

# GENETIKAI VIZSGÁLATOK KRÓNIKUS PANCREATITISBEN ÉS PANCREAS RÁKBAN

Ph.D. Tézis

Dr. Balázs Anita



I. sz. Belgyógyászati Klinika  
Általános Orvostudományi Kar  
Szegedi Tudományegyetem

2015

# **GENETIKAI VIZSGÁLATOK KRÓNIKUS PANCREATITISBEN ÉS PANCREAS RÁKBAN**

Ph.D. Tézis

**Dr. Balázs Anita**

**Témavezetők:**

**Prof. Dr. Hegyi Péter<sup>1,2</sup>**

**Prof. Dr. Sahin-Tóth Miklós<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>I. sz. Belgyógyászati Klinika  
Általános Orvostudományi Kar  
Szegedi Tudományegyetem

<sup>2</sup>MTA-SZTE Lendület Transzlációs Gasztroenterológiai Kutató Csoport

<sup>2</sup>Department of Molecular and Cell Biology  
Boston University  
Henry M. Goldman School of Dental Medicine

Szeged

2015.

# TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés.....	4
A krónikus pancreatitis genetikai rizikófaktorai .....	5
Ductális szekréciós defektus .....	5
SLC26A6 anion transzporter .....	6
Genetikai rizikófaktorok pancreas rákban .....	6
Kolecisztokinin-B receptor (CCKBR).....	6
Célok .....	7
BETEGEK ÉS MÓDSZEREK AZ SLC26A6 GENETIKAI VIZSGÁLATÁRA.....	7
Betegek és tanulmány tervezet .....	7
DNS izolálás és genotipizálás.....	8
Restriction fragmens hossz polimorfizmus .....	8
Statisztika.....	8
BETEGEK ÉS MÓDSZEREK A CCKBR VARIÁNS GENETIKAI ANALÍZISÉRE .....	8
Kohorsz leírás .....	8
DNS izolálás és genotipizálás.....	8
Expressziós plazmidok létrehozása .....	9
Lentivírus termelés .....	9
Sejtkultúra, transzfekció és virális transzdukció .....	9
RNS izolálás és reverz transzkripció .....	9
CCKBR expresszió és splicing meghatározása.....	9
Statisztika.....	10
AZ SLC26A6 TANULMÁNY EREDMÉNYEI .....	10
A CCKBR TANULMÁNY EREDMÉNYEI.....	10
Variant c.811+32C>A does not predict risk for PDAC.....	10
A c.811+32C>A variáns nincs hatással a túlélésre PDAC-ben.....	11
A c.811+32C>A variáns nincs hatással a CCKBR 4. exon splicingra.....	11
MEGBESZÉLÉS.....	11
A SLC26A6 variánsok szerepe krónikus pancreatitisben .....	11
A c.811+32C>A CCKBR génvariáns szerepe pancreas rákban .....	12
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	14

**Tézis témájához kapcsolódó publikációk:**

**I) Anita Balázs** Balázs Csaba Németh Balázs Ördög Eszter Hegyi István Hritz László Czakó József Czimmer MD, Szilárd Gódi Adrienn Csiszkó Zoltán Rakonczay Jr. Andrea Párniczky Ferenc Izbéki Adrienn Halász Zsuzsanna Kahán Péter Hegyi Miklós Sahin-Tóth "A COMMON CCK-B RECEPTOR INTRONIC VARIANT IN PANCREATIC ADENOCARCINOMA IN A HUNGARIAN COHORT"

*Pancreas* (2015 publikálásra elfogadott) **IF: 2.96**

**II.) Anita Balázs**, Claudia Ruffert, Eszter Hegyi, István Hritz, László Czakó, Tamás Takács, Zoltán Szepes, Balázs Csaba Németh, Judit Gervain, Ferenc Izbéki, Adrienn Halász, Dezső Kelemen, Richárd Szmola, János Novák, Stefan Crai, Anita Illés, Áron Vincze, Zsolt Molnár, Márta Varga, Barnabás Bod, Gyula Farkas Jr, János Sümegi, Attila Szepes, Zsolt Dubravcsik, Natália Lásztity, Andrea Párniczky, József Hamvas, Csilla Andorka, Gábor Veres, Zsolt Szentkereszty, Zoltán Rakonczay Jr, József Maléth, Miklós Sahin-Tóth, Jonas Rosendahl, Péter Hegyi "GENETIC ANALYSIS OF THE BICARBONATE SECRETING ANION EXCHANGER SLC26A6 IN CHRONIC PANCREATITIS"

