

Technische Universität München  
Fakultät für Medizin

**CELA2A-, CELA2B-, CELA3A- und CELA3B- Varianten bei chronischer Pankreatitis**

Florence Patricia Zankl

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

**Doktorin der Medizin (Dr. med.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender/-r:

Prof. Dr. Ernst Rummeny

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Prof. Dr. Heiko Witt
2. Prof. Dr. Bernhard Holzmann

Die Dissertation wurde am 08.10.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.03.2022 angenommen.

<b>1.</b>	<b>CHRONISCHE PANKREATITIS</b> .....	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>ÄTIOLOGIE DER CHRONISCHEN PANKREATITIS</b> .....	<b>4</b>
<b>3.</b>	<b>GENETIK DER CHRONISCHEN PANKREATITIS</b> .....	<b>6</b>
3.1	KATIONISCHES TRYPSINOGEN (PRSS1) .....	6
3.2	ANIONISCHES TRYPSINOGEN (PRSS2) .....	7
3.3	SERINPROTEASE-INHIBITOR, KAZAL-TYP 1 (SPINK1) .....	8
3.4	CHYMOTRYPSINOGEN C (CTRC) .....	9
3.5	CARBOXYPEPTIDASE A1 (CPA1) .....	10
3.6	CARBOXYLESTER-LIPASE (CEL) .....	10
3.7	LIPASE (PNLIP) .....	11
3.8	TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL CATION CHANNEL SUBFAMILY V MEMBER 6 (TRPV6).....	12
3.9	CFTR UND CF .....	12
<b>4.</b>	<b>PANKREATISCHE ELASTASEN</b> .....	<b>13</b>
4.1	CELA2A UND CELA2B .....	14
4.2	CELA3A UND CELA3B .....	15
<b>5.</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b> .....	<b>16</b>
<b>6.</b>	<b>MATERIALIEN</b> .....	<b>17</b>
6.1.	VERBRAUCHSMATERIALEN .....	17
6.2.	LÖSUNGEN .....	18
6.3.	GERÄTE .....	18
6.4.	STUDIENPOPULATION .....	18
<b>7.</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>19</b>
7.1.	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) .....	19
7.2.	POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (PAGE).....	23
7.3.	VERDAU DER PCR-PRODUKTE .....	23
7.4.	SEQUENZIERUNG .....	24
7.5.	STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	26
7.6.	NOMENKLATUR .....	26
<b>8.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>27</b>
<b>9.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>32</b>
9.1.	CELA2-MUTATIONEN .....	34
9.2.	CELA3-MUTATIONEN .....	35
9.3.	CELA3B .....	36

## Einleitung

### 1. Chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis (CP) ist ein rekurrerender oder kontinuierlicher Entzündungsprozess der Bauchspeicheldrüse, der bei einigen Patienten in eine exokrine und/oder endokrine Pankreasinsuffizienz mündet (Singer *et al.* 1984). Das Ausmaß des akuten Schubs variiert von einer leichten interstitiell-ödematösen bis zu einer schweren hämorrhagisch-nekrotisierenden Entzündung. Morphologisch findet sich eine unregelmäßige Sklerosierung des Organs mit fokaler, segmentaler oder diffuser Zerstörung des exokrinen Gewebes. Häufig lassen sich auch Erweiterungen des Pankreasgangsystems sowie intraduktale Konkremente in Form von Proteinausfällungen oder Steinen nachweisen (Witt *et al.* 2002). Klinisch imponieren Patienten mit einer chronischen Pankreatitis (CP), insbesondere im Kindesalter, mit vornehmlich epigastrisch lokalisierten, plötzlich auftretenden rezidivierenden Oberbauchschmerzen. Bei Erwachsenen finden sich auch kontinuierliche Schmerzzustände, die nicht selten in den Unterbauch oder Rücken ausstrahlen. Weitere Symptome sind Nausea und Erbrechen (Witt *et al.* 2002). Bei der klinischen Untersuchung des Abdomens zeigt sich meist ein dumpfer Druckschmerz. Es können Gefäßkomplikationen wie Milz- und Pfortaderthrombosen, Duodenalstenosen, Pankreasgangstenosen, Pseudozysten und eine Kompression der Gallenwege auftreten. Durch den fortschreitenden bindegewebigen Umbau des Pankreasparenchyms kann sich im weiteren Verlauf der Erkrankung eine Maldigestion mit Gewichtsverlust und abnormen Stühlen bis hin zur Steatorrhoe sowie ein Insulinmangeldiabetes entwickeln. Als späte Komplikation der CP gilt das duktales Pankreaskarzinom (Witt *et al.* 2002, Lowenfels AB *et al.* 1993, Lowenfels AB *et al.* 2000).

Zur Inzidenz und Prävalenz der chronischen Pankreatitis im Kindesalter existieren keine guten epidemiologischen Daten. Die Inzidenz bei Erwachsenen wird weltweit mit einer steigenden Prävalenz von 1,6-23/100000 angegeben (Dufour *et al.* 2003). In 70-80% ist die Ursache dafür äthyltoxisch und bezieht sich auf Erwachsene in der industrialisierten Welt und kann deshalb nicht auf das Kindesalter übertragen werden (Durbec *et al.* 1978; Ammann *et al.* 1987).

## 2. Ätiologie der chronischen Pankreatitis

Ätiopathogenetisch lassen sich bei der chronischen Pankreatitis somit primäre d.h. genetisch bedingte Ursachen von sekundären Ursachen wie Noxen, Stoffwechseldefekte, anatomische Anomalien oder systemische Grunderkrankungen unterscheiden.

Alkohol stellt die Hauptursache für eine CP beim Erwachsenen dar. Dabei wird, je nach Geschlecht, von einem Minimum an Alkoholkonsum von 60-80 g pro Tag über einen Zeitraum von 6-12 Jahren ausgegangen (S3 Leitlinie Chronische Pankreatitis 2012). Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Menge und Dauer des Alkoholkonsums und der Krankheitsentstehung.

Seltene sekundäre Ursachen einer rezidivierenden Pankreatitis sind ein primärer Hyperparathyreodismus und anatomische Anomalien. Die Rolle des Pancreas divisum bei der Krankheitsentstehung wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Dabei handelt es sich um eine Fehlanlage des Ductus Wirsungianus und des Ductus Santorini während der embryonalen Entwicklung (S3-Leitlinie Chronische Pankreatitis 2012).

Auch ein Zusammenhang zwischen der chronischen Pankreatitis und autoimmunen Erkrankungen ist nachgewiesen. Dazu zählen Kollagenosen wie der systemische Lupus erythematoses, die rheumatoide Arthritis, die Polyarteriitis nodosa und der Morbus Behçet (Ramanan AV *et al.* 2002). Aus Bauchtraumata können sich besonders durch die Komplikation der Ausbildung einer Pseudozyste, ein chronischer Verlauf entwickeln.

In der Dritten Welt gilt die Protein-Energie-Malnutrition als wichtige Ursache (Witt *et al.* 2003). Die erstmalige Beschreibung einer großen Familie mit multiplen Betroffenen im Jahre 1952 legte eine genetische Ursache als krankheitsauslösenden Faktor bei diesen Familienmitgliedern nahe (Comfort *et al.* 1952). Perrault beschrieb 1994 die hereditäre Pankreatitis als eine in der Kindheit auftretende Erkrankung mit rezidivierenden Pankreatitisschüben, gleicher Geschlechterverteilung und Fehlen bekannter prädisponierender Faktoren (Perrault *et al.* 1994).

In 10-30% der Fälle findet sich weder eine auslösende Ursache noch eine positive Familienanamnese für eine CP (DiMagno *et al.* 1993). Diese Fälle werden als „idiopathische“ CP bezeichnet. Generell wurden von Ammann und Layer zwei zu unterscheidende Formen der idiopathischen Pankreatitis beschrieben, zum einen die „juvenile“ bzw. „early onset“, zum anderen die „senile“ oder „late onset“ CP (Ammann *et al.* 1976; Ammann *et al.* 1990; Layer *et al.* 1994). Die frühe Form manifestiert sich schmerzhaft und klassischerweise bis zum 30. Lebensjahr. Sie zeigt in Bezug auf die Pankreasinsuffizienz eine eher langsame Progredienz. Die späte und seltenere Form der beiden verläuft hingegen meistens

schmerzlos, weist häufig eine exokrine Pankreasinsuffizienz auf und findet sich vornehmlich in der 6. - 8. Lebensdekade. Genetische Studien der letzten zwei Dekaden legen nahe, dass zumindest die juvenile idiopathische CP in einem hohen Prozentsatz erbliche Ursachen aufweist.

**Tabelle 1: Ursachen der chronischen Pankreatitis**

Toxisch-metabolisch	Alkohol Hyperkalziämie Hypertriglyzeridämie Chronische Niereninsuffizienz Medikamente
"Idiopathisch" / „Hereditär“	<i>CEL</i> <i>CFTR</i> <i>CPA1</i> <i>CTRC</i> <i>PNLIP</i> <i>PRSS1</i> <i>PRSS2S</i> <i>SPINK1</i> <i>TRPV6</i>
Autoimmun / Systemisch	Isolierte autoimmune Pankreatitis Autoimmunerkrankungen mit Beteiligung des Pankreas (Sjögren Syndrom, PSC, chronisch entzündliche Darmerkrankungen) Hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS)
Mechanisch / Strukturell	<i>Anatomische Anomalien</i> <i>(Choledochuszysten)</i> <i>(Pankreas divisum?)</i> Trauma <i>Tumore</i>

### 3. Genetik der chronischen Pankreatitis

Die Erkenntnisse über die erbliche Pankreatitis unterstützen die These von Hans Chiari, dass die Pankreatitis Folge einer Selbstverdauung des Organs sei (Chiari *et al.* 1896). In diesem Konzept wird dem Verdauungsenzym Trypsin eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Pankreatitis zugeschrieben. Trypsin ist eine Serinprotease, die in den Azinuszellen des exokrinen Pankreas synthetisiert wird. Trypsin vermag sich selbst wie auch alle anderen proteolytischen Proenzyme der Bauchspeicheldrüse zu aktivieren. Damit nimmt Trypsin eine zentrale Rolle beim Verdau der Nahrungsproteine ein. Um eine Autodigestion des Pankreas zu verhindern, werden die Verdauungsenzyme als inaktive Enzymvorstufen, sogenannte Zymogene wie z.B. Trypsinogen, synthetisiert und sezerniert. Erst durch die in der Bürstensaummembran des Darms lokalisierte Enteropeptidase (Enterokinase) erfolgt unter Abspaltung eines Aktivierungspeptides die Umwandlung zur aktiven Form, dem Trypsin (Witt *et al.* 2003). Kleine Mengen an Trypsinogen werden allerdings durch Autolyse bereits im Pankreas zu Trypsin aktiviert. Um einer Selbstverdauung entgegenzuwirken, hat der Körper zwei Mechanismen entwickelt, um dies zu verhindern (Rinderknecht H. *et al.* 1986): zum einen wird Trypsin durch Trypsin und andere trypsinähnliche Enzyme wie Chymotrypsin C degradiert, zum anderen durch den Serinprotease-Inhibitor, Kazal Typ1 (SPINK1) inhibiert. SPINK1 ist als potenter Inaktivierungsfaktor für Trypsin bekannt, bindet kovalent an Trypsin und komplexiert dieses dadurch.

#### 3.1 Kationisches Trypsinogen (PRSS1)

Trypsin ist eine Serinprotease, die als Endoprotease Peptidbindungen nach den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin spezifisch schneidet. Trypsin zählt zu den meistsynthetisierten sekretorischen Proteinen des Pankreas (Guy *et al.* 1978). Es konnten 3 verschiedene Trypsinogene aufgrund ihres Wanderungsverhaltens in der isoelektrischen Fokussierung isoliert werden. Den größten Anteil mit etwa 60% bildet das kationische Isoenzym (PRSS1), gefolgt von der anionischen Isoform (PRSS2) mit ca. 40% und letztlich mit einem geringen Anteil das Mesotrypsinogen (PRSS3) (Scheele *et al.* 1981). Das kationische Isoenzym zeigt im Vergleich zur anionischen Form eine stärkere Neigung zur Selbstaktivierung und eine geringere Inaktivierungstendenz (Colomb *et al.* 1978; Colomb *et al.* 1979). Durch Abspaltung des N-terminalen Aktivierungspeptides, das aus acht Aminosäuren besteht, kommt es zu einer Konformationsänderung und der Umwandlung von

inaktivem Trypsinogen zu aktivem Trypsin. Trypsin seinerseits aktiviert hydrolytisch alle weiteren Zymogene des Pankreassekretes sowie auch sich selbst (autokatalytische Aktivierung) (Steer *et al.* 1987). 1996 wurde durch drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander ein Genort für die autosomal dominant vererbte Pankreatitis auf dem langen Arm von Chromosom 7 (7q35) lokalisiert (Le Bodic *et al.* 1996; Pandya *et al.* 1996; Whitcomb *et al.* 1996). Kurz danach wurde eine Mutation im *PRSS1* als Erkrankungsursache identifiziert (Whitcomb *et al.* 1996). Bei fünf untersuchten Familien fand sich ein Arginin-Histidin-Austausch an Position 122 des Proteins (p.R122H). Diese Mutation hat eine erhöhte Autoaktivierung und einen geringeren Abbau des aktiven Enzyms zur Folge und ist die weltweit häufigste *PRSS1*-Mutation (Várallyay *et al.* 1998; Sahin-Tóth *et al.* 1999; Sahin-Tóth *et al.* 2000). In nachfolgenden Studien wurden zwei weitere häufige Mutationen beschrieben: p.N29I (Gorry *et al.* 1997) und p.A16V (Witt *et al.* 1999). Während p.R122H als auch p.N29I hauptsächlich bei Patienten mit positiver Familienanamnese gefunden werden, lässt sich p.A16V vornehmlich bei Patienten mit idiopathischer CP nachweisen (Whitcomb *et al.* 1996, Witt *et al.* 1999). In Studien an rekombinantem menschlichen Trypsinogen, konnte eine vermehrte Autoaktivierung der Trypsinvarianten p.N29I und p.R122H gezeigt werden. Im Vergleich zum Wildtyp-Protein, weist p.A16V keine erhöhte Autoaktivierung auf (Király *et al.* 2006; Németh *et al.* 2014). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die p.A16V-Mutation die Chymotrypsin C-vermittelte Prozessierung des Trypsinaktivierungspeptides erleichtert, was eine beschleunigte Aktivierung des mutierten V16- Trypsinogen durch Chymotrypsin zur Folge hat (Nemoda *et al.* 2006). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *PRSS1*-Mutationen zu einer Trypsinogen-Aktivierung und/oder Trypsin-Stabilisierung und damit zu einer vermehrten intrapankreatischen Trypsinaktivität führen (Rosendahl *et al.* 2007).

