

# **Az elasztázok szerepe a hasnyálmirigy betegségeiben**

PhD Tézis

Dr. Tóth Anna Zsófia

Témavezetők:

Prof. Dr. Hegyi Péter

Prof. Dr. Sahin-Tóth Miklós



Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Szeged

2018.

# Tartalom

Tartalom .....	1
1 Rövidítések .....	2
2 Bevezetés .....	4
2.1 Exokrin pankreász elégtelenség .....	4
2.2 Pankreász elasztázok .....	4
2.3 Az elasztázok kimutatásán alapuló hasnyálmirigy funkciós tesztek .....	5
2.4 Az elasztázok lehetséges szerepe a krónikus pankreatitiszben .....	5
3 Célkitűzések .....	6
3.1 Az elasztázok kimutatását vizsgáló tanulmány .....	6
3.2 A komplexképződést befolyásoló elasztáz variánsok genetikai vizsgálata .....	6
4 Módszerek .....	6
4.1 Rekombináns humán pankreász enzimek előállítása .....	6
4.2 Az expresszált elasztázok aktivitás mérése és gélelektroforézise .....	7
4.3 ELISA kísérletek a ScheBo Pancreatic Elastase 1 teszttel .....	7
4.4 Genetikai vizsgálat .....	7
4.4.1 Vizsgálati alanyok .....	7
4.4.2 DNS szekvenálás Sanger-módszerrel .....	7
5 Eredmények .....	7
5.1 Elasztázok detekciója .....	7
5.1.1 A ScheBo Pancreatic Elastase 1 székletteszt csak a CELA3A és CELA3B elasztáz izoformákat detektálta .....	7
5.1.2 A zimogén, aktív elasztáz és autolitikus elasztáz formákat a teszt ugyanúgy detektálta, mint a vad típust. A CELA3B esetében a detekciós jel négyszer nagyobb a CELA3A enzimhez képest .....	8
5.1.3 CELA3A és CELA3B genetikai variánsok hatása a klinikai tesztre .....	8
5.1.4 A CELA3B fehérjelánc 154. pozícióban szereplő glutaminsavnak fontos szerepe van a CELA3B izoforma kimutatásban .....	8
5.1.5 Lizin 154. és a közeli Arginin 179. mutáció javították a CELA3A enzim detekcióját .....	9
5.2 Genetikai vizsgálat .....	9
5.2.1 A humán CELA3A és CELA3B DNS szekvencia analízise (7. exon) .....	9
5.2.2 A misszensz mutációk és a génkonverzió funkcionális analízise .....	10
6 Diskusszió .....	10
6.1 Az elasztázok kimutatását vizsgáló tanulmány .....	10
6.2 Genetikai vizsgálat .....	11
7 Összefoglalás és új eredmények .....	12
8 Köszönetnyilvánítás .....	13
9 Anyagi források .....	14

## 1 Rövidítések

A: adenin  
ACP: alkoholos krónikus pankreatitisz  
C: citozin  
CELA: kimotripszinszerű elasztáz  
CFTR: cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor  
CI: konfidencia intervallum  
CO<sub>2</sub>: szén-dioxid  
CP: krónikus pankreatitisz  
CPA1: karboxipeptidáz A1  
CTRB: kimotripszin B  
CT: computer tomográfia  
CTRC: kimotripszin C  
CTRL1: kimotripszinszerű proteáz  
DNS: dezoxiribonukleinsav  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
ELISA: enzimmel kötött immunszorbens módszer  
ERCP: endoszkópos retrográd kolangiopankreatográfia  
G: guanin  
HCl: hidroklorosav  
ICP: idiopátiás krónikus pankreatitisz  
MRCP: mágneses rezonancia kolangiopankreatográfia  
min: perc  
NHLBI: National Heart, Lung, and Blood Institute (USA)  
OR: esélyhányados  
PCR: polimeráz láncreakció  
PNGase f: Peptide:N-glycosidase F  
PRSS1: szerin proteáz 1, kationos tripszinogén  
SPINK: szerin proteáz inhibitor- Kazal type 1  
SDS: nátrium-dodecil-szulfát  
T: timin  
UV: ultraviola  
9 His: 9-hisztidin

**A tézis témájához tartozó közlemények:**

Detection of human elastase isoforms by the ScheBo pancreatic elastase 1 test

**Tóth Anna Zsófia**, Szabó András, Hegyi Eszter, Hegyi Péter, Sahin-Tóth Miklós

American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 2017. March **IF:3,4**

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.