*Pancreatology* (2015 publikálásra elfogadott) **IF: 2.84**

**Tézis témájához nem kapcsolódó publikációk:**

**I.) Anita Balázs**, Péter Hegyi "CYSTIC FIBROSIS-STYLE CHANGES IN THE EARLY PHASE OF PANCREATITIS"

*Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* (2015)

doi:10.1016/j.clinre.2015.05.020 **IF: 1.64**

**II.) József Maléth, Anita Balázs**, Zsolt Balla, Balázs Kui, Máté Katona, Linda Judák, István Németh, Petra Pallagi, Lajos Vince Kemény, Zoltán Rakonczay Jr, Viktória Venglovecz, Imr Földesi, Zoltán Pető, Áron Somorácz, Katalin Borka, Ditta Perdomo, Gergely Lukacs, Mike A. Gray, Sylvio Monterisi, Manuela Zaccolo, Matthias Sendler, Julia Mayerle, Jens Kühn, Markus M. Lerch, Miklós Sahin-Tóth, Péter Hegyi. "ALCOHOL DISRUPTS LEVELS AND FUNCTION OF THE CYSTIC FIBROSIS TRANSMEMBRANE CONDUCTANCE REGULATOR TO PROMOTE DEVELOPMENT OF PANCREATITIS. "

*Gastroenterology* (2014) S0016-5085(14)01336-5. **IF: 16.72**

**III.) József Maléth, Tamara Madácsy, Petra Pallagi, Anita Balázs**, Viktoria Venglovecz, Zoltán Rakonczay, Péter Hegyi "PANCREATIC EPITHELIAL FLUID BICARBONATE SECRETION IS SIGNIFICANTLY ELEVATED IN THE ABSENCE OF PERIPHERAL SEROTONIN"

*Gut* (2015) doi: 10.1136/gutjnl-2015-309776 **IF: 14.66**

**IV.) Eszter Hegyi, Andrea Geisz, Miklós Sahin-Tóth, Monique Derikx, Balázs Csaba Neméth, Anita Balázs**, Istvan Hritz, Ferenc Izbéki, Adrienn Halász, Andrea Párniczky, Tamás Takács, Dezső Kelemen, Patrícia Sarlós, Laszlo Czakó, Péter Hegyi "SPINK1 PROMOTER VARIANTS IN CHRONIC PANCREATITIS"

*Pancreas* (2015 publikálásra elfogadott) **IF: 2.96**

<b>Publikációk száma:</b>	<b>6</b>	<b>(3 első szerzős)</b>
<b>Összesített impact faktor:</b>	<b>41.78</b>	

## BEVEZETÉS

A genetikai rizikófaktorok jelentős mértékben meghatározzák a krónikus pancreatitisre (KP) és a pancreas duktális adeokarcinomára (PDAC) való hajlamot, befolyásolják a lefolyást és a prognózist. Ezen betegségek pathogenezeise rendkívül komplex, mely legtöbbször genetikai rizikófaktorok és környezeti noxák révén együttesen fejlődik ki. A betegek kis százalékában hereditér forma fordul elő, ilyenkor a kórok egy bizonyos génmutációra vezethető vissza. Napjainkig több nagy penetranciájú rizikó gén került felfedezésre örökletes pancreatitisben és örökletes hasnyálmirigy rákban, míg alacsony penetranciájú gének gyakran életmódbeli és környezeti tényezőkkel kölcsönhatásban vezetnek idiopátiás illetve sporadikus esetekhez.

Az örökletes KP-t először 1952-ben autoszóm domináns öröklésmenetű betegségként írták le. A hereditér KP-ért felelős gént, a humán kationos tripszinogént (*PRSSI*) végül 1996-ban sikerült azonosítani Whitcomb és mtsai-nak. Kandidát gén vizsgálattal több pancreatitis asszociált variánst találtak, melyek között a legjelentősebbek: a szerin proteáz inhibitor Kazal típus 1 (*SPINK1*), kimotripszin C (*CTRC*), cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (*CFTR*), karboxipeptidáz A1 (*CPA1*) és karboxil-észter lipáz (*CEL*) proteineket kódoló génekben fellelhetőek, míg teljes genomra kiterjedő asszociációs vizsgálatokkal (GWAS) több egyéb lókuszt mutatott halmozódást betegekben. Annak ellenére, hogy az utóbbi évtizedekben rengeteg új felfedezés történt a KP genetikájában, sok idiopátiás betegben nem található variáns az ismert rizikó génekben, ami felveti annak a lehetőségét, hogy eddig még nem ismert gének, génmutációk játszhatnak szerepet a pathogenezisben.

