 1977). Dabei wird das aufgereinigte PCR-Produkt mit Hilfe von Primern (vorwärts oder rückwärts), einer DNA-Polymerase, dNTPs und ddNTPs linear vervielfältigt. ddNTPs sind künstlich hergestellte, fluoreszenzmarkierte DNA-Nukleotide, bei denen am 3'-Atom die Hydroxygruppe fehlt. Wird während der Replikation anstelle eines dNTPs ein ddNTP eingebaut, kann kein weiteres Nukleotid angehängt werden und es kommt zum Abbruch der Kettenverlängerung. So entsteht ein Gemisch unterschiedlich langer DNA-Fragmente. Mit Hilfe einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese können diese Fragmente aufgetrennt und anschließend mittels Photodetektion aus dem Muster der daraus entstehenden Banden die Basenabfolge abgelesen werden.

Dafür wurden 1 µl HPLC-Wasser, 1,5 µl Sequenzierungspuffer, 1 µl Sequenzierungsprimer und 0,5 µl BigDye Terminator Mix zu je 6 µl verdautem PCR-Produkt pipettiert und mit einem Tropfen Öl beschichtet. Anschließend erfolgte die lineare Vervielfältigung der DNA im Thermocycler unter folgenden Bedingungen: Initiale 3 min Denaturierung bei 95°C, dann 29 Zyklen mit je 20 sek Denaturierung bei

95° C, 30 sek Primeranlagerung bei primerspezifischer Temperatur (siehe Tabelle 5 bis 8), und 1 min 30 sek Extension bei 60 °C.

Die Sequenzierungsprodukte wurden anschließend gefällt. Dafür wurde jede Probe mit 100 µl 70 % Ethanol vermischt und nach einer 20minütigen Inkubationszeit bei -20 °C für 30 min bei 4800 g zentrifugiert. Nach Entfernung des Ethanol-Überstands wurden die Proben erneut mit 100 µl Ethanol vermischt und für 15 min bei 613 g zentrifugiert. Auch nach diesem Schritt wurde der Ethanol-Überstand verworfen. Zur vollständigen Entfernung des restlichen Ethanols wurde das Sediment für 1 min bei 613 g kopfüber zentrifugiert und dann für 45 min bei 60°C in einem Wärmeschrank getrocknet.

Zuletzt wurden die DNA-Fragmente in 50 µl HPLC-Wasser gelöst und mit Hilfe eines denaturierenden Polyacrylamid-Gels im HelmholtzZentrumMünchen (HMGU) an einem 3730 DNA-Sequencer analysiert.

Zur Sequenzierung wurden die in Tabelle 5 bis 8 aufgeführten Primer verwendet. Die Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin, synthetisiert. Für *CEL* wurden alle Proben, die in der Schmelzkurvenanalyse positiv auf eine *CEL-HYB*-Mutation getestet wurden, mittels einer Sequenzierung überprüft. Hierfür wurde bei jeder Positiv-Probe eine PCR mit drei verschiedenen Primer-Kombinationen durchgeführt und anschließend die drei verschiedenen PCR-Produkte mit jeweils einem spezifischen Primer sequenziert (Tabelle 5).

Tabelle 5: Sequenzierungsprimer und Annealing-Temperaturen für die Validierung des *CEL-HYB*

Assay	Sequenzierungsprimer	Temperatur
1	5-CCTCCAAGTCCGGTCTCTGG	56 °C
2	5-CTTCCCTGGGTGTAAGAAGCC	56 °C
3	5-TCTGAGCTGGCCCTGGGCAC	56 °C

Tabelle 6: Sequenzierungsprimer und Annealing-Temperaturen für *CEL* Exon 1-10

Exon	Sequenzierungsprimer	Temperatur
1	5-CAGTGACACCAAGCCCTGTG	56 °C
2-3	5-TGCCTCTGGGCACGCGGAGT	56 °C
4	5-CTACTCCTGGCTTGAGTCTGG	56 °C

5	5-CCCCACCTATGCTGATCTCC	56 °C
6-7	5-GTGCCTTGTCCCAGCGTGG	56 °C
8	5-CTGGCACCTCGTGGGTGAG	56 °C
9	5-AGTGGAGGACTGGGAGTGAG	56 °C
10	5-CCTGCCCACTGCCCGGGACC	56 °C

Tabelle 7: Sequenzierungsprimer und Annealing-Temperaturen für *PLA2G1B*

Exon	Sequenzierungsprimer	Temperatur
1	5'-AGCGTCCGACTGAACTGACG	60 °C
2	5'-GTGAGATCCTTGGCGTGTGC	60 °C
3	5'-GCATCTTGGCGAAGTCATCC	60 °C
4	5'-TCAGTGAATGGCTGCCAGC	60 °C

Tabelle 8: Sequenzierungsprimer und Annealing-Temperaturen für *PNLIP*

Exon	Sequenzierungsprimer	Temperatur
1-2	5'-CCCCTTTCTCATCATCCCAC	60 °C
3	5'-GGGAGTGAAGTGATCCATGTGG	60 °C
4	5'-TTATCCCAAGTTGAACAATGGC	60 °C
5	5'-ATCCAGTTCCCACTATGGTC	60 °C
6	5'-TCCAGTTGCCTAGAGTACACAG	60 °C
7-8	5'-GCTAGAAGTAGATTCCTCTTCAGC	60 °C
9	5'-TTCAGTCAACTTCAGAGTACCT	60 °C
10	5'-TTTATCATCAGAACAGAACTGGC	60 °C
11	5'-ACGTGGCAGTAGTGGGATGC	60 °C
12	5'-CTGCCAATCACCTTAGCCAG	60 °C
13	5'-GGCGTCTACTGACAGCTTCTC	60 °C

3.6 Schmelzkurven-Analyse

Als Screening-Methode auf das Vorliegen des Hybrid-Allels *CEL-HYB* wurde eine Schmelzkurvenanalyse mit dem LightCycler 480 (Roche Diagnostics) durchgeführt. Dabei wird das amplifizierte PCR-Produkt mit einer Hybridisierungssonde (simple probe) zusammengebracht, die komplementär zu der zu untersuchenden mutierten

Sequenz ist. Bei niedriger Temperatur bildet die Sonde einen stabileren Komplex mit dem mutierten Allel als mit der Wildtyp-DNA, da es bei dieser zu einer Basenfehlpaarung kommt. Erhöht man nun schrittweise die Temperatur, löst sich die Sonde wieder und es kommt zu einer Abnahme der gemessenen Fluoreszenz. Im Fall einer Mutation entsteht so eine allelspezifische Schmelzkurve, deren Schmelztemperatur um einige Grad höher liegt als die des Wildtyps (58 °C vs. 50 °C) (Abbildung 5).

Zuerst wurde eine PCR bei 60 °C mit einem Vorwärts- (5'-GTCTCTGGGCTGATCGGTC) und einem Rückwärtsprimer (5'-CAGACTCGGAGTTGCCTGTC) im Verhältnis 5:1 bei 60°C durchgeführt. Anschließend wurden 5 µl amplifiziertes PCR-Produkt mit 2 µl Sondenmix (1 OD gelöst in 330µl HPLC-Wasser) und 2 µl HPLC-Wasser vermischt. Die Sequenz der Hybridisierungssonde (SimpleProbe) war 5'-CAAAGGGCTTCCCGAAA-XI-ATGTA CTG-ph. Nach kurzem Zentrifugieren erfolgte die Schmelzkurvenanalyse im LightCycler 480 unter folgenden Bedingungen: Initiale Denaturierung für 40 sek bei 95 °C (Rampe: 4,8 °C/sek), Abkühlen auf 47 °C für 40 sek (Rampe: 2,5 °C/sek), Schmelzkurvenanalyse unter Temperaturerhöhung bis 64 °C (Rampe: 0,14 °C/sek) und Abkühlen bis 40 °C für 20 sek (Rampe: 2,5 °C/sek). Die Ergebnisse wurden computergesteuert aufgezeichnet und ausgewertet.

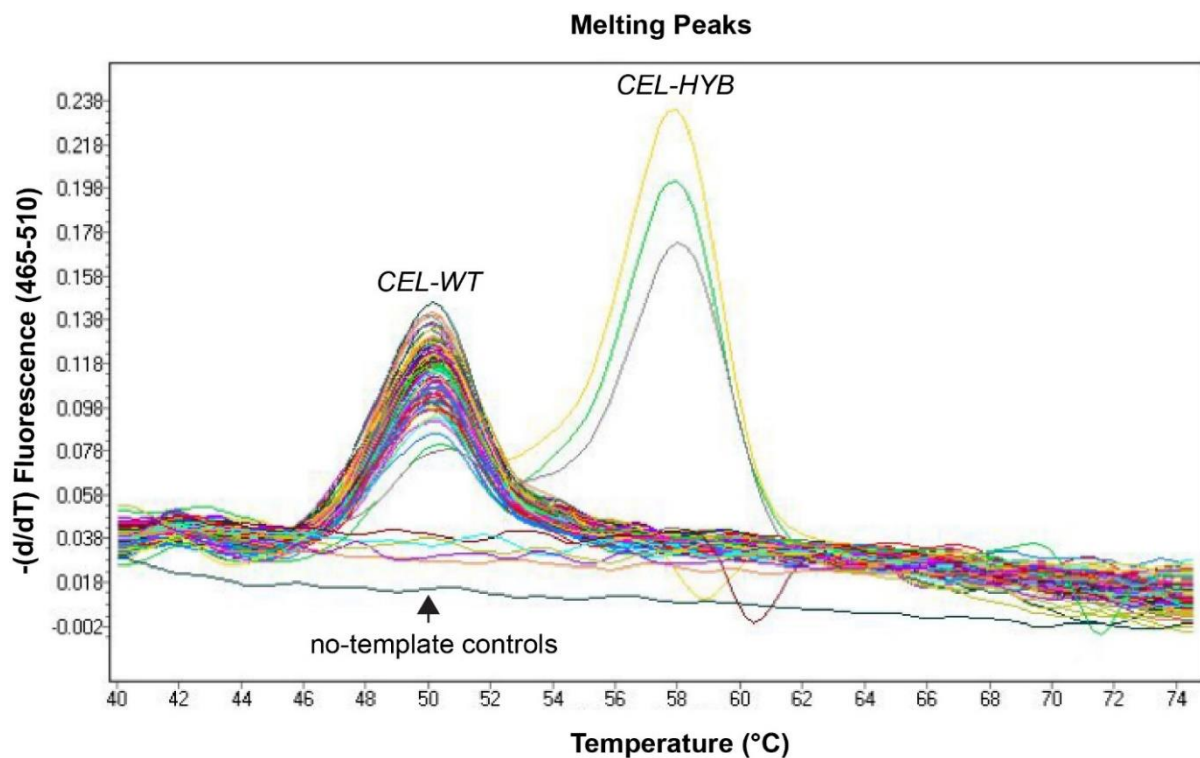


Abbildung 5: Beispiel für eine Schmelzkurven-Analyse für das primäre CEL-HYB-Screening (Fjeld et al. 2015, Supplement). Dargestellt sind die Schmelzkurven von 96 Proben, darunter sechs Kontrollen ohne DNA. Der Schmelzpunkt des amplifizierten CEL-HYB-Allels ist etwa 8 °C höher als der des CEL-WT (58 °C gegenüber 50 °C). Drei Proben waren positiv für das CEL-HYB-Allel und die übrigen 87 negativ.