### **3.2 Anionisches Trypsinogen (PRSS2)**

Das für humanes *PRSS2* (OMIM 601564) kodierende Gen liegt auf 7q35, ist ungefähr 3,6 kb lang und enthält 5 Exons. Das Präproprotein umfasst 247 Aminosäuren, einschließlich eines Signalpeptids mit 15 Resten und eines Aktivierungspeptids mit acht Resten. In einer Studie (Witt *et al.* 2006) wurden Personen mit chronischer Pankreatitis mit gesunden Personen verglichen. Überraschenderweise fand sich bei den Kontrollpersonen eine bestimmte genetische Variation, p.G191R, signifikant häufiger. Funktionelle Untersuchungen zeigten ein vollständiges Fehlen der Enzymaktivität des rekombinanten R191-Proteins, da durch die Mutation eine neue proteolytische Spaltungsstelle entsteht, welche zum autokatalytischen

Abbau des Enzyms führt. Dies führt zu einer Verminderung der intrapancreatischen Trypsinaktivität, was zu einem Schutz vor chronischer Pankreatitis führt (Witt *et al.* 2006). Im Weiteren wurde gezeigt, dass eine Genkonversion zwischen *PRSS1* und *PRSS2* oder zwischen *PRSS1* und dem Pseudogen *PRSS3P2* pathogene Allele generiert, die für eine erbliche Pankreatitis disponieren (Teich *et al.* 2005; Masson *et al.* 2008; Rygiel *et al.* 2015).

### 3.3 Serinprotease-Inhibitor, Kazal-Typ 1 (SPINK1)

Aufgrund der Tatsache, dass viele der Patienten mit chronischer Pankreatitis keine *PRSS1*-Mutation aufwiesen, wurde postuliert, dass noch weitere genetische Defekte in anderen Genen existieren, welche ebenfalls zur Entstehung einer hereditären Pankreatitis beitragen. Dies wurde durch die Identifizierung von *SPINK1*-Mutationen bestätigt (Witt *et al.* 2000). Das für menschliches *SPINK1* kodierende Gen (OMIM 167790) befindet sich auf Chromosom 5 (5q32), ist ungefähr 7,5 kb lang und hat 4 Exone (Horii *et al.* 1987). Das Genprodukt besteht aus 79 Aminosäuren, die ein 23 Aminosäuren langes Signalpeptid enthalten. Das sezernierte Protein besitzt 56 Aminosäuren und ist ausgesprochen stabil bei saurem pH (Bartelt *et al.* 1977). Bei *SPINK1* handelt es sich um ein Serinproteaseinhibitor vom Kazal Typ 1, auch als pankreatischer sekretorischer Trypsininhibitor (PSTI) bekannt. Es wurde erstmals 1948 von Kazal *et al.* aus Rinderpankreas isoliert und beschrieben. Es ist eine potente Antiprotease und damit ein wichtiger intrapancreatischer Trypsinaktivator (Bartelt *et al.* 1977). Außer im Pankreas wird *SPINK1* auch im Gastrointestinaltrakt sowie in vielen anderen Geweben wie Leber, Lunge, Nieren, Ovarien und Brustdrüse gebildet (Shibata *et al.* 1986, Shibata *et al.* 1987). Die *SPINK1*-vermittelte Trypsininhibition ist jedoch nur temporär, da der *SPINK1*-Trypsin-Komplex selbst als Substrat für Trypsin dient, was wiederum zu einer Degradation des *SPINK1* und damit die Wiederherstellung der ursprünglichen Trypsinaktivität zur Folge hat (Laskowski *et al.* 1953). Es wird postuliert, dass *SPINK1*-Mutationen zu einem Funktionsverlust bzw. zu einer Funktionseinschränkung und damit zu einer erhöhten intrapancreatischen Trypsinaktivität führen. In einer Studie an pädiatrischen Patienten, konnte bei insgesamt 22 von 96 Patienten mit chronischer Pankreatitis eine *SPINK1*-Mutation nachgewiesen werden (Witt *et al.* 2000). Die mit 80-90% häufigste *SPINK1*-Mutation ist eine Punktmutation in Exon 3, die zu einem Asparagin-Serin-Austausch an Position 34 des Proteins führt (p.N34S). Die Mutation findet sich hauptsächlich bei Patienten ohne Familienanamnese: In 20-40 % der Patienten mit sogenannter idiopathischer chronischer Pankreatitis findet sich auf einem Allel oder beiden Allelen



diese Mutation (Witt *et al.* 2000; Pfützer *et al.* 2000). Eine Heterozygotie reicht dagegen pathogenetisch nicht aus, da etwa 1-2 % der Bevölkerung p.N34S-Träger sind. Es wird davon ausgegangen, dass erst die Kombination mit anderen Gendefekten oder Umweltfaktoren zum Ausbruch der Erkrankung führt. *SPINK1*-Mutationen finden sich auch gehäuft bei alkoholinduzierter chronischer Pankreatitis (Witt *et al.* 2001; Drenth *et al.* 2002) und bei tropischer Pankreatitis (Chandak *et al.* 2002; Hassan *et al.* 2002; Bhatia *et al.* 2002; Schneider *et al.* 2002).

### 3.4 Chymotrypsinogen C (CTRC)

Das für das menschliche CTRC kodierende Gen (OMIM 601405) liegt auf Chromosom 1p36.21, ist ungefähr 8,2 kb lang und enthält 8 Exons. Es handelt sich um ein Trypsinabbauendes Pankreasenzym, welches ein wichtiger Baustein zur Aufrechterhaltung des physiologischen Gleichgewichts zwischen intrapancreatischer Trypsinogenaktivierung und Trypsininaktivierung in der Bauchspeicheldrüse darstellt. Die Hypothese, dass Funktionsverlustvarianten in Trypsinabbauenden Enzymen das Risiko für Pankreatitis erhöhen, konnte in einer Studie mit Patienten mit idiopathischer oder hereditärer chronischer Pankreatitis bestätigt werden. Insbesondere zwei Veränderungen, p.R254W und p.K247\_R254del, sind signifikant überrepräsentiert (Rosendahl *et al.* 2008). *CTRC*-Varianten disponieren auch zu alkoholischer CP. Interessanterweise spielt *CTRC* auch eine wichtige Rolle in der Regulierung der Aktivierung und des Abbaus der Carboxypeptidasen CPA1 und CPA2 (Nemoda *et al.*, 2006; Szmola *et al.*, 2007). Die Bauchspeicheldrüse sezerniert diese als inaktive Proenzyme, die durch die Spaltung am C-terminalen Ende durch Trypsin aktiviert werden. Eine nachfolgende Spaltung durch Chymotrypsin C führt zu einer fast 10-fachen Erhöhung der Aktivität von CPA1 und CPA2 (Szmola *et al.* 2010).

### 3.5 Carboxypeptidase A1 (CPA1)

Das für menschliches CPA1 kodierende Gen (OMIM114850) befindet sich auf 7q32.2, ist ungefähr 8 kb lang und enthält 10 Exons. Das inaktive Präproprotein umfasst 419 Aminosäuren, einschließlich eines 16 Aminosäuren langen Signalpeptides und eines 94 Aminosäuren langen Propeptides. Die Aktivierung des Proenzym (proCPA1) zu CPA1 wird durch die sequenzielle Wirkung von Trypsin und CTSC katalysiert, die das Propeptid spalten und abbauen (Szmola, R. *et al.* 2011). Carboxypeptidasen sind Metalloproteasen des Pankreas, die als Exopeptidasen C-terminale Peptidbindungen in Polypeptidketten hydrolysieren (Vendrell *et al.* 2000). Drei verschiedene Isoformen wurden im menschlichen Pankreassaft beschrieben: A-Typ-Carboxypeptidasen (CPA1 und CPA2) wirken auf aromatische und aliphatische Aminosäurereste, welche nach Einwirkung von Chymotrypsinen und Elastasen exponiert werden, während die Carboxypeptidase vom B-Typ (CPB1) C-terminale Lysin- und Argininreste spaltet (Vendrell *et al.* 2000).

Nach Trypsinogen ist proCPA1 die zweitgrößte Komponente des Pankreassaftes und trägt mehr als 10% zum Gesamtprotein bei (Scheele *et al.* 1981). CPA1-Mutationen sind signifikant mit chronischer Pankreatitis assoziiert, insbesondere bei Patienten mit frühem Erkrankungsbeginn (Witt *et al.* 2013). Funktionelle Daten legen einen vermehrten Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER-Stress) als Pathomechanismus nahe. Da CPA1 eines der am stärksten synthetisierten Proteine der Bauchspeicheldrüse ist, scheint es auch plausibel, dass fehlgefaltetes CPA1 zu einer vermehrten Belastung des endoplasmatischen Retikulums führt (Witt *et al.* 2013).

### 3.6 Carboxylester-Lipase (CEL)

Das für menschliches CEL kodierende Gen (OMIM 114840) liegt auf Chromosom 9q34.3. Es umfasst auch *CELP*, ein Tandem-angeordnetes *CEL*-Pseudogen. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Genen besteht darin, dass bei *CELP* die Exone 2-7 von *CEL* fehlen, dafür aber ein Stoppcodon im zweiten Exon enthält (korrespondierend zu Exon 8 des *CEL*). Ansonsten sind die beiden Sequenzen im Genom sehr ähnlich (Lidberg *et al.* 1992; Madeyski *et al.* 1998). Das letzte der 11 *CEL*-Exone enthält eine variable Anzahl von Wiederholungssequenzen (variable nucleotide tandem repeats, VNTR), die aus nahezu identischen 33-bp-Segmenten bestehen (Nilsson *et al.* 1990; Lidberg *et al.* 1992). CEL ist ein Glykoprotein, das von den azinären Zellen der Bauchspeicheldrüse in den Verdau-

ungstrakt und von der Milchdrüse in die menschliche Milch sezerniert wird (Lombardo *et al.* 2001; Nilsson *et al.* 1990). Physiologischerweise wird das Enzym durch Gallensalze im Duodenum aktiviert und ist an der Hydrolyse und Absorption von Cholesterin und fettlöslichen Vitaminen beteiligt (Lombardo *et al.* 2001). Die VNTR-Anzahl schwankt zwischen 7 und 23, wobei 16 Wiederholungen in allen bisher untersuchten Populationen am häufigsten vorkommen (Lindquist *et al.* 2002; Higuchi *et al.* 2002; Bengtsson-Ellmark *et al.* 2004; Torsvik *et al.* 2010; Ragvin *et al.* 2013). Deletionen einzelner Basen in der *CEL* VNTR-Region bedingen einen MODY 8 (Maturity-onset diabetes of the young). Dieser ist gekennzeichnet durch einen autosomal dominanten Erbgang und tritt in der Kindheit oder im frühen Erwachsenenalter auf (gewöhnlich vor dem 25. Lebensjahr). Er ist gekennzeichnet durch einen Diabetes, eine exokrine Dysfunktion und morphologischen Veränderungen der Bauchspeicheldrüse (Ræder *et al.* 2006; Ræder *et al.* 2014). In einer Studie von 2015 konnte gezeigt werden, dass ein *CEL*-Hybridallel (*CEL*-HYB), das durch ein Crossing-over zwischen *CEL* und seinem benachbarten Pseudogen *CELP* entsteht, bei Personen mit hereditärer oder idiopathischer chronischer Pankreatitis signifikant häufiger ist. Das Allel war auch mit 1,8% in der Fallgruppe gegenüber 0,8% in der Kontrollgruppe bei alkoholbedingter CP angereichert. Die Expression von *CEL*-HYB in zellulären Modellen zeigte eine verringerte lipolytische Aktivität, eine gestörte Sekretion mit prominenter intrazellulärer Akkumulation und daraus bedingter induzierter Autophagie (Fjeld *et al.* 2015).

### 3.7 Lipase (PNLIP)

Auch Mutationen in einem weiteren Lipase Gen, PNLIP, sind mit CP assoziiert (Lasher *et al.* 2019). Das Gen für PNLIP (OMIM 246600) liegt auf Chromosom 10q25.3, besteht aus 13 Exonen und kodiert für die Pankreaslipase. Das Enzym hydrolysiert mit der Nahrung aufgenommene Triglyceride in freie Fettsäuren und einem Monoglycerid. In 1-2% der europäischen Patienten mit CP fanden sich *PNLIP*-Varianten, die einen gesteigerten Abbau durch Proteasen wie Trypsin (PRSS1), Chymotrypsin C (CTRC) und Chymotrypsin B2 (CTRB2) bedingen (Lasher *et al.* 2019). Protease-sensitive Varianten fanden sich in 8/429 (1.9 %) der deutschen Patienten, aber nur in 2/600 deutschen Kontrollen (0.3 %) ( $P = 0,02$ ;  $OR = 5,7$ ; 95% KI = 1,1-38,9). Die Assoziation konnte in einer französischen Replikationskohorte bestätigt werden, in der 5/632 (0,8 %) der Patienten, aber nur 1/957 (0,1 %) Kontrollen eine Protease-sensitive Variante aufwies ( $P = 0,04$ ;  $OR = 7,8$ ; 95% KI = 0,9-172,9). Im Gegensatz dazu fanden sich keine Protease-sensitiven Varianten bei nicht europäischen

Patienten aus Indien oder Japan. Warum eine erhöhte Protease-sensitivität der Pankreaslipase die Entstehung einer Pankreatitis begünstigt ist derzeit unklar.

### **3.8 Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 6 (TRPV6)**

Hypercalciämien wie sie z.B. beim primären Hyperparathyreodismus beobachtet werden, können eine akute Pankreatitis auslösen. So wirkt Calcium im Pankreas als Sekretionsstimulus und vermag eine vorzeitige Trypsinaktivierung zu verursachen. TRPV6 ist ein konstitutiv aktivierter Calciumkanal, der hauptsächlich in den pankreatischen Gangzellen exprimiert wird. Das Gen für TRPV6 (OMIM 606680) liegt auf Chromosom 7q34 und setzt sich aus 15 Exonen zusammen. Eine vor kurzem publizierte internationale Studie berichtete eine erhöhte Frequenz von *TRPV6*-Mutationen bei Patienten mit nicht-alkoholischer Pankreatitis, aber nicht bei Patienten mit alkoholischer CP (Masamune *et al.* 2020). Die Assoziation mit funktionell defekten *TRPV6*-Varianten fand sich sowohl bei europäischen Patienten aus Deutschland und Frankreich (2 % bei Patienten vs. 0 % bei Kontrollen) wie auch bei japanischen Patienten (4,3 % vs. 0,1%) (Masamune *et al.* 2020).

### **3.9 CFTR und CF**

Die zystische Fibrose (CF) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die durch Mutationen im „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (*CFTR*) verursacht ist. *CFTR* (OMIM 602421) ist auf dem langen Arm von Chromosom 7 (7q31) lokalisiert, umfasst 27 Exone und kodiert für einen cAMP-abhängigen Chloridkanal. Klinisch manifestiert sich die CF mit einer exokrinen Pankreasinsuffizienz, chronischen endobronchialen Infektionen und männlicher Infertilität. Ein Teil der Patienten weist Gallensteine auf und entwickelt eine Hepatopathie bis hin zur Zirrhose. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit zystischer Fibrose und einer chronischen Pankreatitis nicht nur klinisch Parallelen aufweisen, sondern auch genetische Veränderung im *CFTR* gemeinsam haben. Beide Erkrankungen zeichnen sich durch pathologisch erhöhte Chloridkonzentrationen im Schweiß sowie durch duktale Obstruktion aus (Shwachman *et al.* 1975). Bereits 1998 wurde in zwei Studien von Sharer *et al.* und Cohn *et al.* ein Zusammenhang zwischen *CFTR*-Mutationen und CP gezeigt. In weiteren Studien wurden die gesamte kodierende *CFTR*-Sequenz, *PRSS1* und *SPINK1* untersucht. Dabei fanden sich bei 25-30% mindestens eine

*CFTR*-Mutation (ohne 5T-Allel). Mehrere Patienten waren gemischt heterozygot für *CFTR*-Mutationen oder transheterozygot (*SPINK1*- und *CFTR*-Mutation), was den Stellenwert einer Kombination verschiedener Gendefekte unterstreicht (Noone *et al.* 2001). Neuere Studien hingegen gehen von einem geringeren Gesamtrisikobeitrag von *CFTR*-Variationen zur Pathogenese der chronischen Pankreatitis aus (Rosendahl *et al.* 2013). *CFTR*-Varianten, die bei CP-Patienten gefunden wurden, sind in den meisten Fällen "milde" Varianten mit Rest-*CFTR*-Funktion, und in allen gemischt Heterozygoten für *CFTR*-Varianten war mindestens ein "mildes" *CFTR*-Allel vorhanden. Die Häufigkeiten von *CFTR*-Varianten bei CP waren niedriger als zuvor berichtet (Rosendahl *et al.* 2013). Bei Patienten mit einer früh einsetzenden CP sollte aber die Diagnose einer CF mittels Schweißtest ausgeschlossen werden.