Párniczky Andrea, Hegyi Eszter, **Tóth Anna Zsófia**, Szücs Ákos, Szentesi Andrea, Vincze Áron, Izbéki Ferenc, Németh Balázs Csaba, Hegyi Péter, Sahin-Tóth Miklós

International Journal of Molecular Sciencis. 2016. December **IF: 3,2**

**A tézis témájához kevésbé szorosan kapcsolódó közlemények:**

Pain in the Early Phase of Pediatric Pancreatitis (PINEAPPLE Trial): Pre-Study Protocol of a Multinational Prospective Clinical Trial.

Zsoldos Fanni, Párniczky Andrea, Mosztbacher Dóra, **Tóth Anna Zsófia**, Lásztity Natália, Hegyi Péter; Hungarian Pancreatic Study Group and the International Association of Pancreatology.

Digestion. 2016. December **IF: 2,088**

Analysis of Pediatric Pancreatitis (APPLE Trial): Pre-Study Protocol of a Multinational Prospective Clinical Trial.

Párniczky Andrea, Mosztbacher Dóra, Zsoldos Fanni, **Tóth Anna Zsófia**, Lásztity Natália, Hegyi Péter; Hungarian Pancreatic Study Group and the International Association of Pancreatology.

Digestion. 2016 November **IF: 2,088**

<b>Összes közlemény: 4 db (első szerző 1 db)</b>
--

<b>Összesített impakt faktor: 10,76</b>
---

## **2 Bevezetés**

### **2.1 Exokrin pankreász elégtelenség**

Bizonyos hasnyálmirigybetegek a hasnyálmirigyenзимek termelődésének csökkenéséhez vezetnek, emésztési-, felszívódási zavarokat okozva. Felnőtt korban leggyakrabban krónikus hasnyálmirigygyulladás, pankreászrák és pankreász rezekció utáni állapotok okozhatnak exokrin pankreász elégtelenséget. Gyermekkorban a cisztás fibrózis, a súlyos protein-energia hiányt okozó betegségek okoznak hasnyálmirigy elégtelenséget. Egyéb ritka megbetegedések, szindrómák is szerepelhetnek kóroki tényezőként (Swachmann-Diamond szindróma, Johanson-Blizzard szindróma, veleszületett tripszinogén-, enteropeptidáz-, alfa-lantitripszin-, amiláz és lipáz enzimhiányok). Az exokrin pankreász elégtelenség fő tünete a hasi fájdalom, hasi diszkomfortérzés, fogyás, puffadás, hasmenés, zsírszékelés és a felszívódási zavarok következtében kialakult hiányállapotok lehetnek. A tünetek viszonylag későn jelennek meg, például a zsírszékelés kialakulásakor már a mirigyszövet 80-90%-a károsodott. A pankreász elégtelenség megítélésére és diagnosztikájára többféle laboratóriumi módszert dolgoztak ki, melyek közül az egyik legelterjedtebb a pankreász elasztáz enzim kimutatása a székletből.

### **2.2 Pankreász elasztázok**

A kimotripszinszerű pankreász elasztázok (CELA enzimek) a szerin proteázok családjába tartoznak. A kationos jellegű CELA1 enzim a negatív töltésű elasztin rostokhoz kötődik és az alanin-alanin-, alanin-glicin aminosavak közötti peptidkötéseket képes elhasítani. A humán CELA1 gén elméletileg funkcióképes lenne, de a CELA1 enzim nem fejeződik ki a pankreásshözvetben az evolúció során a gén promóter és enhanszer régiójában kialakult mutációk miatt. A CELA2 enzimeket is az elasztin bontó képességük alapján azonosították, azonban a CELA2 enzimek a szubsztrát specifitásuk alapján nem a CELA1 enzimre, hanem a kimotripszin enzimekre hasonlítanak, aromás (tirozin, fenilalanin) és alifás (leucin, metionin) aminosavak után hasítják el a peptidkötéseket. A humán pankreászban az evolúció során a CELA2 gén duplikálódott, CELA2A és CELA2B fehérjét kódoló gének alakultak ki. Messenger RNS szinten mind a két géntermék kimutatható, de csak a CELA2A fehérje működik emésztőenzimként, a pankreáshözvetben található proteinek kb. 10%-át adja. A CELA2B enzim kifejeződik a humán pankreászban, de inaktíváló mutációk miatt a fehérjének nincsen emésztőenzim funkciója. A CELA3 izoformák a legvitatottabbak a hasnyálmirigy elasztázok csoportjában. A CELA2 génekhez hasonlóan a CELA3 izoforma is duplikált formában található meg a humán pankreászban, ezáltal 2 „rokon” fehérje, a CELA3A és CELA3B enzimek termelődnek. Mindkét CELA3 izoforma szubsztrát specifitása a CELA1 fehérjéhez hasonló (alifás láncokat hasítják P1 pozícióban). A CELA3B fehérje megfelel a korábban proteáz E, elasztáz 1, koleszterin-kötő pankreász

fehérjének. A CELA3B enzim a pankréásznedvben található proteinek 4-6%-a. A CELA3B az intesztinális tranzit során nem degradálódik, a fehérje a székletből kimutatható; ez a tulajdonsága, amely alapján használni lehet a pankréász funkció megítélésére a klinikai diagnosztikus tesztekben.

