

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A
Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Markus M. Lerch
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema: „Untersuchung genetischer Risikofaktoren bei chronischer
Pankreatitis mithilfe von Next Generation Sequencing-Technologie“

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2021

vorgelegt von: Lena Bronk

geboren am: 06.06.1995

in: Salzgitter

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Markus Lerch

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Robert Jaster

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum der Thoraxchirurgie

Tag der Disputation: 23.05.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Chronische Pankreatitis – ein Überblick	1
1.1.1	Alkoholisch-chronische Pankreatitis.....	2
1.1.2	Hereditäre und idiopathische Pankreatitis.....	2
1.2	Genetische Risikofaktoren und Pathomechanismen	3
1.2.1	Protease-Aktivierung	3
1.2.2	Protein-Fehlfaltung	5
1.2.3	Ionenkanäle: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)	6
1.2.4	Primärziliengene.....	7
1.3	NGS und GWAS	7
1.4	Fragestellung	9
2	Material, Methoden und Studienpopulation	10
2.1	Material	10
2.1.1	Genotypisierungsassays	10
2.1.2	Kits	10
2.1.3	Materialien und Geräte.....	10
2.1.4	Puffer, Medien und Lösungen	11
2.2	Studienpopulation	12
2.2.1	Rekrutierung und Einwilligung der Patienten und Probanden .	12
2.2.2	Gruppe 1: Primärkohorte.....	12
2.2.3	Gruppe 2: Validierungskohorte	12
2.2.4	Gruppe 3: Erweiterung der Genom-sequenzierten Probanden	13
2.3	Methoden	13
2.3.1	Verarbeitung der VCF-Dateien.....	13
2.3.2	DNA-Extraktion.....	14
2.3.3	Elektrophorese	14
2.3.4	Genotypisierung der Validierungskohorte	14
2.3.5	Statistische Auswertung	15
3	Ergebnisse	16

3.1	Auswahl, Genotypisierung und Auswertung von Sequenzvarianten bei Patienten mit chronischer Pankreatitis	16
3.1.1	Charakterisierung der Primärkohorte	16
3.1.2	Untersuchung von Kandidatengenomen in der Primärkohorte	16
3.1.3	Charakterisierung der Validierungskohorte.....	21
3.1.4	Ergebnisse der Sequenzvarianten in der Validierungskohorte	22
3.2	Untersuchung bekannter Risikogene bei Genom-sequenzierten Patienten mit chronischer Pankreatitis	27
3.2.1	Charakterisierung der Kohorte und Überblick über die untersuchten Gene	27
3.2.2	PRSS1.....	28
3.2.3	SPINK1.....	28
3.2.4	CTRC	30
3.2.5	CFTR.....	32
3.2.6	CPA1	33
3.2.7	Kombiniertes Auftreten von Risikovarianten für chronische Pankreatitis	33
3.2.8	Zusammenfassung.....	35
4	Diskussion.....	36
4.1	Die Suche nach neuen Risikovarianten für chronische Pankreatitis: <i>MAP2K1</i> und <i>FLII</i>	36
4.2	Die N34S-Mutation (<i>SPINK1</i>) als Risikofaktor für alkoholisch-chronische Pankreatitis	39
4.3	Die G60G-Mutation (<i>CTRC</i>) als Risikofaktor für chronische Pankreatitis	40
4.4	Die E283K-Mutation (<i>CPA1</i>) als Risikofaktor für idiopathisch-chronische Pankreatitis	41
4.5	Trans-Heterozygotie für <i>CTRC/CFTR</i> als Risikofaktor für idiopathisch-chronische Pankreatitis	42
4.6	Ausblick: genomweite Assoziationsstudien (GWAS).....	42
5	Zusammenfassung	45
6	Literaturverzeichnis.....	47

Abkürzungsverzeichnis

ACP	alkoholisch-chronische Pankreatitis
AUDIT	Alcohol Use Disorders Identification Test
BAM	Binary Alignment Map
BCF	binary variant call format
BQSR	Base Quality Score Recalibration
CBAVD	kongenitale bilaterale Aplasie des Vas deferens
CEL	Carboxylester-Lipase
CF	zystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CP	chronische Pankreatitis
CPA1	Carboxypeptidase A1
CT	Computertomographie
CTRC	Chymotrypsin C
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
FAM	6-Carboxyfluorescein
FAT	Fat atypical cadherin
FLII	Flightless 1-Homolog
FUT	Fucosyltransferase
GC	Guanin/Cytosin
GPCN	German Pancreatic Cancer Network
GWAS	genomweite Assoziationsstudien
HFE	humanes homöostatisches Eisenregulatorprotein
HP	hereditäre Pankreatitis
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
ICP	idiopathisch-chronische Pankreatitis
IFT	Intraflagellartransport
LD	Linkage Disequilibrium
MAP2K1	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase 1
MGB-Sonden	Minor Groove Binder-Sonden
MHC	major histocompatibility complex
MODY	Maturity-onset diabetes of the young
mRNA	messenger RNA (Ribonukleinsäure)
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
NFQ	nicht-fluoreszierender Quencher
NGS	Next Generation Sequencing
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKD	polyzystische Nierenerkrankung
PRSS1	kationisches Trypsinogen
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SHIP	Study of Health in Pomerania

SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPINK1	Serin-Protease-Inhibitor Kazal-Typ 1
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
UPR	Unfolded Protein Response
UV	ultraviolett
VCF	variant call format
ZNF	Zinc finger protein

Hinweis zur gendergerechten Sprache:

Um diese Arbeit trotz unvermeidbarer Fachterminologie sprachlich übersichtlich zu gestalten, wurde im Folgenden das Maskulinum als Genus verwendet. Dies bezieht jedoch, wenn nicht explizit anders dargestellt, als männlich, weiblich oder divers identifizierende Personen mit ein. Bsp.: Patient = Patient*innen.

1 Einleitung

1.1 Chronische Pankreatitis – ein Überblick

Die chronische Pankreatitis ist eine progressiv-inflammatorische Erkrankung des Pankreas. Sie ist durch einen fibrotischen Umbau des Drüsenparenchyms, Pankreasgangveränderungen, Kalzifikationen, Pseudozysten und fortschreitende zunächst exokrine und schließlich auch mögliche endokrine Insuffizienz des Organs gekennzeichnet. [1] Jährlich erkranken etwa 1,6-23/100.000 Einwohner weltweit, die Tendenz ist steigend [2]. Die Letalität der chronischen Pankreatitis wird auf 28,8 bis 35% geschätzt, zu den gefürchtetsten Komplikationen gehört der Übergang in ein Pankreaskarzinom auf dem Boden einer duktaalen Metaplasie [3–6]. Das Risiko ist im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung um das 13,3-fache erhöht [7]. Da die Behandlung bisher weitgehend auf die Eindämmung der Symptomatik abzielt, ist die chronische Pankreatitis weiterhin Gegenstand intensiver Forschung [8].

Die exokrine Pankreasinsuffizienz wird im klinischen Alltag meist nicht-invasiv anhand erniedrigter Pankreaselastasewerte im Stuhl der Patienten festgestellt und kann aufgrund des Verdauungsenzymmangels zu einer gestörten Fettsäure- und Proteinverwertung im Duodenum sowie langfristig zu Mangelzuständen der fettlöslichen Vitamine führen [9–11]. Die endokrine Pankreasinsuffizienz ist eine mögliche Folge der kontinuierlichen Gewebeerstörung und manifestiert sich als Diabetes mellitus Typ 3c [12]. Vordergründig wird die Lebensqualität der Patienten mit chronischer Pankreatitis durch starke gürtelförmige Oberbauchschmerzen eingeschränkt, die vor allem bei akuten Schüben auftreten und sich mitunter als Dauerschmerz manifestieren. Diesem liegt neben komplikationsbedingten Schmerzen vermutlich eine neuro-immunologische Veränderung der das Pankreas versorgenden Nervenplexus zugrunde. [13, 14] Im Endstadium der Erkrankung können die Schmerzen u. U. nachlassen, es wird von einem sogenannten „burn-out“ gesprochen [15].

Obwohl bezüglich der Pathophysiologie noch einiges ungeklärt bleibt, geht man heute davon aus, dass die chronische Pankreatitis meist zunächst in Form der rekurrend-akuten Pankreatitis auftritt [16]. Die wiederholte Schädigung von Azinus- und Gangzellen führt im Sinne einer Nekrose-Fibrose-Sequenz zu einer veränderten Immunantwort, bei der Makrophagen schlafende Sternzellen aktivieren, die maßgeblich am fibrotischen Umbau des

Parenchyms beteiligt sind. Die Genese kann multikausal sein, bei den morphologischen Veränderungen handelt es sich um die gemeinsame Endstrecke der Erkrankung. [17, 18]

Die Ätiologie der chronischen Pankreatitis ist z.T. multifaktoriell und komplex. Die Erkrankung wird bezüglich der Genese in alkoholisch, autoimmun, hereditär und selten auch durch primären Hyperparathyreoidismus oder Hypertriglyzeridämie hervorgerufen eingeteilt. Bei der idiopathisch-chronischen Pankreatitis handelt es sich um eine Ausschlussdiagnose. [19–21] In dieser Arbeit soll vor allem auf die chronische Pankreatitis idiopathischer bzw. hereditärer sowie alkoholischer Genese eingegangen werden.

1.1.1 Alkoholisch-chronische Pankreatitis

Die durch langjährigen Alkoholabusus hervorgerufene chronische Pankreatitis stellt mit 60-80% die häufigste Form dar [22]. Dabei wird meist ein Tageskonsum von mindestens 80g Alkohol pro Tag als Richtwert für riskanten Konsum festgelegt. Zudem konnte ein dosisabhängiger Effekt festgestellt werden, ein pankreastoxischer Schwellenwert ist jedoch nicht bekannt. [23–25] Fortwährender Alkoholkonsum begünstigt dabei das Fortschreiten der Erkrankung ebenso wie Nikotinabusus [26]. Dieser gilt jedoch als unabhängiger Risikofaktor, der mit dem Konsum von Alkohol synergistisch wirkt [27].

Der Pathomechanismus der alkoholisch-chronischen Pankreatitis (ACP) ist noch nicht vollständig verstanden. Weniger als 10% der Alkoholiker entwickeln eine chronische Pankreatitis, was darauf hindeutet, dass mehrere Faktoren zur Entstehung der Erkrankung beitragen. [2] Zu diesen gehört vermutlich auch eine genetisch bedingte Vulnerabilität, weiteres hierzu im Kapitel „Genetische Risikofaktoren“.

1.1.2 Hereditäre und idiopathische Pankreatitis

Die hereditäre Form wurde erstmals im Jahre 1952 beschrieben und macht nur etwa 1-4% der Fälle von chronischer Pankreatitis aus [28, 29]. Sie tritt durch seltene autosomal-dominante Mutationen im *PRSSI*-Gen auf, welches für kationisches Trypsinogen kodiert [30, 31]. Die Penetranz ist je nach Mutation unterschiedlich. Betroffene erkranken häufig bereits im Kindesalter und haben ein Lebenszeitrisiko von 40-55% für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms. [29, 32]

Nicht jede Mutation ist mit einem dominanten Vererbungsmuster assoziiert, Mutationen mit geringer Penetranz führen zum Krankheitsbild der sporadischen Pankreatitis, die meist als

idiopathische Pankreatitis diagnostiziert wird [33]. Der Begriff „idiopathisch“ bedeutet in diesem Kontext eigentlich „ohne erkennbare Ursache“. Unter dem Überbegriff der idiopathisch-chronischen Pankreatitis (ICP) werden jedoch neben ungeklärten Fällen diverse Mutationen, die sporadisch zur chronischen Pankreatitis führen können, zusammengefasst. [33–35] Auf die genetischen Aspekte wird im Folgenden näher eingegangen.

1.2 Genetische Risikofaktoren und Pathomechanismen

1.2.1 Protease-Aktivierung

Im Jahre 1996 wurde ein Risikogen für autosomal-dominant vererbte chronische Pankreatitis auf dem Chromosom 7 entdeckt [30]. Im selben Jahr identifizierten Whitcomb et. al. mittels Sequenzierung die erste und häufigste kausative Mutation im *PRSSI*-Gen: p.R122H [31]. Im folgenden Jahr wurde die p.N29I Variante publiziert, die ebenfalls signifikant mit hereditärer Pankreatitis assoziiert ist [36, 37]. Zu diesem Zeitpunkt war über die zugrundeliegenden Pathomechanismen noch wenig bekannt.

Das *PRSSI*-Gen kodiert für kationisches Trypsinogen, die inaktive Vorstufe der Protease Trypsin [38]. Trypsinogen wird mit dem Pankreassaft in das Duodenum transportiert und dort von Enteropeptidasen aktiviert [39]. Im Pankreas schützt ein Serin-Protease-Inhibitor namens Kazal Typ 1 (SPINK1) gegen eine frühzeitige Autoaktivierung von Trypsinogen, indem SPINK1 bereits aktiviertes Trypsin bindet und dieses an der weiteren Katalyse der Reaktion hindert. Auf diese Weise können ca. 13% des intrazellulär gespeicherten Trypsins inhibiert werden. [40, 41]

Des Weiteren wirkt der Chymotrypsin C (CTRC)-abhängige Abbau von Trypsinogen einer intrapancreatischen Aktivierung entgegen [42–44]. Paradoxe Weise verstärkt CTRC zunächst die Autoaktivierung von Trypsinogen, indem es die Phe18-Asp19-Peptidbindung am Aktivierungspeptid spaltet. Das verkürzte Aktivierungspeptid ist dadurch anfälliger für die Spaltung der Lys23-Ile24-Bindung durch Trypsin. Dies sorgt initial für einen Anstieg an aktivem Trypsin („trypsin burst“). Durch den Anstieg steht mehr aktives CTRC zur Verfügung, da dieses zunächst von Trypsin aktiviert werden muss. [42, 45] Der dominante Effekt von CTRC ist schließlich folgender: Es spaltet die Leu81-Glu82-Bindung an der Ca²⁺-Schleife und sorgt gemeinsam mit Trypsin, das Trypsinogen an der Arg122-Val123-Stelle spaltet, für den irreversiblen Abbau von Trypsinogen. [42]

Viele der Pankreatitis-assoziierten Mutationen im *PRSS1*-Gen verstärken die intrapankreatische Aktivierung von Trypsin und begünstigen somit die Entstehung einer Pankreatitis [42]. Dies geschieht über zwei verschiedene Angriffspunkte: Die hochpenetranten Mutationen p.R112H, p.R122C, p.N29I, p.N29T und p.V39A verhindern bzw. beeinträchtigen den CTRC-abhängigen Trypsinogen-Abbau und p.A16V sowie p.N29I verstärken die durch CTRC begünstigte Autoaktivierung von Trypsinogen. [42, 45] Die Mutationen p.D19A, p.D21A, p.D22G, p.K23R und p.K23_I24insIDK erhöhen unabhängig von CTRC die Autoaktivierung am Aktivierungspeptid, sodass mehr Trypsinogen bereits intrazellulär aktiviert wird. Innerhalb des endoplasmatischen Retikulums (ER) werden manche dieser Trypsin-Mutationen auch als fehlgefaltetes Trypsinogen erkannt und abgebaut. Die Akkumulation fehlgefalteter Proteine führt zu ER-Stress und einer gesteigerten Apoptose der Zellen. [46, 47] Die Mechanismen der Verstärkung der intrapankreatischen Proteaseaktivierung durch *PRSS1*-Mutationen sind vereinfacht in *Abbildung 1* dargestellt.