#### **4. Pankreatische Elastasen**

Elastasen bilden eine Unterfamilie der Serinproteasen, die neben Elastin viele Proteine hydrolysieren. Sie werden vorwiegend von den Azinuszellen des Pankreas synthetisiert und sezerniert. 1961 wurde die Spezifität des Enzyms CELA1, die sich von der des Trypsin/Chymotrypsin unterscheidet, für neutrale Aminosäuren mit kleiner aliphatischer Kette beobachtet (Naughton *et al.* 1961). CELA2 wurde erst im 1976 aus menschlichem Pankreas isoliert (Largman *et al.* 1976). Menschen haben sechs Elastase-Gene, die starke strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen. Elastasen sind durch ihre Fähigkeit definiert, lösliche Peptide aus unlöslichen Elastinfasern durch einen proteolytischen Prozess, der als Elastinolyse oder Elastolyse bezeichnet wird, freizusetzen (Szabó *et al.* 2016). Die „Pankreaselastase“ (ELA1), die routinemäßig aus Schweine- oder Kuhpankreas gereinigt wird, wird beim Menschen aufgrund des Transkriptions-Silencing nicht im Pankreas exprimiert (Rinderknecht *et al.* 1986; Szmola *et al.* 2011). Aus ungeklärten evolutionären Gründen hat das menschliche *ELA1*-Gen Mutationen in der stromaufwärts gelegenen Region akkumuliert, die seinen Promotor inaktivieren (Rose SD *et al.* 1997). Die *ELA1*-codierende Region ist intakt geblieben, was nahelegt, dass *ELA1* in anderen Geweben exprimiert werden könnte. In der Tat wurde eine *ELA1*-Expression in menschlichen Hautzellen nachgewiesen (Szepessy *et al.* 2006). Studien über die Wechselwirkungen humaner Pankreaselastase mit  $\alpha$ 1-Proteinase-Inhibitor (AAT) und  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin (AACT) zeigten, dass beide Proteinaseinhibitoren die Hauptthemer der menschlichen Pankreaselastase 2 im Plasma sind (Davril *et al.* 1987). Beim Menschen ist Elastase 2 das einzige Verdauungsenzym mit berichteter elastinolytischer Aktivität (Szepessy *et al.* 2006). Das Proenzym besteht aus 269 Aminosäuren und

besitzt eine spezielle Bindungstasche (Gly-238, Ser-250), die für die Chymotrypsin ähnliche Substratspezifität sorgt (Szepessy *et al.* 2006). Den aktiven Elastasen gemeinsam (CELA2A, CELA3A, CELA3B) ist, dass die ersten vier Aminosäuren (Val-Val-X-Gly) des aktiven Enzyms konserviert sind und immer auf einen Arginin-Rest folgen (Codon 28), der für die Spaltung durch Trypsin nötig ist. Die bei den Serinproteasen für die katalytische Aktivität zuständigen Aminosäuren Histidin (Codon 73), Asparaginsäure (Codon 121 bei CELA2A, Codon 123 bei CELA3A und CELA3B) sowie Serin (Codon 216 bei CELA2A, Codon 217 bei CELA3A und CELA3B) sind ebenfalls bei allen diesen Isoformen vorhanden (Tani *et al.* 1988). Die Information für das Signalpeptid liegt in Exon 1, für das Aktivierungspeptid und die N-terminalen 16 Aminosäuren des reifen Proteins in Exon 2. Exon 3, 5 und 7 kodieren für die Aminosäuren der katalytischen Triade. Exon 7 ist daneben für die substratspezifische Bindungstasche zuständig (Tani *et al.* 1988).

#### 4.1 CELA2A und CELA2B

Die kodierenden Gene für CELA2A (OMIM 609443) und CELA2B (OMIM 609444) liegen auf Chromosom 1 (1p36.21), sind etwa 15 kb lang und liegen ca. 4 kb voneinander entfernt. Beide Gene weisen eine hohe Sequenzhomologie von etwa 90% auf Aminosäureebene auf und sind wahrscheinlich Produkt einer Genduplikation (Nemoda *et al.* 2006; Szmola *et al.* 2007; Szabó *et al.* 2012). Szabó *et al.* 2016 konnten nachweisen, dass es sich bei CELA2B um ein weiteres Beispiel einer „stillen“ menschlichen Elastase ohne nachweisbare proteolytische Aktivität handelt. Ursächlich dafür sind evolutionäre Mutationen in den Aminosäuren Met-29, Leu-30 und Cys-210. Da die Aminosäuren an Position 29 und 30 eine wichtige Rolle in der Aktivierung des Proenzym spielen, könnten Mutationen an diesen Stellen zur Inaktivität der *CELA2B* beitragen. Durch den Austausch von Serin zu Cystein an der Stelle 210 entsteht ein zusätzlicher Cystein-Rest, der die Ausbildung der fünf Disulfidbrücken stört und somit zur Fehlfaltung führen kann. Vermutlich sind aber auch noch andere Mutationen an der Stilllegung von *CELA2B* beteiligt (Szepessy *et al.* 2006, Kawashima *et al.* 1987). Der anfänglichen "Burst"-Phase bei der CELA2A-Aktivierung durch kationisches Trypsin, folgt eine langsamere "Steady State"-Aktivierung. Dies legt nahe, dass die Dissoziation der aktivierten CELA2A der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Reaktion ist, was zu einer offensichtlichen Hemmung der kationischen Trypsin-vermittelten Aktivierung von Proelastase führt. Bisher ist es noch nicht geklärt, warum die Elastase-Expression beim Menschen eingeschränkt ist. Denkbar ist, dass der Mensch im Vergleich zu anderen Wirbeltieren einen geringeren Bedarf an der Verdauung von Elastin und anderen

Nahrungsproteinen hat und CELA2A allein, für den Bedarf beim Menschen ausreichend ist. Man geht heute davon aus, dass *CELA2B* ein „Pseudogen“ ist, dass aber mRNA und möglicherweise auch Proteine exprimieren kann. Andererseits ist es auch denkbar, dass *CELA2B* eine noch nicht identifizierte, spezialisierte Proteaseaktivität aufweist oder ihre Funktion völlig unabhängig von der Proteolyse ist (Szabó *et al.* 2016).

## 4.2 CELA3A und CELA3B

Die für menschliche CELA3A und CELA3B kodierenden Genen befinden sich ebenfalls auf Chromosom 1 (1p36.12), sind 11 bzw. 12,5 kb lang und liegen ca. 20 kb voneinander entfernt. Beide Elastasen werden in ihrer inaktiven Form als Proelastasen sezerniert und können Komplexe mit Procarboxypeptidase A bilden. Diese Komplexbildung soll vor ektopischer Proelastasenaktivierung und Pankreasschädigung schützen (Unger *et al.* 2016). Unter diesen Enzymen ist Pankreas-Elastase einzigartig in ihrer Fähigkeit, Elastin, ein faseriges und unlösliches Protein im Bindegewebe, zu hydrolysieren (Tani *et al.* 1987). Aufgrund seiner Spezifität wurde Elastase nicht nur mit einer Verdauungsfunktion im Darm, sondern auch mit der Ätiologie des Lungenemphysems (Kaplan *et al.* 1973) und der vaskulären Verletzung bei akuter Pankreatitis (Geokas *et al.* 1968) in Verbindung gebracht. Es wurde nur eine Komplexbildung zwischen *CELA3B* und proCPA beobachtet. Die Aminosäureposition 241, das Glycin in *CELA3A* und Alanin in *CELA3B* trägt, wurde als Hauptdeterminante der Bindungsaffinität identifiziert (Unger *et al.* 2016). Durch die Mutation p.G241A in *CELA3A* nimmt die Bindung zu, während die Mutation p.A241G in *CELA3B* die Bindung an proCPA1 reduziert (Szabó *et al.* 2016). *CELA3A* bindet aufgrund der evolutionären Substitution von Ala241 mit Glycin in Exon 7 schlecht (Párniczky *et al.* 2016). ProCELA2A bindet ProCPA1, ProCELA3B bindet ProCPA1 und ProCPA2, wohingegen ProCELA3A keine Komplexe bildet (Szabó *et al.* 2016; Moulard *et al.* 1989; Pascual *et al.* 1989; Moulard *et al.* 1990). Obwohl *CELA3A* zu 92% mit *CELA3B* in seiner Primärstruktur identisch ist, bildet es keine engen Komplexe mit proCPA1 oder proCPA2. Um ProCPA (ProCPA1, ProCPA2) aktivieren zu können, muss der Komplex gespalten werden, um später in der monomeren Form aktiviert zu werden. Die ProCPA-Aktivierung erfolgt in zwei Schritten: Nach Spaltung am C-Terminus des Aktivierungspeptids (94 Aminosäuren bei ProCPA1, 96 Aminosäuren bei ProCPA2) durch Trypsin entsteht ein 92 Aminosäure langes Aktivierungspeptid, welches noch an der Procarboxypeptidase gebunden ist. Danach erfolgt die Spaltung durch CTSC an mehreren Stellen des Aktivierungspeptids. Diese verursacht dessen Dissoziation und führt somit zu einer vollständig aktiven Carboxypeptidase (Szabó *et al.* 2016). Die Erkenntnis ermöglichte,

Veränderungen in der Komplexbildung zwischen Proelastasen und Procarboxypeptidasen in Bezug auf das Risiko einer CP, zu untersuchen. Dazu wurden Allelhäufigkeiten der Varianten p.G241A in *CELA3A* und p.A241G in *CELA3B* zwischen Probanden mit CP und Kontrollen ohne Pankreaserkrankung miteinander verglichen. Es zeigte sich allerdings keine statistische Signifikanz. Es wurde beobachtet, dass die intronische Variante c.643-7G> T in *CELA3B* bei ACP-Patienten, aber nicht bei Patienten mit idiopathischer CP, signifikant unterrepräsentiert war, was einen protektiven Effekt nahelegt (Párniczky *et al.* 2016).

## **5. Zielsetzung der Arbeit**

Die chronische Pankreatitis ist im Kindesalter häufig genetisch bedingt. Insbesondere die sogenannte idiopathische Form scheint eine komplex vererbte Erkrankung zu sein, bei der sich oft Mutationen in mehreren verschiedenen krankheitsassoziierten Genen nachweisen lassen.

Trotz der jüngsten Fortschritte in der Aufklärung der genetischen Ursachen der Erkrankung, lassen sich bei einem erheblichen Prozentsatz der Patienten mit chronischer Pankreatitis keine Mutationen in einem der bekannten Suszeptibilitätsgene nachweisen, was auf die Beteiligung anderer, noch nicht identifizierter Gene hindeutet (Párniczky *et al.* 2016).

Fast alle der bisher identifizierten krankheitsassoziierten Gene kodieren für pankreatische Verdauungsenzyme oder deren Inhibitoren. Aus diesem Grund untersuchten wir, ob es einen Zusammenhang zwischen Mutationen in den Chymotrypsin-Like Elastase-Genen und der chronischen Pankreatitis gibt. Dafür analysierten wir sämtliche kodierenden Bereiche einschließlich der Exon-Intron-Übergänge der vier Isoformen *CELA2A*, *CELA2B*, *CELA3A* sowie *CELA3B* bei Patienten mit chronischer Pankreatitis und gesunden Kontrollen mittels direkter DNA-Sequenzierung nach Sanger. Die erhaltenen Elektropherogramme wurden auf Mutationen hin untersucht und die Ergebnisse statistisch ausgewertet.



## Material und Methoden

### 6. Materialien

#### 6.1. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Mikrotiterplatte mit 96-Vertiefungen	4titude, Wotton
Folie für Mikrotiterplatte	4titude, Wotton
Rotisolv HPLC-Wasser	Roth, Karlsruhe
dTTP, dATP, dCTP, dGTP	Roth, Karlsruhe
Primer	TIB Molbiol, Berlin
AmpliTaq Gold DNA-Polymerase mit Gold Puffer & MgCl <sub>2</sub>	Thermo Fisher Scientific, USA
MyTaq DNA-Polymerase	Bioline, Luckenwalde
MyTaq Reaktionspuffer	Bioline, Luckenwalde
Bayol F	SERVA, Heidelberg
GelBond PAG Film	Lonza Rockland, USA
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Rotiphorese Gel A (30% Acrylamidlösung)	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel B (2% Bisacrylamidlösung)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS 40%)	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumborhydrid	Merck, Darmstadt
Formaldehyd (37%)	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
DNA-Leiter	Invitrogen, Darmstadt
Exonuklease I	New England BioLabs, Ipswich
Antarktische Phosphatase	New England BioLabs, Ipswich
Mix2Seq Kit	Eurofins Genomics, Ebersberg

Alle übrigen Chemikalien wurden im Reinheitsgrad p.a. von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

## 6.2. Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
TBE-Puffer (5x)	107,7 g Tris (890 mM) 55,0 g Borsäure (890 mM) 9,3 g EDTA (25 mM) ad 2000 ml bidestilliertes Wasser

## 6.3. Geräte

Gerät	Hersteller
Zentrifuge 5430	Eppendorf, Hamburg
TProfessional (PCR-Gerät)	Biometra, Göttingen
Multiphor II (Elektrophorese-Gerät)	GE Healthcare, Freiburg im Breisgau
Kreisschüttler	IKA, Staufen im Breisgau

## 6.4. Studienpopulation

Es wurden insgesamt 581 Patienten (315 weiblich; Altersmedian 14 Jahre; Durchschnittsalter  $\pm$  Standardabweichung  $17,1 \pm 12,0$  Jahre; Altersbereich 0-62 Jahre) mit chronischer nichtalkoholischer Pankreatitis aus Deutschland (n=543), Österreich (n=32) und der Schweiz (n=6) untersucht. Die Diagnose chronische Pankreatitis basierte auf der Anwesenheit von 2 oder mehr der folgenden Kriterien: typische klinische Zeichen einer rekurrierenden oder chronischen Pankreatitis (Oberbauchschmerzen, Erbrechen) mit erhöhten Pankreasenzymwerten im akuten Schub, radiologische Zeichen wie Kalzifikationen und/oder Pankreasgangunregelmässigkeiten in der ERCP oder der MRT und/oder pathologische Befunde in der Ultraschalluntersuchung des Abdomens. Patienten mit Alkoholabusus wurden ausgeschlossen.

Als Kontrollen wurden mindestens 238 Personen für jedes Exon untersucht. Für einige Exone wurde die Anzahl auf bis zu 1322 Probanden erweitert. Als Kontrollen dienten Blutspender aus Deutschland.