### **2.3 Az elasztázok kimutatásán alapuló hasnyálmirigy funkciók tesztek**

A hasnyálmirigyfunkció meghatározására használt széklet elasztáz kimutatás egy relatív egyszerű, praktikus és megbízható klinikumban elterjedt vizsgálómódszer. Az első „szendvics-ELISA” módszeren alapuló diagnosztikus tesztet Sziegoleit munkacsoportja fejlesztette ki 1989-ben. A kereskedelmi forgalomban kétféle típusú klinikai teszt terjedt el, az egyik a „Schebo Pancreatic Elastase-1” teszt, mely monoklonális ellenanyag módszeren-, a másik teszt a „BioServ Diagnostics Elastase-1” teszt, ami poliklonális ellenanyag módszeren alapul. Mindkét teszt egyformán megbízható, hasonló specificitással és szenzitivitással képesek kimutatni a normális pankréász funkciót és a közepesen súlyos-, súlyos exokrin hasnyálmirigy elégtelenséget. Annak ellenére, hogy a ScheBo Biotech által kifejlesztett diagnosztikus teszt széles körben elterjedt (főként Németországban és az Egyesült Államokban), nem egyértelmű, hogy a CELA3B enzimen kívül más pankreasz elasztázok és más pankréász proteázok (tripszin, kimotripszinek) módosíthatják-e a teszt eredményét. A CELA3 fehérjevariánsok teszteredményt befolyásoló hatása sem volt tisztázott.

### **2.4 Az elasztázok lehetséges szerepe a krónikus pankreatitiszben**

Exokrin hasnyálmirigy elégtelenség gyakran alakul ki krónikus pankreatitisz miatt. A krónikus pankreatitisz a hasnyálmirigy progreddáló, gyulladásos megbetegedése, több esetben genetikai tényezők is hozzájárulnak a betegség kialakulásához. A leginkább karakterizált rizikófaktor a PRSS1 (kationos tripszinogén), SPINK1 (szerin proteáz inhibitor), CTRC (kimotripszin C) géneket érintő mutációk jelentik. A karboxipeptidáz A fehérjét kódoló CPA1 gént érintő funkcióvesztést okozó variánsok szintén fokozzák a krónikus pankreatitisz kialakulásának rizikóját. A legtöbb CPA1 mutáció hibás fehérjeszerkezetet (misfoldingot) okoz. Ezeket a sérült térszerkezetű fehérjéket a sejt nem képes szekretálni, következményes intracelluláris stresszt okozva. Az egér pankréaszban a prokarboxipeptidáz A (proCPA) fehérje gyakran képez komplexeket proelasztázokkal. Ennek következtében a CPA1 mennyiségének változása befolyásolhatja a proelasztázok mennyiségét, ektópiás elasztáz aktivációt okozva, ami feltételezésünk szerint a hasnyálmirigyszövet sérüléséhez vezethetne. A CELA2A és CELA3B fehérjék kötődnek a proCPA1 fehérjéhez, míg a CELA3B a proCPA2 enzimmel is képes komplexet alkotni. Bár a CELA3A és CELA3B fehérjelánca 92%-ban azonos, a CELA3A nem kötődik sem a proCPA1, sem a proCPA2 fehérjéhez. A komplex kialakulását, a két fehérje összekapcsolódását CELA3 enzimek fehérjeláncában a 241. pozícióban található aminosav határozza meg (ez glicin a CELA3A-ban, alanin a CELA3B enzim esetében). A CELA3A p.G241A (glicin-alanin) mutáció fokozza a komplexképzést, míg a CELA3B p.A241G (alanin-glicin)

mutáció csökkenti a komplex képződést. Ezen pozíciót érintő mutáció polimorf variáns mindkét CELA3 izoformában, megközelítőleg 2 %-ban fordul elő a variáns típus az európai populációban.

### **3 Célkitűzések**

#### **3.1 Az elasztázok kimutatását vizsgáló tanulmány**

Ezen vizsgálatban a célunk volt annak kimutatása, hogy:

- I. a „ScheBo Pancreatic Elastase 1” diagnosztikus széklet teszt pontosan melyik pankreász elasztáz izoformára specifikus,
- II. a populációban gyakrabban előforduló elasztáz enzimvariánsok módosítják-e a diagnosztikus teszt eredményét.