A KP bizonyított rizikó faktora a pancreas ráknak. Hereditér KP esetén ez a komplikáció különösen magas, a p.R122H mutáció hordozása a *PRSSI* génben 50 százalékra emeli az adenokarcinóma veszélyét. A KP és pancreas rák esetében leírtak közös rizikó variánsokat is, ami felveti, hogy a két betegséget nem csak azonos környezeti tényezők okozhatják, hanem közös genetikai háttérük is lehet. A PDAC esetek kb. 5%-a familiáris halmozódást mutat, melyben nagy penetranciájú rizikó gének játszanak szerepet, úgy mint: *BRCA2*, *ATM*, és *PALB2*. Az esetek fennmaradó 95%-a 'sporadikus', de ezekben a betegekben is gyanítható örökletes komponens, mely a rákra való hajlam mintegy 30%-ért lehet felelős. Ilyen variánsokat találtak pl. az AB0 vércsoport lókusztban. Napjainkig öt GWAS tanulmány készült, ahol számos alacsony penetranciájú rizikó lókuszt került felismerésre. Ennek ellenére még mindig nem ismert minden rizikóvariáns, amely a veleszületett hajlamért felelőssé tehető.

A pankreászbetegségek genetikai hátterének jobb megértéséhez még sok kérdést kell megválaszolni. A betegség asszociált génvariánsok funkcionális vizsgálata lehetőséget ad arra, hogy jobban megértsük a molekuláris pathogenezist, illetve új terápiás célpontok feltérképezését segíti elő. Szintén kihívás az, hogy jobban megértsük, mit jelentenek az egyes variációk az individuális beteg számára, és hogyan hasznosítsuk ezt a tudást a terápiás döntések meghozatalakor. Noha még gyerekcipőben jár, egyre növekszik az evidencia arra vonatkozólag, hogy az egyénre szabott terápia, melyet a beteg specifikus genetikai háttere határoz meg, a közeljövőben valósággá válik.

Ebben a tézisben a szerző áttekinti a KP és a PDAC genetikai hátterének irodalmát, melyet kutatási eredményeivel közöl, hogy ezzel a pancreas betegségek mélyebb megértését segítse elő.

### **A krónikus pancreatitis genetikai rizikófaktorai**

A KP a hasnyálmirigy irreverzibilis, progresszív gyulladással megbetegedése, melyet morfológiai elváltozások, exokrin és/vagy endokrin funkciózavar, illetve hasi fájdalom jellemez. A KP legtöbbször túlzott alkoholfogyasztás következtében alakul ki, de egyéb tényezők, úgy, mint dohányzás, metabolikus zavarok, anatómiai eltérések, autoimmun betegség és génmutációk is szerepet játszanak. Mintegy 30 százalékban azonban a kórokra nem derül fény, ilyenkor idiopátiás etiológia a diagnózis. A betegség manifesztációja attól függ, hogy különböző exogén és endogén faktorok milyen mértékben vannak jelen. Tény, hogy az alkoholisták mintegy 95%-a nem kap KP-t, ami feltételezi egyéb jelen lévő rizikófaktorok jelenlétét, melyet magyarázhat, hogy alkoholos KP betegekben leírtak asszociációt *SPINK1*, *CTRC*, és *CFTR* variánsokkal. Idiopátiás betegekben a genetikai rizikó jóval magasabb. Nagyobb populáción végzett átfogó szűrések kimutatták, hogy az idiopátiás KP betegek 30-50%-a hordoz egy vagy több mutációt az ismert rizikógénekben. Hereditár pancreatitisben a *PRSSI* gén mutációi a kóroki tényezők. A KP asszociált mutációk mechanizmusa alapvetően háromféle lehet: tripszinogén idő előtti aktivációját okozhatja, endoplazmás reticulum stresszt válthat ki, illetve duktális szekréciós defektushoz vezethet.

#### **Duktális szekréciós defektus**

A pancreas duktális epithelium fő funkciója a  $\text{HCO}_3^-$  szekréció, mely a szöveti integritás megtartásához elengedhetetlen. KP-ben ez a funkció sérül, pathológiássá válik az acinus és duktális sejtek közötti interakció, melynek következtében csökken a lumenális pH, idő előtti tripszinogén aktiváció indul be, gátlódik az acináris szekréció, a kialakuló protein dugók

eltömeszelik a lument, mely végül a szöveti parenchyma roncsolódásához vezet. A *CFTR* klorid csatorna génmutációi bizonyított rizikó faktorai a KP-nek. Heterozigóta formában a cisztás fibrózist (CF) okozó ‘súlyos’ mutációk 2,9X az ‘enyhe’ mutációk 4,5X rizikó fokozódást jelentenek.

### **SLC26A6 anion transzporter**

A pancreas bikarbonát szekréciója főként a *CFTR* klorid csatorna és az *SLC26* anion transzporterek összehangolt működésén alapul, melyek a ductális epithél apikális membránján találhatóak. Korábbi tanulmányok egy direct molekuláris interakciót írtak le a *CFTR* és két *SLC26* transzporter, az *SLC26 A6* és *A3* között, mely a transzporter és csatorna kölcsönös aktiválását okozza. Megfigyelték azt is, hogy olyan CF-okozó *CFTR* mutációk, melyek a klorid konduktanciát nem befolyásolják, jelentősen csökkentik a *CFTR*-dependens bikarbonát szekréciót. Ez azt mutatja, hogy a kapcsolt bikarbonát szekréció gátolt működése önmagában elegendő KP kialakulásához, még normál szintű klorid konduktancia mellett is. Az *SLC26A6* transzporter működése és lokalizációja alapján kijelenthető, hogy a bikarbonát szekréció egyik főszereplője a pancreasban.