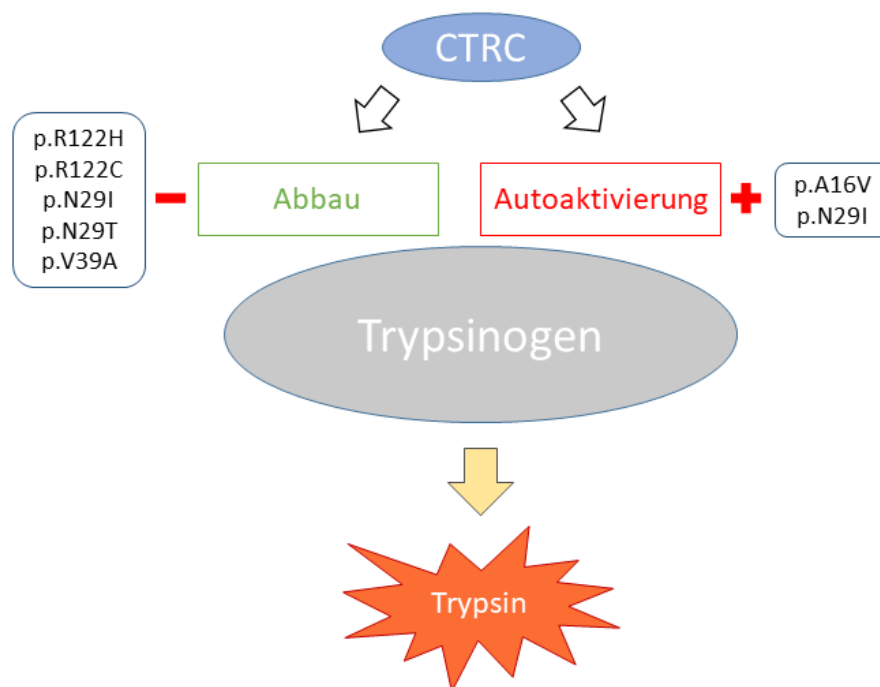


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der CTRC-abhängigen Verstärkung der intrapankreatischen Trypsinaktivierung durch *PRSS1*-Mutationen. CTRC=Chymotrypsin C

Einer der am häufigsten nachgewiesenen genetischen Risikofaktoren bei alkoholischer und idiopathisch-chronischer Pankreatitis ist die *SPINK1*-Variante p.N34S, die mit vier intronischen Varianten assoziiert ist (c.56-37T>C in Intron 1, c.87+268A>G in Intron2, c.195-606G>A sowie c.195-66_65insTTTT in Intron 3) [34, 48]. Der zugrundeliegende

Pathomechanismus ist bisher unklar, vermutlich ist keine der fünf Varianten die krankheitsverursachende Mutation [49–51]. Über Linkage-Analysen wird weiter nach assoziierten Varianten geforscht. So wurde bereits eine ca. 4kb vom *SPINK1*-Promoter entfernte Sequenzvariante identifiziert, die möglicherweise ein Cis-regulatorisches Modul (CRM) stört, an das Transkriptionsfaktoren binden können, um die Expression von *SPINK1* zu beeinflussen [52]. Die zweithäufigste *SPINK1*-Variante ist die c.194+2T>C-Mutation, die durch einen Spleißdefekt mit deutlich reduzierter mRNA-Expression und einem Funktionsverlust von SPINK1 einhergeht [34, 53–55].

1.2.2 Protein-Fehlfaltung

Das raue endoplasmatische Retikulum (rER) dient der Proteinbiosynthese und der Membranproduktion und ist – wie in jeder exokrinen Drüse – im Pankreas stark ausgeprägt [56]. Als ER-Stress wird die Akkumulation fehlgefalteter, insbesondere mutierter Proteine bezeichnet, die eine komplexe Aktivierung von Unfolded Protein Response (UPR)-Prozessen initiiert. Persistierender ER-Stress kann zur Apoptose der Zelle führen, wenn es der UPR nicht gelingt, den physiologischen Zustand der Zelle wiederherzustellen. [57]

Einige Mutationen im *PRSSI*-Gen führen zum Fehlfaltungs-Phänotyp, bei dem das veränderte Protein vermindert sezerniert wird, sich im ER unlösliche Aggregate des Proteins bilden und ER-Stress Marker erhöht sind [33]. In HP-Familien findet sich die p.R116C Mutation, p.C139S wurde meist sporadisch entdeckt, p.L104P scheint familiär und sporadisch aufzutreten [33, 58].

Mutationen im Carboxypeptidase A1-Gen (*CPA1*) sind oft mit einem frühen Auftreten der Erkrankung assoziiert und einige von ihnen führen ebenfalls zum Fehlfaltungs-Phänotyp. Zu den wichtigsten *CPA1*-Mutationen gehören p.N256K, p.R382W und c.1073-2A>G. Sie wurden bei CP-Patienten nicht jedoch in gesunden Kontrollkohorten nachgewiesen, was für einen kausativen Zusammenhang zwischen den Mutationen und der chronischen Pankreatitis spricht. [59] Für die Mutation p.S282P konnte in zwei Familien ein autosomal-dominanter Erbgang festgestellt werden [60].

CTRC-Mutationen sind größtenteils Loss-of-function-Mutationen und ebenfalls signifikant mit chronischer Pankreatitis assoziiert. Im europäischen Raum finden sich vor allem p.R254W, p.K247_R254del sowie c.180C>T (p.G60G). [61, 62] Die p.R254W Variante von *CTRC* wird vermindert sezerniert und von Trypsin abgebaut statt aktiviert, p.K247_R254del

ist katalytisch inaktiv und p.G60G ist mit einer reduzierten mRNA-Expression assoziiert [63–65]. Die c.180C>T-Mutation ist der häufigste Risikofaktor für chronische Pankreatitis und findet sich zu >30% in Patientenkohorten [62, 66, 67]. Ob *CTRC*-Varianten aufgrund der verminderten Sezernierung zu ER-Stress führen bleibt fraglich, da Chymotrypsin C verglichen mit Trypsinogen und Carboxypeptidase A1 sehr viel weniger stark exprimiert wird [38]. Trans-Heterozygotie von *CTRC*- und *SPINK1*-Mutationen, d.h. das Zusammentreffen einer *CTRC*- mit einer *SPINK1*-Variante in einem Individuum, geht mit einem deutlich erhöhten Pankreatitisrisiko einher [61].

Das *CEL*-Gen, das für die Carboxylester-Lipase der Azinuszellen kodiert, rückte 2006 in den Fokus der Pankreasforschung: Die Punktmutationen c.1686delT und c.1785delC in Exon 11 des *CEL*-Gens führen zu einem autosomal-dominant vererbten Syndrom aus exokriner Pankreasinsuffizienz und Maturity-onset diabetes of the young (MODY) 8. [68] Das durch die Deletionen veränderte *CEL*-Protein mit verlängerten C-Termini akkumuliert intrazellulär und führt zu fehlfaltungsbedingtem ER-Stress und Apoptose [69]. Knapp ein Jahrzehnt später wurde das Hybridallel *CEL-HYB1* entdeckt, das durch nicht-allelische homologe Rekombination zwischen *CEL* und dem benachbarten Pseudogen *CELP* entsteht. Bei der Rekombination entstehen ein Duplikations- und ein Deletionshybridallel, wobei letzteres für ein verändertes CEL-Protein kodiert. Das Hybridallel ist signifikant mit idiopathisch- und alkoholisch-chronischer Pankreatitis assoziiert. Die verminderte Sekretion des Proteins legt eine fehlfaltungsbedingte Pathogenese nahe. [70]

1.2.3 Ionenkanäle: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)

Mutationen im Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Gen (*CFTR*) erhöhen das Pankreatitisrisiko durch Störung des intrapancreatischen Sekretabflusses [71]. Die Verbindung zwischen zystischer Fibrose (CF) und Pankreatitis ist seit 1969 bekannt [72]. Eine komplexe Heterozygotie mit zwei schweren *CFTR*-Mutationen macht die Leitfähigkeit des CFTR-Kanals für Chloridionen zunichte und führt zum Krankheitsbild der CF mit Pankreasinsuffizienz – nicht aber Pankreatitis. Dagegen haben komplex Heterozygote mit einer milden und einer schweren *CFTR*-Mutation oder Patienten, die heterozygot für eine *CFTR*-Mutation sind, ein erhöhtes Risiko, an chronischer Pankreatitis zu erkranken. [73] Das höchste Risiko tragen Patienten mit zwei *CFTR*-Varianten und einer p.N34S-Mutation [74]. Ebenso wurde in der Vergangenheit eine signifikante Häufung des 5T-Allels auf Intron 8 des *CFTR*-Gens, das typischerweise mit kongenitaler bilateraler

Aplasie des Vas deferens (CBAVD) assoziiert ist, bei Patienten mit chronischer Pankreatitis festgestellt [74, 75]. Neuere Studien konnten dies bisher nicht bestätigen [76, 77].

1.2.4 Primärziliengene

In dieser Arbeit werden auch Primärziliengene betrachtet, die bisher nicht zu den bekannten Risikogenen für chronische Pankreatitis gehören. Nichtmotile Primärzilien stellen eine Verbindung zwischen Außen- und Innenwelt der Zelle dar. Sie sind am Zellzyklus beteiligt und sind Bestandteil diverser intrazellulärer Signalwege (u.a. WNT, Hedgehog und mTOR). [78–80] Ihnen kam vermehrt Aufmerksamkeit zu, als ein Defekt in den Primärzilien als Ursache für die polyzystische Nierenerkrankung (PKD) identifiziert wurde [81, 82]. Etwa 10% der Patienten mit autosomal-dominanter PKD zeigen zudem eine pankreatische Beteiligung [83–87]. Daher liegt nahe, dass die auf den Pankreasgangzellen exprimierten Zilien bei Erkrankungen des Pankreas eine Rolle spielen könnten – so auch bei chronischer Pankreatitis [88].

1.3 NGS und GWAS

Next Generation Sequencing (NGS) bzw. die Hochdurchsatz-Sequenzierung hat die Genforschung – dank der Möglichkeit, in kürzester Zeit gesamte Genome zu sequenzieren – revolutioniert [89]. Der Markt wird momentan von der Illumina-Sequenzierung, die nach dem Prinzip der „Sequencing-by-Synthesis“ funktioniert, dominiert. Bei dieser Technik werden Millionen bis Milliarden DNA-Fragmente in einer sogenannten Flow Cell parallel sequenziert und anschließend mit einem Referenzgenom verglichen. Während bei der klassischen Sanger-Sequenzierung vor allem Substitutionen, Deletionen und kleinere Insertionen problemlos detektiert werden konnten, erweitert NGS das Spektrum um Deletionen von Exons bzw. ganzen Genen, Inversionen und Translokationen. [90] Herausforderungen in der fehlerfreien Sequenzierung des gesamten Genoms stellen aktuell noch GC-reiche Areale und Repeat-Expansionen dar, letztere sind das genetische Korrelat bestimmter erblicher Krankheitsbilder, z.B. der Huntington-Erkrankung. Im Laufe der letzten zwei Jahre wurden jedoch Lösungsansätze entwickelt, um sich diesen Herausforderungen zu stellen. [91, 92] Es ist beim NGS eine ausgesprochen integrative Herangehensweise möglich, bei der kaum Vorwissen über die zu untersuchenden Genloci notwendig ist. Dies ermöglicht u.a. genomweite Assoziationsstudien (GWAS), die einen hypothesenfreien Ansatz darstellen, um Risikogene zu identifizieren. Dabei wird versucht, einem Phänotypen Sequenzvarianten oder Haplotypen zuzuordnen. In Bezug auf die

chronische Pankreatitis wurde so Claudin-2 (*CLDN2*) als Risikogen identifiziert und eine protektive *PRSSI*-Promoter-Mutation im *PRSSI-PRSS2*-Locus entdeckt [93]. Claudin-2 ist ein wichtiger Bestandteil von Zell-Kontakten, deren Relevanz für die physiologische Funktion des Pankreas experimentell gezeigt wurde [94]. Der *CLDN2-MORC4*-Risiko-Locus konnte an europäischen und indischen Patientenkohorten in genomweiten Assoziationsstudien bestätigt werden [95, 96]. 2017 wurde in einer weiteren europäischen GWAS der *CTRB1-CTRB2*-Locus als weiteres Risikogen identifiziert [97].

1.4 Fragestellung

Basierend auf den Genom-Sequenzdaten einer Primärkohorte von Patienten mit chronischer Pankreatitis soll im Rahmen dieser Arbeit folgendes untersucht werden:

1. Mithilfe von Genom-Sequenzdaten sollen in einem Kandidatengenansatz neue Sequenzvarianten in bekannten Risikogenen für die chronische Pankreatitis identifiziert werden.

An einer Genom-sequenzierten Primärkohorte soll untersucht werden, ob Sequenzvarianten von Risikogenen aus einer Kandidaten-Gen-Liste signifikant häufiger mit chronischer Pankreatitis assoziiert sind. Im nächsten Schritt sollen diese Beobachtungen in einer weiteren Kohorte mittels Real Time-PCR validiert werden. Zusätzlich soll analysiert werden, ob eine unterschiedliche Geschlechterverteilung bei diesen Varianten eine Rolle spielt.

2. Können bekannte Sequenzvarianten für die chronische Pankreatitis in dieser Kohorte als Risikovarianten bestätigt werden – auch in Bezug auf die Geschlechterverteilung unter den Patienten und Probanden?

2.1 Kann die *SPINK1*-Variante p.N34S als Risikovariante für alkoholisch-chronische Pankreatitis bestätigt werden?

2.2 Finden sich homo- und auch heterozygote Träger der *CTRC*-Variante p.G60G signifikant häufiger unter den Patienten mit chronischer Pankreatitis als unter den Kontrollprobanden?

2.3 Wie ist die Verteilung komplexer bzw. trans-heterozygoter Merkmalsträger (Patienten/Probanden mit mehr als einer Risikovariante aus demselben bzw. unterschiedlichen Risikogenen)? Sind kombinierte oder transheterozygote Merkmalsträger unter Patienten mit chronischer Pankreatitis häufiger vertreten als unter pankreasgesunden Kontrollen? Welche Merkmalskombinationen sind besonders mit einem erhöhten Pankreatitisrisiko assoziiert?