#### **3.2 A komplexképződést befolyásoló elasztáz variánsok genetikai vizsgálata**

A tanulmányban célunk volt annak kimutatása, hogy:

- I. a komplexképzésért felelős CELA3A és CELA3B variánsok befolyásolják-e a krónikus hasnyálmirigygyulladás kialakulásának rizikóját,
- II. eddig ismeretlen elasztáz mutációk felfedezése és szerepük azonosítása a hasnyálmirigy betegségekből.

### **4 Módszerek**

#### **4.1 Rekombináns humán pankreász enzimek előállítása**

A humán elasztázokhoz (CELA2A, CELA3A, CELA3B) és kimotripszinekhez (CTRB1, CTRB2, CTRC and CTRL1) expressziós plazmidként pcDNA3.1 (-) vektort, míg a humán tripszinek (PRSS1, PRSS2 and PRSS3) expressziójához pTrapT7 vektort használtunk. A felhasznált tripszinogéneket rekombináns módon állítottuk elő *Escherichia coli* baktériumban. A baktériumban termelt tripszinogéneket a zárványtest frakcióból állítottuk elő, majd ecotin affinitás kromatográfiával megtisztítottuk. A humán elasztázokat és kimotripszinogéneket transzfektált HEK 293T sejtekben termeltük, majd a poli-hisztidinnel ("His-tag") jelölt fehérjéket nikkellal oszlopon végzett folyadék-kromatográfia segítségével tisztítottuk meg.

CELA3A és CELA3B mutánsok készítése átfedő primer extenzió alapú PCR reakciókon alapul.

## **4.2 Az expresszált elasztázok aktivitás mérése és gélelektroforézise**

A termelt CELA3A és CELA3B enzimek enzimaktivitásának meghatározása 100 nM tripszin enzimmel (PRSS1) Suc-Ala-Ala-Pro-Ala-p-nitroanilid szubsztrát felhasználásával történt pH=8 környezetben, 0,1 M Ca jelenlétében. Az enzimaktivitás meghatározása során az abszorbancianövekedést 5 percig mértük, 405 nm hullámhosszon, szobahőmérsékleten. A fehérjeexpresszió kimutatására szolgáló gélelektroforézis SDS-poliakrilamid gélkísérletekkel történt.

## **4.3 ELISA kísérletek a ScheBo Pancreatic Elastase 1 teszttel**

A ScheBo Pancreatic Elastase 1 diagnosztikus teszt a gyártó cégtől került beszerzésre. A rekombináns pankreász elasztázok detektálása a gyártó által meghagyott utasítások alapján történt a „ready-to-use” reagenseket felhasználva. A detekció szendvics-ELISA módszeren alapult, minden reakciót duplikátumban végeztünk el.

## **4.4 Genetikai vizsgálat**

### **4.4.1 Vizsgálati alanyok**

A Hungarian Pancreatic Study Group pankreász regiszteréből származó DNS mintákat használtuk fel (etikai engedély: TUKEB 22254-1/2012/EKU, biobank engedély: IF702-19/2012). A kísérletben 225 krónikus pankreatitiszes beteg mintáját hasonlítottuk (120 fő alkoholos pankreatitisz, 105 fő idiopátiás pankreatitisz beteg) össze 300 kontroll személlyel.

### **4.4.2 DNS szekvenálás Sanger-módszerrel**

A kísérletben a CELA3A és CELA3B gének 7. exon szakasza és az exon közelében található intronikus régiók felsokszorozása történt PCR reakcióval, a kapott termékeket 2% agaróz gélelektroforézissel mutattuk ki. A PCR termékeket FastAP termoszenzitív alkalikus foszfatáz jelenlétében exonukleáz I. enzimmel tisztítottuk meg, majd Sanger-szekvenálást végezve azonosítottuk az elasztáz génvariánsokat.

# **5 Eredmények**

## **5.1 Elasztázok detekciója**

### **5.1.1 A ScheBo Pancreatic Elastase 1 székletteszt csak a CELA3A és CELA3B elasztáz izoformákat detektálta**

CELA3A és CELA3B elasztázokat 100 pM koncentrációban, míg más pankreász proteázokat 1 nM koncentrációban detektáltunk a ScheBo teszt reagenseivel. Detekciós szignál csak a CELA3A és CELA3B fehérjék esetében volt mérhető.