## 7. Methoden

### 7.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Es handelt sich um eine Methode zur sequenziellen Vervielfältigung einzelner, genau festgelegter DNA-Abschnitte. Die Polymerasekettenreaktion, kurz PCR (polymerase chain reaction), wurde 1986 von Kary Mullis entwickelt, wofür er 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde (Mullis *et al.* 1986).

Von den vier Isoformen der Elastase (*CELA2A*, *CELA2B*, *CELA3A*, *CELA3B*) wurden jeweils 8 Exone sowie die angrenzenden intronischen Bereiche vervielfältigt.

Zu allererst wurde eine Mikrotiterplatte mit insgesamt 96 Vertiefungen mit jeweils 2 µl DNA befüllt. Anschließend wurde der PCR-Mastermix hergestellt und je 20 µl davon in jede der Vertiefungen zugegeben. Für die Isoformen *CELA2A* und *CELA3B* wurde für jedes Exon das Enzym AmpliTaq DNA-Polymerase bei einer Anlagerungstemperatur von 64 °C verwendet. Bei gleicher Anlagerungstemperatur wurde das Exon 1-7 von *CELA3A* mit der AmpliTaq Gold benutzt. Für *CELA2B* Exon 1-7 wurde zwar die gleiche AmpliTaq DNA- Polymerase verwendet, allerdings bei einer Anlagerungstemperatur von 60 °C.

Je Probe enthielt der Mastermix 14,85 µl HPLC-Wasser, 2,2 µl Puffer (10-fach), 1,3 µl Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>), 1 µl dNTP-Mix, 0,25 µl Vorwärtsprimer (10 µM), 0,25 µl Rückwärtsprimer (10 µM) und 0,15 µl (5 U/µl) AmpliTaq DNA-Polymerase. MyTaq DNA-Polymerase bei einer Anlagerungstemperatur von 60 °C wurde bei Exon 8 von *CELA2B* und *CELA3A* verwendet. Der Mastermix bestand aus 13,85 µl HPLC-Wasser, 4 µl MyTaq Reaktionspuffer, 1 µl Vorwärtsprimer (10 µM) 1 µl Rückwärtsprimer (10 µM) sowie 0,15 µl (5 U/µl) MyTaq DNA-Polymerase. Die von uns verwendeten Primer wurden passend zu den flankierenden intronischen Bereichen konstruiert (Tabelle 2-5). Eng benachbarte Exone wurden zusammen amplifiziert. Als Schutz vor Verdunstung wurde jeder Reaktionsansatz anschließend mit 1 Tropfen Öl (Bayol F) überschichtet.

Abschließend wurde die Platte mit einer hitzestabilen Folie zugeklebt, für ein paar Sekunden zentrifugiert und dann in den Thermozykler für die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion gegeben. Für die genauen Einstellungen siehe Tabelle 6 (die Phasen 2-4 wurden fünfzigmal wiederholt).

**Tabelle 2: PCR-Primer für CELA2A**

Exon	Primer		PCR-Produkt [bp]
1-2	P12FA	5'GGAACCCATATTCCAATATCTACCT <sup>3'</sup>	779
	P12RB	5'TGCCTGTGCTGCTCTCTGAG <sup>3'</sup>	
3	P3FA	5'GGTGCTGCCTTAAGTTGTGC <sup>3'</sup>	542
	P3RB	5'CAAGGGAACCCAATTCCAGATCCA <sup>3'</sup>	
4-5	P45FA	5'TCCCATCTAGTGGCTCACGC <sup>3'</sup>	1000
	P45RB	5'GCCACACACCCTGGGATGAC <sup>3'</sup>	
6	P6FB	5'CAGTCATTGCCAACAGCTTCCC <sup>3'</sup>	534
	P6RC	5'GGGTAATTCTGCCAGGAGGTG <sup>3'</sup>	
7	P7FC	5'AGACCACCCGCGGGAAGACG <sup>3'</sup>	727
	P7RB	5'GGCAGGCCCAGCAGTTACTC <sup>3'</sup>	
8	P8FB	5'GGGGTTCTGAAGGCCCCCTAC <sup>3'</sup>	416
	P8RA	5'ACAGCCCTGGATGTTAGGAC <sup>3'</sup>	

**Tabelle 3: PCR-Primer für CELA2B**

Exon	Primer		PCR-Produkt [bp]
1-2	P12FA	5'GGAACACTCATATTCCAGTATCTACCC <sup>3'</sup>	776
	P12RB	5'TTCCTGTGCTGCTCTCTGAA <sup>3'</sup>	
3	P3FB	5'GGCTGAGGTTTTGGGTGCC <sup>3'</sup>	554
	P3RB	5'CAAGGGAACCCAATTCCAGACACT <sup>3'</sup>	
4-5	P45FA	5'TGCCAACTAGTGGCTCATGA <sup>3'</sup>	1401
	P45RC	5'CTGACATTTGAACCCAGGCAGACA <sup>3'</sup>	
6	P6FA	5'GTTTCATTGGCTTAGCTTGAG <sup>3'</sup>	483
	P6RC	5'GGGTGCTTCTGCCAGGAGGTC <sup>3'</sup>	
7	P7FC	5'AGACCACCTGCGGGAAGACA <sup>3'</sup>	794
	P7RC	5'CGTCTTTGGACAAGGCCATA <sup>3'</sup>	
8	P8FA	5'CAGGTCAATGAAAAGCTGTGATTG <sup>3'</sup>	383
	P8RB	5'CCTGACCTATTTCTGGTTCTTAGG <sup>3'</sup>	

**Tabelle 4: PCR-Primer für CELA3A**

Exon	Primer		PCR-Produkt [bp]
1	P1FA	5'CCTCTGCCTCTCCGCTCCCA <sup>3'</sup>	918
	P1RA	5'CCTGTGGAACCAGGCATAGCA <sup>3'</sup>	
2	P2F	5'TGAATCTCTATCCCTGGACTCC <sup>3'</sup>	487
	P2R	5'CCCAGTGAGGGTTACAGATGAAAC <sup>3'</sup>	
3-4	P34FA	5'GAGGGCCTTCAAGGGCTGTT <sup>3'</sup>	1182
	P34RA	5'GCCTTCACACCACCCAGGAA <sup>3'</sup>	
5-6	P56FM	5'AGTGGATTTGGAGGGTAAAGAAGT <sup>3'</sup>	1200
	P56R2	5'GTCTCAAACCTCCTAGCCTCAAGC <sup>3'</sup>	
7	P7FA	5'GTTGCAATGAGCCAAGCTTGCG <sup>3'</sup>	884
	P7RA	5'GCTGGGATTACAGGCATGACTATG <sup>3'</sup>	
8	P8FA	5'TCTAAATTTGTGCTGGGCATTGTAA <sup>3'</sup>	693
	P8R	5'CACTCTACCATGAGCCTCCTCAA <sup>3'</sup>	

**Tabelle 5: PCR-Primer für CELA3B**

Exon	Primer		PCR-Produkt [bp]
1	P1FA	5'CTCTGCCTCCCTGCCTCCTG3'	918
	P1RA	5'CCTGTGGAACCAGGCATAGGG3'	
2	P2F-neu	5'TGAATCTCTATCCCTGGAGTCT3'	487
	P2R	5'CCCAGTGAGGGTTACAGACGGAAT3'	
3-4	P34F	5'CCCTCTAGAGTTGCACAGTGC3'	565
	P34R	5'ACRCAGCTCCCCCGTCCCTA3'	
5	P5FN	5'GAAAGAGTGGATTTGGAGGG3'	588
	P5RN	5'GGGCACAGGGCTAGGAG3'	
6	P6FN	5'TCAGAGCAGAAGAAGTGTGC3'	453
	P6RN	5'GTCAGTGTGTGAGCTGAGA3'	
7	P7FN	5'TCAGAGGAGTCAGGTAATGTGCG3'	484
	P7RN	5'AAGTTCAGCTGTAGTTCCAAGC3'	
8	P8FA	5'TCTAAATTCATGCTGGCCATTGTAG3'	699
	P8R	5'CACTCTACCATGAGCCTGCTGAG3'	

**Tabelle 6: Einstellungen des PCR-Gerätes für die PCR**

Phasen	AmpliTaq 64 °C		AmpliTaq 60 °C		MyTaq 60 °C	
	Temp	Zeit	Temp	Zeit	Temp	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95 °C	12:00	95 °C	12:00	95 °C	01:00
2. Denaturierung	95 °C	00:20	95 °C	00:20	95 °C	00:20
3. Anlagerung der Primer	64 °C	00:40	60 °C	00:40	60 °C	00:40
4. Elongation	72 °C	01:30	72 °C	01:30	72 °C	01:00
5. Finale Elongation	72 °C	02:00	72 °C	02:00	72 °C	02:00

## **7.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Amplifikation wurden nach der PCR die Proben auf ein Gel aufgetragen und einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) unterzogen. Bei diesem Verfahren werden Makromoleküle in einem elektrischen Feld aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts aufgetrennt, wobei kleinere Fragmente weiterwandern als größere Fragmente. Dafür wurde zuerst ein Gel aus 12%igem Polyacrylamid mit 54 Taschen (27 Taschen pro Reihe) hergestellt. Das Gel bestand aus 1,8 g Harnstoff, 6 ml 5x TBE-Puffer, 10 ml Gellösung A, 4 ml Gellösung B, 10 ml destilliertem Wasser, 48 µl APS (40 %) sowie 24 µl TEMED. Die ersten zwei Taschen und die letzte Tasche wurden in beiden Reihen mit 4 µl Blaumarker (Bromphenolblau), die zweite und die letzte Tasche mit 4 µl DNA-Leiter (1:100 verdünnt) gefüllt. In die restlichen Taschen wurden 4 µl PCR-Produkt pipettiert. Die Gelenden, an denen die Elektroden platziert werden sollten, wurden jeweils mit einem in 1x TBE-Puffer getränkten Papierstreifen abgedeckt. Die Elektrophorese erfolgte über 35 Minuten unter folgenden Bedingungen: 1100V Spannung, 300 mA Stromstärke und 300 W Leistung. Zur Visualisierung der PCR-Produkte wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Dazu wurde das Gel in eine Fixierlösung (10 % Ethanol, 2 % Essigsäure) eingelegt und für 15 Minuten auf den Kreisschüttler gestellt. Nach kurzem Waschen in entsalztem Wasser folgte eine Inkubation in 0,2%iger Silbernitratlösung für 35 Minuten. Nach erneutem Waschen mit destilliertem Wasser wurde die PCR-Fragmente im Gel mit 200 ml gekühlter Entwicklerlösung (1,5 % Natriumhydroxid, 0,01 % Natriumborhydrid) und 1 ml 37%igem Formaldehyd sichtbar gemacht. Der Formaldehyd wurde dabei erst unmittelbar davor zugegeben. Letztlich wurde das Gel in eine Folie eingeschweißt und ausgewertet.

## **7.3. Verdau der PCR-Produkte**

Bevor die PCR-Produkte sequenziert werden konnten, mussten überschüssige Primer und dNTPs aus dem Reaktionsansatz entfernt werden. Dafür wurde ein Gemisch aus je 1,5 µl HPLC-Wasser, 0,25 µl (20 U/µl) Exonuklease I sowie 0,25 µl (5 U/µl) antarktische Phosphatase zu jedem PCR-Produkt pipettiert. Die Exonuklease I diente dazu, einzelsträngige DNA-Fragmente (PCR-Primer) abzubauen. Die antarktische Phosphatase katalysierte die Entfernung der 5'-Phosphatgruppen, welche die im Reaktionsansatz verbliebenden dNTPs inaktivierte. Nach kurzem Zentrifugieren erfolgte der Verdau bei 37 °C im Thermocycler für 40 Minuten mit anschließender Enzyminaktivierung bei 85 °C für 20 Minuten. Zum Schluss wurden die Reaktionsansätze auf 10 °C abgekühlt.

#### 7.4. Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung geht auf eine Methode nach Frederick Sanger zurück (Sanger *et al.* 1977). Sie wird auch Kettenabbruch-Synthese genannt. Für die Entwicklung dieser enzymatischen Methode erhielt Sanger zusammen mit Gilbert und Berg 1980 den Nobelpreis für Chemie. Im Gegensatz zur PCR wird hier allerdings nur ein Primer verwendet. Zusätzlich befinden sich außer dNTPS auch fluoreszenzmarkierte ddNTPS im Reaktionsansatz. Wenn anstelle eines dNTP ein ddNTP mit fehlender Hydroxygruppe am 3`-C-Atom eingebaut wird, bricht die Kettenverlängerung ab (Sanger *et al.* 1977). Es entstehen fluoreszenzmarkierte Fragmente jeder Länge, welche mittels Photodetektion bestimmt werden konnten.

Der Reaktionsansatz bestand aus 6 µl verdautem PCR-Produkt, 1 µl HPLC-Wasser, 1,5 µl Sequenzierungspuffer, 1 µl Sequenzierungsprimer (10 mM) (Tabelle 7) und 0,5 µl BigDye. Das Ganze wurde wieder mit 1 Tropfen Öl (Bayol F) überzogen. Nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 3 min. erfolgte die Amplifikation mit 30 Zyklen 95 °C für 20 sec., 60 °C für 30 sec. und 68 °C für 90 sec.

Nach Amplifikation wurden die Sequenzierungsprodukte gefällt, um überschüssige fluoreszenzmarkierte ddNTPs zu entfernen. Hierzu wurden die Sequenzierungsprodukte mit jeweils 100 µl 70%igem Ethanol versetzt und bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde es für 30 Minuten bei 4800 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte ein Waschschrift mit erneut 100 µl 70%igem Ethanol und einer Zentrifugation bei 4800 g. Danach wurden die Sequenzierungsplatten kopfüber für 1 min bei 613 g zentrifugiert, dann bei 60 °C für 45-60 min in einem Wärmeschrank getrocknet und in 50 µl HPLC- Wasser aufgenommen. Die elektrophoretische Auftrennung der Produkte erfolgte im Helmholtz-Zentrum München (HMGU) an einem ABI 3730 DNA Analyzer.



**Tabelle 7: Primer für die Sequenzierung**

Gen	Exon	Primer	
<b>CELA2A</b>	1	S1F	5'GAAAACCCCATCTTGGCGTGC3'
	2	P12RA	5'GCTCTCTGAGTCCCATCAATACTC3'
	3	S3F	5'AGTTGTGCACATGAGGCGAC3'
	4	S4F	5'AGTTACTTGGGTCTATCCCC3'
	5	S5F	5'ACACAGGGACAGTGCTGTCA3'
	6	S6F	5'GAGCTCATTGGCTTAGCTTGAGTC3'
	7	S7F	5'TGGGCTATGACCACAAGGGT3'
	8	S8FA	5'TACTGTAGTGTGGGCTGCCTGTA3'
<b>CELA2B</b>	1	S1F	5'CCCATCTTGCCTGCTCCTAG3'
	2	P12RA	5'GCTCTCTGAATCCCATCAATCCTA3'
	3	S3F	5'AGTTGTGTACCTGAGGTGAG3'
	4	S4F	5'AGTTACTTGGGTCTATCCCT3'
	5	S5F	5'GAGCAACCTGGGTAACGTAC3'
	6	S6F	5'ACTGCTGAACCAATCACCAG3'
	7	S7F	5'TGAGCTATGACCACAAGGAC3'
	8	S8FA	5'TGAACTCCTCAGGCAGGAGC3'
<b>CELA3A</b>	1	S1F	5'CAGGATTGAACCGTGGTCTGC3'
	2	S2F	5'GGATTCTGGAAAGCCCTGCTC3'
	3-4	S34F	5'CAACCTATACAGCCATTGGTGG3'
	5	S5FA	5'GAAGTTGGGGCATCTCAGAGG3'
	6	S6FA	5'GGAGGAGAGTCCTCATCAGG3'
	7	P7R	5'GTTTAGCTATTACTGTTACCATGAGC3'
	8	S8RA	5'ACCAGGATGGTCAGGTCACC3'
	<b>CELA3B</b>	1	P1R
2		P2R	5'CCCAGTGAGGGTTACAGACGGAAT3'
3-4		S34F	5'CAACCTATACAGCCATTGGTGG3'
5		P56F	5'GGAGCTGGGGCATCTCAGAGGC3'
6		S6FA	5'CAGAAGAAGTGTGCGCCTTGG3'
7		S7FA	5'GTTTAGCTATTACTGTTACCATGAG3'
8		P8F	5'CCATGAGGTAAGTTCTATCATTATCCC3'

## **7.5. Statistische Auswertung**

Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Mutationshäufigkeiten wurde über den zweiseitigen exakten Test nach Fisher mit Hilfe des Computerprogramms R untersucht. Ein p-Wert von kleiner 0,05 wurde als signifikant betrachtet. Das Programm berechnete auch zusätzliche Odds Ratios (OR) und Konfidenzintervalle (KI).