2 Material, Methoden und Studienpopulation

2.1 Material

2.1.1 Genotypisierungsassays

TaqMan Genotyping Master Mix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<i>HFE</i> (p.S65C): TaqMan SNP Assay rs1800730	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<i>IFT74</i> (p.V579M): TaqMan SNP Assay rs138591335	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<i>IFT74</i> (p.F224L): TaqMan SNP Assay rs17694549	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<i>FAT4</i> (p.H3215Y): TaqMan SNP Assay rs73849225	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<i>MAP2K1</i> (c.10238C>T): TaqMan SNP Assay rs41306345	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<i>FLII</i> (p.F20L): TaqMan SNP Assay rs145840264	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<i>ZNF18</i> (p.S522L): TaqMan SNP Assay rs117755721	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

2.1.2 Kits

Quick-DNA Miniprep Plus Kit	Zymo Research (Irvine, CA, USA)
-----------------------------	---------------------------------

2.1.3 Materialien und Geräte

Autoklave DX – 150	Systemec (Linden, Deutschland)
Autoklave VX – 150	Systemec (Linden, Deutschland)
Combitips advanced 0,1 ml	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Electrophoresis Power Supply 201	Amersham Biosciences Europe (Freiburg im Breisgau, Deutschland)
Elektrophoresekammer	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
FluorChem SP	Alpha Innotech Cell Biosciences (San Leandro, CA, USA)

M52 Minishaker	IKA (Staufen, Deutschland)
Multipipette M4	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
PCR 384-well TW-MT-Platte	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Pipetten 2-1000 µl	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Pipette 0,1-2 µl	BRAND (Wertheim, Deutschland)
Pipettenspitzen 200 µl, 1000 µl	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Pipettenspitzen 20 µl	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Real Time – PCR System Quant Studio 7 flex	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Thermomixer compact	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Vortexer IKA MS 3 digital	IKA (Staufen, Deutschland)
Zentrifuge 5424 R	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Zentrifuge 5418	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Zentrifuge CS – 6KR	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)
Zentrifuge Model 10	Corning (Corning, NY, USA)

2.1.4 Puffer, Medien und Lösungen

Agarose-Gel 1%	200 ml TAE-Puffer 2g Agarose 3 µl Ethidiumbromidlösung
TAE-Puffer (1:10)	48g Tris base 20ml EDTA pH 8,0 (0,5M) 11,42ml Essigsäure 1l ddH ₂ O
EDTA	93,06g Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat, >99%, p.a. 500ml Aq. dest. NaOH pellets
Etidiumbromidlösung 0,025%	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HPLC Gradient Grade H ₂ O	Avantor Performance Materials (Center Valley, USA)

2.2 Studienpopulation

2.2.1 Rekrutierung und Einwilligung der Patienten und Probanden

Die Proben der Patienten und Kontrollprobanden wurden im Zeitraum von 2003 bis 2018 an der Universitätsmedizin Greifswald gesammelt. Sie sind Teil der GPCN-Studie, der ProZyt-Studie sowie der SHIP-Studie und ihre Gewinnung unterliegt den jeweiligen bewilligten Ethikanträgen (III UV05/06; III UV91/03). Alle Patienten und Probanden haben der weiteren wissenschaftlichen Verwendung ihrer Proben zugestimmt.

2.2.2 Gruppe 1: Primärkohorte

Die Primärkohorte diente sowohl der Analyse von Sequenzvarianten der Primärziliengene und weiteren potenziell interessanten Genen als auch der Bestätigung bereits bekannter Risikovarianten für chronische Pankreatitis. Es lagen Sequenz-Informationen zum gesamten Genom der einzelnen Patienten und gesunden Probanden vor, die von der Centogene GmbH erstellt wurden. Die Kohorte besteht aus 51 Patienten mit idiopathischer Pankreatitis, 91 Patienten mit alkoholischer Pankreatitis sowie 89 gesunden Kontrollen. Einschlusskriterium für idiopathische Pankreatitis war die CT-morphologisch gesicherte chronische Pankreatitis mit Fibrose, Gangveränderungen und/oder Kalzifikationen. Ausschlusskriterien: dominante PRSS1-Varianten und eine alkoholische oder autoimmune Genese. Einschlusskriterien der alkoholisch-chronischen Pankreatitis: rekurrend-akute oder chronische Pankreatitis mit riskantem Alkoholkonsum gemäß AUDIT-C-Fragebogen. Von den 89 gesunden Kontrollen wurden 39 Probanden von der Centogene GmbH in Rostock zur Verfügung gestellt, zu diesen liegen keine Informationen zu Geschlecht, Alter und Raucherstatus vor. Weiter 50 Kontrollprobanden sind pankreasgesunde Blutspender mit positivem Audit-C-Score der Universitätsmedizin Greifswald, die der wissenschaftlichen Verwendung ihrer Proben zugestimmt haben. Alle Kontrollen, inklusive der folgenden aus Gruppe 2 und 3, sind übereinstimmend mit den Patientenkohorten kaukasischer Abstammung von zumeist regionaler Herkunft sowie frei von bekannten Erkrankungen des Pankreas.

2.2.3 Gruppe 2: Validierungskohorte

Die Validierungskohorte setzt sich aus 390 Patienten mit idiopathischer Pankreatitis, 299 Patienten mit alkoholisch-chronischer Pankreatitis sowie 381 gesunden Kontrollen zusammen. In dieser Kohorte wurden die anhand der Ergebnisse in der Primärkohorte ausgewählten SNPs mittels Real Time-PCR untersucht. Bei einem Teil der Probanden war

DNA in Lösung bereits vorhanden, alle weiteren Proben wurden aus Vollblut extrahiert (siehe 2.3.2).

2.2.4 Gruppe 3: Erweiterung der Genom-sequenzierten Probanden

Im Verlauf der Arbeit konnte der Bestand an Genom-sequenzierten Patienten und Probanden um 50 Patienten mit idiopathischer Pankreatitis, 34 Patienten mit idiopathischer Pankreatitis und p.N34S-Mutation sowie 215 gesunde Kontrollen erweitert werden. Die Patienten wurden durch die Centogene GmbH und die Kontrollprobanden im Rahmen der SHIP-Studie sequenziert. In der Gesamtheit von Gruppe 1 (siehe 2.2.2) und Gruppe 3 wurden bereits bekannte Risikovarianten für chronische Pankreatitis überprüft.

2.3 Methoden

2.3.1 Verarbeitung der VCF-Dateien

Die Ergebnisse der Genotypisierung der Primärkohorte sowie deren Erweiterung (s.o.) lagen im VCF-Format vor, dem für die Speicherung von Sequenzdaten üblichen Datenformat. Die VCF-Dateien wurden von der Centogene GmbH erstellt: Die Genomsequenzierung basiert auf dem Illumina-Verfahren. Die generierten Sequenzdaten werden mit dem Referenzgenom mittels BWA-Software abgeglichen und in eine BAM-Datei konvertiert. Mithilfe der Base Quality Score Recalibration (BQSR) wird die Qualität der Basenidentifikation verbessert. Zum Detektieren der Varianten verwendet Centogene den GATK HaploTypeCaller sowie freebayes und samtools. Die Dateien werden mit Annovar⁷ annotiert und mit dem Integrative Genomics Viewer v.2.38 und Alamut v.2.4.5 überprüft.

Ein entscheidender Aspekt dieser Arbeit war die Verarbeitung dieser Dateien mit Sequenzanalysetools im Betriebssystem Linux Mint in der Cinnamon-Edition. Ziel dessen war es, aus den patientenspezifischen VCF-Dateien eine Gesamtdatei zu erstellen, die lediglich die Genotyp-Informationen der Varianten inklusive der Art des Basenaustausches enthielt und in Form einer Excel-Tabelle weiterer Auswertung zugänglich war.

Zunächst wurden die VCF-Dateien komprimiert (*bgzip*-Befehl) und ein Verzeichnis von ihnen erstellt (*tabix*-Befehl), das den weiteren Zugriff auf die Dateien vereinfacht. Mit BCFtools wurden die VCF-Dateien zu einer Datei zusammengeführt und diese wiederum komprimiert und mit einem Verzeichnis versehen. Die interessierenden Genbereiche wurden ebenfalls mit BCFtools extrahiert und anschließend Informationen zum Genotyp mit VCFtools isoliert. Des Weiteren wurden die generierten Tabellen mit dem *grep*-Befehl um

die Informationen über die Art des Basenaustausches ergänzt. Die entstandene Datei konnte nun mit Excel geöffnet und analysiert werden.

2.3.2 DNA-Extraktion

Die Isolierung der DNA erfolgte aus EDTA-Vollblut mit dem Quick-DNA Miniprep Plus Kit von Zymo Research nach dem beiliegenden Protokoll des Herstellers. Das Kit basiert auf der enzymatischen Extraktion von DNA durch die Proteinase K. Diese benötigt Calcium-Ionen als stabilisierende Cofaktoren und zerkleinert in den Zellen enthaltene Proteine, v.a. die hydrophoben Anteile. Das Vollblut und die Proteinase K werden mit einem Puffer für die optimale pH-Einstellung (ca. pH=8) versetzt und bei 55°C inkubiert. [98] Weitere Konzentration der DNA erfolgt durch Zentrifugation und Filtration mit anschließender wiederholter Ethanolfällung [99].

2.3.3 Elektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um zu bestätigen, dass sich ausreichend DNA in den per Extraktion aus Vollblut gewonnenen Proben befand. Hierbei wurden 5 µl DNA mit Probenpuffer mit anionischem Farbstoff versetzt und auf ein 1% Agarose-Gel gegeben (siehe 2.1.4). Anschließend wurde für eine Dauer von 20 Minuten ein elektrisches Feld von 120 V und 400 mA angelegt, wodurch sich die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle auf den Pluspol zubewegen. Dank des im Gel enthaltenen DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid konnten die Banden unter UV-Licht mit der FluorChem SP-Kamera-System sichtbar gemacht werden. [100]

2.3.4 Genotypisierung der Validierungskohorte

Die Genotypisierung der Validierungskohorte erfolgte mittels Real-Time PCR von TaqMan SNP-Genotypisierungsassays. Bei diesen werden spezifische Nukleotid-Primer verwendet, um die zu untersuchende Sequenz zu amplifizieren. Des Weiteren enthält der Assay zwei verschiedene MGB-Sonden, die mit jeweils einem fluoreszierenden Farbstoff (FAM-Farbstoffmarkierung bzw. VIC-Farbstoffmarkierung) am 5'-Ende sowie einem nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ) am 3'-Ende versehen sind. Diese Sonden binden hochspezifisch an das interessierende Allel und werden nur von der Taqpolymerase gespalten, sofern sie daran gebunden sind. Bei der Spaltung entfernen sich Farbstoff und Quencher räumlich voneinander, wodurch der Farbstoff fluoreszieren kann und dieses Signal registriert wird. Dabei kann mithilfe der FAM- bzw. VIC-Farbstoffmarkierung

zwischen den Basen unterschieden werden, sodass eine qualitative und quantitative Messung der Probe möglich wird und somit eine Differenzierung in homozygot für Allel 1, homozygot für Allel 2 oder heterozygot für beide Allele. [101] In dieser Arbeit wurden TaqMan SNP Genotyping-Assays sowie ein TaqMan Master Mix von Thermo Fisher Scientific verwendet. Der Ansatz für eine Probe besteht aus 1 µl DNA, 2,5 µl Master Mix, 0,125 µl Assay und 1,375 µl HPLC Gradient Grade H₂O. Die Amplifizierung und Messung der Proben erfolgte mit dem Real Time-PCR System Quant Studio 7 flex von Thermo Fisher Scientific. Das Programm für Genotypisierung verwendet standardmäßig folgenden Temperaturzyklus: 60 °C Pre-Read Phase, 95 °C Hold Phase, 95 °C PCR Phase 1, 60 °C PCR Phase 2, 60 °C Post-Read Phase. Die Temperaturerwärmung bzw. -senkung erfolgt jeweils um 1,6 °C/s. Fluoreszenzdaten wurden in der Pre-Read Phase, der PCR Phase 2 und der Post-Read Phase aufgenommen.

2.3.5 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden zunächst mit Microsoft Excel verarbeitet. Als Test auf Signifikanz wurde der Exakte Test nach Fisher von GraphPad Prism v.5 verwendet, da dieser auch bei geringen Beobachtungszahlen anwendbar ist. Die Odds Ratio wurde ebenfalls mit GraphPad Prism v.5 berechnet. Die Bestimmung der Abweichung von Hardy-Weinberg Equilibrium erfolgte nach der Formel $q^2+2pq+q^2=1$ und anschließender p-Wert Bestimmung mit dem Chi Quadrat-Test von Excel.

3 Ergebnisse

3.1 Auswahl, Genotypisierung und Auswertung von Sequenzvarianten bei Patienten mit chronischer Pankreatitis

3.1.1 Charakterisierung der Primärkohorte

Die Primärkohorte besteht aus 51 Patienten mit idiopathischer Pankreatitis und 89 Kontrollprobanden (siehe 2.2.2), von denen Daten zum vollständig sequenzierten Genom vorlagen. Informationen zum Verhältnis von Alter, Geschlecht und Raucherstatus der Primärkohorte zeigt *Tabelle 1*. 50 Genom-sequenzierte Kontrollprobanden sind pankreasgesunde Blutspender, die einen positiven Audit-C Score aufweisen. Das Alter der Patienten und Kontrollen weist einen Altersunterschied von im Mittel zehn Jahren auf. Passend zum positiven Audit-C Score sind jedoch anteilig mehr Männer sowie mehr Raucher unter den Kontrollprobanden im Vergleich zu den ICP-Patienten.

Kohorteninformationen Primärkohorte		
	Idiopathische CP (n=51)	Kontrollen (n=89)
mittleres Alter	49 (13-80)	39 (24-64)*
Männlich	23 (45,1%)	45 (91,8%)*
Weiblich	28 (54,9%)	4 (8,2%)*
Raucher	25 (49,1%)	43 (86,0%)*
Ehemalige Raucher	9 (17,6%)	
Nichtraucher	9 (17,6%)	6 (12,0%)*
Raucherstatus unbekannt	8 (15,7%)	1 (2,0%)*

Tabelle 1: Informationen zu Alter, Geschlecht sowie Raucherstatus der Patienten und Kontrollprobanden in der Primärkohorte. *Zu 39 Kontrollprobanden liegen keine Daten vor (siehe Text 2.2.2).

3.1.2 Untersuchung von Kandidatengen in der Primärkohorte

Im ersten Schritt wurden bekannte Risikogene in der Primärkohorte analysiert, darunter *PRSSI* und *SPINK1*. Dies diente vor allem dazu, die Qualität der Genomsequenzierung sowie der anschließenden biomathematischen Verarbeitung der VCF-Dateien zu überprüfen. Bei letzterer wurden die VCF-Dateien der Patienten und Probanden mit Sequenzanalyse-Tools von Linux verkleinert, zu einer Datei zusammengefasst und die entsprechenden Genbereiche extrahiert (siehe 2.3.1). Da die Kohorte aus Patienten mit idiopathischer Pankreatitis besteht, bei der dominante *PRSSI*-Mutationen ein Ausschlusskriterium

darstellen, traten diese dominanten Sequenzvarianten - wie erwartet - nicht auf. Signifikant häufiger kam die *SPINK1*-Mutation p.N34S bei den ICP-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen vor ($p=0,01$). Die signifikante Häufung der p.N34S-Variante unter den ICP-Patienten stimmt mit Befunden anderer genetischer Studien überein [102]. Weitere Analysen zu bekannten Risikogenen wurden zu einem späteren Zeitpunkt im zweiten Teil der Arbeit durchgeführt (siehe 3.2), zu dem die Primärkohorte um mehr Genom-sequenzierte Patienten und Kontrollprobanden erweitert werden konnte.