#### **5.1.2 A zimogén, aktív elasztáz és autolitikus elasztáz formákat a teszt ugyanúgy detektálta, mint a vad típust. A CELA3B esetében a detekciós jel négyszer nagyobb a CELA3A enzimhez képest**

A CELA3A és CELA3B detekciójának karakterizálásához hígítási sort készítettünk 20-200 pM koncentráció tartományban. A CELA3B esetében 4,3-szor erősebb detekciós jelet mértünk a CELA3A enzimhez képest. A proelasztáz, aktív elasztáz és autolitikus elasztáz formákat ugyanúgy mutatta ki a teszt, mint a vad típusú elasztázokat.

#### **5.1.3 CELA3A és CELA3B genetikai variánsok hatása a klinikai tesztre**

Az NHLBI (Nemzeti Szív, Tüdő és Vér Intézet, USA), Exom Szekvenáló Projekt „Variáns Szerver” adatbázisából származó adatok alapján 1% feletti allél frekvencia gyakorisággal egy CELA3A variánst (CELA3A G241A), és öt CELA3B variánst (CELA3B W79R-, Q134L-, I209V-, R210H és A241G) azonosítottunk. Fehérjetisztítás után megmértük, hogy a „Schebo-teszt” eredményét befolyásolja-e valamelyik variáns. A variánsok közül a CELA3B W79R fehérjét 1,4-szer erősebben detektálta a teszt, a többi variáns kimutatásában nem volt különbség a vad típushoz képest. Mivel ez az allél variáns heterozigóta formában szerepel, így valószínűleg nem befolyásolja lényegesen a klinikai teszt eredményét.

#### **5.1.4 A CELA3B fehérjelánc 154. pozícióban szereplő glutaminsavnak fontos szerepe van a CELA3B izoforma kimutatásban**

A CELA3A és CELA3B fehérje aminosav szerkezete 92%-ban azonos, azonban a diagnosztikus teszt használata során a CELA3B fehérje 4-szer erősebb jelet adott. A kimutatásbeli különbség megértése miatt CELA3B mutánsokat készítettünk, melyekben a megfelelő aminosav pozíciókban (- ott, ahol különbség van a két fehérje szerkezetében) a CELA3A-nak megfelelő aminosav található. A CELA3B mutáns fehérjékkel is elvégeztük az ELISA reakciókat. (Kvalitatív „screening” vizsgálat). A vizsgált fehérje mutánsok közül a CELA3B E154K fehérje esetében egyáltalán nem volt mérhető detekciós szignál (abszorbancia). A mutációk alternálhatnak a fehérjék expressziójával és aktivitásával is, emiatt SDS gélikísérletek és enzimaktivitás meghatározás is történt. Az összes expresszált CELA3B mutáns fehérjének (beleértve az E154K variánst is) az enzimaktivitása megfelelt, vagy magasabb, mint a vad típusú CELA3B enzimaktivitása. A CELA3B S77R,S78D,W79L tripla mutáns és a dupla mutáns CELA3B D89N,R90L fehérjéket a HEK293T sejtek jobban szekretálták, (ez a gélikísérleteken is kimutatható), és emiatt a magasabb koncentráció miatt az ELISA szignál is erősebb volt, a vártak megfelelően. A CELA3B A241G mutáns esetében is a szekrécióbeli különbség kimutatható volt. A tisztított fehérjékkel végzett kísérlet is hasonló eredményt adott, nem volt mérhető jel a CELA3B E154K mutáns esetében. Annak elkülönítésére, hogy ez a pozíció a primer antitesthez való kikötődésben vagy a szekunder antitest általi detektálásban játszik szerepet, a mutáns fehérjét (CELA3B E154K) nikkel ionokkal borított lemezhez kötöttük ki, majd az ELISA kísérletet a „Schebo teszt” reagenseivel folytattuk, melynek során a mutáns E154K fehérje hasonló jelet adott, mint a vad típus, tehát a 154. pozíció a kikötődésben játszik szerepet. Ennek megfelel a szerkezeti modell is,

amely szerint a 154. pozícióban szereplő glutaminsav a fehérje felszínén található, távol a fehérje katalitikus helyétől.

#### **5.1.5 Lizin 154. és a közeli Arginin 179. mutáció javították a CELA3A enzim detekcióját**

Meglepő módon a „reciprok” mutáció (CELA3A K154E) a CELA3A enzimben nem javította az enzim kimutatását, nem „hozta vissza” a CELA3B-nek megfelelő négyszeres abszorbancia jelet. (A fehérjét ugyanúgy gyengébben detektálta a teszt.) A strukturális modell szerint, a 154. pozícióhoz közel található 179. aminosav pozíció is befolyásolhatja a kötődést. A CELA3A K154E-R179L mutáns fehérje esetében a detekciós jel 2,5-szeresére nőtt, hasonlóvá vált a CELA3B esetében mért értékhez.