## **7.6. Nomenklatur**

Die Nummerierung der Nukleotide fängt mit der A (c.1) des ATG-Codons (Codon 1) im Exon 1 an. Mutationen im kodierenden Bereich werden fortlaufend nummeriert.

## 8. Ergebnisse

Tabelle 8: *CELA2A*-Mutationen im kodierenden Bereich

Exon	Mutation			Häufigkeit Patienten		Häufigkeit Kontrollen		p-Wert
	Nukleotid-austausch	AS-Austausch	GT					
2	c.75T>C	p.Y25=	het	1/581	0,2%	1/239	0,4%	0.498
2	c.105g>A	p.A35=	het	4/581	0,7%	1/239	0,4%	1.0
3	c.157A>C	p.K53Q	het	0/581	0,0%	1/238	0,4%	0.29
3	c.161g>C	p.W54S	het	0/581	0,0%	1/238	0,4%	0.29
4	c.247g>A	p.V83M	het	1/581	0,2%	1/427	0,2%	1.0
4	c.297A>C	p.A99=	het	251/581	43,2%	178/427	41,7%	1.0
			homo	54/581	9,3%	37/427	8,7%	0.82
4	c.300C>g	p.V100=	het	1/581	0,2%	0/427	0,0%	1.0
4	c.304g>T	p.V102F	het	2/581	0,3%	0/427	0,0%	0.51
4	c.356+1gA	-	het	0/581	0,0%	1/427	0,2%	0.42
5	c.420C>T	p.A140=	het	1/581	0,2%	0/428	0,0%	1.0
5	c.489g>A	p.L163=	het	65/581	11,2%	65/428	15,2%	0.07
			homo	4/581	0,7%	2/428	0,5%	1.0
6	c.497A>G	p.N166S	het	0/581	0,0%	1/238	0,4%	0.29
6	c.508C>T	p.P170S	het	1/581	0,2%	0/238	0,0%	1.0
6	c.627C>A	p.I209=	het	1/581	0,2%	0/238	0,0%	1.0
6	c.629C>G	p.S210C	het	1/581	0,2%	0/238	0,0%	1.0
6	c.632G>C	p.S211T	het	1/581	0,2%	0/238	0,0%	1.0
7	c.672g>A	p.A224=	het	220/581	37,9%	154/428	36,0%	0.55
			homo	38/581	6,5%	7/428	1,6%	0.000
			allele	296/581	25,5%	168/856	19,6%	0.002
7	c.724G>A	p.G242S	het	1/581	0,2%	0/428	0,0%	1.0
7	c.758C>g	p.T253R	het	0/581	0,0%	1/428	0,2%	0.42
7	c.770A>g	p.N257S	het	4/581	0,7%	4/428	0,9%	0.73

Bei den *CELA2A*-Varianten c.157A>C (p.K53Q), c.297A>C (p.A99=) und c.672g>A (p.A224=) handelt es sich um eine Konvertierung des jeweiligen Nukleotids in das entsprechende Nukleotid des anderen Gens.

**Tabelle 9: CELA2B-Mutationen im kodierenden Bereich**

Exon	Mutation			Häufigkeit Patienten		Häufigkeit Kontrollen		p-Wert
	Nukleotid-austausch	AS-Austausch	GT					
2	c.51T>C	p.C17=	het	0/581	0,0%	1/427	0,2%	0.42
2	c.93A>C	p.G31=	het	6/581	1,0%	1/427	0,2%	0.25
2	c.105g>A	p.A35=	het	2/581	0,3%	1/427	0,2%	1.0
4	c.235g>A	p.G79R	het	217/581	37,3%	98/238	41,2%	0.34
			homo	33/581	5,7%	10/238	4,2%	0.18
			allele	283/581	24,4%	118/476	24,8%	0.85
4	c.250_251AT>gg	p.M84G	het	1/581	0,2%	0/238	0,0%	1.0
4	c.340g>A	p.D114N	het	217/581	37,3%	98/238	41,2%	0.34
			homo	33/581	5,7%	10/238	4,2%	0.18
			allele	283/581	24,4%	118/476	24,8%	0.85
5	c.402C>T	p.T134=	het	1/581	0,2%	0/238	0,0%	1.0
5	c.446T>g	p.L149R	het	1/581	0,2%	0/238	0,0%	1.0
5	c.474g>A	p.T158=	het	218/581	37,5%	98/238	41,2%	0,34
			homo	33/581	5,7%	9/238	3,8%	0.13
			allele	284/581	24,4%	116/476	24,4%	1.0
7	c.672A>g	p.A224=	het	1/581	0,2%	6/427	1,4%	0.046
7	c.696T>C	p.H232=	het	4/581	0,7%	3/427	0,7%	1.0
7	c.704g>T	p.G235V	het	10/581	1,7%	3/427	0,7%	0.1

Bei den *CELA2B*-Varianten c.93A>C (p.G31=), c.235g>A (p.G79R), c.340g>A (p.D114N), c.696T>C (p.H232=) und c.704g>T (p.G235V) handelt es sich um eine Konvertierung des jeweiligen Nukleotids in das entsprechende Nukleotid des anderen Gens.

**Tabelle 10: CELA3A-Mutationen im kodierenden Bereich**

Exon	Mutation			Häufigkeit Patienten		Häufigkeit Kontrollen		p-Wert
	Nukleotid-austausch	AS-Austausch	GT					
1	c.40g>A	p.V14I	het	5/558	0,9%	7/242	2,9%	0.052
2	c.71A>g	p.H24R	het	94/558	16,8%	40/242	16,5%	1.0
			homo	5/558	0,9%	3/242	1,2%	0.7
2	c.73T>C	p.S25P	het	94/558	16,8%	40/242	16,5%	1.0
			homo	5/558	0,9%	3/242	1,2%	0.7
2	c.91C>A	p.H31N	het	94/558	16,8%	40/242	16,5%	1.0
			homo	5/558	0,9%	3/242	1,2%	0.7
2	c.115A>g	p.S39G	het	2/558	0,4%	0/242	0,0%	1.0
4	c.257G>T	p.G86V	het	1/558	0,2%	0/242	0,0%	1.0
4	c.332C>A	p.P111Q	het	1/558	0,2%	0/242	0,0%	1.0
5	c.481g>A	p.G161S*	het	3/558	0,5%	1/242	0,4%	1.0
6	c.504T>C	p.N168=	het	1/558	0,2%	0/242	0,0%	1.0
6	c.588C>T	p.S196=	het	6/558	1,1%	5/242	2,1%	0.32
6	c.622T>g	p.Y208D	het	0/558	0,0%	1/242	0,4%	0.3
6	c.633C>T	p.S211=	het	1/558	0,2%	1/242	0,4%	0.51
7	c.686G>T	p.G229V	het	1/558	0,2%	0/242	0,0%	1.0
7	c.699C>T	p.H233=	het	3/558	0,5%	0/242	0,0%	0.56
7	c.700g>A	p.G234S	het	4/558	0,7%	0/242	0,0%	0.32
7	c.703g>A	p.V235M	het	0/558	0,0%	1/242	0,4%	0.3
7	c.722g>C	p.G241A	het	22/558	3,9%	5/242	2,1%	0.21
			homo	2/558	0,4%	1/242	0,4%	1.0
7	c.736_737 TT>AC	p.F246T*	het	0/558	0,0%	1/242	0,4%	0.3
7	c.739_740 AT>Cg	p.I247R*	het	0/558	0,0%	1/242	0,4%	0.3
7	c.742T>A	p.W248R*	het	0/558	0,0%	1/242	0,4%	0.3
7	c.750C>T	p.P250=	het	184/558	33,0%	91/242	37,6%	0.22
			homo	25/558	4,5%	14/242	5,8%	0.48
7	c.753g>A	p.T251=	het	184/558	33,0%	91/242	37,6%	
			homo	25/558	4,5%	14/242	5,8%	0.48
7	c.772G>A	p.A258T	het	2/558	0,4%	0/242	0,0%	1.0
7	c.781G>A	p.D261N	het	0/558	0,0%	1/242	0,4%	0.3
	activity <20%	G86V + G161S + G234S		8/558	1,4%	1/242	0,4%	0.29

Die Exon Varianten c.71A>g (p.H24R), c.73T>C (p.S25P) und c.91C>A (p.H31N) stehen im Kopplungsungleichgewicht. Diese treten immer mit den Varianten c.44-79T>C, c.44- 82A>g und c.129+64T>C, darüber hinaus oft zusätzlich mit den Varianten c.44- 31A>C, c.44-89g>C, c.129+100T>C und c.129+151g>A auf.

Die synonyme Mutationen c.750C>T (p.P250=) und c.753g>A (p.T251=) stehen ebenfalls im Kopplungsungleichgewicht.

**Tabelle 11: CELA3B-Mutationen im kodierenden Bereich**

Exon	Mutation			Häufigkeit Patienten		Häufigkeit Kontrollen		p-Wert
	Nukleotid-austausch	AS-Austausch	GT					
2	c.129+1G>A	-	het	9/524	1,7%	5/1312	0,4%	0.006
3	c.153T>C	p.S51=	het	47/524	9,0%	11/241	4,6%	0.039
3	c.171g>C	p.T57=	het	47/524	9,0%	11/241	4,6%	0.039
		p.S51=_p.T57= - w/o p.R210H	het	17/524	3,2%	7/241	2,9%	1.0
		p.S51=_p.T57= - with p.R210H	het	30/524	5,7%	4/241	1,7%	0.013
3	c.189C>T	p.I63=	het	1/524	0,2%	2/241	0,8%	0.235
4	c.235T>C	p.W79R	het	16/524	3,1%	9/241	3,7%	0.663
5	c.366T>C	p.N122=	het	84/524	16,0%	26/241	10,8%	0.059
			homo	7/524	1,3%	1/241	0,4%	0.031
			allele	98/524	9,4%	28/482	5,8%	0.021
		p.N122= - w/o p.R210H	allele	90/524	8,6%	28/482	5,8%	0.063
		p.N122= - with p.R210H	allele	8/524	0,8%	0/482	0,0%	0.062
5	c.401A>T	p.Q134L*	het	1/524	0,2%	0/241	0,0%	1.0
5	c.415G>A	p.V139I	het	4/524	0,8%	0/241	0,0%	0.31
5	c.438C>g	p.P146=	het	17/524	3,2%	6/241	2,5%	0.655
5	c.488G>A	p.G163D	het	1/524	0,2%	0/241	0,0%	1.0
6	c.504C>T	p.N168=	het	1/524	0,2%	0/1322	0,0%	0.28
6	c.519C>T	p.D173=	het	10/524	1,9%	27/1322	2,0%	1.0
6	c.543C>g	p.P181=	het	80/524	15,3%	153/1322	11,6%	
			homo	4/524	0,8%	6/1322	0,5%	0.027
			allele	88/524	8,4%	165/2644	6,2%	0.021
		p.P181= - w/o p.R210H	allele	58/524	5,5%	131/2644	5,0%	0.457
		p.P181= - with p.R210H	allele	30/524	2,9%	34/2644	1,3%	0.002
6	c.607G>A	p.V203M	het	1/524	0,2%	0/1322	0,0%	1.0
6	c.625A>G	p.I209V*	het	39/524	7,4%	114/1322	8,6%	0.45
6	c.627C>G	p.I209M*	het	1/524	0,2%	5/1322	0,4%	1.0
6	c.629g>A	p.R210H	het	30/524	5,7%	34/1322	2,6%	0.002
6	c.642C>T	p.N214= (splice site!)	het	16/524	3,1%	18/1322	1,4%	0.02

Exon	Mutation			Häufigkeit Patienten	Häufigkeit Kontrollen	p- Wert
	Nukleotid- austausch	AS-Austausch	GT			
7	c.653g>C	p.G218A	het	1/524 0,2%	0/1309 0,0%	0.286
7	c.694g>C	p.V232L	het	2/524 0,4%	5/1309 0,4%	1.0
7	c.722C>g	p.A241G - all	het	35/524 6,7%	53/1309 4,0%	0.021
		p.A241G - all	homo*	0/524 0,0%	3/1309 0,2%	
		p.A241G - all	allele	35/524 3,3%	59/2618 2,3%	0.002
		p.A241G - w/o p.R210H	het	5/524 1,0%	23/1309 1,8%	0.291
		p.A241G - with p.R210H	het	30/524 5,7%	33/1309 2,5%	0.002
		p.A241G - gene conversion*	het	2/524 0,4%	5/1309 0,4%	
		p.A241G w/o p.R210H	het	5/524 1,0%	23/1309 1,8%	0.29
		p.A241G with p.R210H	het	30/524 5,7%	33/1309 2,5%	0.002
8	c.799A>g	p.T251M	het	0/524 0,0%	1/1309 0,1%	0.32
8	c.759C>T	p.F253=	het	1/524 0,2%	0/1309 0,0%	1.0
8	c.780T>C	p.I260=	het	16/524 3,1%	19/1309 1,5%	0.036
8	c.799A>g	p.I267V	het	3/524 0,6%	1/241 0,4%	1.0
8	c.780T>C	p.I260=	het	16/524 3,1%	19/1309 1,5%	0.036
8	c.799A>g	p.I267V	het	3/524 0,6%	1/241 0,4%	1.0

## 9. Diskussion

Um zu überprüfen, ob Mutationen in den CELA-Genen einen Einfluss auf das CP- Risiko haben, wurde im Rahmen dieser Arbeit die jeweils acht Exone der Gene *CELA2A*, *CELA2B*, *CELA3A* sowie *CELA3B* sequenziert und auf Mutationen untersucht. Insgesamt wurden 20 *CELA2A*-, 12 *CELA2B*-, 24 *CELA3A*- sowie 25 *CELA3B*-Varianten gefunden. Die relativen Häufigkeiten bei den Patienten sowie Kontrollen wurden ausgerechnet und die Unterschiede auf Signifikanz überprüft. Bei der Beurteilung der Signifikanz wurden bei häufigen Varianten die heterozygoten und homozygoten Genotypen und die Allelfrequenzen getrennt betrachtet. Mit Ausnahme einer synonymen Variante in *CELA2A* und *CELA2B* (p.A224=) fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen bei *CELA2A*, *CELA2B* und *CELA3A*.