Im zweiten Schritt sollten neue Risikovarianten für die chronische Pankreatitis identifiziert werden. Hierzu wurde die Auswahl an Kandidatengen in der Primärkohorte betrachtet. Es wurden –sofern möglich – Signifikanzniveaus für sowohl ein dominantes als auch ein rezessives Vererbungsmodell berechnet. Im dominanten Modell wird davon ausgegangen, dass eine heterozygote Variante mit einem klinischen Phänotyp assoziiert ist, wohingegen das rezessive Modell das Zusammentreffen von zwei veränderten Allelen erfordert. Unter den Patienten wurden signifikant häufiger auftretende Varianten und auch solche mit suggestiver Verteilung gesucht, da bei potenziell seltenen Sequenzvarianten und einer eher kleinen Primärkohorte nicht unbedingt mit statistisch signifikanten Ergebnissen zu rechnen war. Aus der Kandidatengen-Liste wurden auf diese Weise die folgenden sieben SNPs ausgewählt:

Kandidatengene			
Gen	p-Nomenklatur	c-Nomenklatur	rs-Nummer
HFE	p.S65C	c.193A>T	rs1800730
IFT74	p.V579M	c.1735G>A	rs138591335
IFT74	p.F224L	c.670T>C	rs17694549
FAT4	p.H3215Y	c.9643C>T	rs73849225
MAP2K1	-	c.1023-8C>T	rs41306345
FLII	p.F20L	c.60C>T	rs145840264
ZNF18	p.S522L	c.1568C>T	rs117755721

Tabelle 2: Übersicht über die sieben in der Primärkohorte zur Validierung ausgewählten Sequenzvarianten

Die Verteilung der ausgewählten Sequenzvarianten in der Primärkohorte ist in *Tabelle 3* dargestellt.

Primärkohorte - Genotyp: ICP (n=51), Kontr. (n=89)						Allel: ICP (n=102), Kontr. (n=178)						
Sequenz-variante	Kohorte	AA	Aa	aa	dominantes Modell		rezessives Modell		A	a	p-Wert	OR (95% CI)
					p-Wert	OR (95% CI)	p-Wert	OR (95% CI)				
p.S65C (<i>HFE</i>)	ICP	49 (96,1%)	2 (3,9%)	0	0,13	9,04 (0,43-192,2)			100 (98%)	2 (2%)	0,13	8,88 (0,42-186,9)
	Kontrollen	89 (100%)	0	0					178 (100%)	0		
p.V579M (<i>IFT74</i>)	ICP	47 (92,2%)	4 (7,8%)	0	0,02	16,96 (0,89-321,9)			98 (96,1%)	4 (3,9%)	0,02	16,31 (0,87-306,3)
	Kontrollen	89 (100%)	0	0					178 (100%)	0		
p.F224L (<i>IFT74</i>)	ICP	44 (86,3%)	7 (13,7%)	0	0,12	2,67 (0,8-8,91)			95 (93,1%)	7 (6,9%)	0,13	2,55 (0,79-8,26)
	Kontrollen	84 (93,4%)	5 (6,6%)	0					173 (97,2%)	5 (2,8%)		
p.H3215Y (<i>FAT4</i>)	ICP	41 (80,4%)	10 (19,6%)	0	0,03	3,37 (1,15-9,93)			92 (90,2%)	10 (9,8%)	0,03	3,12 (1,1-8,85)
	Kontrollen	83 (93,3%)	6 (6,7%)	0					172 (96,6%)	6 (3,4%)		
c.1023-8C>T (<i>MAP2K1</i>)	ICP	40 (78,4%)	10 (19,6%)	1 (2%)	0,04	2,78 (1,04-7,47)	1	1,76 (0,11-28,77)	90 (88,2%)	12 (11,8%)	0,06	2,5 (1,02-6,17)
	Kontrollen	81 (91%)	7 (7,9%)	1 (1,1%)					169 (94,9%)	9 (5,1%)		
p.F20L (<i>FLII</i>)	ICP	45 (88,2%)	6 (11,8%)	0	0,01	11,73 (1,37-100,5)			96 (94,1%)	6 (5,9%)	0,01	11,06 (1,31-93,28)
	Kontrollen	88 (98,9%)	1 (1,1%)	0					177 (99,4%)	1 (0,6%)		
p.S522L (<i>ZNF18</i>)	ICP	49 (96,1%)	2 (3,9%)	0	0,13	9,04 (0,43-192,2)			100 (98%)	2 (2%)	0,13	8,88 (0,42-186,9)
	Kontrollen	89 (100%)	0	0					178 (100%)	0		

Tabelle 3: Verteilung der sieben Sequenzvarianten (Genotypen links, Allelfrequenzen rechts) bei Patienten mit idiopathischer Pankreatitis und gesunden Kontrollen in der Primärkohorte. Die Berechnung des p-Wertes wurde mittels exaktem Test nach Fisher (zweiseitig) für ein dominantes Modell (Aa+aa vs. AA) sowie ein rezessives Modell (aa vs. AA+Aa) durchgeführt. AA steht hierbei für den Wildtyp, Aa für die Heterozygoten, aa für die Homozygoten der jeweiligen Sequenzvarianten: p.S65C: A=A, a=T; p.V579M: A=G, a=A; p.F224L: A=T, a=C; p.H3215Y: A=C, a=T; c.1023-8C>T: A=C, a=T; p.F20L: A=G, a=T; p.S522L: A=G, a=A

Der erste der ausgewählten Kandidaten-SNPs ist die *HFE*-Variante p.S65C/c.193A>T. Das *HFE*-Gen kodiert für das humane homöostatische Eisenregulatorprotein 1. Dieses ist ein den MHC I-Proteinen ähnliches Membranprotein, das u.a. die Eisenabsorption reguliert. Die Erbkrankheit Hämochromatose beruht auf Defekten im *HFE*-Gen. [103] Die Verteilung, den p-Wert sowie die Odds Ratio für den Genotyp und die Allelfrequenz in der Primärkohorte zeigt *Tabelle 3*. Bei Fehlen von Homozygoten wurden die Berechnungen für ein dominantes Modell durchgeführt. In der Primärkohorte konnte zwar keine signifikante Häufung des SNPs beobachtet werden, da aber unter den Kontrollprobanden nur Wildtypen waren, wurde die *HFE*-Variante als Kandidat aufgenommen.

Das Vorkommen der *IFT74*-Variante p.V579M/c.1735G>A ist ebenfalls in *Tabelle 3* dargestellt. Das Gen kodiert für das Intraflagellar Transport Protein 74, das Teil eines Multiproteinkomplexes ist und sowohl an dem Transport von Ziliarproteinen entlang axonemaler Mikrotubuli als auch an der Zilienentstehung beteiligt ist. Veränderungen im *IFT74*-Gen werden mit dem Bardet-Biedl-Syndrom, einer Ziliopathie, in Verbindung gebracht. [104] In der Primärkohorte fanden sich signifikant mehr Heterozygote unter den ICP-Patienten als unter den Kontrollprobanden ($p=0,02$). Da stets nur ein Allel betroffen war, wurde die statistische Auswertung für ein dominantes Modell durchgeführt. Aufgrund der signifikanten Häufung unter den Patienten mit chronischer Pankreatitis wurde p.V579M als Kandidat für die weitere Validierung aufgenommen.

Ebenfalls auf dem *IFT74*-Gen befindet sich die Sequenzvariante p.F224L/c.670T>C. Wie in *Tabelle 3* dargestellt, war in der Primärkohorte die Tendenz sichtbar, dass sich mehr Heterozygote unter den Patienten als unter den Kontrollen befanden. Daher wurde die Sequenzvariante zu den Kandidaten hinzugefügt, wenngleich der beobachtete Unterschied nicht statistisch signifikant war.

Zu den Kandidaten-SNPs gehört auch die *FAT4*-Variante p.H3215Y/c.9643C>T. Das Gen kodiert für das FAT Atypische Cadherin 4, das Teil der Protocadherin-Familie ist. Es reguliert Zellpolarisierung in Zilien, ein Mechanismus, der bei Defekten u.a. zur zystischen Nierenkrankheit führen kann [105]. *Tabelle 3* zeigt, dass sich in der Primärkohorte signifikant mehr Heterozygote unter den ICP-Patienten als unter den Kontrollprobanden befanden ($p=0,03$), daher wurde die *FAT4*-Variante als Kandidat zur Validierung aufgenommen.

Die intronische Variante c.1023-8C>T befindet sich im *MAP2K1*-Gen. *MAP2K1* kodiert für die Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase 1, die Schnittstelle vieler Signaltransduktionskaskaden ist und u.a. im Zellzyklus von Primärzilien eine Rolle spielt. In der Primärkohorte ist diese Variante unter den ICP-Patienten signifikant mehr vertreten als unter den gesunden Kontrollen ($p=0,04$, siehe *Tabelle 3*) und wurde somit auf die Liste der zu validierenden Sequenzvarianten gesetzt.

Das Vorkommen der *FLII*-Variante p.F20L/c.60C>T ist in *Tabelle 3* dargestellt. Sie ist Teil des *FLII*-Gens, das für das Protein Flightless-1 Homolog (Flii) kodiert. Das *FLII*-Gen wird sowohl mit dem Smith-Magenis-Syndrom als auch mit dem Ewing-Sarkom in Verbindung gebracht [106, 107]. Die Flightless-Variante kam signifikant häufiger unter den ICP-

Patienten der Primärkohorte vor ($p=0,01$) und stellte daher einen sinnvollen Kandidaten für die Validierung dar.

Zu den Kandidaten zählt ebenfalls die *ZNF18*-Variante p.S522L/c.1568C>T. Das *ZNF18*-Gen kodiert für das DNA-bindende Zink Finger Protein 18, das möglicherweise an der Transkriptionsregulation beteiligt ist. In der Primärkohorte war die Variante unter den Patienten mit chronischer Pankreatitis nicht signifikant erhöht, da sich aber unter den Kontrollprobanden keine Heterozygoten befanden, wurde p.S522L dennoch als Kandidat aufgenommen (siehe *Tabelle 3*).

In einer Subgruppenanalyse wurde anschließend überprüft, ob die Verteilung der sieben untersuchten Sequenzvarianten bei männlichen im Vergleich zu weiblichen Patienten Unterschiede zeigt, um die Frage zu beantworten, ob das Geschlecht einen Einfluss auf das Auftreten der sieben Varianten hat. Auch hierbei wurde auf statistische Signifikanz mit dem exakten Test nach Fisher geprüft und die Odds Ratio berechnet. Die Ergebnisse in der Primärkohorte waren nicht eindeutig: Bei der p.V597M-Variante (*IFT74*) gab es signifikant mehr Heterozygote unter den Männern als unter den Frauen, bei den anderen Sequenzvarianten zeigte sich ein derartiger Zusammenhang zwar nicht, allerdings war die Verteilung zwischen Männern und Frauen überwiegend unausgeglichen (siehe *Tabelle 4*). Dies galt es zum Zeitpunkt der Validierung in einer größeren Kohorte zu überprüfen (siehe 3.1.4).

Primärkohorte					
	wt	ht	hm	p-Wert	OR (95% CI)
p.S65C					
♂	23 (100%)	0	0	0,49	0,23 (0,01-4,94)
♀	26 (92,9%)	2 (7,1%)	0		
p.V579M					
♂	19 (82,6%)	4 (17,4%)	0	0,04	13,15 (0,67-258,6)
♀	28 (100%)	0	0		
p.F224L					
♂	18 (78,3%)	5 (21,7%)	0	0,22	3,61 (0,63-20,72)
♀	26 (92,9%)	2 (7,1%)	0		
p.H3215Y					
♂	20 (87%)	3 (13%)	0	0,48	0,45 (0,1-1,99)
♀	21 (75%)	7 (25%)	0		
rs41306345					
♂	17 (73,9%)	6 (26,1%)	0	0,51	1,62 (0,42-6,22)
♀	23 (82,1%)	4 (14,3%)	1 (3,6%)		
p.F20L					
♂	21 (91,3%)	2 (8,7%)	0	0,68	0,57 (0,09-3,44)
♀	24 (85,7%)	4 (14,3%)	0		
p.S522L					
♂	22 (95,7%)	1 (4,3%)	0	1	(0,07-20,78)
♀	27 (96,4%)	1 (3,6%)	0		

Tabelle 4: Verteilung der sieben untersuchten SNPs unter männlichen bzw. weiblichen ICP-Patienten der Primärkohorte. Die Untersuchung auf Signifikanz wurde mittels exaktem Test nach Fisher (zweiseitig) durchgeführt. Die Verteilung der Basenpaare für wt/ht/hm kann Tabelle 3 entnommen werden. wt= Wildtyp; ht=heterozygot; hm=homozygot.

3.1.3 Charakterisierung der Validierungskohorte

Wie unter 3.1.2 dargestellt, wurden sieben Sequenzvarianten zur Validierung ausgewählt. Für diese wurden 390 ICP-Patienten, 299 ACP-Patienten und 381 pankreasgesunde Kontrollen mittels Real Time-PCR genotypisiert und die Ergebnisse anschließend statistisch ausgewertet. Die Zusammensetzung der Validierungskohorte in Bezug auf Alter, Geschlecht und Nikotinkonsum zeigt *Tabelle 5*. Vor allem bei den ICP-Patienten und den Kontrollprobanden ist das Geschlechterverhältnis ähnlich. In der ACP-Kohorte befinden sich deutlich mehr Männer als Frauen. Die Kontrollprobanden sind insgesamt jünger als die Patienten, da es sich um Blutspender handelt, die an der Universitätsmedizin Greifswald zu einem großen Teil aus Studierenden bestehen.

Kohorteninformationen Validierungskohorte			
	Idiopathische CP (n=390)	Alkoholische CP (n=300)	Kontrollen (n=381)
mittleres Alter	40 (1-104)	49 (22-82)	21 (18-66)
Männlich	219 (56,2%)	268 (89,3%)	206 (54,1%)
Weiblich	171 (43,8%)	32 (10,6%)	175 (45,9%)
Raucher	82 (21,0%)	130 (43,3%)	220 (57,7%)
Ehemalige Raucher	43 (11,0%)	17 (5,7%)	
Nichtraucher	75 (19,3%)	5 (1,7%)	161 (42,3%)
Raucherstatus unbekannt	190 (48,7%)	148 (49,3%)	

Tabelle 5: Informationen zu Alter, Geschlecht sowie Raucherstatus der Patienten und Kontrollprobanden in der Validierungskohorte.

3.1.4 Ergebnisse der Sequenzvarianten in der Validierungskohorte

Die Gruppe der ICP-Patienten und der Kontrollprobanden ist in der Validierungskohorte um den Faktor 7,6 bzw. 4,3 größer als in der Primärkohorte, somit sind die Ergebnisse der Validierung zuverlässiger als die zuvor erzielten. Zudem wurden die Sequenzvarianten auch in einer Gruppe aus Patienten mit alkoholisch-chronischer Pankreatitis untersucht. *Tabelle 6* zeigt die Verteilung der sieben Sequenzvarianten in der Validierungskohorte.