## **5.2 Genetikai vizsgálat**

### **5.2.1 A humán CELA3A és CELA3B DNS szekvencia analízise (7. exon)**

A vizsgálattal ki szeretnénk mutatni, hogy a proelasztázok és prokarboxipeptidázok közötti komplexképzésben bekövetkezett esetleges változás növelheti-e a krónikus pankreátitiszre való hajlamot. A kísérletben a c.722G>C (p.G241A) CELA3A és a c.722C>G (p.A241G) CELA3B variánsok előfordulását határoztuk meg 225 fő krónikus pankreátitiszes beteg és 300 fő kontrol mintában. A CELA3A esetében összesen 8 variánst fedeztünk fel, ezek között volt 4 intronikus, 3 szinonim és 1 misszensz típusú variáns. A c.750C>T (p.P250=) és c.753G>A (p.T251=) variánsok kapcsoltan öröklődnek. A CELA3B fehérjében 13 variánst mutattunk ki a szekvenálás során, melyből 6 intronikus variáns, 2 szinonim variáns, 3 misszensz variáns volt, további 1 génkonverzió igazolódott. A c.699T>C (p.H233=) and c.702C>T (p.G234=) variánsok alkoholos pankreátitiszes betegekben voltak kimutathatóak.

Csak a c.643-7G>T intronikus mutáció esetében volt kimutatható szignifikáns különbség a beteg (16%) és a kontroll (21,3%) csoport között, az utóbbi javára (OR = 0.7; 95% CI 0.51–0.97; p = 0.03). A szubcsoport analízis eredménye alapján az eloszlásbeli különbség az alkoholos pankreátitiszes betegek csoportból származtatható, ahol ez a variáns jelentősen ritkábban fordult elő (OR = 0.59, 95% CI = 0.39–0.89, p = 0.01). Érdekes módon a komplex képződést befolyásoló variánsok (CELA3A G241A és CELA3B A241) eloszlása között nem volt lényeges különbség a beteg és a kontroll között, bár a várt tendencia megfigyelhető volt. Egy újonnan felfedezett heterozigóta misszensz mutáns (a CELA3B c.694G>C p.V232L) volt kimutatható egy betegben az ACP csoportban és egy kontroll egyénben, míg egy kontroll mintában heterozigóta formában CELA3B c.740G>C (p.R247P) variáns igazolódott. Mindkét személyből, aki a p.V232L variánst hordozta, heterozigóta formában c.643-7G>T CELA3B variáns szintén kimutatható volt, míg a p.R247P variáns egyénben a heterozigóta c.643-26C>T CELA3B variáns is detektálható volt. Egy ICP esetben heterozigóta génkonverzió volt kimutatható a CELA3B génben: a c.736 és c.742 pozíciókban a CELA3A-nak megfelelő 5 nukleotid

cseré (c.736A>T, c.737C>T c.739C>A, c.740G>T, c.742A>T) történt, amely három aminosav cserével járt (p.T246F, p.R247I, p.R248W) a CELA3B fehérjében.

Genotípus elemzések során a domináns modellben (GT + TT genotípus eloszlás betegekben összehasonlítva kontroll személyekkel) a c.643-7G>T variáns az ACP csoportban alulreprezentált (OR = 0.6, 95% CI 0.37–0.96, p = 0.03), de az összefüggés az ICP csoportban nem igazolódott. Recesszív modellt használva (TT genotípus eloszlás betegekben összehasonlítva kontroll személyekkel) a különbség még szembetűnőbb az ACP csoportban 1.7% a variáns előfordulása a betegekben, míg 5,8% a kontroll csoportban. Az ICP csoportban 3,8%.

### **5.2.2 A misszensz mutációk és a génkonverzió funkcionális analízise**

A kísérletek során a HEK293T sejtekben termeltetett elasztáz variánsok aktivitásmérése és gélelektroforézise történt. A CELA3B V232L variáns megközelítőleg 20%-kal jobban szekretálódott. Az aktivitásmérés során nem volt lényeges különbség a variánsok és a vad típusú CELA3B között. A jobban szekretált CELA3B V232L variáns aktivitása ennek megfelelően kissé emelkedettebb volt, míg a génkonverzió (p.T246F, p.R247I, p.R248W) 1,4-szer csökkentette az aktivitás értékét. CELA3A p.G241A variáns esetében az aktivitás 1.8-szor nagyobb volt, míg a CELA3B p.A241G variáns esetében az aktivitás 2,2-szer alacsonyabb volt a vad típushoz képest.