3.7 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde der Fisher-Exakt-Test (zweiseitig) verwendet. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Programmes R (Version 2.13.0 für Windows).

4 Ergebnisse

4.1 *CEL-HYB* bei Patienten mit chronischer Pankreatitis

CEL-HYB konnte sowohl in der Gruppe der Patienten mit idiopathischer und hereditärer chronischer Pankreatitis ($P = 1,3 \times 10^{-8}$; OR = 6,6; 95 % CI = 3,4-12,7) als auch in der Gruppe der Patienten mit alkohol-induzierter chronischer Pankreatitis ($P = 0,022$; OR = 3,0; 95 % CI = 1,2-7,3) signifikant gehäuft nachgewiesen werden. Alle Individuen, die positiv für das *CEL-HYB* getestet wurden, waren heterozygote Träger der Mutation.

Tabelle 9: Verteilung der heterozygoten *CEL-HYB*-Träger bei deutschen Patienten mit nicht-alkoholischer und alkoholischer chronischer Pankreatitis und Kontrollen

Kohorte	Patienten (+/n)	Kontrollen (+/n)	P-Wert
idiopathische / hereditäre CP	22/510 (4,3 %)	16/2362 (0,7 %)	$1,3 \times 10^{-8}$
alkoholische CP	7/352 (2,0 %)	16/2362 (0,7 %)	0,022

Aufgrund der Assoziation mit dem *CEL-Hybrid*allel untersuchten wir, ob weitere seltene Varianten in der kodierenden Region ebenfalls zu einer chronischen Pankreatitis disponieren. Wir analysierten 364 Patienten und 238 Kontrollen mittels Sanger-Sequenzierung auf die Exone 1 bis 10. Das letzte Exon 11 ließ sich nicht untersuchen, da durch die VNTRs die Elektropherogramme nicht auswertbar waren. In den ersten 10 Exonen fanden wir keine Varianten, die bei chronischer Pankreatitis überrepräsentiert waren (Tabelle 10).

Tabelle 10: *CEL*-Varianten in der Region von Exon 1 bis 10 bei deutschen Patienten mit nicht-alkoholischer chronischer Pankreatitis und Kontrollen

Lokalisierung	Nukleotid-austausch	dbSNP	Aminosäure-austausch	Patienten (n = 364)	Kontrollen (n = 238)
5'-Region	c.-102G>T	rs377527297	-	1 (0,3 %)	0 (0 %)
	c.-22G>A	-	-	2 (0,6 %)	2 (0,8 %)
Exon 1	c.16C>T	rs201383133	p.Arg6Cys	1 (0,3 %)	0 (0 %)
Intron 1	c.76-26delT	-	-	2 (0,6 %)	0 (0 %)
Exon 2	c.105C>T	-	(p.Phe35Phe)	1 (0,3 %)	0 (0 %)
Intron 2	c.226+35G>A	rs8193019	-	7 (1,9 %)	5 (2,1 %)
	c.226+35del18	-	-	0 (0 %)	1 (0,4 %)
	c.227-37C>T	rs371081359	-	3 (0,8 %)	0 (0 %)
Intron 3	c.350-61delG	-	-	1 (0,3 %)	0 (0 %)
Exon 4	c.362T>G	rs113056079	p.Leu121Arg	0 (0 %)	1 (0,4 %)
	c.411C>G	rs150358550	(p.Gly137Gly)	3 (0,8 %)	5 (2,1 %)
	c.469G>A	rs370344006	p.Gly157Arg	0 (0 %)	1 (0,4 %)
	c.535G>A	-	p.Ala179Thr	1 (0,3 %)	0 (0 %)
Exon 5	c.635C>T	-	p.Thr212Met	1 (0,3 %)	0 (0 %)
	c.666C>T	rs202216787	(p.Ser222Ser)	2 (0,6 %)	0 (0 %)
Intron 6	c.787-20G>T	rs201657030	-	1 (0,3 %)	0 (0 %)
	c.787-13G>C	rs369248889	-	0 (0 %)	1 (0,4 %)
Intron 7	c.905-58G>A	rs150986867	-	35 (9,6 %)	20 (8,4 %)
	c.905-49G>A	-	-	0 (0 %)	2 (0,8 %)
	c.905-41G>A	rs377584384	-	0 (0 %)	2 (0,8 %)
Intron 8	c.1091+41A>G	rs142943621	-	4 (1,1 %)	6 (2,5 %)
	c.1091+41A>G #	rs142943621	-	1 (0,3 %)	0 (0 %)
	c.1091+49C>T	-	-	0 (0 %)	1 (0,4 %)
	c.1092-47T>C	rs370440041	-	1 (0,3 %)	3 (1,3 %)
	c.1092-33G>C	rs368102860	-	5 (1,4 %)	4 (1,7 %)
	c.1092-19G>A	-	-	1 (0,3 %)	0 (0 %)
Exon 9	c.1154C>T	-	p.Thr385Met	1 (0,3 %)	0 (0 %)
	c.1173C>T	rs201255412	(p.Thr391Thr)	168 (46,2 %)	105 (44,1 %)
	c.1173C>T #	rs201255412	(p.Thr391Thr)	44 (12,1 %)	26 (10,9 %)
	c.1240G>A	-	p.Val414Ile	1 (0,3 %)	1 (0,4 %)
	c.1252G>A	-	p.Val418Met	0 (0 %)	1 (0,4 %)
Exon 10	c.1463T>C	rs77696629	p.Ile488Thr	1 (0,3 %)	2 (0,8 %)
Intron 10	c.1493+120G>C	-	-	1 (0,3 %)	0 (0 %)

Sofern nicht anders angegeben sind heterozygote Trägerfrequenzen dargestellt. Keine der Varianten zeigte statistisch signifikante Unterschiede in der Verteilung zwischen Fällen und Kontrollen. Wenn seltene kodierende Varianten gepoolt wurden, betrug die Verteilung 6/364 (1,7 %) Fälle vs. 6/238 (2,5 %) Kontrollen ($P=0,45$).

Homozygote-Frequenzen

4.2 *PLA2G1B*-Varianten

Im *PLA2G1B* fanden sich zwei verschiedene Varianten im Exon 3, die aber zu keinem Aminosäureaustausch führten: c.222T>C (p.Y74=) und c.294G>A (p.S98=). Es zeigte sich keine signifikante Häufung bei Patienten mit chronischer Pankreatitis im Vergleich zu den Kontrollen (c.222TC: CP 0,9 % vs. Kontrollen 1,0 %; c.294GA: CP 3,0 % vs. Kontrollen 2,8 %; c.294AA: CP 0,2 % vs. Kontrollen 0,1 %; P-Wert für alle Berechnungen nicht signifikant).

Tabelle 11: *PLA2G1B*-Varianten bei Kontrollpersonen und Patienten mit chronischer Pankreatitis

Exon	Nukleotid- veränderung	Aminosäure- austausch	Patienten (n=146)	Kontrollen (n=186)	P-Wert
3	c.222TC	p.Y74=	13/151 (0,9 %)	18/186 (1,0 %)	0,85
3	c.294GA	p.S98=	45/151 (3,0 %)	52/186 (2,8 %)	0,72
3	c.294AA	p.S98=	3/151 (0,2 %)	2/186 (0,1 %)	0,66

4.3 *PNLIP*-Missense-Mutationen

Für *PNLIP* konnten heterozygote nicht-synonyme Mutationen bei 8/429 (1,9 %) Patienten und bei 2/600 (0,3 %) Kontrollen identifiziert werden. Alle Patienten, bei denen eine Missense-Mutation nachgewiesen wurde, zeigten einen frühen Krankheitsbeginn (Altersdurchschnitt 12,3 Jahre). Die am häufigsten gefundene Variante war p.F300L, die sich bei 4 Patienten, aber bei keiner Kontrolle fand.

Tabelle 12: *PNLIP*-Varianten bei Patienten und Kontrollpersonen mit chronischer Pankreatitis

Exon	Nukleotid- veränderung	Aminosäure- austausch	Patienten (n=429)	Kontrollen (n=600)	P-Wert
3	c.124C>T	p.H42Y	0/429 (0 %)	1/600 (0,2 %)	
8	c.733C>G	p.P245A	1/429 (0,2 %)	0/600 (0 %)	
8	c.794T>G	p.I265R	2/429 (0,5 %)	0/600 (0 %)	
9	c.900C>A	p.F300L	4/429 (0,9 %)	0/600 (0 %)	0,03
9	c.911C>T	p.S304F	1/429 (0,2 %)	0/600 (0 %)	
13	c.1360G>T	p.V454F	0/429 (0 %)	1/600 (0,2 %)	

total			8/429 (1,9 %)	2/600 (0,3 %)	0,02
-------	--	--	---------------	---------------	------

Sowohl die Variante p.F300L ($P = 0,03$; OR = Inf.; 95 % CI = 0.9-Inf.) als auch alle Varianten insgesamt ($P = 0,02$; OR = 5,7; 95 % CI = 1,1-38,9) fanden sich signifikant häufiger in der Gruppe der Patienten im Vergleich zur Gruppe der Kontrollen.

5 Diskussion

5.1 *CEL-HYB* bei Patienten mit idiopathischer/hereditärer und alkohol-induzierter chronischer Pankreatitis

Wir konnten zeigen, dass *CEL-HYB* bei Patienten mit idiopathischer/hereditärer chronischer Pankreatitis signifikant gehäuft auftritt. 22/510 (4,3 %) Patienten, aber nur 16/2362 (0,7 %) der Kontrollpersonen wiesen eine *CEL-HYB*-Variante auf. Alle Positiv-Getesteten waren heterozygote Träger der Variante.