### **Genetikai rizikófaktorok pancreas rákban**

A pancreas adenokarcinoma egy genetikai megbetegedés, melyet örökletes és szerzett mutációk okoznak. Jelenleg nem áll rendelkezésre megfelelő szűrőstratégia és a betegség általában már előrehaladott stádiumban kerül felismerésre. Bizonyított rizikófaktorai: dohányzás, KP, cukorbetegség és obesitas. A KP és a PDAC több közös genetikai és környezeti rizikófaktorral bír, úgy, mint pl. dohányzás és túlzott alkoholfogyasztás.

A karcinóma-asszociált gének működésének megértése fontos előrelépést jelent, mely fényt derít a molekuláris pathogenezisre, hogyan alakul ki invazív carcinoma a normál ductális sejtből, ami a terápiás és prevenciós stratégiák kidolgozásához elengedhetetlen.

### **Kolecisztokinin-B receptor (CCKBR)**

A gasztrin/CCK-B receptor egy G-protein kapcsolt fehérje, mely fiziológiásan kifejeződik a human pancreasban. Amikor a gasztrin beköt a receptoron, több szignalizációs útvonal aktiválódik, melynek eredményeképpen trofikus válasz és sejtproliferáció jön létre. Számos tanulmány kimutatta, hogy a CCKBR szerepet játszik a karcinogenezisben és a tumor progresszióban. Egy alternatív splicing miatt kialakult izoformát több tumortípusban, köztük

pancreas rákban is leírtak. Ez a 4. intron retenciója miatt kialakult izoforma, melyet CCK-BRi4sv vagy CCK-C receptornak neveznek, konstitutív, avagy agonista independens aktivációt mutatott. Smith és mtsai egy leírtak egy pancreas rák-asszociált missense mutációt a *CCKBR* génben, melyet azelőtt nem mutata ki GWAS tanulmányokban. Egy kisebb kohorszban (51 beteg és 39 kontroll) kimutatták, hogy a c.811+32C>A variáns (rs1800843), mely a 4. intronban található megnöveli a pancreas rák rizikóját és a betegek, akik hordozták a mutációt rövidebb túlélést mutattak. Immunhisztokémia segítségével kimutatták, hogy ez a variáns a CCK-BRi4sv receptor protein kifejeződését idukálta.

## CÉLOK

I. Az SLC26A6 anion cserélő lokalizációja és funkciója alapján fontos szereplője a pancreas duktális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréciónak, de genetikai variációinak lehetséges szerepét eddig még nem vizsgálták. Ezért célul tűztük ki ennek vizsgálatát krónikus pancreatitisben.

**Specifikus célok:** ebben a tanulmányban célunk volt, hogy megszekvenáljuk az *SLC26A6* gén teljes kódoló régióját 100 nem-alkoholos KP betegben. A talált mutációkat célunk volt tovább vizsgálni Magyar és német populációkban.

II. Mindössze néhány ismert rizikófaktor létezik pancreas adenokarcinómában és szükség van a molekuláris pathogenezis jobb megértésére. Ezért célul tűztük ki a *CCKBR* variáns c.811+32C>A vizsgálatát.

**Specifikus célok:** ebben a tanulmányban 3 célunk volt: (1) megismételjük a korábbi asszociációs vizsgálatot a c.811+32C>A variáns és a pancreas rák rizikója között egy független populációban (2) megvizsgáljuk a variáns hatását a túlélésre és (3) hogy funkcionális vizsgálattal igazoljuk a variáns hatását a pre-mRNA splicingra.

## BETEGEK ÉS MÓDSZEREK AZ SLC26A6 GENETIKAI VIZSGÁLATÁRA

### Betegek és tanulmány tervezet

Az összes résztvevő tájékozott beleegyezését adta a genetikai analízisre. KP betegeket vontunk be Magyarországról (n = 106) és Németországból (n = 361). Etiológia szerint a



betegek alkoholos és nem-alkoholos csoportra oszlottak. Alkoholos etiológia volt megállapítható, ha a fogyasztás meghaladta a 80g/napot férfi esetén és 60g/napot nő esetén legalább két évig. 99 magyar és 171 német kontroll került bevonásra magukat egészségesnek tartó felnőttekből.