## **6 Diszkusszió**

### **6.1 Az elasztázok kimutatását vizsgáló tanulmány**

A kísérleteinkben meghatároztuk a klinikai diagnosztikai gyakorlatban használt teszt izoforma specificitását, a teszt pontos molekuláris működési mechanizmusát és, hogy a populációban előforduló gyakoribb elasztáz variánsok befolyásolják-e a teszt eredményét. A vizsgálataink megerősítették, hogy a teszt elsődlegesen a CELA3B izoformára specifikus, de érdekességképp a CELA3A izoformát is detektálta, bár 4-szer gyengébben a másik izoformához képest. A CELA2A enzim, kimotripsinek (CTRB1, CTRB2, CTRC, CTRL1) és tripszinek (PRSS1, PRSS2, PRSS3) esetében nem volt mérhető detekciós ELISA szignál. A CELA3B enzim különböző (autolitikus, proenzim) molekuláris típusok kimutatása során nem volt különbség a vad típushoz képest. A gyakrabban előforduló elasztáz variánsok közül csak a CELA3B W79R fehérje esetében mértünk 1,4-szer magasabb detekciós jelet, de feltehetően ez a különbség a heterozigóta hordozókban a klinikai interpretálás szempontjából nem jelentős. Teljességgel nem kizárható, hogy bizonyos nagyon ritka elasztáz genetikai variáns talán interferálhat a teszt eredményével, de ennek a valószínűsége nagyon kicsi.

A CELA3B mennyisége a pankréásznedv teljes protein tartalmának 4-6%-át adja. Tanulmányok szerint a CELA3A és CELA3B mRNS és expresszált protein mennyisége nagyjából megegyezik.

Arról egyelőre nincs irodalmi adat, hogy a két izoforma expressziója és az expresszió aránya hogyan változik fiziológiás és patológiás körülmények között. Ennek alapján az izoformák kifejeződésének megváltozása, vagy az egyéni variációk elméletileg befolyásolhatják a teszt eredményét. A jövőben egy kizárólag a CELA3B izoformára specifikus (kereszt-reaktivitást a CELA3A-val nem adó) klinikai teszt kifejlesztése a fentebb kifejtett indokok alapján indokolt lehet.

## 6.2 Genetikai vizsgálat

Kísérleteink során azon hipotézist teszteltük, hogy a humán proelasztázok és prokarboxipeptidázok közötti komplexképződés és annak megváltozása befolyásolhatja-e a krónikus pankreatitisz rizikóját. Feltételezzük, hogy az enzimek szabad (komplekkötésben nem levő) formája hajlamosabb az aktivációra. A komplex formálásban kritikus aminosav (p.241) polimorf variáns az európai populációban mind a két CELA3 izoforma esetében. Eredetileg a CELA3A a 241. pozícióban található glicin aminosav miatt nem képes komplex képződésre, míg a CELA3B, ami ugyanitt alanint tartalmaz, képes kötődni a prokarboxipeptidázokhoz. Ezek alapján feltételeztük, hogy a CELA3A G241A mutáció alulreprezentált, vagy a CELA3B A241G mutáció gyakoribb a krónikus pankreatitisz csoportban. Bár eredményeinkben megfigyelhető volt az előzetesen feltételezett tendencia, nem volt szignifikáns különbség ezen mutációt illetően a beteg és kontroll csoport között, ami alapján az a következtetés vonható le, hogy a komplexképződést érintő változások nem befolyásolják jelentősen a krónikus pankreatitisz rizikóját.

A 241. pozícióban található variánsok elemzése mellett a szekvenálások során azonosítottunk további 6 szinonim-, 2 misszensz variánst, 1 génkonverziót és 10 intronikus régióban található mutációt. Közöttük csak a 6. intronban található CELA3B c.643-7G>T mutáció volt szignifikánsan alulreprezentált az ACP csoportban, ami azt sugallja, hogy ez a variáns protektív, csökkentve a krónikus alkoholos pankreatitisz rizikóját. A variáns relatív közel helyezkedik a pre-mRNS splice-site-hoz; nem kizárt, hogy befolyásolja a splicing folyamatát, végeredményben csökkentve a CELA3B expressziót. Ennek alapján a későbbiekben érdemes lehet a variáns vizsgálata egy későbbi tanulmányban.

A funkcionális vizsgálatok (expressziós kísérletek, gélelektroforézis és aktivitásmérés) során nem volt szignifikáns a talált mutáns fehérjék és a vad típusú enzimek között.