Des Weiteren konnten wir nachweisen, dass *CEL-HYB* auch mit alkohol-induzierter chronischer Pankreatitis assoziiert ist. Hier wurde die Variante bei 7/352 (2,0 %) Patienten detektiert. 70-80 % aller erwachsenen Patienten mit chronischer Pankreatitis weisen einen langjährigen und übermäßigen Alkoholkonsum auf, doch obwohl Alkoholmissbrauch als wichtigste Ursache gilt, entwickelt nur ein kleiner Teil der Alkoholiker eine chronische Pankreatitis. Das deutet auf den Einfluss von genetischen Risikofaktoren hin, die Rolle solcher Faktoren ist jedoch noch deutlich weniger erforscht als bei der hereditären/idiopathischen chronischen Pankreatitis. Bisher wurden nur wenige Gene identifiziert, die im Zusammenhang mit Alkoholmissbrauch das Risiko für eine chronische Pankreatitis erhöhen. Zu nennen sind hier *SPINK1*- und *CTRC*-Varianten (Rosendahl et al., 2013) sowie Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) bei *PRSS1-PRSS2* und *CLDN-MORC4* (M. H. Derikx et al., 2015; Whitcomb et al., 2012). Mit *CEL-HYB* konnten wir nun ein weiteres Gen identifizieren, das einen Einfluss auf die Entstehung einer alkohol-induzierten chronischen Pankreatitis hat.

Die norwegische Arbeitsgruppe, die *CEL-HYB* erstmalig identifizierte, befasste sich auch mit dessen funktionellen Eigenschaften (Fjeld et al., 2015). Lässt man *CEL-HYB* von menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK293) exprimieren, die keine endogene Expression der CEL mRNA oder des Proteins aufweisen, sieht man, dass die Sekretion des *CEL-HYB*-Proteins im Vergleich zum Wildtyp (*CEL-WT*) erniedrigt ist. Misst man die enzymatische Aktivität der Carboxylester-Lipase, so zeigt sich, dass das *CEL-HYB*-Enzym nach Stimulation mit Gallensalzen nur etwa 40 % der Aktivität

des CEL-WT-Enzyms erreicht. Außerdem akkumuliert CEL-HYB deutlich stärker in der Zelle als CEL-WT, wenn man die Proteinbiosynthese mit Cycloheximid hemmt. Vor allem die intrazelluläre Retention zusammen mit der verminderten Sekretion ließen vermuten, dass der Pathomechanismus auf Zellschäden zurückzuführen ist. Sie postulierten, CEL-HYB könnte eine Autophagozytose auslösen, um die defekten und akkumulierten Proteine zu entfernen. Für diese Vermutung spricht, dass bei der Kultivierung von Zellen, die CEL-HYB exprimieren, sich sowohl im Minimal- als auch im Vollmedium ein erhöhter Spiegel des Autophagozytose-Markers LC3-II nachweisen lässt. Es wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen berichtet, dass erhöhte LC3-II-Spiegel bei Pankreatitis beobachtet werden können und dass ein gestörter Autophagozytose-Ablauf ursächlich für die Entstehung einer Pankreatitis sein könnte (Gukovskaya & Gukovsky, 2012). Auf jeden Fall ist davon auszugehen, dass eine vorzeitige Aktivierung oder eine gesteigerte enzymatische Aktivität der Carboxyester-Lipase keine Rolle bei der Pathogenese spielen.

Ein Pathomechanismus, der auf intrazelluläre Aggregate und daraus resultierende Zellschäden zurückzuführen ist, konnte 2016 von Xiao und Mitarbeitern bereits für eine andere pathogene *CEL*-Variante nachgewiesen werden (Xiao et al., 2016). Sie untersuchten die funktionellen Eigenschaften von *CEL-MODY*, der *CEL*-Variante, die zu einer erblichen Form des Diabetes mellitus mit exokriner Pankreasinsuffizienz führt (MODY8). Sie konnten zeigen, dass *CEL-MODY* intrazelluläre Aggregate bildete, Stress im Endoplasmatischen Retikulum verursachte und schließlich zur Autophagozytose führte. Tjora und Mitarbeiter bestätigten diesen Pathomechanismus auch für *CEL-HYB* (Tjora et al., 2021).

Eine weitere Arbeit, die sich sowohl mit *CEL-HYB* als auch mit *CEL-MODY* beschäftigt und die Effekte der beiden *CEL*-Varianten auf duktales und azinäres Pankreas untersucht, wurde 2020 von Dalva und Mitarbeitern veröffentlicht (Dalva et al., 2020). Sie wiesen nach, dass beide pathogenen Varianten jeweils die Lebensfähigkeit der Pankreaszellen signifikant verringerten. Als Pathomechanismus postulierten sie ebenfalls intrazelluläre Akkumulation und ER-Stress-vermittelte Autophagozytose. Im Gegensatz zu den vorherigen Arbeiten untersuchten sie außerdem den Effekt der beiden pathogenen Proteine auf CEL-WT und konnten zeigen, dass bei Koexpression auch CEL-WT vermehrt intrazellulär akkumuliert. Das ist vor allem interessant, weil

alle identifizierten Träger von *CEL-HYB* und *CEL-MODY* heterozygote Träger sind. Ein weiterer Aspekt, der sich aus den Koexpressions-Versuchen ergab, war, dass das Vorhandensein von *CEL-WT* die zytotoxische Wirkung der beiden pathogenen Proteine verringerte. Diese Beobachtung könnte eine Erklärung für den sich langsam entwickelnden Verlauf beider durch diese Varianten verursachten Erkrankungen sein.

Als Ursache für die vermehrte intrazelluläre Akkumulation von *CEL-HYB* und *CEL-MODY* vermuteten sie die veränderte VNTR-Region der beiden Varianten, da diese den wesentlichen Unterschied zu *CEL-WT* darstellt. Beide Varianten weisen eine verkürzte VNTR-Region im Vergleich zum Wildtyp auf und damit auch weniger potentielle Bindungsstellen für O-Glykosylierung. Wolters-Eisfeld und Mitarbeiter fanden heraus, dass eine gestörte O-Glykosylierung in den azinären Zellen des Pankreas die Sekretion der Zymogengranula behindert und zu intrazellulären Aggregaten führt (Wolters-Eisfeld et al., 2018). Als Resultat konnten im Mausmodell eine exokrine Pankreasinsuffizienz und Diabetes beobachtet werden. Dass die Länge der VNTR-Region und damit die Anzahl der potentiellen Bindungsstellen für O-Glykosylierung entscheidend für die Pathogenität der Variante ist, wird auch von zwei anderen Arbeiten unterstützt. Gravidal und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Deletionen im proximalen Teil der VNTR-Region zu vermehrter intrazellulärer Aggregation und ER-Stress führten, wohingegen natürlich vorkommende Deletionen im weiter distal liegenden Teil der VNTR-Region diesen Effekt nicht hatten (Gravidal et al., 2021). Das würde auch erklären, warum bei *MODY8*-Patienten bisher nur Deletionen im proximalen Teil nachgewiesen wurden. Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte den Einfluss der Länge der VNTR-Region von *CEL* auf die Entstehung von chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinomen bei chinesischen Patienten (Mao et al., 2021). Sie konnten zeigen, dass kurze VNTR-Regionen (5-15 Wiederholungen) signifikant gehäuft bei Patienten mit idiopathischer chronischer Pankreatitis auftreten. Für Patienten mit alkohol-induzierter chronischer Pankreatitis oder Pankreaskarzinomen ließ sich keine Assoziation nachweisen.

Zwei weitere Arbeitsgruppen untersuchten den Zusammenhang von *CEL-HYB* mit chronischer Pankreatitis in anderen Populationen. Zou und Mitarbeiter testeten drei Kohorten aus China, Japan und Indien, konnten *CEL-HYB* jedoch bei keinem Individuum nachweisen (Zou et al., 2016). Stattdessen fanden sie in allen drei

Kohorten ein anderes Hybridallel, das sie *CEL-HYB2* nannten und das nicht mit chronischer Pankreatitis assoziiert war. 2019 untersuchte eine Studie polnische pädiatrische Patienten mit chronischer Pankreatitis und gesunde Kontrollen, konnte jedoch keine statistisch signifikante Häufung bei den Patienten nachweisen (Oracz et al., 2019). Interessanterweise wurde *CEL-HYB* bei den gesunden Kontrollpersonen allerdings deutlich häufiger nachgewiesen als in unserer Kohorte (2,4 % vs. 0,7 %). Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass *CEL-HYB* ein Risikofaktor sein könnte, der spezifisch für bestimmte ethnische Gruppen ist, und dass es noch weitere Umwelteinflüsse oder genetische Faktoren benötigt, um eine chronische Pankreatitis auszulösen.

Bei der initialen Identifikation von *CEL-HYB* wurden im Bereich der *CEL-CELP*-Verbindungsstelle zwei Einzelnukleotidpolymorphismen beschrieben, rs77696629 (p. Ile488Thr) und rs750991274 (p. Thr548Ile) (Fjeld et al., 2015). Cassidy und Mitarbeiter untersuchten, ob diese zwei Einzelnukleotidpolymorphismen bei *CEL-HYB*-Trägern Einfluss auf das Risiko zur Entstehung einer chronischen Pankreatitis haben könnten (Cassidy et al., 2020). Die eine Variante, rs77696629 (p. Ile488Thr), wurde bei fast allen Patienten und Kontrollen, die *CEL-HYB* trugen, nachgewiesen. Die andere, rs750991274 (p. Thr548Ile), fand sich nur bei Patienten. Das spricht dafür, dass vor allem das gleichzeitige Vorliegen beider Einzelnukleotidpolymorphismen das Risiko einer chronischen Pankreatitis erhöht.

Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass *CEL-HYB* aufgrund seiner veränderten Proteinstruktur intrazelluläre Aggregate bildet und nicht regulär sezerniert werden kann. Der dadurch verursachte Stress im endoplasmatischen Retikulum könnte Autophagozytose-Prozesse auslösen, die schlussendlich zu einer chronischen Pankreatitis führen. Ursächlich für die intrazelluläre Akkumulation könnten die verkürzte VNTR-Region und die dadurch veränderte O-Glykosylierung im Vergleich zu *CEL-WT* sein. Damit das Vorliegen einer *CEL-HYB*-Variante jedoch tatsächlich die Entstehung einer chronischen Pankreatitis verursacht, ist vermutlich ein komplexes Zusammenspiel aus weiteren Umwelteinflüssen und genetischen Faktoren erforderlich, was sich in den nächsten Jahren wahrscheinlich immer deutlicher zeigen wird.

5.2 *PLA2G1B*-Varianten bei chronischer Pankreatitis

Für die detektierten *PLA2G1B*-Varianten zeigte sich keine signifikante Häufung bei Patienten mit chronischer Pankreatitis im Vergleich zu den Kontrollen. Somit spielen *PLA2G1B*-Varianten in der Pathogenese der chronischen Pankreatitis wahrscheinlich keine Rolle.

In einer aktuellen Arbeit, die ein etwas größeres Patientenkollektiv (n=416) mit chronischer Pankreatitis untersuchte, konnten neben den beiden in dieser Arbeit identifizierten *PLA2G1B*-Varianten auch noch zwei weitere detektiert werden (Ewers et al., 2022). Bei jeweils einem Patienten fand sich eine synonyme (p.N46=) und eine nicht-synonyme Variante (p.S82G). Eine signifikante Häufung der Varianten in der Gruppe der Patienten konnte auch in der aktuellen Arbeit nicht beobachtet werden.