### **DNS izolálás és genotipizálás**

Genomiális DNSt izoláltunk teljes vérből. Egy kezdeti felfedező kohorszként 60 magyar nem-alkoholos KP beteget kiválasztottunk és a teljes kódoló régiót megszekvenáltuk. A primereket a human *SLC26A6* gén publikált szekvenciája alapján terveztük (GenBank: [NM\\_022911.2](#)). A PCR reakció 30 µl végtérfogatban történt, mely 0.5 U HotStarTaq DNA Polimeráz enzimet, 1.5 mM Mg<sub>2</sub>Cl, 0.2 mM dNTP, 0.5 µM primert tartalmazott 10-50 ng genomiális DNS hozzáadásával.

### **Restriction fragmens hossz polimorfizmus**

A p.V206M és a c.1191C>A (p.P397=) variánsok vizsgálata a Magyar kohortban RFLP analízissel történt. A PCR reakció a 7 és 16 primer párokkal történt. A termékek emésztése *NlaIII* és *BmrI* restrikciós enzimekkel történt.

### **Statisztika**

A kvantitatív változókat mint átlag ± SD írtuk le. Az allélfrekvenciák közti különbség szignifikanciáját Fisher tesztelhatároztuk meg, p-értékeket, esélyhányadosokat GraphPad Prism v6.0a szoftver segítségével számoltuk.

## **BETEGEK ÉS MÓDSZEREK A CCKBR VARIÁNS GENETIKAI ANALÍZISÉRE**

### **Kohorsz leírás**

Az összes résztvevő tájékozott beleegyezését adta a genetikai analízisre. 122 PDAC beteget vontunk be a Magyar Hasnyálmirigy Munkacsoport Anyagából. Minden betegre vonatkozólag adatgyűjtés történt nemre, korra, diagnosis időpontjára, utolsó ellenőrzés/exit időpontjára vonatkozólag. Kontrollként 106 egészséges önkéntest vontunk be.

### **DNS izolálás és genotipizálás**

300 µl EDTA-vérből izoláltunk genomiális DNS-t. A primereket a human *CCKBR* gén publikált szekvenciája alapján terveztük (GenBank NC\_000011.10). A PCR reakció 30 µl

végtérfogatban történt, mely 0.5 U HotStarTaq DNA Polimeráz enzimet, 1.5 mM Mg<sub>2</sub>Cl, 0.2 mM dNTP, 0.5 µM primert tartalmazott 10-50 ng genomiális DNS hozzáadásával.

### **Expressziós plazmidok létrehozása**

*CCKBR* minigéneket terveztünk, mely a kódoló DNS szakaszban tartalmazta a 4. intront. A *CCKBR* kódoló DNS-t (GenBank NM\_176875.3) megszingetizáltattuk és pcDNA3.1(-) plazmidba klónoztuk a XhoI és EcoRI restriktációs helyek segítségével. Ahhoz, hogy a *CCKBR* minigéneket létrehozzuk, az 584 bp hosszú 4. intronnak megfelelő inszertet klónoztuk a pcDNA3.1(-) *CCKBR* plazmidba a BsrGI és a BamHI restriktációs helyeket használva.

### **Lentivírus termelés**

A pWPI lentivírus vektor plazmid és a csomagoló plazmidok (psPAX2 és pMD2.G) a Didier Trono's laboratóriumából szereztük be. Először a *CCKB* minigén templátokat PCR-rel amplifikáltuk. *CCKBR* minigén inszertek ezután szublónoztuk a pWPI plazmidba a PmeI és a PacI restriktációs helyek között. The lentivirus termelés HEK 293T sejtekben történt, korábban leírt módszerrel. A vírus preparátumok titere HEK 293T sejteken let meghatározva.

### **Sejtkultúra, transzfekció és virális transzdukció**

HEK 293T sejteket transzfektáltunk 2 µg plasmid DNS és 10 µL Lipofectamine 2000 segítségével 2 ml Opti-MEM médiumban. 4 órával a transzfekció után médiumcsere történt 2 ml DMEM-mel. A sejtek 24 órával a médiumcsere után lettek begyűjtve. Capan-1 pancreas karcinóma sejtek a titrált víruspreparátummal 4 MOI értékben lettek transzdukálva.

### **RNS izolálás és reverz transzkripció**

A transzfektált sejtekből teljes RNS-t izoláltunk RNase-Free DNase jelenlétében. 2 µg RNS-t írtunk át cDNS-sé reverz transzkriptáz segítségével RNase inhibitor jelenlétében.

### ***CCKBR* expresszió és splicing meghatározása**

Real-time PCR reakciókhoz Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) használtunk ABI PRISM 7000 Sequence Detection System platform segítségével. Relatív expressziók vizsgálata a komparatív CT módszerrel történt ( $\Delta\Delta CT$  method). A splice variáns relatív expressziója két különböző primerpár segítségével történt, az egyik az összes *CCKBR* receptor termékre specifikus, a másik pár csak a missplice variánsra (*CCKB-Ri4sv*) volt specifikus. A *CCK-BRi4sv* expresszió abszolút kvantifikáláshoz külső kalibrációs görbéket készítettünk a minigén plasmid templátok segítségével. Az abszolút kópiaszámok

meghatározásával az eredmények a missplice-olt receptor az összes CCKBR receptor százalékában lett kifejezve.