In *CELA3B* wurden insgesamt neun signifikante Ergebnisse im kodierenden Bereich gefunden. Dabei erhöhen alle Varianten das CP-Risiko (OR>1), während keine Mutation protektiv wirkt (OR<1) (Tabelle 12).

Die stärkste Assoziation fand sich mit den *CELA3B*-Varianten c.129+1G>A (OR=4,6) und c.629g>a (p.R210H) (OR=2.30).



**Tabelle 12: CELA3B-Varianten mit signifikantem Ergebnis**

Gen	Ort	Mutation		Häufigkeit Patienten		Häufigkeit Kontrollen		OR	p-Wert
3A	1	c.40g>A	het	5/558	0,9%	7/242	2,9%	0.30	0.052
3B	2	G>A	het	9/524	1,7%	5/1312	0,4%	4.6	0.006
3B	3	c.153T>C	het	47/524	9,0%	11/241	4,6%	2.06	0.039
3B	3	c.171g>C	het	47/524	9,0%	11/241	4,6%	2.06	0.039
3B	3	c.189C>T	het	1/524	0,2%	2/241	0,8%	0.228	0.235
3B	5	c.366T>C	het	84/524	16,0%	26/241	10,8%	1.58	0.059
3B	5	c.401A>T	het	1/524	0,2%	0/241	0,0%	-	1.0
3B	5	c.415G>A	het	4/524	0,8%	0/241	0,0%	-	0.31
3B	5	c.438C>g	het	17/524	3,2%	6/241	2,5%	1.31	0.655
3B	5	c.488G>A	het	1/524	0,2%	0/241	0,0%	-	1.0
3B	6	c.504C>T	het	1/524	0,2%	0/1322	0,0%	-	0.28
3B	6	c.519C>T	het	10/524	1,9%	27/1322	2,0%	0.93	1.0
3B	6	c.543C>g	het	80/524	15,3%	153/1322	11,6%	0	0
3B	6	c.607G>A	het	1/524	0,2%	0/1322	0,0%	-	1.0
3B	6	c.625A>G	het	39/524	7,4%	114/1322	8,6%	0.85	0.45
3B	6	c.627C>G	het	1/524	0,2%	5/1322	0,4%	0.50	1.0
3B	6	c.629g>A	het	30/524	5,7%	34/1322	2,6%	2.30	0.002
3B	6	c.642C>T	het	16/524	3,1%	18/1322	1,4%	2.28	0.02
3B	7	c.653g>C	het	1/524	0,2%	0/1309	0,0%	-	0.286
3B	7	c.694g>C	het	2/524	0,4%	5/1309	0,4%	1.0	1.0
3B	7	c.722C>g	het	35/524	6,7%	53/1309	4,0%	1.7	0.021
3B	7	c.752C>T	het	0/524	0,0%	1/1309	0,1%	-	0.32
3B	7	c.759C>T	het	1/524	0,2%	0/1309	0,0%	-	1.0
3B	7	c.780T>C	het	16/524	3,1%	19/1309	1,5%	2.14	0.036

## 9.1. CELA2-Mutationen

Die Variante c.672g>A (p.A224=) im Exon 7 (*CELA2A*) ist ein synonymer Polymorphismus welcher in beiden Genen signifikant ist, was jedoch zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz führt. Trotzdem ist die relative Häufigkeit des homozygoten Genotyps bei den Patienten signifikant höher, was die Annahme stützt, dass synonyme Mutationen an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sein könnten. Das geschieht, indem sie den Spleißvorgang stören, die Stabilität der mRNA beeinflussen und somit einen Einfluss auf die Proteinbiosynthese und -faltung sowie die enzymatische Aktivität der Proteine haben. Ein möglicher Mechanismus wäre, dass durch den Codon-Austausch von dem weniger häufigeren „gCg“ (Häufigkeit im menschlichen Genom: 7,4/1000) zu dem häufigeren „gCA“ (Häufigkeit im menschlichen Genom: 15,8/1000) eine schnellere Elongation ( $\Delta$ RSCU "relative synonymous codon usage" = 0,48) der Proteine stattfindet (Sauna *et. al* 2011). Dies könnte zu einer erhöhten Anzahl an CELA2A-Proteinen führen, die eventuell verfrüht im Pankreasgewebe aktiviert werden. Denkbar wäre auch eine Fehlfaltung der Proteine, die über ER-Stress zum Tod der Azinuszellen führen könnten. Bereits 2009 konnte Kereszturi in zwei Arbeiten zeigen, dass Mutationen in dem Aktivierungspeptid von *PRSS1* durch eine frühzeitige, intrazelluläre Aktivierung von Trypsinogen zu einer niedrigeren Sekretion führen kann, was auch den Tod der Azinuszelle verursachen kann. Auch andere *PRSS1*- Mutationen (p.R116C, p.C139S) führen durch Fehlfaltung und intrazellulären Rückhaltung der Proteine zum ER-Stress und rufen damit die ungefaltete Proteinantwort (UPR) hervor, welche wiederum in der Apoptose enden kann (Kereszturi *et al.* 2009). Diese Theorie sollte aber mit Vorsicht behandelt werden, da bei den Kontrollen das Hardy-Weinberg-Gesetz nicht erfüllt wird ( $\chi^2=8.45$ ;  $P=0.01$ ). Dies könnte beispielweise auf ein Genotypisierungsproblem hinweisen, oder auf ein mögliches technisches Problem bei der PCR, weswegen bei den Kontrollen nicht die wahre Verteilung der hetero- und homozygoten Genotypen gezeigt wird. Eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bei den Patienten deutet nicht zwingend auf eine fehlerhafte Genotypisierung hin, da es auch auf eine Assoziation mit der Krankheit hinweisen kann (Wittke-Thompson JK *et. al* 2005). Da beide Gene sehr ähnlich sind und es sich um die identische Position in beiden Genen handelt, kann es sein, dass in der PCR beide Genen in einigen Fällen amplifiziert worden sind. Als möglicher Lösungsansatz, sollten die PCRs wiederholt und überprüft werden mit einer eventuell neuen Primerkombination.

Außerdem ist zu erwähnen, dass diese Variante teilweise mit der *CTRC*- Mutation c.180C>T (p.G60=), einem der häufigsten Risikofaktoren der CP (Hegyi E *et. al* 2017) gekoppelt ist, was auch zur Signifikanz von p.A224= beitragen könnte.

*CELA2B* ist zwar in enger Beziehung zu *CELA2A*, wird jedoch im Vergleich dazu nur kaum im Pankreas sezerniert mit einer GTEX RNA von 1885.6 pTPM, als direkter Vergleich wird *CELA2A* mit einer GTEX RNA von 15011.9 pTPM hergestellt.

Ein Zusammenhang zwischen *CELA2*-Mutationen und der CP konnte anhand unserer Daten somit nicht belegt werden. In einer neueren Studie von Esteghamat *et. al* 2019 konnte *CELA2A* in Zusammenhang zwischen früh einsetzender Atherosklerose und metabolischem Syndrom und *CELA2A* gebracht werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *CELA2A* die Hyperaktivierung von Blutplättchen reduziert, die Sekretion und den Abbau von Insulin auslöst sowie die Insulinsensitivität erhöht. Der Verlust dieser Funktionen durch die mutierten Proteine liefert Einblicke in Krankheitsmechanismen und legt nahe, dass *CELA2A* in Zukunft ein attraktives therapeutisches Ziel sein könnte in der Behandlung des metabolischen Syndroms als auch der Atherosklerose.

## 9.2. *CELA3*-Mutationen

Die Mutation c.40g>a (p.V14I) verursacht einen Aminosäureaustausch in der Signalpeptid-Sequenz. Solche Signalpeptid-Mutationen wurden auch schon in einem anderen mit chronischer Pankreatitis assoziiertem Gen, *SPINK1*, entdeckt (Király *et al.* 2007). Bei den *SPINK1*-Mutationen wird der hydrophobe Kern des Signalpeptids verändert, was die Sekretion der inaktiven Enzyme verhindert. Diese fördert die Entstehung der Krankheit. Bei *CELA3A* dagegen ist eine tendenziell protektive Wirkung zu erkennen. Obwohl sich die Variante nicht direkt an der Spaltstelle (die vermutlich zwischen den Aminosäuren Ala-15 und Ser-16) befindet (Sziegoleit *et al.* 1982), aber da Signalpeptide normalerweise am C-Terminus polare Aminosäuren aufweisen (Jarjanazi *et al.* 2008), wie die Aminosäuren 17-21, könnte man annehmen, dass es noch weiter entfernt liegt und die Hydrophobizität des hydrophoben Kerns durch den Austausch von Valin zu Isoleucin nicht verändert wird, könnten eventuell andere Mechanismen zu einer niedrigeren Sekretion von *CELA3A* und somit zu einer geringeren Anzahl an aktivierbaren Proenzymen führen, was die protektive Wirkung erklären könnte. Dies wäre aber nur möglich, wenn die Rückhaltung der Proenzyme die Proteinhomöostase nicht stören würde. Sollte es aber doch, könnte es Stress für die Zelle verursachen, was einen gegenseitigen Effekt erzeugen würde.

Keine der gefundenen Mutationen zeigte sich bei *CELA3A* signifikant, selbst Mutationen mit einer Aktivität unter 20 % (c.781G>A) nicht. Um das abschließend klären zu können, sollten noch weitere Kohorten untersucht werden. Mutationen in kürzlich entdeckten Krankheitsgenen wie *PNLIP* und *TRPV6*, die mit der chronischen Pankreatitis assoziiert sind, betrafen nur ca. 1-2% der Patienten und nicht wie bei *SPINK1* 20-30 % der Patienten. So fanden sich *PNLIP*-Mutationen in nur 1,9 % der deutschen Patienten. Auch funktionell defekte *TRPV6*-Varianten ließen sich bei europäischen Patienten in nur 2% nachweisen (Masamune *et al.* 2020). Deshalb sind in Zukunft vielleicht größere Patientenkollektive nötig, um seltenere Risikogene, die nur in einer geringen Prozentzahl der Patienten nachweisbar sind, identifizieren zu können.

### 9.3. *CELA3B*

Die signifikant assoziierte Missense-Mutation c.629g>A in *CELA3B* verursacht einen Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin im Codon 210 (p.R210H). Dies könnte beispielweise die Komplexbildung mit Procarboxypeptidasen verhindern und somit durch die erhöhte Anzahl an Monomer vorliegenden ProCPAs und Proelastasen das Risiko für chronische Pankreatitis erhöhen. Vorläufige Daten der Arbeitsgruppe von Miklós Sahin-Tóth zeigten, dass die p.R210H-Variante mit einer deutlich erhöhten elastolytischen Aktivität einhergeht (unpubliziert). Somit könnte ähnlich wie bei *PRSS1*-Mutationen eine erhöhte Proteasenaktivität pathogenetisch verantwortlich sein.

Die Mutation IVS2+1G>A ist nicht im Kopplungsungleichgewicht mit einem Single Nucleotide Polymorphismus in *CELA3B* und zeigt auch kein LD mit p.P250 = und p.T251 = von *CELA3A*. Das signifikante Ergebnis bei p.N122= (P=0,021 für die Allelfrequenz) lässt sich zu dem jetzigen Zeitpunkt nicht erklären. Die Möglichkeit eines unabhängigen Risikofaktors könnte in Betracht gezogen werden, ebenso die Möglichkeit einer Genumwandlung in Exon 2.

Bei *CELA3B* fand sich zudem eine signifikante Assoziation mit einer „Splice site“-Mutation c.642C>T (p.N214=), bei der das letzte Nukleotid von Exon 6 betroffen ist, die konservierte Sequenzen am 5´- und 3´-Ende des Introns aber unverändert bleiben. Diese Variante könnte einen Einfluss auf das Spleißen haben, wie es beispielweise auch im Falle von der Mutation c.546g>T, einem Austausch des letzten Nukleotids in Exon 2 des GAA (Lysosomalen Alpha-Glucosidase-Gens) bei der erblichen Glykogenspeicherkrankheit beobachtet wurde (Maimaiti *et al.* 2009). Folglich könnte sich die Rate der *CELA3B*-Expression verändern, die einen Einfluss auf die Komplexbildung mit ProCPAs oder auf die Anzahl aktiver *CELA3B*-Enzyme im Pankreasgewebe haben könnte. Es konnte ein starkes Kopplungsungleichgewicht mit

p.W79R gezeigt werden sowie eine nahezu vollständiges Kopplungsungleichgewicht mit p.I260=.

Die polymorphe Natur von *CELA3A* und *CELA3B* an der Aminosäureposition p.241 verändert die Affinität bei der Komplexbildung von Procarboxypeptidasen und Proelastasen (Szabo *et al.* 2016). Wir konnten in unseren Untersuchungen signifikante Werte bei p.A241G nachweisen (P=0,021). Allerdings befindet sich die Variante im Kopplungsungleichgewicht mit p.R210H. Alle Patienten, die heterozygot für p.R210H waren, waren auch heterozygot für p.A241G. Vergleicht man die Häufigkeiten der Patienten mit p.A241G ohne die p.R210H-Variante (5/524, 0,95 %; P=0,29) mit denen, die doppelt heterozygot waren (30/524, 5,73 %; P=0,002), so läßt sich die Assoziation mit p.A241G komplett durch die Assoziation mit p.R210H erklären.

Auch die Assoziation mit c.543C>g (p.P181=) läßt sich durch die Kopplung mit p.R210H erklären: Während sich für p.P181=\_p.R210H ein P-Wert von 0,002 ergab, war die isolierte p.P180= - Variante ohne p.R210H nicht assoziiert (P=0.46).