Unsere Daten sind auch im Einklang mit Beobachtungen an *Pla2g1b*^{-/-}-Mäusen. Die Tiere waren gegen ernährungsbedingte Fettleibigkeit und Typ-2-Diabetes geschützt, zeigten aber keinen offensichtlichen Pankreas-Phänotyp (Richmond et al., 2001)(Labonté et al., 2010).

5.3 *PNLIP*-Missense-Varianten bei chronischer Pankreatitis

Bei der Sequenzierung von *PNLIP* wurden heterozygote Missense-Varianten bei 8/429 (1,9 %) Patienten mit nicht-alkoholischer chronischer Pankreatitis und bei 2/600 (0,3 %) der Kontrollen nachgewiesen. Damit zeigte sich eine signifikante Häufung in der Patientengruppe ($P = 0,02$). Interessanterweise lag bei allen deutschen Patienten mit einer nicht-synonymen Variante, die mit einer Proteasen-Sensitivität einherging (s.u.), ein frühes Manifestationsalter (≤ 12 Jahre) vor. Die Variante p.F300L stach besonders heraus, weil sie die am häufigsten detektierte Variante war (4/429 Patienten) und in der Kontrollgruppe nicht auftrat. Die Mutation findet sich nicht in der gnomAD-Datenbank, in der für diese genomische Position (10:118315600) über 250.000 analysierte Allele hinterlegt sind (https://gnomad.broadinstitute.org/variant/10-118315600-C-T?dataset=gnomad_r2_1). Die restlichen Missense-Varianten konnten mit Ausnahme von p.I265R, die zweimal bei Patienten gefunden worden ist, jeweils

nur einmal in der Patienten- oder Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Insgesamt scheinen diejenigen Varianten, die mit chronischer Pankreatitis assoziiert sind, zu einer fehlerhaften Funktion des Enzyms zu führen.

Es wurde bereits berichtet, dass Mutationen in Verdauungsenzymen eine fehlerhafte Proteinfaltung zur Folge haben können, wodurch es zu einer verminderten Sekretion und zu einer intrazellulären Retention der Enzyme kommen kann (Sahin-Tóth, 2017). Der daraus entstehende Stress im endoplasmatischen Retikulum kann die Entstehung einer chronischen Pankreatitis fördern. Dieser Mechanismus konnte bei einigen *PRSS1*- und *CPA1*-Varianten beobachtet werden (E. Kereszturi et al., 2009)(Witt et al., 2013). Bei der funktionellen Untersuchung der gefundenen *PNLIP*-Varianten anhand von transient transfizierten HEK293T-Zellen zeigte der überwiegende Teil eine normale Sekretion im Vergleich zum Wildtyp (>75 % des Wildtyp-Niveaus) (Lasher et al., 2019). Lediglich eine der 6 gefundenen Varianten wies eine deutlich verminderte Sekretion auf (<20 % des Wildtyp-Niveaus). Dabei handelte es sich um die Variante p.V454F, die bei einem Individuum der Kontrollgruppe nachgewiesen wurde.

Um die Enzymaktivität der *PNLIP*-Varianten zu ermitteln, erfolgte durch Kooperationspartner (Xunjun Xiao und Mark Lowe, St. Louis, USA) eine Testung an drei verschiedenen Triglyzerid-Substraten mit zunehmender Kettenlänge. Die 6 in der deutschen Kohorte gefundenen Varianten zeigten für alle drei Substrate eine hohe Enzymaktivität (>50 % des WT), jedoch keine deutlich erhöhte Aktivität im Vergleich zur Wildtyp-Lipase.

PNLIP wird während der Magen-Darm-Passage proteolytisch abgebaut und inaktiviert (Layer et al., 1986; Thiruvengadam & DiMagno, 1988). Für die klinisch am häufigsten auftretenden *PRSS1*-Varianten wie zum Beispiel p.R122H konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen den proteolytischen Abbau zu einer vermehrten Enzymaktivität führt und dadurch die Entstehung einer Pankreatitis begünstigt (Szabó & Sahin-Tóth, 2012). Daher wurde die proteolytische Stabilität von *PNLIP* und den sechs in dieser Arbeit detektierten Varianten untersucht (Lasher et al., 2019). Bei der Testung mit kationischem Trypsin konnte kein Effekt auf die Wildtyp-*PNLIP* gemessen werden. Überraschenderweise zeigten 4 der 6 Varianten (p.P245A, p.I265R, p.F300L und p.S304F) eine vermehrte Degradation durch Trypsin. Die

anderen beiden Varianten, p.H42Y und p.V454F, die ausschließlich bei Kontrollen gefunden worden sind, zeigten sich ebenso unbeeinträchtigt durch das kationische Trypsin wie die Wildtyp-PNLIP. Testungen mit Chymotrypsin C und Chymotrypsin B2 ergaben dasselbe Muster.

In Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen wurde *PNLIP* bei französischen, japanischen, indischen und amerikanischen Kohorten untersucht (Lasher et al., 2019). In der französischen Kohorte fanden sich Protease-sensitive Varianten ebenfalls signifikant häufiger bei Patienten: 5/632 (0,8 %) bei Patienten vs. 1/957 (0,1 %) bei Kontrollen ($P = 0,04$; OR = 7,6; 95 % CI = 0,9-172,9). In den nicht-europäischen Kohorten ließen sich hingegen keine Protease-sensitiven Varianten nachweisen (Lasher et al., 2019).

Es bleibt unklar, wie genau die gefundenen *PNLIP*-Varianten das Risiko für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis erhöhen. Eine Möglichkeit wäre, dass die erhöhte proteolytische Anfälligkeit nur ein Marker für einen anderen funktionellen Defekt ist. Eine veränderte Proteinfunktion könnte beispielsweise eine Aggregation oder die Komplexbildung mit anderen Proteinen wie zum Beispiel Verdauungsenzymen begünstigen. Das wiederum könnte zu einer Trypsin-Aktivierung oder Stress im endoplasmatischen Retikulum führen. Es wäre auch denkbar, dass durch den vorzeitigen Abbau der Lipasen ein regulatorischer Mechanismus ausgelöst wird, der eine ungewollte Stimulation des Pankreas zur Folge hätte. Trotz der denkbaren Szenarien konnte jedoch kein Pathomechanismus gefunden werden.

5.4 Rolle der Lipasen

Viele Gene, die bisher im Zusammenhang mit der Entstehung einer chronischen Pankreatitis identifiziert werden konnten, kodieren für Gene des Proteasen-Antiproteasen-Systems der pankreatischen Azinuszellen. Wie schon zu Beginn dieser Arbeit erläutert, zählen hierzu das kationische (*PRSS1*) und das anionische (*PRSS2*) Trypsinogen, der Serinproteaseinhibitor Kazal Typ 1 (*SPINK1*), Chymotrypsinogen C (*CTRC*), Carboxypeptidase A1 (*CPA1*), die Chymotrypsinogene B1 und B2 (*CTRB1*,

CTRB2) und die Elastase 3B (*CELA3B*). Weitere genetische Risikofaktoren stellen Varianten in den Genen *CFTR*, *TRPV6*, *CLDN2* und *CASR* dar.

In dieser Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass auch Lipasen eine Rolle bei der Entstehung einer chronischen Pankreatitis spielen. Im Gegensatz zu den bereits bekannten Risikogenen aus dem Proteasen-/Antiproteasen-System beruht der Pathomechanismus nicht auf einer vorzeitigen Aktivierung pankreatischer Verdauungsenzyme. Vielmehr scheint bei *CEL*-Mutationen eine Akkumulation von defekten Proteinen zu Zellschäden zu führen und dadurch Autophagozytoseprozesse auszulösen. Somit stellen die in dieser Arbeit identifizierten Risikogene in mehrerlei Hinsicht eine außergewöhnliche und neuartige Erkenntnis in der Pankreatitisforschung dar.

Abbildung 6 und die beiden folgenden Tabellen (Tabelle 13 und 14) stellen eine Übersicht der bereits bekannten Risikogene und der beiden in dieser Arbeit neu identifizierten Gene dar.

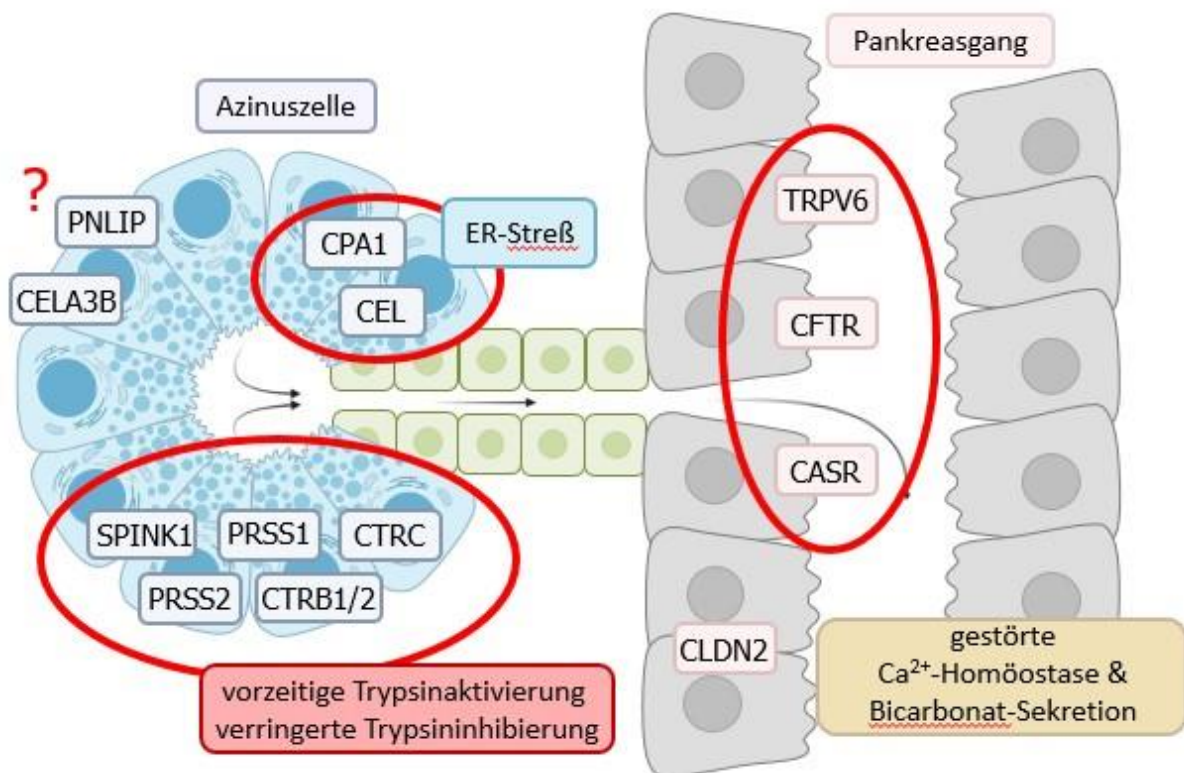


Abbildung 6: Modell der hereditären chronischen Pankreatitis mit einer Übersicht aller bisher bekannten und der beiden neu identifizierten Risikogene (Rosendahl et Witt, Internist 2021).