### **Statisztika**

A kvantitatív változókat mint átlag  $\pm$  SD írtuk le. Az allélfrekvenciák közti különbség szignifikanciáját Fisher tesztelhatároztuk meg. Kétoldalú log rank tesztet használtunk a túlélések összevetésére a betegek között, akik hordozták a mutációt (A/A vagy A/C genotípus) illetve a vad típusú C/C genotípus. A számítások GraphPad Prism szoftver segítségével történtek.

## **AZ SL26A6 TANULMÁNY EREDMÉNYEI**

A Magyar felfedező kohorszban 55 felnőtt és 5 gyermek idiopátiás KP betegnél a teljes kódoló régiót megszekvenáltuk. 4 gyakori variánst találtunk: egy missense variánst c.616G>A (p.V206M; *rs13324142*) a 6. exonban és három intronikus variánst: c.23+71\_103del az 1. intronban (*rs72201074*); c.183-4C>A a 2. intronban (*rs34368826*); és c.1134+32C>A a 9. intronban (*rs3821876*) teljes kapcsoltságban, jelezve, hogy ez egy konzervált haplotípus. Ezután meghatároztuk a p.V206M asszociált haplotípus gyakoriságát a Magyar kohorszban: 46 alkoholos KP beteg és 99 kontroll esetében. Mikor a genotípus frekvenciákat összehasonlítottuk, nem találtunk eltérést a p.V206M variáns eloszlásában a betegek és kontrollok között. Ezt a tanulmányt egy német replikációs kohorszban is megismételtük, ahol 202 nem-alkoholos KP beteget és 159 alkoholos beteget és 171 kontrollt vontunk be. 40 nem-alkoholos betegnél a teljes kódoló részt megszekvenáltuk, ahol a p.V206M asszociált haplotípust 5 betegnél találtuk meg (3 heterozigóta 2 homozigóta eset). A magyar kohorshoz hasonlóan a német kohorszban sem mutatott a p.V206M variáns szignifikáns mértékű különbséget betegekben és kontrollokban.

## **A CCKBR TANULMÁNY EREDMÉNYEI**

### **Variant c.811+32C>A does not predict risk for PDAC**

Először a korábban már publikált asszociációs vizsgálatot kíséreltük megismételni a CCKBR 4. intronjában található génvariáns c.811+32C>A és a pancreas rák között. Ehhez megszekvenáltattuk ezt a régiót a magyar kohortunkban, ahol a c.811+32C>A variánst 35

heterozigóta és 5 homozigóta betegnél (allél frekvencia 18.4%), és 32 heterozigóta és 3 homozigóta kontrollnál (allél frekvencia 17.9%) észleltük.

### **A c.811+32C>A variáns nincs hatással a túlélésre PDAC-ben**

Ahhoz, hogy meghatározzuk a variáns prognózisra gyakorolt hatását, megvizsgáltuk a genotípus szerinti túlélést. Az átlagos túlélés A/C és A/A genotípussal nem volt szignifikánsan különböző az átlagos túléléstől CC genotípussal (257 nap és 266 nap;  $p=0.45$ ). Ez azt jelzi, hogy a c.811+32C>A variáns nincs hatással a túlélésre PDAC betegekben.

### **A c.811+32C>A variáns nincs hatással a CCKBR 4. exon splicingra**

Ahhoz, hogy meghatározzuk a c.811+32C>A variáns hatását a pre-mRNS splicingra, expressziós vektorokkal transzfektáltunk HEK 293T sejteket, és kvantitatív PCR segítségével megvizsgáltuk az missplicing-olt variáns kifejeződését. Azt találtuk, hogy az intronretenciós *CCK-BRi4sv* izoforma átíródása 10%-a volt az összes *CCKBR* mRNS-ének és nem befolyásolta a c.811+32C>A variáns jelenléte ennek az átíródását. Mivel carcinoma sejtekben különböző splice faktorok lehetnek jelen a sejtben, ezért Capan-1 pancreas duktális carcinoma sejt vonalat is transzdukáltunk *CCKBR* minigénekkel lentivírus vector segítségével. Hasonlóan a HEK 293T sejtekben tapasztaltakhoz, a c.811+32C>A variáns jelenléte nem befolyásolta a splicingot.