Auch die Anreicherung von p.S51= und p.T57= kann vollständig durch die Kopplung mit p.R210H erklärt werden. In einer Studie wurde bei 225 Probanden mit chronischer Pankreatitis und 300 Kontrollen untersucht, ob Veränderungen in Exon 7 von *CELA3A* und *CELA3B* das Risiko für eine chronische Pankreatitis erhöhen. Es fand sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen genetischen Varianten in diesem Exon und der Krankheit (Parniczky *et al.*, 2016). Die Studie wurde weiter ausgeweitet auf die Exone 1-6 und 8 bei einem Patientenkollektiv von 100 Patienten und Kontrollen. Wieder konnte keine der identifizierten Exon Varianten, inklusive der Exon-flankierenden intronischen Regionen von *CELA3A* und *CELA3B* eine signifikante Assoziation mit der Krankheit zeigen. Nur zwei intronische Varianten erreichten eine statistische Signifikanz, c.129+297G>A (Intron 2) wirkte protektiv (OR = 0,6), dagegen erhöht c.499+88 G> A (Intron 5) das Risiko (OR = 1,7) für chronische Pankreatitis (Unger *et al.* 2016). Ungeachtet der signifikanten Effekte basiert die Arbeit auf einer begrenzten Anzahl Patienten, so dass es einer größeren Kohorte bedarf, um die Ergebnisse zu bestätigen. Was aber gezeigt werden konnte, war, dass insbesondere Single Nucleotide Polymorphismen in der Nähe der Transkriptionsstelle vermutlich die Genexpression oder das Prä-mRNA-Spleißen beeinflussen und so zur Krankheitsentstehung beitragen könnten. Obwohl zunehmend Beweise dafür vorliegen, dass auch tiefe intronische Varianten wie die *CELA3A*-Varianten c.129 + 297 G> A und c.499 + 88 G> A pathogenes Potenzial haben und mit verschiedenen Krankheiten assoziiert sind (Vaz-Drago *et al.* 2017) ist die funktionelle Auswirkung solcher Varianten schwer zu untersuchen (Maston *et al.* 2006). Tiefe intronische Regionen können als Enhancer oder Silencer für die Regulation entfernter

Gene fungieren und wirken sich nicht unbedingt auf das Gen aus, indem sie sich befinden (Maston *et al.* 2006). Keines der bisher mit Pankreatitis in Verbindung gebrachten Genen (*CEL*, *CFTR*, *CPA1*, *CTRB1-CTRB2*, *CTRC*, *PRSS1-PRSS2*, *SPINK1*) liegt jedoch in der Nähe von *CELA3A*, somit kann diese Theorie ausgeschlossen werden. Neben der Veränderung der Genregulation können intronische Varianten das mRNA-Spleißen beeinflussen und die ordnungsgemäße Exon-Assemblierung stören. Konservierte Nukleotidsequenzen, einschließlich GU- und AG-Dinukleotide am 5'-Exon-Intron- und am 3'-Intron-Exon-Übergang, ein Polypyrimidin-Trakt und ein A-Nukleotid an der Verzweigungsstelle, sind wesentliche Elemente für ein effizientes Spleißen (Pagani *et al.* 2004). Unger *et al.* 2016 konnten zwischen dem Exon 2 von *CELA3A* (c.71A>G (p.H24R), c.73T>C (p.S25P) und c.91C>A (p.H31N)) und *CELA3B*-Homologon (c.71G>A (p.R24H), c.73C>T (p.P25S) und c.91A>C (p.N31T)) eine Genkonversion vorliegen kann, ähnlich dem Polymorphismus an Position 241. Eine solche Genumwandlung bezieht sich auf einen nicht reziproken Austausch genetischer Informationen und tritt häufig zwischen zwei hoch homologen Sequenzen auf. Dadurch bleibt die Donorsequenz unverändert, während die übertragene genetische Information in der Akzeptorsequenz enthalten ist (Chen *et al.* 2007). Dabei scheint *CELA3B* der vorherrschende Donor und *CELA3A* der vorherrschende Akzeptor zu sein, obwohl eine Umwandlung auch umgekehrt möglich ist. Parniczky *et al.* konnten in einer Studie zu Exon 7 eine wahrscheinlich zufällige Umwandlung von *CELA3B* in *CELA3A* bei einem Patienten mit chronischer Pankreatitis nachweisen. Sie konnten in diesem Zusammenhang fünf Nukleotidänderungen, die nicht die Aminosäuresequenz verändern (c.736A>T, c.737C>T, c.739C>A, c.740G>T, c.742A>T) und drei Missense-Mutationen (p.T246F, p.R247I, p.R248W) nachweisen (Parniczky *et al.* 2016). Indessen weiß man, dass solche Genkonversionen wie zum Beispiel bei *PRSS1*, mit den beiden häufigsten Varianten p.N29I und p.R122H, die autolytische Aktivierung von Trypsinogen erhöhen und damit ursächlich für die chronische Pankreatitis sind (Chen *et al.* 2000; Rygiel *et al.* 2015; Teich *et al.* 2005). Ein weiteres Beispiel einer solchen Genkonversion konnte Boocock *et al.* bereits 2003 zeigen in Bezug auf das *SBDS*-Gen und sein Pseudogen *SBDSP1*, welches das Shwachman-Diamond-Syndrom verursacht, eine autosomal-rezessive Störung, bei der Patienten an exokriner Pankreasinsuffizienz, hämatologischer Dysfunktion und Skelettanomalien leiden. Die angegebenen Beispiele zeigen deutlich, dass Genkonversionen entweder zu schweren Pathologien führen können oder keinen offensichtlichen Effekt haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich in unserer Studie keine Assoziation von natürlich vorkommenden Exonvarianten in *CELA2A*, *CELA2B* und *CELA3A* mit chronischer

Pankreatitis fand. Für *CELA3B* fanden sich mehrere Varianten, die bei Patienten mit chronischer Pankreatitis im Vergleich zu Kontrollen signifikant angereichert waren. Die funktionellen Daten sind allerdings widersprüchlich, da für die assoziierte p.R210H-Variante funktionell eine Funktionsvermehrung (gain of function) nachgewiesen werden konnte. Die Assoziation mit der c.129+1G>A-Variante, die das erste Nukleotid des Intron 2 betrifft, steht hierzu im Widerspruch. Die ersten und letzten beiden Nukleotide eines Introns sind in Eukaryoten hoch konserviert und führen durch Intron-Retention oder Exon-Überspringen (exon skipping) in der Regel zu einem Funktionsverlust des Proteins. Zurzeit werden in der Fortsetzung unserer Ergebnisse weitere, europäische Patientenkollektive untersucht, um die hier erhobenen Daten für *CELA3B* zu untermauern.

## Literaturverzeichnis

Ammann RW, Bühler H, Münch R, Freiburghaus AW, Siegenthaler W. Differences of the natural history of idiopathic (nonalcoholic) and alcoholic chronic pancreatitis. A comparative long-term study of 287 patients. *Pancreas* 1987; 2; 368-377.

Ammann RW. Chronic pancreatitis in the elderly. *Gastroenterol Clin North Am* 1990; 19; 905-914.

Ammann RW. Idiopathic "juvenile" chronic pancreatitis. *Dtsch Med Wochenschr* 1976; 101; 1789-1794.

Bartelt DC, Shapanka R, Greene LJ. The primary structure of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor. Amino acid sequence of the reduced S-aminoethylated protein. *Arch Biochem Biophys* 1977; 179; 189-199.

Bengtsson-Ellmark SH, Nilsson J, Orho-Melander M, Dahlenborg K, Groop L, Bjursell G.. Association between a polymorphism in the carboxyl ester lipase gene and serum cholesterol pro le. *Eur. J. Hum. Genet.* 12, 627–632 (2004).

Bhatia E, Choudhuri G, Sikora SS, Landt O, Kage A, Becker M, Witt H. Tropical calcific pancreatitis: strong association with SPINK1 trypsin inhibitor mutations. *Gastroenterology* 2002; 123; 1020-1025.

Chandak GR, Idris MM, Reddy DN, Bhaskar S, Sriram PV, Singh L. Mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (PST1/SPINK1) rather than the cationic trypsinogen gene (PRSS1) are significantly associated with tropical calcific pancreatitis. *J Med Genet* 2002; 39; 347-351.

Chen J-M, Cooper DN, Chuzhanova N, Ferec C, Patrinos GP. Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease. *Nat Rev Genet.* 2007, 8(10): 762-775.

Chiari H Über Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Zeitschrift für Heilkunde* 1896; 17; 69-96.

Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998;339:653e8.

Colomb E, Figarella C. Comparative studies on the mechanism of activation of the two human trypsinogens. *Biochem Biophys Acta* 1979; 571; 343-351.



Colomb E, Guy O, Deprez P, Michel R, Figarella C. The two human trypsinogens: Catalytic properties of the corresponding trypsin. *Biochem Biophys Acta* 1978; 525: 186-193.

Comfort MW, Steinberg AG. Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology* 1952; 21:; 54-63.

Davril M, Laine A, Hayem A. Studies on the interactions of human pancreatic elastase 2 with human  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor and  $\alpha$ 1-antichymotrypsin. *Biochem J.* (1987) 245 699-704

DiMagno EP, Layer P, Clain JE. Chronic pancreatitis. Hrsg.: Go VLW et al.: *The Pan- creas: Biology, Pathobiology, and Disease* New York, Raven, 1993 665-706.

Drenth JPH, te Morsche R, Jansen JBMJ. Mutations in serine protease inhibitor Kazal type 1 are strongly associated with chronic pancreatitis. *Gut* 2002; 50; 687-692.

Dufour MC, Adamson MD. The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas* 2003;27:286-290.

Durbec JP, Sarles H. Multicenter survey on the etiology of pancreatic diseases. Relationship between the relative risk of developing chronic pancreatitis and alcohol, protein, and lipid consumption. *Digestion* 1978; 18; 337-350.

Esteghamat F, Broughton JS, Smith E, Cardone R, Tyagi T, Guerra M, Szabó A, Ugwu N, Mani MV, Azari B, Kayingo G, Chung S, Fathzadeh M, Weiss E, Bender J, Mane S, Lifton RP, Adeniran A, Nathanson MH, Gorelick FS, Hwa J, Sahin-Tóth M, Belfort-DeAguiar R, Kibbey RG, Mani A.

CELA2A mutations predispose to early-onset atherosclerosis and metabolic syndrome and affect plasma insulin and platelet activation. *Nat Genet.* 2019 Aug;51(8):1233-1243.

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, Sendler 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(5): 518-522.

Geokas, M.C., Rinderknecht, H., Swanson, V., and Haverback, B. J. (1968) *Lab. Invest.* 19 , 235-239.

Gorry MC, Ghabbaizedeh D, Furey W, Gates LK Jr, Preston RA, Aston CE, Zhang Y, Ulrich C, Ehrlich GD, Whitcomb DC.

Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1997;113:1063-1068.

Guy O, Lombardo D, Bartelt DC, Amic J, Figarella C. Two human trypsinogens: purification, molecular properties and N-terminal sequences. *Biochemistry* 1978; 17; 1669-1675.

Hassan Z, Mohan V, Ali L, Allotey R, Barakat K, Faruque MO, Deepa R, McDermott MF, Jackson AE, Cassell P, Curtis D, Gelding SV, Vijayaravaghan S, Gyr N, Whitcomb DC, Khan AK, Hitman GA. SPINK1 is a susceptibility gene for fibrocalculous pancreatic pancreatic diabetes in subjects from the Indian subcontinent. *Am J Hum Genet* 2002; 71; 964-968.

Hegy E, Sahin-Tóth M. Genetic Risk in Chronic Pancreatitis: The Trypsin- Dependent Pathway. *Dig Dis Sci.* 2017, 62: 1692-1701.

Higuchi, S., Nakamura, Y. & Saito, S. Characterization of a VNTR polymorphism in the coding region of the CEL gene. *J. Hum. Genet.* 47, 213–215 (2002).

Horii A, Kobayashi T, Tomita N, Yamamoto T, Fukushige S, Murotsu T, Ogawa M, Mori T, Matsubara K. Primary structure of human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 149; 635-641.

Jarjanazi H, Savas S, Pabalan N, Dennis JW, Ozcelik H. Biological implications of SNPs in signal peptide domains of human proteins. *Proteins.* 2008, 70(2): 394- 403.

Kaplan PD, Kuhn C, Pierce JA. *J Lab Clin Med.* 1973 Sep;82(3):349-56.

Kawashima I, Tani T, Shimoda K, Takiguchi Y. Characterization of Pancreatic Elastase II cDNAs: Two Elastase II mRNAs Are Expressed in Human Pancreas. *DNA.* 1987, 6(2): 163-172.

Kazal LA, Spicer DS, Brahinsky RA. Isolation of a crystalline trypsin inhibitor- anticoagulant protein from the pancreas. *J Am Chem Soc* 1948; 70; 304-340.

Kereszturi E, Szmola R, Kukor Z, Simon P, Weiss FU, Lerch MM, Sahin-Tóth M. Hereditary pancreatitis caused by mutation induced misfolding of human cationic trypsinogen - a novel disease mechanism. *Hum Mutat.* 2009, 30(4): 575-582.

Kereszturi E, Sahin-Tóth M. Intracellular Autoactivation of Human Cationic Trypsinogen Mutants Causes Reduced Trypsinogen Secretion and Acinar Cell Death. *Journal of biological chemistry.* 2009, 284(48): 33392-33399.

Király O, Boulling A, Witt H, Le Maréchal C, Chen JM, Rosendahl J, Battaglia C, Wartmann T, Sahin-Tóth M, Férec C. Signal peptide variants that impair secretion of pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) cause autosomal dominant hereditary pancreatitis. *Hum Mutat* 2007;28:469-476.

Király O, Guan L, Szepessy E, Tóth M, Kukor Z, Sahin-Tóth M. Expression of human cationic trypsinogen with an authentic N terminus using intein-mediated splicing in aminopeptidase P deficient *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 2006;48:104-111.

Király O, Wartmann T, Sahin-Tóth M. Missense mutations in pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) cause intracellular retention and degradation. *Gut*. 2007, 56: 1433-1438.

Largman C, Brodrick JW, Geokas MC. Purification and characterization of two human pancreatic elastases. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 1976, 357: 1153-1161.

Lasher D, Szabo A, Masamune A. Protease-Sensitive Pancreatic Lipase Variants Are Associated With Early Onset Chronic Pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2019;00:1–10.

Laskowski M, Wu FC. Temporary inhibition of trypsin. *J Biol Chem* 1953: 204; 797-805.

Layer P, Yamamoto H, Kalthoff L, Clain JE, Bakken LJ, DiMagno EP. The different courses of early- and late-onset idiopathic and alcoholic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1994: 107; 1481-1487.

Le Bodic L, Bignon JD, Raguénès O, Mercier B, Georgelin T, Schnee M, Soulard F, Gagne K, Bonneville F, Muller JY, Bachner L, Férec C. The hereditary pancreatitis gene maps to long arm of chromosome 7. *Hum Mol Genet* 1996: 5; 549-554.

Lidberg U, Nilsson J, Strömberg K, Stenman G, Sahlin P, Enerbäck S, Bjursell G. Genomic organization, sequence analysis, and chromosomal localization of the human carboxyl ester lipase (CEL) gene and a CEL-like (CELL) gene. *Genomics* 13, 630–640 (1992).

Lindquist S, Bläckberg L, Hernell O. Human bile salt-stimulated lipase has a high frequency of size variation due to a hypervariable region in exon 11. *Eur. J. Biochem*. 269, 759–767 (2002).

Lombardo, D. Bile salt-dependent lipase: its pathophysiological implications. *Biochim. Biophys. Acta* 1533, 1–28 (2001).

Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andrén-Sandberg A, Domellöf L. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med* 1993; 328; 1433- 1437.

Lowenfels AB, Maisonneuve P. Risk factors for cancer in hereditary pancreatitis. *Med Clin North Am* 2000; 84; 5565-5573.

Madeyski K, Lidberg U, Bjursell G, Nilsson J. Structure and organization of the human carboxyl ester lipase locus. *Mamm. Genome* 9, 334–338 (1998).

Maimaiti M. Silent exonic mutation in the acid- $\alpha$ -glycosidase gene that causes glycogen storage disease type II by affecting mRNA splicing. *J Hum Genet.* 2009, 54: 493-496.

Masamune A, Kotani H, Sörgel F. Variants That Affect Function of Calcium Channel TRPV6 Are Associated With Early-Onset Chronic Pancreatitis . *Gastroenterology* 2020;158:1626–1641.

Masson E, Chen JM, Scotet V, Le Maréchal C, Férec C. Association of rare chymotrypsinogen C (CTRC) gene variations in patients with idiopathic chronic pancreatitis. *Hum Genet.* 2008, 123: 83-91.

Masson E, Le Maréchal C, Delcenserie R, Chen JM, Férec C. Hereditary pancreatitis caused by a double gain-of-function trypsinogen mutation. *Hum Genet.* 2008;123(5):521– 529.

Maston G. A., Evans S. K., Green M. R. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006, 7, 29-59.

Moulard M, Kerfelec B, Mallet B, Chapus C. Identification of a procarboxypeptidase A-truncated protease E binary complex in human pancreatic juice. *FEBS Lett.* 1989, 250(2): 166-170.

Moulard M, Michon T, Kerfelec B, Chapus C. Further studies on the human pancreatic binary complexes involving procarboxypeptidase A. *FEBS Lett.* 1990, 261(1): 179-183.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-273.