ER, endoplasmatisches Retikulum; ?, Pathomechanismus unklar.

Proteasen und Antiproteasen								Lipasen	
	<i>PRSS1</i>	<i>PRSS2</i>	<i>SPINK1</i>	<i>CTRC</i>	<i>CPA1</i>	<i>CTRB1/2</i>	<i>CELA3B</i>	<i>CEL</i>	<i>PNLIP</i>
Funktion	Endoprotease	Endoprotease	Trypsin-inhibitor	Spaltung von Trypsin	Exoprotease	Endoprotease	Endoprotease	Aufspaltung von Cholesterinestern	Spaltung langkettiger Triglyzeride
Erstbeschreibung	1996	2006	2000	2008	2013	2018	2019	2015	2019
Bekanntes Mutationen	Mehrere Mutationen, häufigste: p.A16V, p.N29I und p.R122H	p.G191R	Mehrere Mutationen, häufigste: p.N34S	Mehrere Mutationen, häufigste: p.R254W und p.K247_R254del	Mehrere Mutationen, häufigste: p.N256K	16,6kb-Inversion im CTRB1-CTRB2-Locus	p.R90C, p.R90L c.129+1G>A	Deletions-Hybrid-Allel (<i>CEL-HYB</i>)	Mehrere Mutationen, häufigste: p.F300L
Effekt der Mutation(en) auf das Protein	Erhöhte Autoaktivierung, verminderter Abbau	Erhöhte Anfälligkeit für autokatalytische Spaltung	Verminderte Expression des Inhibitors	Funktionsverlust, verminderte Synthese, gestörte Sekretion	Fehlfaltung im endoplasmatischen Retikulum (ER)	Vermehrte CTRB2-Expression und dadurch erhöhte Trypsin-Inaktivierung	Vermehrte CELA3B-Expression und erleichterte Aktivierung durch Trypsin	Intrazelluläre Retention und verminderte Sekretion	unklar
Pathomechanismus	Trypsinaktivität ↑ Autodigestion	Trypsinaktivität ↓ Protektiver Effekt	Trypsinaktivität ↑ Autodigestion	Trypsinaktivität ↑ Autodigestion	ER-Stress	Trypsinaktivität ↓ Protektiver Effekt	Unklar (Proteasenaktivität ↑ bei Codon 90.Mutationen)	Zellschäden	unklar

Tabelle 13: Übersicht der bekannten und der beiden neu identifizierten azinären Risikogene für chronische Pankreatitis

	CFTR	TRPV6	CLDN2	CASR
Funktion	Chloridionen-Kanal	epithelialer Ca ²⁺ -Kanal	interzelluläres Verbindungsprotein	Kalzium-sensitiver Rezeptor
Erstbeschreibung	1998	2020	2012	2003
bekannte Mutationen	mehr als 1900 Mutationen bekannt. Nur bei heterozygotem Vorliegen mit Varianten anderer Gene relevant (Trans-Heterozygotie).	mehrere Mutationen	zwei Einzelnukleotid-polymorphismen im X-chromosomalen <i>CLDN2-MORC4</i> -Locus: <i>rs12688220</i> und <i>rs7057398</i>	Mehrere Mutationen bekannt. In Einzelfällen Trans-Heterozygotie mit <i>SPINK</i> -Mutation (p.N34S) beschrieben.
Effekt der Mutation(en) auf das Protein	Funktionsverlust des Chlorid-Ionen-Kanals, Viskositätserhöhung von Drüsensekreten	Funktionsverlust des Ca ²⁺ -Kanals, veränderte intrapankreatische Ca ²⁺ -Konzentration	vermehrte Expression	Funktionsverlust
Pathomechanismus	intrapankreatische Aktivierung der Verdauungsenzyme	Vorzeitige Trypsin-Aktivierung, Autodigestion	unklar	unklar evtl. durch Hypercalciämie

Tabelle 14: Übersicht der bekannten duktaalen Risikogene für chronische Pankreatitis

6 Zusammenfassung

Die chronische Pankreatitis (CP) ist eine Erkrankung der Bauchspeicheldrüse, bei der es durch anhaltende oder rezidivierende Entzündungsprozesse zu einem fibrotischen Umbau des Drüsenparenchyms kommt. Bisher konnten verschiedene Gene identifiziert werden, deren Mutationen unterschiedlich stark mit der Entstehung einer CP assoziiert sind. Da diese Mutationen vor allem Enzyme aus dem Proteasen-/Antiproteasen-System betreffen, wurden in dieser Arbeit drei Gene untersucht, die für pankreatische Lipasen kodieren: Carboxylester-Lipase (*CEL*), Pankreatische Phospholipase A2 (*PLA2G1B*) und Pankreatische Lipase (*PNLIP*)

Für *CEL* wurden 510 Patienten mit idiopathischer oder hereditärer CP auf das Vorliegen eines Hybrid-Allels (*CEL-HYB*) getestet, das aus einer Fusion von *CEL* und seinem benachbarten Pseudogen *CELP* entstanden ist. Das Patientenkollektiv wurde mit 2362 gesunden Kontrollpersonen verglichen. Des Weiteren wurden 352 Patienten mit alkohol-induzierter CP untersucht. Als Screening-Methode auf *CEL-HYB* wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Alle Positiv-Proben wurden zur Verifizierung noch einer DNA-Sequenzierung nach Sanger unterzogen. *CEL-HYB* konnte sowohl in der Gruppe der Patienten mit idiopathischer und hereditärer CP als auch in der Gruppe der Patienten mit alkohol-induzierter CP signifikant gehäuft nachgewiesen werden. Alle positiv getesteten Individuen waren heterozygote Träger der Mutation. Um zu untersuchen, ob weitere seltene Varianten in der kodierenden Region ebenfalls zu einer chronischen Pankreatitis disponieren, analysierten wir 364 Patienten und 238 Kontrollen mittels Sanger-Sequenzierung auf die Exone 1 bis 10, fanden aber keine Varianten, die bei chronischer Pankreatitis überrepräsentiert waren.

Für *PLA2G1B* wurde der gesamte kodierende Bereich einschließlich der Exon-Intron-Grenzen mittels PCR und DNA-Sequenzierung nach Sanger nach Varianten abgesucht. Die Analyse erfolgte bei 151 Patienten mit nicht-alkoholischer CP und 186 gesunden Kontrollen. Es fanden sich zwei verschiedene Varianten im Exon 3, die aber zu keinem Aminosäureaustausch führten: c.222T>C (p.Y74=) und c.294G>A (p.S98=). Es zeigte sich keine signifikante Häufung bei Patienten mit CP im Vergleich zu den Kontrollen (c.222TC: CP 0,9 % vs. Kontrollen 1,0 %; c.294GA: CP 3,0 % vs. Kontrollen

2,8 %; c.294AA: CP 0,2 % vs. Kontrollen 0,1 %). Somit spielen *PLA2G1B*-Varianten in der Pathogenese der CP wahrscheinlich keine Rolle.

Auch für *PNLIP* wurden alle 13 Exone einschließlich der Exon-Intron-Grenzen mittels PCR und DNA-Sequenzierung nach Sanger analysiert. Hierfür wurden 429 Patientin mit idiopathischer und hereditärer CP sowie 600 gesunde Kontrollpersonen untersucht. Für *PNLIP* konnten heterozygote nicht-synonyme Mutationen bei 8/429 (1,9%) Patienten und bei 2/600 (0,3 %) Kontrollen identifiziert werden. Die am häufigsten gefundene Variante war p.F300L, die sich bei 4 Patienten, aber bei keiner Kontrolle fand. Sowohl die Variante p.F300L als auch alle Varianten insgesamt fanden sich signifikant häufiger in der Gruppe der Patienten im Vergleich zur Gruppe der Kontrollen.

Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass auch Lipasen eine Rolle bei der Entstehung einer CP spielen. Im Gegensatz zu den bereits bekannten Risikogenen aus dem Proteasen-/Antiproteasen-System beruht der Pathomechanismus nicht auf einer vorzeitigen Aktivierung pankreatischer Verdauungsenzyme. Vielmehr könnte eine Akkumulation defekter Proteine zu Zellschäden führen und Autophagozytoseprozesse auslösen. Die beiden in dieser Arbeit identifizierten Risikogene stellen damit in mehrerlei Hinsicht eine außergewöhnliche und neuartige Erkenntnis in der Pankreatitisforschung dar.

Schlagworte: Chronische Pankreatitis, Gen, Lipase, *CEL*, *CELHYB*, *PLA2G1B*, *PNLIP*, Mutation, Autophagozytose

7 Abstract

Chronic pancreatitis (CP) is a continuing or relapsing inflammatory disease of the pancreas leading to irreversible morphological changes of the gland. Until now various gene mutations have been identified that are associated with CP. Since most of these mutations affect enzymes of the protease-antiprotease system, here we analysed three genes encoding pancreatic lipases: Carboxyl ester lipase (*CEL*), pancreatic phospholipase A2 (*PLA2G1B*) and pancreatic lipase (*PNLIP*)

For *CEL* we screened 510 patients with idiopathic or hereditary CP for a hybrid allele (*CEL-HYB*) originating from a crossover between *CEL* and its neighbouring pseudogene *CELP*. We compared the group of patients to 2362 healthy controls. Furthermore we examined 352 patients with alcoholic CP. For screening we used melting curve analysis, all positive samples were then verified by DNA sequencing. *CEL-HYB* was significantly overrepresented among patients with idiopathic or hereditary CP as well as among patients with alcoholic CP. All positive individuals were heterozygous carriers of the allele. To examine whether other rare variants within exons 1-10 outside the context of *CEL-HYB* could be associated with CP, 364 patients and 238 controls were sequenced. No variants were found, that were overrepresented among CP cases.

For *PLA2G1B* we sequenced all coding exons and the flanking intronic regions in 151 cases with non-alcoholic CP and in 186 healthy control subjects. We found two variants in exon 3 that did not result in a change of the amino acid sequence: c.222T>C (p.Y74=) and c.294G>A (p.S98=). There was no significant enrichment in cases with CP compared to the controls (c.222TC: CP 0,9 % vs. controls 1,0 %; c.294GA: CP 3,0 % vs. controls 2,8 %; c.294AA: CP 0,2 % vs. controls 0,1 %). Therefore genetic alterations in *PLA2G1B* do not seem to play a role in the development of CP.