Validierungskohorte - Genotyp					Allel								
Sequenz-variante	Kohorte	AA	Aa	aa	dominantes Modell		rezessives Modell		Kohorten-größe	A	a	p-Wert	OR (95% CI)
					p-Wert	OR (95% CI)	p-Wert	OR (95% CI)					
p.S65C (<i>HFE</i>)	ICP (n=389)	372 (95,6%)	17 (4,4%)	0	0,58	1,29 (0,62-2,7)			(n=778)	761 (97,8%)	17 (2,2%)	0,58	1,28 (0,62-2,66)
	ACP (n=299)	291 (97,3%)	8 (2,7%)	0						0,66	(0,32-1,9)		
	Kontrollen (n=380)	367 (96,6%)	13 (3,4%)	0					(n=760)	747 (98,3%)	13 (1,7%)		
p.V579M (<i>IFT74</i>)	ICP (n=390)	388 (99,5%)	2 (0,5%)	0	0,45	0,49 (0,09-2,66)			(n=780)	778 (99,7%)	2 (0,3%)	0,45	0,49 (0,09-2,66)
	ACP (n=296)	294 (99,3%)	2 (0,7%)	0						0,7	(0,12-3,52)		
	Kontrollen (n=380)	276 (99%)	4 (1%)	0					(n=760)	756 (99,5%)	4 (0,5%)		
p.F224L (<i>IFT74</i>)	ICP (n=390)	351 (90%)	38 (9,7%)	1 (0,3%)	1	1 (0,63-1,61)	0,62	0,49 (0,04-5,4)	(n=780)	740 (94,9%)	40 (5,1%)	1	0,98 (0,62-1,53)
	ACP (n=299)	264 (88,3%)	33 (11%)	2 (0,7%)						0,53	1,2 (0,74-1,95)		
	Kontrollen (n=381)	343 (90%)	36 (9,5%)	2 (0,5%)					(n=762)	722 (94,8%)	40 (5,2%)		
p.H3215Y (<i>FAT4</i>)	ICP (n=388)	333 (85,8%)	54 (13,9%)	1 (0,3%)	0,92	0,98 (0,65-1,46)	0,12	0,19 (0,02-1,67)	(n=776)	720 (92,8%)	56 (7,2%)	0,63	0,91 (0,62-1,33)
	ACP (n=297)	266 (89,6%)	30 (10,1%)	1 (0,3%)						0,13	0,69 (0,43-1,1)		
	Kontrollen (n=380)	325 (85,5%)	50 (13,2%)	5 (1,3%)					(n=760)	700 (92,1%)	60 (7,9%)		
c.1023-8C>T (<i>MAP2K1</i>)	ICP (n=390)	336 (86,1%)	51 (13,1%)	3 (0,8%)	0,23	0,78 (0,53-1,16)	0,25	6,89 (0,35-134)	(n=780)	723 (92,7%)	57 (7,3%)	0,4	0,85 (0,58-1,23)
	ACP (n=300)	248 (82,7%)	50 (16,7%)	2 (0,6%)						1	1,02 (0,68-1,52)		
	Kontrollen (n=381)	316 (82,9%)	65 (17,1%)	0					(n=697)	697 (91,5%)	65 (8,5%)		
p.F20L (<i>FLII</i>)	ICP (n=390)	358 (91,8%)	30 (7,7%)	2 (0,5%)	0,21	1,46 (0,83-2,56)	0,5	4,91 (0,23-102,7)	(n=780)	746 (95,6%)	34 (4,4%)	0,14	1,53 (0,89-2,65)
	ACP (n=299)	277 (92,6%)	20 (6,7%)	2 (0,7%)						0,43	1,3 (0,7-2,39)		
	Kontrollen (n=381)	359 (94,2%)	22 (5,8%)	0					(n=762)	740 (97,1%)	22 (2,9%)		
p.S522L (<i>ZNF18</i>)	ICP (n=389)	373 (95,9%)	16 (4,1%)	0	0,61	0,82 (0,41-1,61)			(n=778)	762 (97,9%)	16 (3,5%)	0,61	0,82 (0,42-1,61)
	ACP (n=300)	279 (93%)	21 (7%)	0						0,33	1,43 (0,76-2,72)		
	Kontrollen (n=381)	362 (95%)	19 (5%)	0					(n=762)	743 (97,5%)	19 (2,5%)		

Tabelle 6: Verteilung der sieben Sequenzvarianten (Genotypen links, Allelfrequenzen rechts) bei Patienten mit idiopathischer und alkoholischer Pankreatitis sowie gesunden Kontrollen in der Validierungskohorte. Die Berechnung des p-Wertes wurde mittels exaktem Test nach Fisher (zweiseitig) für ein dominantes Modell (Aa+aa vs. AA) sowie ein rezessives Modell (aa vs. AA+Aa) durchgeführt. AA steht hierbei für den Wildtyp, Aa für die Heterozygoten, aa für die Homozygoten der jeweiligen Sequenzvarianten: p.S65C: A=A, a=T; p.V579M: A=G, a=A; p.F224L: A=T, a=C; p.H3215Y: A=C, a=T; c.1023-8C>T: A=C, a=T; p.F20L: A=G, a=T; p.S522L: A=G, a=A

Bei der *HFE*-Variante p.S65C ließ sich die in der Primärkohorte gesehene Tendenz in der Validierungskohorte nicht bestätigen. Es gab kaum Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen, auch nicht in der Gruppe mit alkoholischer Pankreatitis. Somit scheint es sich nicht um eine Risikovariante für chronische Pankreatitis zu handeln.

Die Ergebnisse der *IFT74*-Variante p.V579M aus der Primärkohorte konnten in der Validierungskohorte nicht reproduziert werden. Die Genotypisierung ergab mehr Heterozygote bei den pankreasgesunden Kontrollen (keine Signifikanz), dies schließt das Vorliegen einer Risikovariante mit hoher Wahrscheinlichkeit aus.

Die in der Primärkohorte gesehene Tendenz, dass sich mehr Heterozygote mit der *IFT74*-Variante p.F224L unter den Patienten als unter den pankreasgesunden Kontrollen befinden, bestätigte sich nicht in der Validierung. In der Validierungskohorte scheinen Heterozygote und Homozygote annähernd gleich verteilt und auch in der ACP-Kohorte zeigen sich keine signifikanten Unterschiede – weder im dominanten noch im rezessiven Modell (siehe *Tabelle 6*). Demzufolge scheidet p.F224L als potenzielle Risikovariante aus.

Die Ergebnisse der *FAT4*-Variante p.H3215Y in der Primärkohorte konnten im Rahmen der Sequenzierung der Validierungskohorte ebenfalls nicht reproduziert werden. *Tabelle 6* zeigt, dass die Heterozygoten bei ICP-Patienten und pankreasgesunden Kontrollen ähnlich verteilt waren. Es befanden sich zudem mehr Homozygote unter den Kontrollprobanden (keine Signifikanz). In der Gruppe der ACP-Patienten waren weniger Heterozygote als unter den Kontrollen. Dementsprechend entfällt auch p.H3215Y als Risikovariante für chronische Pankreatitis.

Unter den ICP-Patienten der Validierungskohorte zeigte sich keine Häufung der intronischen *MAP2K1*-Variante c.1023-8T>C, allerdings fiel auf, dass lediglich bei Patienten mit chronischer Pankreatitis Homozygote vorkamen – nicht jedoch bei pankreasgesunden Kontrollprobanden (siehe *Tabelle 6*). Im rezessiven Modell wurde hierbei kein signifikantes Niveau erreicht, dadurch scheidet c.1023-8C>T in dieser Arbeit als Risikovariante aus. Ob die Sequenzvariante im rezessiven Modell eine mögliche Assoziation zur chronischen Pankreatitis hat, müsste in größeren Kohorten überprüft werden.

Die *FLII*-Variante p.F20L trat in der Primärkohorte signifikant häufiger unter ICP-Patienten als unter pankreasgesunden Kontrollen auf. In der Genotypisierung der Validierungskohorte bestätigte sich dies nicht. Wiederum war auffällig, dass Homozygote hier nur bei Patienten mit chronischer Pankreatitis vorkamen, nicht aber bei pankreasgesunden Kontrollen (keine Signifikanz im rezessiven Modell). Wie auch bei der eben besprochenen *MAP2K1*-Variante wäre es hier sinnvoll, das Vorkommen von Homozygoten in größeren Kohorten zu analysieren. In dieser Arbeit konnte p.F20L nicht als Risikovariante bestätigt werden.

Bei der *ZNF18*-Variante p.S522L zeigte sich in der Validierungskohorte eine ähnliche Verteilung von Heterozygoten unter ICP-Patienten und pankreasgesunden Kontrollen. Es fanden sich anteilig die meisten Heterozygoten in der ACP-Gruppe, doch auch hier war der Unterschied im dominanten Modell nicht signifikant (siehe *Tabelle 6*). Die p.S522L-Variante scheidet somit ebenfalls als Risikovariante aus.

Im Anschluss an die Sequenzierung der Validierungskohorte wurde zur Kontrolle der Qualität der Genotypisierung eine Prüfung auf Abweichung vom Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) durchgeführt (siehe *Tabelle 7*). Es liegt in der gesamten Validierungskohorte keine signifikante Abweichung vom HWE vor, dies lässt darauf schließen, dass die Genotypisierung mit hoher Wahrscheinlichkeit zuverlässig ist.

Hardy-Weinberg-Equilibrium

Gen	Sequenzvariante	AA	Aa	aa	p-Wert
HFE	p.S65C/c.193A>T	367	13	0	0,93
IFT74	p.V579M/c.1735G>A	376	4	0	0,99
IFT74	p.F224L/c.670T>C	343	36	2	0,61
FAT4	p.H3215Y/c.9643C>T	325	50	5	0,18
MAP2K1	c.1023-8C>T	316	65	0	0,19
FLII	p.F20L/c.60C>T	359	22	0	0,84
ZNF18	p.S522L/c.1568C>T	362	19	0	0,88

Tabelle 7: Berechnung der Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium: Die nach HWE erwarteten Werte wurden nach der Hardy-Weinberg-Formel ($p^2+2pq+q^2=1$) berechnet und der p-Wert mit 95% Konfidenzintervall mit dem Chi Quadrat-Test von Excel bestimmt. AA steht hierbei für den Wildtyp, Aa für die Heterozygoten, aa für die Homozygoten der jeweiligen Sequenzvarianten. Die Basenpaare können Tabelle 6 entnommen werden. HWE=Hardy-Weinberg-Equilibrium

In einer Subgruppenanalyse wurde anschließend überprüft, ob die Verteilung der sieben untersuchten Sequenzvarianten bei männlichen im Vergleich zu weiblichen Patienten Unterschiede zeigt und das Geschlecht somit einen Einfluss auf das Auftreten der Varianten hat. Es wurde wiederum auf statistische Signifikanz mit dem exakten Test nach Fisher geprüft und die Odds Ratio berechnet. Die Ergebnisse der Subgruppenanalyse in der Primärkohorte waren nicht eindeutig gewesen (siehe *Tabelle 4*). In der in Bezug auf die Anzahl an Patienten und Kontrollprobanden überlegenen Validierungskohorte zeigte sich, dass die sieben Varianten ausgeglichen auf weibliche und männliche Patienten bzw. Kontrollen verteilt sind (siehe *Tabelle 8*) und das Geschlecht somit mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen Einfluss auf die Verteilung der Sequenzvarianten hat.

Validierungskohorte					
	wt	ht	hm	p-Wert	OR (95% CI)
p.S65C					
♂	209 (95,9%)	9 (4,1%)	0	0,81	0,88 (0,33-2,33)
♀	163 (95,3%)	8 (4,7%)	0		
p.V579M					
♂	218 (99,5%)	1 (0,5%)	0	1	0,78 (0,05-12,57)
♀	170 (99,4%)	1 (0,6%)	0		
p.F224L					
♂	197 (90%)	22 (10%)	0	1	1,01 (0,52-1,97)
♀	154 (90%)	16 (9,4%)	1 (0,6%)		
p.H3215Y					
♂	187 (85,8%)	31 (14,2%)	0	1	1,01 (0,57-1,79)
♀	146 (85,9%)	23 (13,5%)	1 (0,6%)		
rs41306345					
♂	189 (86,3%)	29 (13,2%)	1 (0,5%)	1	0,97 (0,55-1,73)
♀	147 (85,9%)	22 (12,9%)	2 (1,2%)		
p.F20L					
♂	203 (92,7%)	15 (6,8%)	1 (0,5%)	0,46	(0,37-1,58)
♀	155 (90,6%)	15 (8,8%)	1 (0,6%)		
p.S522L					
♂	209 (95,9%)	9 (4,1%)	0	1	1,01 (0,37-2,77)
♀	164 (95,9%)	7 (4,1%)	0		

Tabelle 8: Verteilung der sieben untersuchten SNPs unter männlichen bzw. weiblichen ICP-Patienten der Validierungskohorte. Die Untersuchung auf Signifikanz wurde mittels exaktem Test nach Fisher (zweiseitig) durchgeführt. Die Verteilung der Basenpaare für wt/ht/hm kann Tabelle 6 entnommen werden. wt= Wildtyp; ht=heterozygot; hm=homozygot

In dieser Arbeit konnten keine neuen Risikovarianten für chronische Pankreatitis identifiziert werden. Die Ergebnisse der Kandidatengen-Analyse in der Primärkohorte ließen sich in der größeren Validierungskohorte nicht bestätigen. Die zeigt auch, dass die Kohortengröße der Primärkohorte nicht geeignet ist, um das Auftreten von seltenen Varianten zuverlässig zu analysieren.

3.2 Untersuchung bekannter Risikogene bei Genom-sequenzierten Patienten mit chronischer Pankreatitis

3.2.1 Charakterisierung der Kohorte und Überblick über die untersuchten Gene

Es wurden die Häufigkeiten bekannter Risikovarianten bei Patienten mit chronischer Pankreatitis und gesunden Kontrollen untersucht. Dazu wurden Gruppe 1 und Gruppe 3 (siehe 2.2.2 und 2.2.4) zu einer Kohorte verbunden. Diese setzt sich somit aus 92 ICP-Patienten, 91 ACP-Patienten, 43 ICP-Patienten mit der *SPINK1*-Mutation p.N34S (im Folgenden als N34S-Patienten bezeichnet) und 304 pankreasgesunden Kontrollen zusammen. *Tabelle 9* zeigt, dass Patienten und Kontrollen in Bezug auf Alter und Geschlecht recht ausgeglichen sind. Eine Ausnahme stellen hierbei die ACP-Patienten dar, bei denen deutlich mehr Männer als Frauen vertreten sind. Des Weiteren sind die N34S-Patienten in dieser Gruppe etwas jünger als das restliche Kollektiv. *Tabelle 9* erfasst außerdem den Raucherstatus der Patienten und Kontrollprobanden. Im Folgenden sind die Ergebnisse der gesuchten Risikovarianten aus den Genen *PRSS1*, *SPINK1*, *CTRC*, *CFTR* und *CPA1* dargestellt. Einen Überblick über die untersuchten Sequenzvarianten aus diesen Genen bietet *Tabelle 10*. Bei den *PRSS1*-, *SPINK1*-, *CTRC*- und *CPA1*-Varianten handelt es sich um eine Auswahl aus der Datenbank pancreasgenetics.org [108].