Egy ritka génkonverzió volt kimutatható egy személyben az ICP csoportban a 7. exonban a CELA3A és CELA3B génben. A génkonverzió nem-reciprok, homológ DNS szakaszok között kicserélődés, a mismatch-repair során keletkezhet. A génkonverzió által létrehozott DNS csere több betegség patomechanizmusában játszik szerepet, beleértve a krónikus pankreatitist. Például a PRSS1 és PRSS2 közötti vagy a PRSS1 és PRSS3P2 pszeudogén közötti génkonverzió által létrehozott patogén allélvariáns szerepet játszik krónikus pankreatitisz kialakulásában. Ezen kívül a karboxil észter lipáz

gén (CEL) és a génnel rokon pszeudogén (CELP) rekombinációs allélje is egy mostanában leírt genetikai rizikófaktor a krónikus pankreátitisznek. A tanulmányunkban leírt génkonverzió által létrehozott variáns a funkcionális kísérletek során nem mutatott szekréció vagy aktivációbeli különbséget, így feltételezhetően nincs patogén szerepe a krónikus pankreátitiszben.

## **7 Összefoglalás és új eredmények**

Munkánk során az elasztázok szerepét vizsgáltuk a pankréasz betegségekben.

- I. Meghatároztuk, hogy a diagnosztikában használt „ScheBo Pancreatic Elastase 1” teszt molekuláris célpontja a CELA3B, de ezen kívül a teszt kereszt-reagál a CELA3A izoformával is.
- II. Megállapítottuk, hogy más pankréasz proteázok és a gyakoribb elasztáz variánsok nem befolyásolják a teszt eredményét.
- III. Kimutattuk, hogy a CELA3A és CELA3B komplexképzésben fontos 241 aminosav pozíció nem befolyásolja szignifikánsan a krónikus hasnyálmirigy gyulladás rizikóját.
- IV. A CELA3B c.643-7G>T intronikus variáns szignifikánsan alulreprezentált volt az ACP csoportban, amely alapján a variáns protektív hatása feltételezhető a krónikus alkoholos pankreátitisszel szemben.

## 8 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani és kifejezni őszinte hálámat témavezetőimnek: **Dr. Hegyi Péter Professzor Úrnak** és **Dr. Sahin-Tóth Miklós Professzor Úrnak** az irántam tanúsított türelmükért és támogatásukért. Az Ő szakértelmük és bátorításuk nélkül ez a PhD munka nem jöhetett volna létre. Soha nem felejttem el azt, hogy bíztak bennem. Ők adták meg a lehetőséget, hogy az Egyesült Államokban tanulmányúton vehessek részt, életreszóló tapasztalatokat szerezve. Mindkettőjüket inspiráló, kiváló szakembernek tartom.

Hálával tartozom **Dr. Bereczki Csaba Tanár Úrnak** a támogatásáért, személyes segítségéért és, hogy engedélyezte számomra, hogy a klinikai gyermekgyógyász rezidens munkám mellett a PhD területemen dolgozhassak.

Ezen munka nem készülhetett volna el **Dr. Párniczky Andrea**, **Dr. Hegyi Eszter** és **Dr. Szabó András** tanácsai és segítsége nélkül, ezúton szeretnék köszönetet mondani az irántam tanúsított türelmükért és az összes segítségükért, amit a kísérletek megtervezése, kivitelezése és az eredmények értékelése során nyújtottak. Hálásan köszönöm **Dr. Geisz Andrea**, **Dr. Németh Balázs**, **Dr. Mosztbacher Dóra**, **Dr. Zsoldos Fanni**, **Dr. Szűcs Ákos**, **Dr. Vince Áron**, **Dr. Izbéki Ferenc**, **Dr. Berki Dorottya**, **Dr. Demcsák Alexandra**, **Dr. Balázs Anita**, **Dr. Szentesi Andrea** és a **Magyar Hasnyálmirigy Munkacsoport** tagjainak közreműködését és segítségét a munkában.

Őszinte hálával tartozom **Dr. Bari Ferenc Professzor Úrnak** és **Dr. Forczek Erzsébetnek**, akik az orvosi egyetemi tanulmányaim alatt a TDK témavezetőim voltak, támogattak, a jövőmet nagyban meghatározó útmutatást adtak.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Neparáczi Endrének** a PhD disszertáció megszerkesztése során nyújtott segítségéért és türelméért.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom **Szüleimnek** és **Nagyszüleimnek**, akik mellettem álltak és mindig feltétel nélkül támogattak eddigi életem során.

## **9 Anyagi források**

Ezen munkához pénzügyi forrásul szolgált:

NIH grant R01DK095753, R01DK082412, R01DK058088 (to MST)

Momentum Grant - Magyar Tudományos Akadémia LP2014-10/2014.