For *PNLIP* we sequenced all 13 coding exons and the flanking intronic regions in 429 patients with idiopathic or hereditary CP and 600 healthy control subjects. We found heterozygous missense variants in 8/429 (1.9%) cases and in 2/600 (0.3%) controls. The most frequently found variant was p.F300L, which was present in four cases but

not in controls. Both the variant p.F300L and all other variants were significantly overrepresented among CP cases.

This is the first time that lipase genes were directly associated with CP. In contrast to the genes of the protease/antiprotease system identified so far the disease mechanism here does not involve premature activation of pancreatic digestive enzymes. Instead, intracellular accumulation of defective proteins might lead to injury inside the cell and induce compensatory autophagy. The identification of the two lipase genes here is therefore in many ways an exceptional and novel finding in pancreatic research.

Key words: chronic pancreatitis, gene, lipase, *CEL*, *CELHYB*, *PLA2G1B*, *PNLIP*, mutation, autophagy

8 Literaturverzeichnis

- Behar, D. M., Basel-Vanagaite, L., Glaser, F., Kaplan, M., Tzur, S., Magal, N., Eidlitz-Markus, T., Haimi-Cohen, Y., Sarig, G., Bormans, C., Shohat, M., & Zeharia, A. (2014). Identification of a novel mutation in the *PNLIP* gene in two brothers with congenital pancreatic lipase deficiency. *Journal of Lipid Research*, *55*(2), 307–312. <https://doi.org/10.1194/jlr.P041103>
- Borgström, B., & Erlanson, C. (1973). Pancreatic lipase and co-lipase. Interactions and effects of bile salts and other detergents. *European Journal of Biochemistry*, *37*(1), 60–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4738093>
- Bruce, J. I. E., 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.29.20561>
- 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. <https://doi.org/10.1002/humu.24105>
- Chandak, G. R., Idris, M. M., Reddy, D. N., Bhaskar, S., Sriram, P. V. J., & Singh, L. (2002). Mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (PSTI/SPINK1) rather than the cationic trypsinogen gene (PRSS1) are significantly associated with tropical calcific pancreatitis. *Journal of Medical Genetics*, *39*(5), 347–351. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.5.347>
- Chiari, H. (1896). Über die Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Zeitschrift Für Heilkunde*, *17*, 69–96.
- Cohn, J. A., Friedman, K. J., Noone, P. G., Knowles, M. R., Silverman, L. M., & Jowell, P. S. (1998). Relation between Mutations of the Cystic Fibrosis Gene

and Idiopathic Pancreatitis. *New England Journal of Medicine*, 339(10), 653–658. <https://doi.org/10.1056/NEJM199809033391002>

Colomb, E., Guy, O., Deprez, P., Michel, R., & Figarella, C. (1978). The two human trypsinogens: catalytic properties of the corresponding trypsins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 525(1), 186–193. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28765>

Comfort, M. W., & Steinberg, A. G. (1952). Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology*, 21(1), 54–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14926813>

Dalva, M., Lavik, I. K., El Jellas, K., Gravdal, A., Lugea, A., Pandol, S. J., Njølstad, P. R., Waldron, R. T., Fjeld, K., Johansson, B. B., & Molven, A. (2020). Pathogenic Carboxyl Ester Lipase (CEL) Variants Interact with the Normal CEL Protein in Pancreatic Cells. *Cells*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/cells9010244>

Derikx, M. H., Kovacs, P., Scholz, M., Masson, E., Chen, J.-M., Ruffert, C., Lichtner, P., Te Morsche, R. H. M., Cavestro, G. M., Férec, C., Drenth, J. P. H., Witt, H., Rosendahl, J., & PanEuropean Working group on Alcoholic Chronic Pancreatitis Members and Collaborators. (2015). Polymorphisms at PRSS1-PRSS2 and CLDN2-MORC4 loci associate with alcoholic and non-alcoholic chronic pancreatitis in a European replication study. *Gut*, 64(9), 1426–1433. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307453>

Derikx, M. H. M., Geisz, A., Kereszturi, É., & Sahin-Tóth, M. (2015). Functional significance of SPINK1 promoter variants in chronic pancreatitis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 308(9), G779-84. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00022.2015>

Durno, C., Corey, M., Zielenski, J., Tullis, E., Tsui, L. C., & Durie, P. (2002). Genotype and phenotype correlations in patients with cystic fibrosis and pancreatitis. *Gastroenterology*, 123(6), 1857–1864. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.37042>

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. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2021.08.008>

Ewers, M., Epple, D., Bugert, P., Rosendahl, J., & Witt, H. (2022). Genetic analysis of pancreatic phospholipase A2 (PLA2G1B) in patients with chronic pancreatitis. *Pancreatology*, 2(xxxx), 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2022.01.003>

F.M. Müller, J.Bend, E. R. (2013). S3 - Leitlinie „Lungenerkrankung bei Mukoviszidose“, Modul 1 : Diagnostik und Therapie nach dem ersten Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa*. *AWMF Online*, 58.

Farrell, P. M., Rosenstein, B. J., White, T. B., Accurso, F. J., Castellani, C., Cutting, G. R., Durie, P. R., LeGrys, V. A., Massie, J., Parad, R. B., Rock, M. J., & Campbell, P. W. (2008). Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *Journal of Pediatrics*, 153(2). <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2008.05.005>

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, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-3-34>

Felderbauer, P., Klein, W., Bulut, K., Ansorge, N., Dekomien, G., Werner, I., Eppel, J. T., 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. <https://doi.org/10.1080/00365520510024214>

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., Sendler, M., Simon, P., Sztromwasser, P., Torsvik, J., Scholz, M., Tjora, E., Férec, C., Witt, H., Lerch, M. M., Njølstad, P. R., Johansson, S., & 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.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25774637>
- Gerasimenko, J. V., Gerasimenko, O. V., & Petersen, O. H. (2014). The role of Ca²⁺ in the pathophysiology of pancreatitis. *Journal of Physiology*, *592*(2), 269–280.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.261784>
- Gorry, M. C., Ghabbaizedeh, D., Furey, W., Gates, L. K., Preston, R. A., Aston, C. E., Zhang, Y., Ulrich, C., Ehrlich, G. D., & Whitcomb, D. C. (1997). Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, *113*(4), 1063–1068.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9322498>
- Gottesman-Katz, L., Chung, W., Hernan, R., & DeFelice, A. R. (2020). Two Novel PNLIP Mutations Causing Congenital Lipase Deficiency in Identical Twin Boys. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*., *70*(4), 85–86.
<https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002641>
- Gravdal, A., Xiao, X., Cnop, M., Jellas, K. E., Johansson, S., Njølstad, P. R., Lowe, M. E., Johansson, B. B., Molven, A., & Fjeld, K. (2021). The position of single-base deletions in the VNTR sequence of the carboxyl ester lipase (CEL) gene determines proteotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, *296*, 100661.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100661>
- Gukovskaya, A. S., & Gukovsky, I. (2012). Autophagy and pancreatitis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *303*(9), G993–G1003. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00122.2012>
- Hannan, F. M., Nesbit, M. A., Turner, J. J. O., Stacey, J. M., Cianferotti, L., Christie, P. T., Conigrave, A. D., Whyte, M. P., & Thakker, R. V. (2010). Comparison of

human chromosome 19q13 and syntenic region on mouse chromosome 7 reveals absence, in man, of 11.6 Mb containing four mouse calcium-sensing receptor-related sequences: Relevance to familial benign hypocalciuric hypercalcaemia type 3. *European Journal of Human Genetics*, 18(4), 442–447. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.161>

Hoffmeister, A., Mayerle, J., Beglinger, C., Büchler, M. W., Bufler, P., Dathe, K., Fölsch, U. R., Friess, H., Izbicki, J., Kahl, S., Klar, E., Keller, J., Knoefel, W. T., Layer, P., Loehr, M., Meier, R., Riemann, J. F., Rünzi, M., Schmid, R. M., Schreyer, A., Tribl, B., Werner, J., Witt, H., Mössner, J., & Lerch, M. M. (2012). S3-Leitlinie Chronische Pankreatitis: Definition, Ätiologie, Diagnostik, konservative, interventionell endoskopische und operative Therapie der chronischen Pankreatitis. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGv. *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, 50(11), 1176–1224. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1325479>

Kazal, L. A., Spicer, D. S., & Brahinsky, R. A. (1948). Isolation of a Crystalline Trypsin Inhibitor-Anticoagulant Protein from Pancreas 1a. *Journal of the American Chemical Society*, 70(9), 3034–3040. <https://doi.org/10.1021/ja01189a060>

Keim, V., Teich, N., Fiedler, F., Hartig, W., Thiele, G., & Mössner, J. (1998). A comparison of lipase and amylase in the diagnosis of acute pancreatitis in patients with abdominal pain. *Pancreas*, 16(1), 45–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9436862>

Kerem, B., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., Buchwald, M., & Tsui, L. C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), 1073–1080. <https://doi.org/10.1126/science.2570460>

Kereszturi, É., & Sahin-Tóth, M. (2017). Pancreatic cancer cell lines heterozygous for the SPINK1 p.N34S haplotype exhibit diminished expression of the variant allele. *Pancreas*, 46(6), e54–e55. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000817>

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. <https://doi.org/10.1002/humu.20853>

Khattar, V., Wang, L., & Peng, J.-B. (2022). Calcium selective channel TRPV6: Structure, function, and implications in health and disease. *Gene*, 817, 146192. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146192>

Kihara, Y., Yoshikawa, H., Honda, H., Fukumitsu, K., Yamaguchi, T., & Otsuki, M. (2005). Natural disruption of group 2 phospholipase A2 gene protects against choline-deficient ethionine-supplemented diet-induced acute pancreatitis and lung injury. *Pancreas*, 31(1), 48–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15968247>

Krüger, B., Albrecht, E., & Lerch, M. M. (2000). The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis. *American Journal of Pathology*, 157(1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64515-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64515-4)

Labonté, E. D., Pfluger, P. T., Cash, J. G., Kuhel, D. G., Roja, J. C., Magness, D. P., Jandacek, R. J., Tschöp, M. H., & Hui, D. Y. (2010). Postprandial lysophospholipid suppresses hepatic fatty acid oxidation: the molecular link between group 1B phospholipase A2 and diet-induced obesity. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(7), 2516–2524. <https://doi.org/10.1096/fj.09-144436>

Lankisch, P., & Layer, P. (2000). Chronische Pankreatitis. *Gastroenterologe*, 6(3), 237–247. <https://doi.org/10.1007/s11377-010-0514-9>