Kohorteninformationen

	Idiopathische CP (n=92)	Alkoholische CP (n=91)	N34S (n=43)	Kontrollen (n=304)
mittleres Alter	40 (1-80)	48 (28-76)	24 (4-82)	56 (24-70)*
Männlich	48 (52,2%)	81 (89,0%)	17 (39,5%)	139 (52,7%)*
Weiblich	44 (47,8%)	10 (11,0%)	26 (60,5%)	125 (47,3%)*
Raucher	40 (43,5%)	53 (58,2%)	11 (25,6%)	71 (26,7%)*
Ehemalige Raucher	17 (18,5%)	12 (13,2%)	3 (7,0%)	88 (33,1%)*
Nichtraucher	7 (7,6%)	2 (2,2%)	4 (9,3%)	104 (39,1%)*
Raucherstatus unbekannt	28 (30,4%)	24 (27,4%)	25 (58,1%)	3 (1,1%)*

Tabelle 9: Informationen zu Alter, Geschlecht und Raucherstatus der Genom-sequenzierten Patienten und Kontrollprobanden. *Zu 39 Kontrollprobanden liegen keine Daten vor. (siehe Text 2.2.2)

bekannte Risikovarianten

Variante	c-Nomenklatur	Variante	c-Nomenklatur	Variante	c-Nomenklatur
PRSS1		p.W55X	c.164G>A	p.D1152H	c.3454G>C
p.D162D	c.486G>T	p.G60G	c.180C>T	p.S1235R	c.3705T>G
p.K170E	c.508A>G	p.G61R	c.181G>A	CPA1	
p.N246N	c.738C>T	p.A73T	c.217G>A	p.L5P	c.14T>C
SPINK1		p.W113X	c.338G>A	p.R27P	c.80G>C
p.M1R	c.2T>G	p.C155Y	c.464G>A	p.E100K	c.298G>A
p.M1T	c.2T>C	p.Q178R	c.533A>G	p.D133H	c.397G>C
p.L14P	c.41T>C	p.G214R	c.640G>A	p.T164M	c.491C>T
p.L14R	c.41T>G	p.G217S	c.649G>A	p.G225S	c.673G>A
p.N34S	c.101A>G	p.G217R	c.649G>A	p.T229M	c.686C>T
p.K41N	c.123G>C	p.L220R	c.659T>G	p.K238M	c.713A>T
p.G48E	c.143G>A	p.V235I	c.703G>A	p.R240Q	c.719G>A
p.D50E	c.150T>G	p.S239C	c.716C>G	p.V251M	c.751G>A
p.Y54H	c.160T>C	p.P249L	c.746C>T	p.P253R	c.788C>G
p.P55S	c.163C>T	p.V250E	c.749T>A	p.N256K	c.768C>G
p.N64D	c.190A>G	p.R254W	c.760C>T	p.P270R	c.809C>G
p.R65Q	c.194G>A	CFTR		p.C271R	c.811T>C
-	c.914+2T>C	p.R31C	c.91C>T	p.G277S	c.829G>A
p.K66N	c.198A>C	p.R74Q	c.221G>A	p.A280D	c.839C>A
p.R67C	c.200G>A	p.R75Q	c.224G>A	p.S282P	c.844T>C
p.R67H	c.206C>T	p.R117H	c.350G>A	p.E283K	c.847G>A
p.T69I	c.236G>T	p.R347P	c.1040G>C	p.Y308H	c.922T>C
p.C79F	c.236G>T	p.M348V	c.1042A>G	p.Y314C	c.941A>G
CTRC		p.G576A	c.1727G>C	p.G362E	c.1085G>A
p.R29G	c.85C>G	p.R668C	c.2002G>T	p.K374E	c.1120A>G
p.R29Q	c.86G>A	p.V754M	c.2260G>A	p.S376P	c.1126T>C
p.G32V	c.95G>T	p.L967S	c.2900C>T	p.R382W	c.1144C>T
p.Q44Q	c.132G>A	p.L997F	c.2991G>T		
p.Q48R	c.143A>G	p.A1087P	c.3259G>C		

Tabelle 10: Übersicht der in der Kohorte untersuchten bekannten Risikovarianten für chronische Pankreatitis aus dem *PRSS1*-, *SPINK1*-, *CTRC*-, *CFTR*- und *CPA1*-Gen

3.2.2 PRSS1

Zunächst wurde das Vorkommen von pathogenen Sequenzvarianten im Risikogen *PRSS1* untersucht. Unter den Patienten mit idiopathischer Pankreatitis waren keine der dominanten *PRSS1*-Varianten aus den Exons 2 und 3, wie z.B. p.N29I und p.R122H, zu erwarten. Diese zählen zu den Ausschlusskriterien für die Klassifikation als idiopathisch-chronische Pankreatitis und gehören in diesem Projekt zur genetischen Diagnostik jedes neu erfassten Patienten. Auch weitere bekannte pathogene Varianten in den Exons 4 und 5 (siehe *Tabelle 10*) kamen bei den Patienten mit chronischer Pankreatitis oder den pankreasgesunden Kontrollen nicht vor.

3.2.3 SPINK1

Tabelle 10 zeigt die in der Kohorte untersuchten *SPINK1*-Risikovarianten, darunter die häufigste p.N34S-Variante. Im Folgenden wurde zunächst das Vorkommen der *SPINK1*-Variante p.N34S/c.101A>G in der Gruppe der ACP-Patienten analysiert. Die Verteilung des

SNPs wurde lediglich bei ACP-Patienten im Vergleich zu pankreasgesunden Kontrollen überprüft, da in der Gesamtheit der ICP-Patienten diejenigen mit p.N34S-Mutation bereits als eigenständige Gruppe isoliert wurden. Wie *Tabelle 11* zeigt, kam die p.N34S-Variante im dominanten Modell signifikant häufiger unter Patienten mit alkoholisch-chronischer Pankreatitis im Vergleich zu gesunden Kontrollen vor (p=0,006).

p.N34S					
A					
Kohorte	Genotyp			p-Wert	OR (95% CI)
	TT	TC	CC		
Alkoholische CP (n = 91)	85 (93,4%)	6 (6,6%)	0	0,006	7,08 (1,73-28,92)
Kontrollen (n=304)	301 (99%)	3 (1%)	0		
dominantes Modell					
B					
Kohorte	Allel		p-Wert	OR (95% CI)	
	T	C			
Alkoholische CP (n = 182)	176 (96,7%)	6 (3,3%)	0,006	6,88 (1,7-27,78)	
Kontrollen (n=608)	605 (99,5%)	3 (0,5%)			

Tabelle 11: Verteilung der *SPINK1*-Variante p.N34S (Genotypen in Tabelle 11A, Allelfrequenzen in Tabelle 11B) bei Patienten mit alkoholischer Pankreatitis und gesunden Kontrollen. Die Berechnungen wurden mittels exaktem Test nach Fisher (zweiseitig) für ein dominantes Modell (TC+CC vs. TT) durchgeführt.

Zum Ausschluss von Fehlern bei der Genotypisierung wurde auch in dieser Kohorte für die Sequenzvariante p.N34S eine Abweichung vom Hardy-Weinberg Equilibrium in der Kontrollgruppe untersucht. *Tabelle 12* zeigt, dass keine signifikante Abweichung vom HWE vorliegt, dies schließt einen Genotypisierungsfehler im Rahmen des Konfidenzintervalls aus.

Hardy-Weinberg-Equilibrium

Gen	Sequenzvariante	AA	Aa	aa	p-Wert
SPINK1	c.101A>G	301	3	0	1,00

Tabelle 12: Berechnung der Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium in der Kontrollgruppe: Die nach HWE erwarteten Werte wurden mit der Hardy-Weinberg-Formel ($p^2+2pq+q^2=1$) berechnet und der p-Wert mit 95% Konfidenzintervall mit dem Chi Quadrat-Test mithilfe von Excel bestimmt. AA steht hierbei für den Wildtyp, Aa für die Heterozygoten, aa für die Homozygoten der jeweiligen Sequenzvarianten. Die Basenpaare können der Tabelle 11 entnommen werden. HWE=Hardy-Weinberg-Equilibrium

Außerdem kamen in der Genom-sequenzierten Kohorte die bekannten *SPINK1*-Varianten p.P55S/c.163C>T und c.194+2T>C vor (siehe *Tabelle 13*). Aufgrund der geringen Beobachtungszahlen wurden an dieser Stelle keine statistischen Berechnungen durchgeführt.

<i>SPINK1</i> -Varianten				
Variante	ACP (n=91)	ICP (n=92)	N34S (=43)	Kontrollen (n=304)
p.P55S/c.163C>T	1	1	0	4
c.194+2T>C	0	0	1	1

Table 13: Verteilung der *SPINK1*-Varianten p.P55S/c.163C>T und c.194+2T>C bei Patienten mit alkoholischer und idiopathischer Pankreatitis, N34S-Patienten sowie pankreasgesunden Kontrollen

3.2.4 CTRC

Im Folgenden sind die Ergebnisse aus dem *CTRC*-Gen dargestellt. *Table 10* dokumentiert die untersuchten *CTRC*-Risikovarianten. Zu den in der Literatur beschriebenen Risikovarianten gehört die *CTRC*-Variante p.G60G, bei der ein C>T-Austausch vorliegt. Die Sequenzvariante kam im rezessiven Modell signifikant häufiger bei den ICP-Patienten vor ($p=0,02$) und schien auch in der ACP-Gruppe gehäuft aufzutreten (keine Signifikanz, $p=0,05$). Bei den N34S-Patienten kam die Variante sowohl im dominanten als auch im rezessiven Modell signifikant häufiger vor ($p=0,005$ bzw. $p<0,0001$). Die Verteilung, die p-Werte und die Odds Ratios zeigt *Table 14*.

p.G60G							
A Kohorte	Genotyp			dominantes Modell		rezessives Modell	
	CC	CT	TT	p-Wert	OR (95% CI)	p-Wert	OR (95% CI)
Idiopathische CP (n = 92)	65 (70,7%)	22 (23,9%)	5 (5,4%)	0,27	1,36 (0,81-2,3)	0,02	5,77 (1,35-24,62)
Alkoholische CP (n = 91)	62 (68,1%)	25 (27,5%)	4 (4,4%)	0,13	1,54 (0,92-2,57)	0,05	4,61 (1,01-21,01)
N34S (n = 43)	24 (55,8%)	11 (25,6%)	8 (18,6%)	0,005	2,6 (1,35-5,02)	<0,0001	22,93 (5,81-90,49)
Kontrollen (n = 304)	233 (76,6%)	68 (22,4%)	3 (1%)				

B				
Kohorte	Allel		p-Wert	OR (95% CI)
	C	T		
Idiopathische CP (n = 184)	152 (82,6%)	32 (17,4%)	0,08	1,52 (0,97-2,39)
Alkoholische CP (n = 182)	149 (81,9%)	33 (18,1%)	0,047	1,6 (1,02-2,5)
N34S (n = 86)	59 (68,6%)	27 (31,4%)	<0,0001	7,64 (4,28-13,62)
Kontrollen (n = 608)	534 (87,8%)	74 (12,2%)		

Table 14: Verteilung der *CTRC*-Variante p.G60G (Genotypen in *Table 14A*, Allelfrequenzen in *Table 14B*) bei Patienten mit idiopathischer Pankreatitis, alkoholischer Pankreatitis und idiopathischer Pankreatitis bei

bekannter p.N34S-Mutation in Gegenüberstellung mit gesunden Kontrollen. Die Berechnungen wurden mittels exaktem Test nach Fisher (zweiseitig) für ein dominantes Modell (CT+TT vs. CC) sowie ein rezessives Modell (TT vs. CC+CT) durchgeführt.

Zum Ausschluss von Genotypisierungsfehlern wurde auch in dieser Kohorte für die Sequenzvariante p.G60G die Abweichung vom Hardy-Weinberg Equilibrium in der Kontrollgruppe bestimmt. Bei der p.G60G-Variante liegt keine signifikante Abweichung vom HWE vor, dies schließt einen Fehler bei der Genotypisierung im Rahmen des Konfidenzintervalls mit hoher Wahrscheinlichkeit aus (siehe *Tabelle 15*).

Hardy-Weinberg-Equilibrium

Gen	Sequenzvariante	AA	Aa	aa	p-Wert
CTRC	c.180C>A	233	68	3	0,71

Tabelle 15: Berechnung der Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium in der Kontrollgruppe: Die nach HWE erwarteten Werte wurden mit der Hardy-Weinberg-Formel ($p^2+2pq+q^2=1$) berechnet und der p-Wert mit 95% Konfidenzintervall mit dem Chi Quadrat-Test mithilfe von Excel bestimmt. AA steht hierbei für den Wildtyp, Aa für die Heterozygoten, aa für die Homozygoten der jeweiligen Sequenzvarianten. Die Basenpaare können der Tabelle 14 entnommen werden. HWE=Hardy-Weinberg-Equilibrium

Die Subgruppenanalyse der p.G60G-Variante zeigte keine signifikanten Unterschiede der Verteilung zwischen männlichen bzw. weiblichen Patienten (siehe *Tabelle 16*). Dies spricht dafür, dass das Geschlecht beim Vorkommen dieser Sequenzvariante keine Rolle spielt.

p.G60G					
ICP	wt	ht	hm	p-Wert	OR (95% CI)
♂	32 (66,7%)	13 (27,1%)	3 (6,2%)	0,49	1,5 (0,6-3,72)
♀	33 (75%)	9 (20,5%)	2 (4,5%)		
N34S					
♂	9 (52,9%)	5 (29,4%)	3 (17,7%)	1	1,21 (0,35-4,15)
♀	15 (57,7%)	6 (23,1%)	5 (19,2%)		

Tabelle 16: Verteilung des p.G60G-SNPs unter männlichen bzw. weiblichen ICP-Patienten sowie ICP-Patienten mit p.N34S-Mutation. Die Untersuchung auf Signifikanz wurde mittels exaktem Test nach Fisher (zweiseitig) durchgeführt. Die Basenpaare für wt/ht/hm können Tabelle 14 entnommen werden. wt= Wildtyp; ht=heterozygot; hm=homozygot

Abgesehen von p.G60G wurde lediglich die *CTRC*-Variante p.R254W/c.760C>T in der Kohorte gefunden (siehe *Tabelle 17*). Sie kam in allen Gruppen vor (ACP, ICP, N34S und pankreasgesunde Kontrollen), da jedoch auch hierbei die Beobachtungszahlen sehr klein waren, wurde an dieser Stelle keine statistische Berechnung durchgeführt.