## **MEGBESZÉLÉS**

### **A SLC26A6 variánsok szerepe krónikus pancreatitisben**

A pancreas duktális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréció esszenciális a szöveti integritás fenntartásához, és ez a funkció károsodott KP-ben. Ebben a tanulmányban megvizsgáltuk az *SLC26A6* anion transzporter gén variációinak KP-szel való asszociációját, mivel a transzporten fontos szerepet játszik a bikarbonát szekrécióban. Ennek ellenére nem találtunk olyan variánst, mely szignifikáns mértékben mutatott volna halmozódást alkoholos vagy idiopátiás KP-ben.

Natív, szövetből izolált duktuszokon végzett tanulmányok nem adtak egységes képet arra vonatkozólag, hogy a transzporter hiánya *Slc26a6*<sup>-/-</sup> génkiütött egerekben mit okoz. Másrészt az *Slc26a6*<sup>-/-</sup> KO egerekben vesekövesség fordul elő, mivel az intesztinális és renális oxalát transzport zavart szenved. *SLC26A6* variánsokat szűrtek veseköves betegekben, de nem találtak asszociációt a betegséggel. Funkcionális analízissel megvizsgálták a p.V206M mutációt *Xenopus* oocita expressziós rendszerben és azt találták, hogy 30%-ban csökkent az

oxalát transzport aktivitás a mutáció hatására. Valószínűleg heterozigóta formában ez a variáns nem okozna jelentős mértékű (mindössz 15%-os) transzport zavart, mely nem lenne elegendő kőképződéshez. Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy teszteltük azt a hipotézisünket, hogy a pancreas anion transzportert kódoló *SLC26A6* génben található variánsok rizikó faktorai lehetnek a KP-nek, viszont nem találtunk olyan variánst, mely asszociációt mutatott volna a betegséggel.

### **A c.811+32C>A *CCKBR* génvariáns szerepe pancreas rákban**

A genetikai rizikófaktorok megismerése pancreas rákban rendkívül fontos, mivel elősegíti a magas kockázatú betegek felismerését, akiknél szervezett szűréssel korai diagnózist lehetne elérni. A karcinogenezisben és a tumor növekedésben betöltött szerepe alapján a kolecisztokinin-B receptort kódoló *CCKBR* gén ígéretes jelöltnek mutatkozott. Szomatikus mutációit, melyek megváltoztatatták a receptor aktivitását, lokalizációját, több kolorektális és gasztrikus tumorról hozták már összefüggésbe. Ezen mutációk a receptor harmadik intracelluláris hurkán találhatóak, mely régió a szignál transzdukcióban játszik fontos szerepet. Ugyanez a hurok változik meg a *BRi4sv* splice variáns esetében is. A 4. intron retenciója egy 69 aminosav hosszú peptidlánc beékelődését idézi elő, mely megnöveli a receptor aktivitását. Az aberráns splicing molekuláris alapját bizonyos splice faktorok carcinoma sejtekben való eltérő kifejeződésével magyarázták. Smith és mtsai azt feltételezték (2012, 2014), hogy a c.811+32C>A intronikus variáns okozhatja a splice variáns kifejeződését, ezáltal fokozva a PDAC rizikóját és csökkentve a prognózist. Ezzel szemben mi tanulmányunkban azt tapasztaltuk, hogy a c.811+32C>A variáns nincs hatással a *CCKBR* mRNS splicingra, és nem asszociált fokozott rizikóval, sem rosszabb prognózissal pancreas rákban. Annak ellenére, hogy a tanulmányt nem arra terveztük, hogy potenciálisan kis effektust is ki lehessen mutatni, az eredmények egy irányba mutatva arra engednek következtetni, hogy a c.811+32C>A variánst funkcionálisan ártalmatlan, nem-pathogén polimorfizmusként kell kezelni. Végezetül ez a tanulmány kiemeli a genetikai eredmények replikációinak és funkcionális vizsgálatának fontosságát.

## ÖSSZEFOGLALÁS

**Bevezetés:** A genetikai rizikófaktorok jelentős mértékben meghatározzák a krónikus pancreatitisre (KP) és a pancreas duktális adeokarcinomára (PDAC) való hajlamot. Ezen betegségek pathogenezisének jobb megértéséhez a tézis két genetikai vizsgálatot mutat be:

**I.** A pancreas duktális  $\text{HCO}_3^-$  szekréció a cisztás fibrózis konduktancia regulátor (CFTR) klorid csatorna és az SLC26A6 anion transzporter működésétől függ. A *CFTR* gén mutációi bizonyított rizikófaktorai a betegségnek, viszont az SLC26A6 transzporter variánsainak szerepe KP-ben eddig még nem ismert.

**II.** Korábban leírtak a kolecisztokinin-B receptor (*CCKBR*) gén 4. intronjában egy nukleotid polimorfizmust (c.811+32C>A), mely fokozta a PDAC rizikóját és csökkentette a túlélést. Feltételezték, hogy a mutáció indukálja a 4. intron retencióját, mely fokozza a receptor aktivitását. Célunk volt, hogy a c.811+32C>A variánst, mint biomarkert, validáljuk.