Lasher, D., Szabó, A., Masamune, A., Chen, J.-M., Xiao, X., Whitcomb, D. C., Barmada, M. M., Ewers, M., Ruffert, C., Paliwal, S., Issarapu, P., Bhaskar, S., Mani, K. R., Chandak, G. R., Laumen, H., Masson, E., Kume, K., Hamada, S., Nakano, E., Seltsam, K., Bugert, P., Müller, T., Groneberg, D. A., Shimosegawa,

- T., Rosendahl, J., Férec, C., Lowe, M. E., Witt, H., & Sahin-Tóth, M. (2019). Protease-Sensitive Pancreatic Lipase Variants Are Associated With Early Onset Chronic Pancreatitis. *The American Journal of Gastroenterology*, *114*(6), 974–983. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000051>
- Laskowski, M., & Wu, F. C. (1953). Temporary inhibition of trypsin. *The Journal of Biological Chemistry*, *204*(2), 797–805.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13117856>
- Layer, P., Go, V. L., & DiMagno, E. P. (1986). Fate of pancreatic enzymes during small intestinal aboral transit in humans. *The American Journal of Physiology*, *251*(4 Pt 1), G475-80. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1986.251.4.G475>
- Lidberg, U., Nilsson, J., Strömberg, K., Stenman, G., Sahlin, P., Enerbäck, S., & Bjursell, G. (1992). Genomic organization, sequence analysis, and chromosomal localization of the human carboxyl ester lipase (CEL) gene and a CEL-like (CELL) gene. *Genomics*, *13*(3), 630–640.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1639390>
- Lindquist, S., Bläckberg, L., & Hernell, O. (2002). Human bile salt-stimulated lipase has a high frequency of size variation due to a hypervariable region in exon 11. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *269*(3), 759–767.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846777>
- Lombardo, D. (2001). Bile salt-dependent lipase: its pathophysiological implications. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1533*(1), 1–28.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11514232>
- Lowe, M. E., Rosenblum, J. L., & Strauss, a W. (1989). Cloning and characterization of human pancreatic lipase cDNA. *The Journal of Biological Chemistry*, *264*(33), 20042–20048. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2479644>
- Lupski, J. R. (1998). Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends in Genetics : TIG*,

14(10), 417–422. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9820031>

Madeyski, K., Lidberg, U., Bjursell, G., & Nilsson, J. (1998). Structure and organization of the human carboxyl ester lipase locus. *Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 9(4), 334–338. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9530636>

Mao, X.-T., Deng, S.-J., Kang, R.-L., Wang, Y.-C., Li, Z.-S., Zou, W.-B., & Liao, Z. (2021). Homozygosity of short VNTR lengths in the CEL gene may confer susceptibility to idiopathic chronic pancreatitis. *Pancreatology : Official Journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et Al.]*, 21(7), 1311–1316. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2021.09.001>

Marchbank, T., Freeman, T. C., & Playford, R. J. (1998). Human Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor. *Digestion*, 59(3), 167–174. <https://doi.org/10.1159/000007485>

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., Kriebis, 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.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.01.005>

Masamune, A., Nakano, E., Hamada, S., Kakuta, Y., Kume, K., & Shimosegawa, T. (2015). Common variants at PRSS1–PRSS2 and CLDN2–MORC4 loci associate with chronic pancreatitis in Japan. *Gut*, 64(8), 1345–1346. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309802>

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.
<https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000361>

Masson, E., Rebours, V., Buscail, L., Frete, F., Pagenault, M., Lachaux, A., Chevaux, J.-B., Génin, E., Cooper, D. N., Férec, C., & Chen, J.-M. (2021). The reversion variant (p.Arg90Leu) at the evolutionarily adaptive p.Arg90 site in CELA3B predisposes to chronic pancreatitis. *Human Mutation*, *42*(4), 385–391.
<https://doi.org/10.1002/humu.24178>

Meriläinen, S., Mäkelä, J., Anttila, V., Koivukangas, V., Kaakinen, H., Niemelä, E., Ohtonen, P., Risteli, J., Karttunen, T., Soini, Y., & Juvonen, T. (2008). Acute edematous and necrotic pancreatitis in a porcine model. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *43*(10), 1259–1268.
<https://doi.org/10.1080/00365520802158580>

Moore, P. C., Cortez, J. T., Chamberlain, C. E., Alba, D., Berger, A. C., Quandt, Z., Chan, A., Cheng, M. H., Bautista, J. L., Peng, J., German, M. S., Anderson, M. S., & Oakes, S. A. (2019). Elastase 3B mutation links to familial pancreatitis with diabetes and pancreatic adenocarcinoma. *Journal of Clinical Investigation*, *129*(11), 4676–4681. <https://doi.org/10.1172/JCI129961>

Murakami, M., & Kudo, I. (2002). Phospholipase A2. *Journal of Biochemistry*, *131*(3), 285–292. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11872155>

Murugaian, E. E., Ram Kumar, R. M., 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.
<https://doi.org/10.1080/00365520701580413>

Naehrlich, L., Stuhmann-Spangenberg, M., Barben, J., Bargon, J., Blankenstein, O., Bremer, W., Brunsmann, F., Buchholz, T., Ellemunter, H., Fusch, C., Gembruch, U., Hammermann, J., Jacobeit, J., Jung, A., Keim, V., Loff, S., Mayr, S., Pfeiffer-

- Auler, S., Rossi, R., Sitter, H., Stern, M., Straßburg, C., & Derichs, N. (2013). S2-Konsensus-Leitlinie „Diagnose der Mukoviszidose“ (AWMF 026-023) unter Federführung der Gesellschaft für Pädiatrischen Pneumologie. *AWMF-Register Nr.026/023 Klasse: S2k, 026*, 1–28.
- Nilsson, J., Blackberg, L., Carlsson, P., Enerback, S., Hernell, O., & Bjursell, G. (1990). cDNA cloning of human-milk bile-salt stimulated lipase and evidence for its identity to pancreatic carboxylic ester hydrolase. *European Journal of Biochemistry*, *192*(2), 543–550. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19259.x>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2019.04.006>
- Perrault, J. (1994). Hereditary pancreatitis. *Gastroenterology Clinics of North America*, *23*(4), 743–752. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7698830>
- Rácz, G. Z., Kittel, Á., Riccardi, D., Case, R. M., Elliott, A. C., & Varga, G. (2002). Extracellular calcium sensing receptor in human pancreatic cells. *Gut*, *51*(5), 705–711. <https://doi.org/10.1136/gut.51.5.705>
- Raeder, H., Johansson, S., Holm, P. I., Haldorsen, I. S., Mas, E., Sbarra, V., Nermoen, 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. <https://doi.org/10.1038/ng1708>
- Raeder, H., McAllister, F. E., Tjora, E., Bhatt, S., Haldorsen, I., Hu, J., Willems, S. M., Vesterhus, M., El Ouaamari, A., Liu, M., Ræder, M. B., Immervoll, H., Hoem, D., Dimcevski, G., Njølstad, P. R., Molven, A., Gygi, S. P., & Kulkarni, R. N. (2014).

Carboxyl-ester lipase maturity-onset diabetes of the young is associated with development of pancreatic cysts and upregulated MAPK signaling in secretin-stimulated duodenal fluid. *Diabetes*, 63(1), 259–269.

<https://doi.org/10.2337/db13-1012>

Ragvin, A., Fjeld, K., Weiss, F. U., Torsvik, J., Aghdassi, A., Mayerle, J., Simon, P., Njølstad, P. R., Lerch, M. M., Johansson, S., & Molven, A. (2013). The number of tandem repeats in the carboxyl-ester lipase (CEL) gene as a risk factor in alcoholic and idiopathic chronic pancreatitis. *Pancreatology*, 13(1), 29–32.

<https://doi.org/10.1016/j.pan.2012.12.059>

Rahner, C., Mitic, L. L., & Anderson, J. M. (2001). Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology*, 120(2), 411–422. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.21736>

Rehner, G., & Daniel, H. (2010). *Biochemie der Ernährung*. 3. Auflage, 334–335.

Richmond, B. L., Boileau, A. C., Zheng, S., Huggins, K. W., Granholm, N. A., Tso, P., & Hui, D. Y. (2001). Compensatory phospholipid digestion is required for cholesterol absorption in pancreatic phospholipase A(2)-deficient mice.

Gastroenterology, 120(5), 1193–1202. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.23254>

Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B. S., Alon, N. O. A., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S. I., Plavsic, N., Chou, J. L., Drumm, M. L., Iannuzzi, M. C., Collins, F. S., & Tsui, L. C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245(4922), 1066–1073. <https://doi.org/10.1126/science.2475911>

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., Farré, A., Frank, J., ... 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.

<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314454>

Rosendahl, J., Landt, O., Bernadova, J., Kovacs, P., Teich, N., Bödeker, H., Keim, V., Ruffert, C., Mössner, J., Kage, A., Stumvoll, M., Groneberg, D., Krüger, R., Luck, W., Treiber, M., Becker, M., & Witt, H. (2013). CFTR, SPINK1, CTRC and PRSS1 variants in chronic pancreatitis: is the role of mutated CFTR overestimated? *Gut*, *62*(4), 582–592. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300645>

Rosendahl, J., Witt, H., Szmola, R., Bhatia, E., Ozsvári, B., Landt, O., Schulz, H., 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, 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. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.44>

Sahin-Tóth, M. (2017). Genetic risk in chronic pancreatitis: The misfolding-dependent pathway. *Current Opinion in Gastroenterology*, *33*(5), 390–395. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000380>

Sahin-Tóth, M., & Tóth, M. (2000). Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *278*(2), 286–289. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3797>

Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, C. A., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M., & Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, *265*(5596), 687–695. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/870828>

Scheele, G., Bartelt, D., & Bieger, W. (1981). Characterization of human exocrine pancreatic proteins by two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Gastroenterology*, *80*(3), 461–473.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6969677>

Seltsam, K., Pentner, C., Weigl, F., Sutedjo, S., Zimmer, C., Beer, S., Bugert, P., Ewers, M., Ruffert, C., Michl, P., Laumen, H., Witt, H., & Rosendahl, J. (2020). Sequencing of the complex CTRB1-CTRB2 locus in chronic pancreatitis. *Pancreatology: Official Journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et Al.]*, 20(8), 1598–1603. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2020.09.017>

Sharer, N., Schwarz, M., Malone, G., Howarth, A., Painter, J., Super, M., & Braganza, J. (1998). Mutations of the Cystic Fibrosis Gene in Patients with Chronic Pancreatitis. *New England Journal of Medicine*, 339(10), 645–652. <https://doi.org/10.1056/NEJM199809033391001>

Steer, M. L., & Meldolesi, J. (1987). The cell biology of experimental pancreatitis. *The New England Journal of Medicine*, 316(3), 144–150. <https://doi.org/10.1056/NEJM198701153160306>