CTRC-Variante				
Variante	ACP (n=91)	ICP (n=92)	N34S (n=43)	Kontrollen (n=304)
p.R254W/c.760C>T	1	1	1	3

Tabelle 17: Verteilung der *CTRC*-Variante p.R254W/c.760C>T bei Patienten mit alkoholischer und idiopathischer Pankreatitis, N34S-Patienten und pankreasgesunden Kontrollen

3.2.5 CFTR

Tabelle 10 zeigt die unter den Genom-sequenzierten Patienten und gesunden Kontrollen untersuchten *CFTR*-Varianten. Bei den Mutationen handelt es sich um eine Auswahl bekannter Pankreatitis-assoziiierter Varianten, da es eine sehr große Anzahl an Mutationen gibt, die mit zystischer Fibrose assoziiert sind und potenziell auch als Risikovarianten für die chronische Pankreatitis infrage kommen. Diese konnten jedoch nicht alle im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden. Das Vorkommen der *CFTR*-Varianten unter den Patienten und pankreasgesunden Kontrollen zeigt *Tabelle 18*. Anzumerken ist, dass bei keinem der Individuen eine komplexe Heterozygotie vorlag, d.h. keine Kombination aus zwei verschiedenen *CFTR*-Mutationen.

CFTR -Varianten										
Variante	Kontrollen (n=304)	ICP (n=92)	p-Wert	OR (95% CI)	ACP (n=91)	p-Wert	OR (95% CI)	N34S (n=43)	p-Wert	OR (95% CI)
p.R31C	1	0	1	1,09 (0,04-27,1)	0	1	1,11 (0,04-27,39)	0	1	2,33 (0,09-58,04)
p.R75Q	18	4	0,8	0,72 (0,24-2,19)	6	0,8	1,12 (0,43-2,92)	0	0,14	0,18 (0,01-3,01)
p.R117H	2	0	1	0,65 (0,3-13,76)	0	1	0,66 (0,03-13,91)	0	1	1,39 (0,07-29,48)
p.R347P	1	0	1	1,09 (0,04-27,1)	0	1	1,11 (0,04-27,39)	0	1	2,33 (0,09-58,04)
p.G576A	6	2	1	1,1 (0,22-5,57)	1	1	0,55 (0,07-4,65)	1	1	1,18 (0,14-10,07)
p.R668C	7	2	1	0,94 (0,19-4,62)	1	0,69	0,47 (0,06-3,84)	1	1	1,01 (0,12-8,42)
p.V754M	1	0	1	1,09 (0,04-27,1)	0	1	1,11 (0,04-27,39)	0	1	2,33 (0,09-58,04)
p.L997F	2	2	0,23	3,36 (0,47-24,17)	1	0,55	1,68 (0,15-18,73)	0	1	1,39 (0,07-29,48)
p.D1152H	0	1	0,23	9,98 (0,4-247,4)	0	-	-	0	-	-

Tabelle 18: Übersicht über die Verteilung der gefundenen *CFTR*-Varianten (ausschließlich heterozygot mutierte) bei Patienten mit alkoholischer und idiopathischer Pankreatitis sowie pankreasgesunden Kontrollen

3.2.6 CPA1

Das *CPA1*-Gen schließt die Liste der untersuchten Risikogene für chronische Pankreatitis ab. Es liegt auf Chromosom 7q32.2 und kodiert für die im Pankreas exprimierte Carboxypeptidase A. *Tabelle 10* zeigt die in der Genom-sequenzierten Kohorte untersuchten *CPA1*-Risikovarianten. Unter den Patienten mit chronischer Pankreatitis wurde lediglich die *CPA1*-Variante p.E283K/c.847G>A entdeckt (siehe *Tabelle 19*). Diese kam einmal in der Gruppe der ICP-Patienten vor, nicht jedoch bei pankreasgesunden Kontrollen sowie ACP- und N34S-Patienten.

<i>CPA1</i> -Variante				
Variante	ACP (n=91)	ICP (n=92)	N34S (n=43)	Kontrollen (n=304)
p.E283K/c.847G>A	0	1	0	0

Tabelle 19: Verteilung der *CPA1*-Variante p.E283K/c.847G>A bei Patienten mit alkoholischer und idiopathischer Pankreatitis sowie pankreasgesunden Kontrollen

3.2.7 Kombiniertes Auftreten von Risikovarianten für chronische Pankreatitis

Abschließend wurde das Vorkommen von mehreren Risikovarianten für chronische Pankreatitis in einem Individuum in der Kohorte der Genom-sequenzierten Patienten und Probanden untersucht. Dabei wurde nach komplex Heterozygoten mit zwei unterschiedlichen Mutationen im selben Gen sowie trans-Heterozygoten mit mindestens zwei Mutationen in verschiedenen Risikogenen für chronische Pankreatitis gesucht.

Trans- und komplex-heterozygote Merkmalsträger

Variante 1		Variante 2	Genkombination	ICP	ACP	N34S	Kontrollen
p.G60G (<i>ht</i>)	+	p.R75Q (<i>ht</i>)	CTRC/CFTR	2	2	0	4
p.G60G (<i>ht</i>)	+	p.G576A/p.R668C (<i>ht</i>)	CTRC/CFTR	1	1	0	0
p.G60G (<i>ht</i>)	+	p.L997F (<i>ht</i>)	CTRC/CFTR	1	0	0	0
p.G60G (<i>ht</i>)	+	p.D1152H (<i>ht</i>)	CTRC/CFTR	1	0	0	0
p.G60G (<i>ht</i>)	+	p.N34S (<i>ht</i>)	CTRC/SPINK1	-	1	11	0
p.G60G (<i>hm</i>)	+	p.N34S (<i>ht</i>)	CTRC/SPINK1	-	0	8	0
p.G60G (<i>ht</i>)	+	p.P55S (<i>ht</i>)	CTRC/SPINK1	1	0	0	1
p.R254W (<i>ht</i>)	+	p.N34S (<i>ht</i>)	CTRC/SPINK1	-	0	1	0
p.R75Q (<i>ht</i>)	+	p.N34S (<i>ht</i>)	CFTR/SPINK1	-	1	0	0
p.G576A/p.R668C (<i>ht</i>)	+	p.N34S (<i>ht</i>)	CFTR/SPINK1	-	0	1	0
p.G576A/p.R668C (<i>ht</i>)	+	p.P55S (<i>ht</i>)	CFTR/SPINK1	0	0	0	1
p.G60G (<i>ht</i>)	+	p.R254W (<i>ht</i>)	CTRC/CTRC	0	0	0	1
p.N34S (<i>ht</i>)	+	c.194+2T>C (<i>ht</i>)	SPINK1/SPINK1	-	0	1	0

Tabelle 20: Darstellung trans- und komplex-heterozygoter Merkmalsträger bei Patienten mit idiopathisch-chronischer (ICP), alkoholisch-chronischer Pankreatitis (ACP) und ICP-Patienten mit p.N34S-Mutation (N34S) sowie pankreasgesunden Kontrollprobanden (Kontrollen). Die statistisch signifikanten Ergebnisse (p.G60G bei N34S-Patienten) sind fett gedruckt, genauere Erläuterung siehe 3.2.4 und Tabelle 14. Die statistische Auswertung der CTRC/CFTR-Transheterozygoten zeigt Tabelle 21.

Bei den Patienten mit idiopathisch-chronischer Pankreatitis wurden vier Individuen mit kombinierten Varianten aus dem *CTRC*- und *CFTR*-Gen und ein Patient mit Varianten im *CTRC*- und *SPINK1*-Gen identifiziert. Dabei lag stets die p.G60G-Variante als *CTRC*-Mutation vor (siehe *Tabelle 20*).

Unter den Patienten mit alkoholisch-chronischer Pankreatitis gab es drei Patienten mit *CTRC/CFTR*-Kombination und einen Patienten mit *CTRC/SPINK1*-Kombination, wobei auch hier p.G60G die *CTRC*-Risikovariante darstellte. Außerdem fand sich ein Patient mit Varianten im *CFTR*- und *SPINK1*-Gen, hierbei war jedoch p.R75Q die *CTRC*-Variante (siehe *Tabelle 20*).

Tabelle 20 zeigt, dass unter den N34S-Patienten viele trans-Heterozygote vorkamen. Ein Patient war komplex-heterozygot für zwei *SPINK1*-Mutationen. Elf Patienten waren sowohl heterozygot für die p.N34S-Variante als auch die p.G60G-Variante. Bei acht Patienten gab es eine Kombination aus der p.N34S-Variante und dem homozygoten Vorliegen der p.G60G-Variante. Die darauf bezogenen statistischen Berechnungen wurden bereits im Kapitel 3.2.4 beschrieben. Des Weiteren traten *SPINK1/CFTR*- und *SPINK1/CTRC*-Kombinationen bei jeweils einem N34S-Patienten auf, wobei p.R254W hier die beteiligte *CTRC*-Variante darstellte.

Unter den pankreasgesunden Kontrollprobanden fanden sich ebenfalls einige trans-Heterozygote. Es gab vier Probanden mit *CTRC/CFTR*-Kombination, einen Probanden mit *CTRC/SPINK1*-Kombination sowie ein Individuum mit Varianten aus dem *SPINK1*- und *CFTR*-Gen. Außerdem wurde ein komplex Heterozygoter für *CTRC* identifiziert (siehe *Tabelle 20*).

Tabelle 21 zeigt, dass unter den Patienten mit idiopathisch-chronischer Pankreatitis signifikant mehr trans-Heterozygote mit *CTRC/CFTR*-Kombinationen vorkamen als unter pankreasgesunden Kontrollprobanden ($p=0,03$).

Kohorte	CTRC/CFTR	p-Wert	OR (95% CI)
ICP (n=92)	5 (5,4%)	0,03	4,31 (1,13-16,41)
Kontrollen (n=304)	4 (1,3%)		

Tabelle 21: Verteilung von trans-heterozygoten *CTRC/CFTR*-Mutationsträgern bei ICP-Patienten im Vergleich zu pankreasgesunden Kontrollen. Die Berechnungen wurden mittels exaktem Test nach Fisher (zweiseitig) durchgeführt.

3.2.8 Zusammenfassung

Im zweiten Abschnitt des Ergebnisteils wurde das Vorkommen bekannter Risikovarianten aus dem *SPINK1*-, *CTRC*-, *CFTR*- und *CPAI*-Gen nachgewiesen. Die *SPINK1*-Variante p.N34S konnte als Risikovariante für alkoholisch-chronische Pankreatitis mit signifikantem Ergebnis ($p=0,006$) bestätigt werden. Die häufigste Risikovariante für chronische Pankreatitis, p.G60G aus dem *CTRC*-Gen, findet sich auch in dieser Kohorte signifikant häufiger unter den Patienten mit chronischer Pankreatitis als unter pankreasgesunden Kontrollprobanden. Für die ACP-Patienten ließ sich dieser Zusammenhang in dieser Arbeit nicht statistisch signifikant nachweisen. Bei den ICP-Patienten wurde jedoch ein Signifikanzniveau von $p=0,02$ erreicht. Hervorzuheben sind die signifikanten Ergebnisse in der N34S-Kohorte, die zeigen, dass das kombinierte Vorliegen einer p.N34S-Mutation mit einer sowohl heterozygoten p.G60G-Variante als auch einer homozygoten p.G60G-Variante einen Risikofaktor für die chronische Pankreatitis darstellt ($p=0,005$ bzw. $p<0,0001$).

4 Diskussion

In den letzten 25 Jahren wurden große Fortschritte bei der Aufklärung von Risikofaktoren für die chronische Pankreatitis gemacht. Die Erforschung des genetischen Hintergrundes erreichte 1996 mit der Identifikation des *PRSSI*-Gens als Risikolocus einen Meilenstein [30]. Seitdem wurden einige weitere Risikogene- und Varianten entdeckt [34, 35, 51, 59]. Die Genetik der chronischen Pankreatitis ist bisher jedoch noch nicht ausreichend verstanden, daher erfolgte in dieser Arbeit in einer Kohorte von Patienten mit idiopathischer und alkoholisch-chronischer Pankreatitis anhand von Genomdaten die Suche nach weiteren Risikogenen und die Analyse von Synergismen bekannter Risikovarianten.

4.1 Die Suche nach neuen Risikovarianten für chronische Pankreatitis:

MAP2K1 und *FLII*

Aus einer Liste mit Genen, u.a. aus dem Bereich der Proteasen, des Eisenstoffwechsels, des Fettsäurestoffwechsels, des Immunsystems sowie der Primärzilien, wurden mithilfe der Genomdaten der Primärkohorte die Varianten mit höchster Prävalenz unter Patienten mit idiopathisch-chronischer Pankreatitis ausgewählt. Zu den vielversprechendsten Kandidaten gehörten sieben Varianten aus Genen im Zusammenhang mit dem Eisenstoffwechsel, den Primärziliengen, dem Immunsystem und der Transkriptionsregulation: Das *HFE*-Gen kodiert für das humane homöostatische Eisenregulatorprotein 1, Mutationen in diesem Gen sind mit der Hämochromatose assoziiert [103]. Das *IFT74*-, *FAT4*- sowie das *MAP2K1*-Gen sind am intraflagellaren Transport, der Polarität und der Signaltransduktion in Primärzilien beteiligt [109–111]. Das *FLII*-Gen kodiert für das Protein Flightless-1 Homolog (Flii), das u.a. die Transkription und Inflammation beeinflusst [112]. Auf dem *ZNF18*-Gen basiert der Transkriptionsfaktor Zink Finger Protein 18 [113].

Von den sieben analysierten Sequenzvarianten kamen in der Primärkohorte vier signifikant häufiger unter den Patienten vor (p.V579M [*IFT74*], p.H3215Y [*FAT4*], c.1023-8C>T [*MAP2K1*], p.F20L [*FLII*]), bei den anderen drei Varianten wurde ohne Erreichen des Signifikanzniveaus eine ähnliche Tendenz festgestellt (p.S65C [*HFE*], p.F224L [*IFT74*], p.S522L [*ZNF18*]). In der größeren Validierungskohorte ließen sich diese Ergebnisse nicht reproduzieren, keine der sieben Sequenzvarianten war signifikant mit chronischer Pankreatitis assoziiert. Ein möglicher Grund für diese Diskrepanz ist, dass die Primärkohorte (n=51) für die zuverlässige Vorhersage der Verteilung der Sequenzvarianten zu klein war,

besonders da sich die bekannten Allelfrequenzen der ausgewählten Varianten in der allgemeinen Bevölkerung lediglich auf 0,008 bis 0,086 belaufen [114]. Hierbei ist untypisch, dass in der kleineren Kohorte signifikante Ergebnisse erzielt wurden. In der Regel gelingt es besonders in kleinen Kohorten nicht, einen statistischen Zusammenhang aufzuzeigen, der anschließend in einer größeren Population nachgewiesen werden kann. [115] Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Primärkohorte nicht ausreichend repräsentativ für die Gesamtheit der Patienten mit idiopathisch-chronischer Pankreatitis war, wodurch es zu falsch-positiven Ergebnissen bei der Auswahl der Sequenzvarianten kam. Im Vergleich zu anderen erfolgreicherer Studien zur chronischen Pankreatitis, die ebenfalls mit Next Generation Sequencing-Technologien arbeiteten, war die hier verwendete Screening-Kohorte (n=51) 13- bis 80-fach kleiner. Zudem handelte es sich bei den Studien, die u.a. den *CLDN2-MORC4*- und den *CTRB1-CTRB2*-Risikolocus identifizierten, um genomweite Assoziationsstudien, bei denen über Linkage-Analysen entweder einer bereits bekannten Variante oder einem Phänotyp neue Sequenzvarianten zugeordnet wurden. [52, 93, 97, 116] Im Gegensatz dazu wurde bei dieser Arbeit mit einem Kandidatengen-Ansatz gearbeitet, der die Zahl der möglichen Varianten im Gegensatz zu GWAS-Ansätzen stark eingrenzt.