**Betegek és módszerek I.** 106 magyar KP beteget és 99 kontrollt vontunk be. 60 nem-alkoholos KP betegnél a kódoló régiót megszekvenáltuk. A magyar kohortban a c.616G>A (p.V206M) variánst és a c.1191C>A (p.P397=) variánst RFLP analízissel vizsgáltuk. A német kohorszban 40 nem-alkoholos KP betegnél a kódoló régiót megszekvenáltuk, majd a c.616G>A (p.V206M) variánst tovább genotipizáltuk 321 KP betegben és 171 kontrollban.

**Betegek és módszerek II.** A c.811+32C>A variánst genotipizáltuk 122 PDAC betegben és 106 kontrollban és megvizsgáltuk a PDAC-val való asszociációt és a túlélésre gyakorolt hatást. A variáns hatását a splicingra *CCKBR* minigén vektorokkal transzfektált sejtvonalakon vizsgáltuk.

**Eredmények I.** A kódoló régió szekvenáltatásakor 4 gyakori variánst találtunk: intronikus variánsokat c.23+78\_110del, c.183-4C>A, c.1134+32C>A, és egy missense variánst c.616G>A (p.V206M) melyek teljes kapcsoltságban öröklődtek, mint konzervált haplotípus. A haplotípus eloszlása nem mutatott szignifikáns különbséget betegek és kontrollok között.

**Eredmények II.** A c.811+32C>A variáns allélfrekvenciája közel azonos volt betegek és kontrollok között (17.9% és 18.4%). A túlélést vizsgálva nem volt különbség a variánst hordozó (257 nap) és vad típusú (266 nap) betegek között. Variáns és vad típusú *CCKBR* minigének kifejeződése között nem volt különbség.

**Megbeszélés I.** Eredményeink azt mutatják, hogy az *SLC26A6* variánsok nem befolyásolják a KP kialakulásának rizikóját.

**Megbeszélés II:** Ezek az adatok azt mutatják hogy a *CCKBR* génben található c.811+32C>A variáns nem befolyásolja a pancreas rák rizikóját és a túlélésre sincs hatással.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni mentoraimnak Prof. Hegyi Péternek és Prof. Sahin-Tóth Miklósnak, akik kiváló kutatóként és témavezetőként példaképül szolgáltak.

Szeretném megköszönni Dr. Venglovecz Viktoriának és Prof. Dr. Rakonczay Zoltánnak, a Sejtélettani Kutató Laboratórium témavezetőinek a munkám során nyújtott segítségüket. Hálás vagyok Prof. Dr. Ábrahám Györgynek és Prof. Dr. Wittmann Tibornak, az I. sz. Belgyógyászati Klinika jelenlegi és leköszönt intézetvezetőinek, hogy biztosították az intézeti háttérrel kutatásaimhoz.

Hálás vagyok munkatársaimnak és barátaimnak: Dr. Hegyi Eszternek, Dr. Kui Balázsnak, Dr. Maléth Józsefnek, Dr. Németh Balázsnak, Dr. Pallagi Petrának, Madácsy Tamarának, Balla Zsoltnak, Kunstár Évának, Dr. Geisz Andreának, Dr. Schnúr Andreának, Dr. Laczkó Dorottyanak, Dr. Kormányos Eszternek, Katona Máténak és Dr. Végh Eszternek segítségükért, biztatásukért és jó hangulatban eltöltött munkaórákért. Ez a munka nem készülhetett volna el Pritz Tünde, Fritz Rea, Árva Miklósné, Fuksz Zoltánné, Magyarné Pálfi Edit, Ignáth Imre és Szentesi Andrea asszisztensi segítségével nélkül.

Szeretném elismerni kiváló kollaborátorunk Prof. Jonas Rosendahl és munkacsoportja segítségét a Lipcsei Egyetemről.

Köszönjük az anyagi támogatást a következő forrásoknak: Magyar Nemzeti Fejlesztési Hivatal pályázatai (TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0052, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0073), az Országos Tudományos Kutatási Alapprogram (OTKA NF105758, NF100677, K101521, K109756, PD105948), A Magyar Tudományos Akadémia (BO/00531/11/5, BO/00632/14/5), TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 and TÁMOP-4.2.4.A2- 710-SZJÖ-TOK-13-0017 'Nemzeti Kiválóság Program' és az MTA-SZTE Lendület Grant (LP2014-10/2014), a Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) grants RO 3929/1-1 & RO 3939/2-1 (to J.R.), és a the Colora Stiftung gGmbH (J.R.). Funkcionális tanulmányok MST laboratóriumában az NIH pályázatokból R01DK058088, R01DK082412, és R01DK095753 kaptak finanszírozást.