Szabó, A., & Sahin-Tóth, M. (2012). Increased activation of hereditary pancreatitis-associated human cationic trypsinogen mutants in presence of chymotrypsin C. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(24), 20701–20710. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.360065>

Szabó, A., Xiao, X., Haughney, M., Spector, A., Sahin-Tóth, M., & Lowe, M. E. (2015). A novel mutation in PNLIP causes pancreatic triglyceride lipase deficiency through protein misfolding. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(7), 1372–1379. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.04.002>

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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703714104>

Takáts, A., Berke, G., Szentesi, A., Farkas, G., Izbéki, F., Erőss, 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*, 21(7), 1305–1310. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2021.08.012>
- Teich, N., Mössner, J., & Keim, V. (1998). Mutations of the cationic trypsinogen in hereditary pancreatitis. *Human Mutation*, 12(1), 39–43. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1998\)12:1<39::AID-HUMU6>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1998)12:1<39::AID-HUMU6>3.0.CO;2-P)
- Teich, N., Rosendahl, J., Tóth, M., Mössner, J., & Sahin-Tóth, M. (2006). Mutations of human cationic trypsinogen (PRSS1) and chronic pancreatitis. *Human Mutation*, 27(8), 721–730. <https://doi.org/10.1002/humu.20343>
- Thiruvengadam, R., & DiMagno, E. P. (1988). Inactivation of human lipase by proteases. *The American Journal of Physiology*, 255(4 Pt 1), G476-81. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1988.255.4.G476>
- 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. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000001963>
- Tóth, A., Demcsák, A., Zankl, F., Oracz, G., Unger, L. S., Bugert, P., Laumen, H., Párniczky, A., Hegyi, P., Rosendahl, J., Gambin, T., Płoski, R., Koziel, D., Gluszek, S., Lindgren, F., Löhr, J. M., Sahin-Tóth, M., Witt, H., Rygiel, A. M., Ewers, M., & Hegyi, E. (2022). Loss-of-function variant in chymotrypsin like elastase 3B (CELA3B) is associated with non-alcoholic chronic pancreatitis. *Pancreatology: Official Journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et Al.]*. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2022.06.258>
- Vendrell, J., Querol, E., & Avilés, F. X. (2000). Metalloproteases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties. *Biochimica et*

Biophysica Acta, 1477(1–2), 284–298.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10708864>

Whitcomb, D. C., Gorry, M. C., Preston, R. A., Furey, W., Sossenheimer, M. J., Ulrich, C. D., Martin, S. P., Gates, 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. <https://doi.org/10.1038/ng1096-141>

Whitcomb, D. C., LaRusch, J., Krasinskas, A. M., Klei, L., Smith, J. P., Brand, R. E., Neoptolemos, J. P., Lerch, M. M., Tector, M., Sandhu, B. S., Guda, N. M., Orlichenko, L., Alzheimer's Disease Genetics Consortium, Alkaade, S., Amann, S. T., Anderson, M. A., Baillie, J., Banks, P. A., Conwell, D., Coté, G. A., Cotton, P. B., DiSario, J., ... Devlin, B. (2012). Common genetic variants in the CLDN2 and PRSS1-PRSS2 loci alter risk for alcohol-related and sporadic pancreatitis. *Nature Genetics*, 44(12), 1349–1354. <https://doi.org/10.1038/ng.2466>

Witt, H. (2002). Chronische Pankreatitis. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 150(1), 87–99. <https://doi.org/10.1007/s112-002-8189-0>

Witt, H., Beer, S., Rosendahl, J., Chen, J.-M., Chandak, G. R., Masamune, A., Bence, M., Szmola, R., Oracz, G., Macek, M., Bhatia, E., Steigenberger, S., Lasher, D., Bühler, F., Delaporte, C., Tebbing, J., Ludwig, M., Pilsak, C., Saum, K., Bugert, P., Masson, E., Paliwal, S., ... Sahin-Tóth, M. (2013). Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. *Nature Genetics*, 45(10), 1216–1220. <https://doi.org/10.1038/ng.2730>

Witt, H., Luck, W., & Becker, M. (1999). A signal peptide cleavage site mutation in the cationic trypsinogen gene is strongly associated with chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 117(1), 7–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10381903>

Witt, H., Luck, W., Becker, M., Böhmig, M., Kage, A., Truninger, K., Ammann, R. W., O'Reilly, D., Kingsnorth, A., Schulz, H. U., Halangk, W., Kielstein, V., Knoefel, W. T., Teich, N., & Keim, V. (2001). Mutation in the SPINK1 trypsin inhibitor gene,

alcohol use, and chronic pancreatitis. *JAMA*, 285(21), 2716–2717.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11386926>

Witt, H., Luck, W., Hennies, H. C. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, K. type 1 are associated with chronic pancreatitis., 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. <https://doi.org/10.1038/76088>

Witt, H., Sahin-Tóth, M., Landt, O., Chen, J., Kähne, T., Drenth, J. P., Kukor, Z., Szepessy, E., Halangk, W., Dahm, S., Rohde, K., Schulz, H., Le Maréchal, C., Akar, N., Ammann, R. W., Truninger, K., Bargetzi, M., Bhatia, E., Castellani, C., Cavestro, G. M., Cerny, M., Destro-Bisol, G., ... Férec, C. (2006). A degradation-sensitive anionic trypsinogen (PRSS2) variant protects against chronic pancreatitis. *Nature Genetics*, 38(6), 668–673. <https://doi.org/10.1038/ng1797>

Wolters-Eisfeld, G., Mercanoglu, B., Hofmann, B. T., Wolpers, T., Schnabel, C., Harder, S., Steffen, P., Bachmann, K., Steglich, B., Schrader, J., Gagliani, N., Schlüter, H., Güngör, C., Izbicki, J. R., Wagener, C., & Bockhorn, M. (2018). Loss of complex O-glycosylation impairs exocrine pancreatic function and induces MODY8-like diabetes in mice. *Experimental and Molecular Medicine*, 50(10). <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0157-3>

Xiao, X., Jones, G., Sevilla, W. A., Stolz, D. B., Magee, K. E., Haughney, M., Mukherjee, A., Wang, Y., & Lowe, M. E. (2016). A Carboxyl Ester Lipase (CEL) mutant causes chronic pancreatitis by forming intracellular aggregates that activate apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 291(44), 23224–23236. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.734384>

Yelshanskaya, M. V, Nadezhdin, K. D., Kurnikova, M. G., & Sobolevsky, A. I. (2021). Structure and function of the calcium-selective TRP channel TRPV6. *The Journal of Physiology*, 599(10), 2673–2697. <https://doi.org/10.1113/JP279024>

Yoshikawa, T., Naruse, S., Kitagawa, M., Ishiguro, H., Nakae, Y., Ono, T., &

Hayakawa, T. (1999). Effect of a new inhibitor of type II phospholipase A2 on experimental acute pancreatitis in rats. *Pancreas*, 19(2), 193–198.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438167>

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., Férec, C., Shimosegawa, T., Chandak, G. R., Chen, J.-M., Li, Z.-S., & Liao, Z. (2016). No Association Between CEL-HYB Hybrid Allele and Chronic Pancreatitis in Asian Populations. *Gastroenterology*, 150(7), 1558-1560.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.071>

9 Publikationen

Witt H, Beer S, Rosendahl J, Chen JM, Chandak GR, Masamune A, Bence M, Szmola R, Oracz G, Macek M Jr, Bhatia E, Steigenberger S, **Lasher D**, Bühler F, Delaporte C, Tebbing J, Ludwig M, Pilsak C, Saum K, Bugert P, Masson E, Paliwal S, Bhaskar S, Sobczynska-Tomaszewska A, Bak D, Balascak I, Choudhuri G, Nageshwar Reddy D, Rao GV, Thomas V, Kume K, Nakano E, Kakuta Y, Shimosegawa T, Durko L, Szabó A, Schnúr A, Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Pfützer R, Schneider A, Groneberg DA, Braun M, Schmidt H, Witt U, Friess H, Algül H, Landt O, Schuelke M, Krüger R, Wiedenmann B, Schmidt F, Zimmer KP, Kovacs P, Stumvoll M, Blüher M, Müller T, Janecke A, Teich N, Grützmann R, Schulz HU, Mössner J, Keim V, Löhr M, Férec C, Sahin-Tóth M. Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2013; 45: 1216-1220.

Fjeld K, Weiss FU*, **Lasher D***, Rosendahl J*, Chen JM*, Johansson BB, Kirsten H, Ruffert C, Masson E, Steine SJ, Bugert P, Cnop M, Grützmann R, Mayerle J, Mössner J, Ringdal M, Schulz HU, Sandler M, Simon P, Sztromwasser P, Torsvik J, Scholz M, Tjora E, Férec C, Witt H, Lerch MM, Njølstad PR, Johansson S, Molven A. A recombined allele of the lipase gene CEL and its pseudogene CELP confers susceptibility to chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2015; 47: 518-522.

Lasher D*, Szabó A*, Masamune A*, Chen JM*, Xiao X, Whitcomb DC, Barmada MM, Ewers M, Ruffert C, Paliwal S, Issarapu P, Bhaskar S, Mani KR, Chandak GR, Laumen H, Masson E, Kume K, Hamada S, Nakano E, Seltsam K, Bugert P, Müller T, Groneberg DA, Shimosegawa T, Rosendahl J, Férec C, Lowe ME, Witt H, Sahin-Tóth M. Protease-Sensitive Pancreatic Lipase Variants Are Associated With Early Onset Chronic Pancreatitis. *Am J Gastroenterol.* 2019; 114: 974-983.

Ewers M*, **Epple D***, Bugert P, Rosendahl J, Witt H. Genetic analysis of pancreatic phospholipase A2 (PLA2G1B) in patients with chronic pancreatitis. *Pancreatology* 2022; 22: 244-247.

* equal contribution

10 Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Heiko Witt, der seine Rolle als Doktorvater weit über die üblichen Erwartungen hinaus erfüllte. Stets verlässlich, mit hohem wissenschaftlichen Anspruch und scharfsinnigem Witz begleitete er geduldig jede Phase des steinigen Entstehungsprozesses dieser Arbeit und prägte meinen Einstieg ins wissenschaftliche Arbeiten nachhaltig positiv.

Ich möchte mich auch herzlich bei Frau Catherine Delaporte und allen anderen Mitarbeitern des Labors für die Einweisung in die Laboratoriumsarbeit und die fortwährende Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem verstorbenen Großvater, Peter Kopeczek, dem ich diese Arbeit von ganzem Herzen widmen möchte. Der Stolz, mit dem ihn die Promotion seiner Enkelin erfüllte, war meine größte Motivation, diese Arbeit fertig zu stellen. Ich bitte ihn zu entschuldigen, dass ich ihm diese Freude nicht schon zu Lebzeiten gemacht habe.