Naughton MA, Sanger F. Purification and Specificity of Pancreatic Elastase. *Biochem J.* 1961, 78: 156-163.

Németh BCs, Sahin-Tóth M. Human cationic Trypsinogen (PRSS1) variants and chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014, 306(6): G466- G473.

Nemoda Z, Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C (caldecrin) stimulates autoactivation of human cationic trypsinogen. *J Biol Chem* 2006;281:11879-11886.

Nilsson J, Bläckberg L, Carlsson P, Enerbäck S, Hernell O, Bjursell G. cDNA cloning of human-milk bile-salt-stimulated lipase and evidence for its identity to pancreatic carboxylic ester hydrolase. *Eur. J. Biochem.* 192, 543–550 (1990)

Noone PG, Zhou Z, Silverman LM, Jowell PS, Knowles MR, Cohn JA. Cystic fibrosis gene mutations and pancreatitis risk: relation to epithelial ion transport and trypsin inhibitor gene mutations. *Gastroenterology* 2001;121:1310e19.

Pagani F, Baralle FE. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet*, 5(5), 389-396. doi:10.1038/nrg1327

Pandya A, Blanton SH, Landa B, Javaheri R, Melvin E, Nance WE, Markello T. Linkage studies in a large kindred with hereditary pancreatitis confirms mapping of the gene to a 16-cM region on 7q. *Genomics* 1996: 38; 227-230.

Párniczky A, Hegyi E, Tóth AZ, Szücs Á, Szentesi A, Vincze Á, Izbéki F, Németh BC, Hegyi P, Sahin-Tóth M. Genetic Analysis of Human Chymotrypsin-Like Elastases 3A and 3B (CELA3A and CELA3B) to Assess the Role of Complex Formation between Proelastases and Procarboxypeptidases in Chronic Pancreatitis. *Int J Mol Sci.* 2016, 17(12): 2148.

Pascual R, Burgos FJ, Salva M, Soriano F, Mendez E, Avilés FX. Purification and properties of five different forms of human procarboxypeptidases. *Eur J Biochem.* 1989, 179(3): 609-616.

Perrault J. Hereditary pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am* 1994: 23; 743-752.

Pfützer RH, Barmada MM, Brunskill AP, Finch R, Hart PS, Neoptolemos J, Furey WF, Whitcomb DC. SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2000: 119; 615-623.

Ræder H, McAllister FE, Tjora E, Bhatt S, Haldorsen I, Hu J, Willems SM, Vesterhus M, El Ouaamari A, Liu M, Ræder MB, Immervoll H, Hoem D, Dimcevski G, Njølstad PR, Molven A, Gygi SP, Kulkarni RN. Carboxyl-ester lipase maturity-onset diabetes of the young is associ-

ated with development of pancreatic cysts and upregulated MAPK signaling in secretin-stimulated duodenal uid. *Diabetes* 63, 259–269 (2014).

Raeder H, Johansson S, Holm PI, Haldorsen IS, Mas E, Sbarra V, Neramoen I, Eide SA, Grevle L, Bjørkhaug L, Sagen JV, Aksnes L, Søvik O, Lombardo D, Molven A, Njølstad PR. Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *Nat. Genet.* 38, 54–62 (2006).

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

Ramanan AV, Thimmarayappa AD, Baildam EM. Acute lethal pancreatitis in childhood systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2002; 41; 467-9.

Rinderknecht H. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Dig Dis Sci* 1986; 31; 314-321.

Rose SD, MacDonald RJ. Evolutionary silencing of the human elastase I gene (ELA1). *Hum Mol Genet.* 1997, 6: 897-903.

Rosendahl J, Witt H, Szmola R, Bhatia E, Ozsvári B, Landt O, Schulz HU, Gress TM, Pfützer R, Löhr M, Kovacs P, Blüher M, Stumvoll M, Choudhuri G, Hegyi P, te Morsche RH, Drenth JP, Truninger K, Macek M Jr, Puhl G, Witt U, Schmidt H, Büning C, Ockenga J, Kage A, Groneberg DA, Nickel R, Berg T, Wiedenmann B, Bödeker H, Keim V, Mössner J, Teich N, Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C (CTRC) alterations that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2008, 40(1): 78-82.

Rosendahl J, Bödeker H, Mössner J, Teich N. Hereditary chronic pancreatitis. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:1.

Rygiel AM, Beer S, Simon P, Wertheim-Tysarowska K, Oracz G, Kucharzik T, Tysarowski A, Niepokój K, Kierkus J, Jurek M, Gawliński P, Poznański J, Bal J, Lerch MM, Sahin-Tóth M, Weiss FU. Gene conversion between cationic trypsinogen (PRSS1) and the pseudogene trypsinogen 6 (PRSS3P2) in patients with chronic pancreatitis. *Hum Mutat.* 2015 Mar;36(3):350-6

Sahin-Tóth M, Gráf L, Tóth M. Trypsinogen stabilization by mutation arg117-to-his: a unifying pathomechanism for hereditary pancreatitis?. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:505-508.

Sahin-Tóth M, Tóth M. Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:286-289.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74:5463-5467.

Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet.* 2011, 12(10): 683-691.

Scheele GA, Bartelt D, Bieger W. Characterization of human exocrine pancreatic proteins by two-dimensional isoelectric focusing/SDS gel electrophoresis. *Gastroenterology* 1981: 80; 461-473.

Schneider A, Suman A, Rossi L, Barmada MM, Beglinger C, Parvin S, Sattar S, Ali L, Khan AK, Gyr N, Whitcomb DC. SPINK1/PST1 mutations are associated with tropical pancreatitis and type II diabetes mellitus in Bangladesh. *Gastroenterology* 2002: 123; 1026-1030.

Sharer N, Schwarz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M, Braganza J. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *The New England Journal of Medicine.* 1998, 339(10): 645-652.

Shibata T, Ogawa M, Matsuda K, Miyauchi K, Yamamoto T, Mori T. Purification and characterisation of pancreatic secretory trypsin inhibitor in human gastric mucosa. *Clin Chim Acta* 1986: 159; 27-36.

Shibata T, Ogawa M, Takata N. Distribution of pancreatic secretory trypsin inhibitor in various human tissues and its inactivation in the gastric mucosa. *Res Commun Pathol Pharmacol* 1987: 55; 243-248.

Shwachman H, Lebenthal E, Khaw KT. Recurrent acute pancreatitis in patients with cystic fibrosis with normal pancreatic enzymes. *Pediatrics* 1975;55:86e95.

Singer MV, Gyr K, Sarles H. Report of the Second International Symposium on the Classification of Pancreatitis in Marseille, France, March 28-30, 1984. *Gastroenterology* 1985;89:683-685.

Steer ML, Meldolesi J. The cell biology of experimental pancreatitis. *N Engl J Med* 1987;316:144-150.

Szabó A, Pilsak C, Bence M, Witt H, Sahin-Tóth M. Complex Formation of Human Proelastases with Procarboxypeptidases A1 and A2. *JBC*. 2016, 291(34): 17706-17716.

Szabó, A., and Sahin-Tóth, M. Increased activation of hereditary pancreatitis-associated human cationic trypsinogen mutants in presence of chymotrypsin C. *J Biol Chem*. 2012 Jun 8;287(24):20701-10

Szepessy E, Sahin-Tóth M. Inactivity of recombinant ELA2B provides a new example of evolutionary elastase silencing in humans. *Pancreatology*. 2006, 6(1-2): 117-122.

Sziegoleit, A. Purification and characterization of a cholesterol-binding protein from human pancreas. *Biochem J*. 1982, 207: 573-582.

Szmola R, Bence M, Carpentieri A, Szabó A, Costello CE, Samuelson J, Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C Is a Co-activator of Human Pancreatic Procarboxypeptidases A1 and A2. *JBC*. 2011, 286(3): 1819-1827.

Szmola R, Sahin-Tóth M. Pancreatitis-associated chymotrypsinogen C (CTRC) mutant elicits endoplasmic reticulum stress in pancreatic acinar cells. *Gut*. 2010, 59: 365-372.

Szmola, R., Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C (caldecrin) promotes s dation of human cationic trypsin: identity with Rinderknecht's enzyme Y. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 3;104(27):11227-32.

Tani T, Ohsumi J, Mita K, Takiguchi Y. Identification of a Novel Class of Elastase Isozyme, Human Pancreatic Elastase III, by cDNA and Genomic Gene Cloning. *J Biol Chem*. 1988, 263(3): 1231-1239.

Teich N, Nemoda Z, Köhler H, Heinritz W, Mössner J, Keim V, Sahin-Tóth M. Gene conversion between functional trypsinogen genes PRSS1 and PRSS2 associated with chronic pancreatitis in a six-year-old girl. *Hum Mutat*. 2005;25(4):343–347.



Torsvik J, Johansson S, Johansen A, Ek J, Minton J, Raeder H, Ellard S, Hattersley A, Pedersen O, Hansen T, Molven A, Njølstad PR. Mutations in the VNTR of the carboxyl-ester lipase gene (CEL) are a rare cause of monogenic diabetes. *Hum. Genet.* 127, 55–64 (2010).

Unger L, Hegyi E, Párniczky A, Genetic analysis of human elastases CELA3A and CELA3B in chronic pancreatitis 2016, bisher nicht veröffentlicht

Várallyay E, Pál G, Patthy A, Szilágyi L, Gráf L. Two mutations in the rat trypsin confer resistance against autolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;243:56-60

Vaz-Drago R, Custódio N, Carmo-Fonseca M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet.* 2017, 136: 1093-1111.

Vendrell J, Querol E, Avilés FX. Metallocoarboxypeptidases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1477:284–298.

Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nature Genetics.* 1996, 14: 141-145.

Witt H, Sahin-Tóth M, Landt O, Chen JM, Kähne T, Drenth JP, Kukor Z, Szepessy E, Halangk W, Dahm S, Rohde K, Schulz HU, Le Maréchal C, Akar N, Ammann RW, Truninger K, Bargetzi M, Bhatia E, Castellani C, Cavestro GM, Cerny M, Destro-Bisol G, Spedini G, Eiberg H, Jansen JB, Koudova M, Rausova E, Macek M Jr, Malats N, Real FX, Menzel HJ, Moral P, Galavotti R, Pignatti PF, Rickards O, Spicak J, Zarnescu NO, Böck W, Gress TM, Friess H, Ockenga J, Schmidt H, Pfützer R, Löhr M, Simon P, Weiss FU, Lerch MM, Teich N, Keim V, Berg T, Wiedenmann B, Luck W, Groneberg DA, Becker M, Keil T, Kage A, Bernardova J, Braun M, Güldner C, Halangk J, Rosendahl J, Witt U, Treiber M, Nickel R, Férec C. A degradation-sensitive anionic trypsinogen (PRSS2) variant protects against chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2006, 38(6): 668-673.

Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U, Landt O, Becker M. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nature Genetics.* 2000, 25: 213-216.

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(10): 1216-1220.

Witt H, Becker M. Genetics of Chronic Pancreatitis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 2002, 34: 125-136.

Witt H, Luck W, Becker M. A Signal Peptide Cleavage Site Mutation in the Cationic Trypsinogen Gene is Strongly Associated with Chronic Pancreatitis. *Gastroenterology.* 1999, 117: 7-10.

Wittke-Thompson JK, Pluzhnikov A, Cox NJ. Rational Inferences about Departures from Hardy-Weinberg Equilibrium. *Am J Hum Genet.* 2005, 76:967–986.

Witt H, Chronic pancreatitis and cystic fibrosis. *Gut* 2003;52(Suppl II):ii31-41.

Witt H, Hennies HC, Becker M. SPINK1 Mutations in Chronic Pancreatitis. *Gastroenterology* 2001;120:1060-1

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. CFTR, SPINK1, CTSC and PRSS1 variants in chronic pancreatitis: is the role of mutated CFTR overestimated? *Gut.* 2013 Apr;62(4):582-92

Chen JM, Mercier B, Audrézet MP, Férec C. Mutational analysis of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene in hereditary and sporadic chronic pancreatitis. *J Med Genet* 2000: 37; 67-69.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>CEL</b>	Carboxylester-Lipase
<b>CELA</b>	Chymotrypsin-Like Elastase
<b>CELP</b>	Carboxylester-Lipase-Pseudogen
<b>CPA1</b>	Carboxypeptidase A1
<b>CPA2</b>	Carboxypeptidase A2
<b>CPB1</b>	Carboxypeptidase B1
<b>CTRC</b>	Chymotrypsinogen C
<b>et al.</b>	und Mitarbeiter
<b>HUS</b>	hämolytisch-urämisches Syndrom
<b>ml</b>	milliliter
<b>mM</b>	millimolar
<b>PNLIP</b>	Lipase
<b>ProCELA</b>	Pro-Chymotrypsin-Like Elastase
<b>ProCPA</b>	Procarboxypeptidase
<b>PSC</b>	primär sklerosierende Cholangitis
<b>TRPV6</b>	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 6
<b>VNTR</b>	Variable Number Tandem Repeats

Ferner wurden im Text der international gültige Einbuchstaben-Code der Aminosäuren und die Abkürzungen der Fachzeitschriften verwendet

<b>A</b>	Adenin
<b>ACP</b>	alkoholisch bedingte chronische Pankreatitis
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>C</b>	Cytosin
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>CBAVD</b>	kongenitale bilaterale Aplasie des Vas deferens
<b>CF</b>	cystische Fibrose
<b>CFTR</b>	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
<b>CP</b>	chronische Pankreatitis
<b>ddNTP</b>	Didesoxynukleotidtriphosphat
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxynukleotidtriphosphat
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>F</b>	Forward (vorwärts)
<b>g</b>	Gramm
<b>m</b>	milli = 10 <sup>-3</sup>
<b>mRNA</b>	Boten-RNA (Ribonukleinsäure)
<b>OR</b>	Odds-Ratio
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PRSS1</b>	Serinprotease 1 (kationisches Trypsinogen)
<b>PRSS2</b>	Serinprotease 2 (anionisches Trypsinogen)
<b>R</b>	Reverse (rückwärts)
<b>SPINK1</b>	Serinprotease-Inhibitor Kazal Typ 1
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>μ</b>	mikro = 10 <sup>-6</sup>
<b>μl</b>	Mikroliter

## **Danksagung**

Mein größter Dank gilt Herrn Prof Dr. med. Heiko Witt, ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Er war nicht nur der Vater des Gedankens, sondern ein steter Unterstützer und Antreiber im positivsten Sinn des Wortes. Seine Unterstützung ging weit über das normale Maß hinaus. Ohne sein stetes Engagement wäre es mir nicht möglich gewesen diese Arbeit zu einem Abschluss zu bringen. Die Dankbarkeit, die ich empfinde, lässt sich nicht mit Worten ausdrücken.

Ebenfalls möchte ich mich im Besonderen bei Frau Dr. Maren Ewers und bei allen anderen Mitarbeitern des Labors für die Einweisung in die Laboratoriumsmedizin und die konstante Unterstützung bedanken.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meiner Familie, besonders meinem Ehemann, Herr Andreas Zankl, welcher mich durch die emotionalen Hoch- und Tiefs dieser Arbeit als stets treuer Begleiter geführt hat. Ebenfalls über die Hürden der Word-Formatierung. Meine Eltern, Frau Auguste Schmid und Herr Albert Bühler, welche mich auf jede nur erdenkliche Weise in den vielen Jahren der Arbeit unterstützt haben.