Obwohl bei den sieben Sequenzvarianten in der Validierung keine statistische Signifikanz erreicht und somit keine Risikovariante bestätigt wurde, fiel auf, dass bei zwei Varianten (c.1023-8C>T [*MAP2K1*] und p.F20L [*FLII*]) auch in der Validierungskohorte lediglich das Referenzallel unter den gesunden Kontrollprobanden vorkam und der jeweilige Basenaustausch nur bei Patienten mit chronischer Pankreatitis nachgewiesen werden konnte. Die berechneten HWE von 0,19 bzw. 0,84 sprechen gegen einen Fehler bei der Genotypisierung. Die Zusammenfassung der ICP- und ACP-Patienten zu einer Kohorte von CP-Patienten (n=690 bzw. 689) ergab Odds Ratios von 6 bzw. 5, ohne im rezessiven Modell statistische Signifikanz zu erreichen (c.1023-8C>T: p=0,17, OR=6,12 [0,34-111,1]; p.F20L: p=0,3, OR=5,01 [0,27-93,35]). Es wäre interessant, in weiteren Kohorten zu überprüfen, ob sich diese Beobachtung bestätigt, da beide Gene von potenzieller Relevanz für die chronische Pankreatitis sind, wie im Folgenden dargestellt:

MAP2K1 kodiert für die Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase 1 (Mek1), die Bestandteil der Raf-Mek1/2-Erk1/2-Kaskade ist, einem Teil des MAP-Kinase-Signalwegs. Dieser ist u.a. an Zellproliferation-, Differenzierung, Apoptose und Inflammation beteiligt. [117, 118] Bereits früh in der Krankheitsentwicklung der chronischen Pankreatitis scheint der MAP-Kinase-Weg von Bedeutung zu sein: Eine Stimulation mit Caerulein, einem zur

experimentellen Induktion von Pankreatitis verwendeten Oligopeptid, führt zu einer Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs. Die Hemmung von Mek mit dem Kinaseinhibitor Trametinib verhindert im Mausmodell die Progression zur chronischen Pankreatitis. [119–121] Zudem können *KRAS*-Mutationen, die zur konstitutiven Aktivierung der Raf-Mek1/2-Erk1/2-Kaskade führen, in Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms bei Patienten mit CP nachgewiesen werden [122–124].

FLII kodiert für das Protein Flightless-1 Homolog (Flii), das u.a. an der Aktin-Regulation, Transkription und Inflammation sowie Kollagensynthese beteiligt ist [112]. Eine *FLII*-Nullmutation ist embryonisch letal [125]. Mutationen im *FLII*-Gen könnten über verschiedene Mechanismen an der Entwicklung von chronischer Pankreatitis beteiligt sein: Zum einen hemmt Flii die β -Catenin-vermittelte Transkription des WNT-Signalwegs, der u.a. an embryonaler Entwicklung, Zellpolarität und Proliferation beteiligt ist und zur Pathogenese des Pankreaskarzinoms beiträgt [126–128]. Mutationen im *FLII*-Gen könnten folglich zur Dysregulation der WNT-Kaskade führen [126]. Bei dieser kommt es auch zur Aktivierung von Pankreassternzellen, die hauptverantwortlich für den fibrotischen Umbau des Parenchyms sowohl bei CP als auch beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas sind [18, 129, 130]. Auf eine Relevanz des β -Catenin abhängigen WNT-Signalwegs bei der Entwicklung von chronischer Pankreatitis deutet hin, dass Wnt und β -Catenin im Pankreas von Mäusen mit CP überexprimiert werden [129]. Zudem ist β -Catenin an der Regeneration geschädigter Azinuszellen beteiligt [131].

Zum anderen konnte in Makrophagen gezeigt werden, dass Flii den IL-1/TLR4-Signalweg inhibiert, indem es die Formation des TLR4/MyD88-Komplexes stört [132]. Der TLR4-Signalweg führt über die Aktivierung von NF- κ B zur inflammatorischen Zytokinausschüttung [133]. TLR4 ist in Monozyten in frühen Stadien akuter Pankreatitis hochreguliert und an der Progression von akuter Pankreatitis beteiligt [134–136]. Darüber hinaus wurde eine Überexpression von TLR4-mRNA und dem TLR-Adapterprotein MyD88, an das Flii bindet, in Pankreasproben von Patienten mit chronischer Pankreatitis nachgewiesen [137]. *FLII*-Mutationen könnten zur Enthemmung des TLR4-Signalweges führen und somit zur Progression von chronischer Pankreatitis beitragen.

4.2 Die N34S-Mutation (*SPINK1*) als Risikofaktor für alkoholisch-chronische Pankreatitis

Alkoholabusus ist längst als Risikofaktor für chronische Pankreatitis bekannt [138–140]. Zu den zugrundeliegenden Pathomechanismen gehört die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die Schädigung von Mitochondrien durch Alkoholmetaboliten. Dies senkt die Schwelle der intrapancreatischen Trypsin-Aktivierung und folgenden Azinusschädigung. [141–144] Zudem bewirkt Alkohol eine Ausschüttung von Zytokinen, u.a. TNF- α , die ebenfalls die intrapancreatische Proteaseaktivierung sowie die Stimulation von Makrophagen begünstigen [145–147]. Des Weiteren aktiviert chronischer Alkoholabusus Pankreassternzellen und fördert somit die Fibrosebildung [148–150]. Die alkoholbedingte Ausfällung von Proteinen im Pankreassekret und die folgende Entstehung von „protein plugs“, die den Pankreasgang verstopfen, stellen eine mögliche Erklärung für die Auslösung von akuten Pankreatitis-Schüben dar [151].

Dennoch ist im Vergleich zu anderen Alkohol-assoziierten Erkrankungen, z.B. Leberzirrhose, der kausale Zusammenhang zwischen Alkoholabusus und chronischer Pankreatitis schwach und nur 5-10% der langjährigen Alkoholiker entwickeln eine CP [152, 153]. Dies spricht dafür, dass verschiedene Faktoren bei der Entstehung von alkoholisch-chronischer Pankreatitis zusammenwirken. So ist eine Vermutung, dass lediglich genetisch prädisponierte Individuen bei riskantem Alkoholkonsum eine CP entwickeln. Dominante *PRSSI*-Mutationen scheinen bei der ACP kaum eine Rolle zu spielen. [154–156] Bisher konnte gezeigt werden, dass Varianten in den *CTRC*-, *CLDN2*-, *PRSSI-PRSS2*-, *CTRB1-CTRB2*-Loci sowie der *FUT2* „non-secretor“-Status und die Blutgruppe B mit alkoholisch-chronischer Pankreatitis assoziiert sind [61, 93, 97, 116].

Auch ein Zusammenhang zwischen der *SPINK1*-Mutation p.N34S und alkoholisch-chronischer Pankreatitis wurde bereits festgestellt, wobei die Prävalenz bei ca. 5,8-6,8% unter ACP-Patienten liegt und der Zusammenhang je nach Vorkommen in der einzelnen Kontrollkohorte nicht immer statistisch signifikant war [34, 48, 102, 157, 158]. Meta-Analysen haben gezeigt, dass die Effektstärke der p.N34S-Mutation bei ICP-Patienten deutlich größer ist als bei ACP-Patienten (OR~15 vs. ~5) [102]. Mit der p.N34S-Variante sind vier intronische Varianten assoziiert, dennoch scheint es sich bei keiner von ihnen um die kausale Mutation zu handeln [34, 48–51]. In dieser Arbeit konnte die statistisch signifikante Häufung der p.N34S-Variante unter Patienten mit alkoholisch-chronischer Pankreatitis (n=91) im Vergleich zu pankreasgesunden Kontrollprobanden (n=304)

festgestellt werden ($p=0,006$). Dies stützt die Vermutung, dass es sich bei p.N34S um einen Risikofaktor für alkoholisch-chronische Pankreatitis handelt.

Das Zusammentreffen von chronischem Alkoholabusus und der p.N34S-Variante könnte das Protease-Antiprotease-Gleichgewicht zugunsten der Proteaseaktivierung beeinträchtigen: SPINK1 verhindert im gesunden Pankreas die vorzeitige Autoaktivierung von Trypsinogen, indem ca. 13% des bereits aktivierten Trypsins gebunden wird [40, 41]. Wenngleich der Pathomechanismus von p.N34S bisher nicht abschließend geklärt ist, konnte 2017 eine 4kb vom *SPINK1*-Promoter entfernte Sequenzvariante identifiziert werden, die womöglich ein Cis-regulatorisches Modul (CRM) stört, an das Transkriptionsfaktoren binden und so die Expression des Gens beeinflussen [52]. In einem Pankreas, in dem durch Alkoholabusus die Schwelle der Autoaktivierung von Trypsinogen herabgesetzt und potenziell auch der Abfluss der Proteasen durch „protein plugs“ gestört ist, könnte das zusätzliche Vorliegen einer p.N34S-Mutation, die vermutlich den natürlichen Schutzmechanismus gegenüber intrapancreatischer Proteaseaktivierung mindert, das Risiko für Azinusschädigung und die Entstehung einer Pankreatitis zusätzlich erhöhen [141–144, 151].

4.3 Die G60G-Mutation (*CTRC*) als Risikofaktor für chronische Pankreatitis

Für die idiopathisch-chronische Pankreatitis wurde 2008 eine Assoziation mit seltenen *CTRC*-Mutationen, u.a. p.R254W und p.K247_R254del, beschrieben [61]. Die häufiger vorkommende p.G60G-Variante, deren Pathomechanismus noch unzureichend verstanden ist, wurde zunächst nur mit familiärer Pankreatitis in Verbindung gebracht [62, 159]. Mittlerweile ist bekannt, dass p.G60G für sowohl nicht-alkoholische als auch alkoholisch-chronische Pankreatitis einen Risikofaktor darstellt und sich das Pankreatitis-Risiko von 2,5-fach bei Heterozygoten auf 10-fach bei Homozygoten erhöht [66, 67, 160]. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden: Individuen mit homozygoter p.G60G-Mutation kamen unter ICP-Patienten signifikant häufiger vor als unter gesunden Kontrollprobanden ($p=0,02$) und auch bei den ACP-Patienten wurde eine ähnliche Tendenz gesehen ($p=0,05$). Somit konnte die homozygote p.G60G-Variante als Risikofaktor für idiopathische Pankreatitis und möglicherweise auch alkoholisch-chronische Pankreatitis bestätigt werden.

Andere Studien stellten bereits fest, dass zusätzlich vorliegende *CFTR*- oder *SPINK1*-Mutationen den Effekt von p.G60G verstärken [67]. In dieser Studie konnte der beschriebene Zusammenhang in der Kohorte mit N34S-Patienten deutlich gezeigt werden: Im dominanten Modell gab es eine signifikante Häufung von heterozygoten p.G60G-Varianten unter den

N34S-Patienten im Vergleich zu pankreasgesunden Kontrollen ($p=0,005$). Dieser Effekt war bei homozygotem Vorliegen der p.G60G-Variante noch eindeutiger ($p<0,0001$). Dies zeigt, dass p.G60G und p.N34S im trans-heterozygoten Vorliegen synergistisch auf das Pankreatitis-Risiko wirken und das homozygote Vorliegen einer p.G60G-Mutation das Risiko für chronische Pankreatitis zusätzlich erhöht.

Auch wenn die Wirkungsweise der *SPINK1*-Mutation p.N34S und der *CTRC*-Mutation p.G60G bisher nicht abschließend geklärt werden konnte, deuten Studienergebnisse darauf hin, dass beide Varianten die Expression ihres jeweiligen Gens stören könnten [52, 67, 159]. Der Serin-Protease-Inhibitor Kazal-Typ 1 schützt vor der frühzeitigen Autoaktivierung von Trypsinogen, indem er bereits aktiviertes Trypsin bindet [40, 41]. Die Hauptfunktion von Chymotrypsin C ist die Beteiligung am Abbau von Trypsinogen [42–44]. Der Synergismus von p.G60G und p.N34S könnte somit in der eingeschränkten Funktion zweier Schutzmechanismen gegenüber der intrapankreatischen Autoaktivierung von Trypsinogen begründet sein und additiv die Proteaseaktivierung in den Azinuszellen des Pankreas begünstigen.

4.4 Die E283K-Mutation (*CPA1*) als Risikofaktor für idiopathisch-chronische Pankreatitis

Das *CPA1*-Gen kodiert für die pankreatische Metalloproteinase Carboxypeptidase A1 (CPA1), die C-terminale Peptidbindungen in der Nahrung spaltet, nachdem Trypsin und Chymotrypsin C CPA1 durch Abspaltung des Propeptids aktiviert haben [161, 162]. Dass die meisten *CPA1*-Mutationen zum Fehlfaltungs-Phänotyp und somit zu ER-Stress führen, wurde erstmals für die p.N256K-Variante gezeigt und in weiteren Studien bestätigt [59, 163]. Die verminderte Sezernierung von CPA1 kann ER-Stress auslösen, da die Protease mit ca. 10% des Proteinanteils einen größeren Teil des Pankreassekretes ausmacht. Es wird davon ausgegangen, dass *CPA1*-Varianten mit einer Aktivität von $\leq 20\%$ signifikant mit chronischer Pankreatitis und einem frühen Erkrankungsalter assoziiert sind. [38, 59] Die p.E283K-Variante wurde in einer großen Studie bei lediglich zwei Patienten mit nicht-alkoholischer Pankreatitis ($n=944$) und keiner der gesunden Kontrollprobanden ($n=3938$) nachgewiesen ($p=0,01$). Zudem wurde gezeigt, dass die Variante weder sezerniert wird noch aktiv ist. [59] In dieser Arbeit konnte ein Patient mit der p.E283K-Variante in der ICP-Kohorte ($n=92$) identifiziert werden, bei den pankreasgesunden Kontrollen ($n=304$) kam die Sequenzvariante nicht vor. Aufgrund der kleineren Kohortengröße im Vergleich zur zuvor genannten Studie konnte kein statistischer Zusammenhang nachgewiesen werden. In der

Zusammenschau sprechen die Ergebnisse dennoch für eine zwar seltene aber möglicherweise kausale Risikovariante für die chronische Pankreatitis.

4.5 Trans-Heterozygotie für *CTRC/CFTR* als Risikofaktor für idiopathisch-chronische Pankreatitis

Unter 4.3 ist dargestellt, dass Trans-Heterozygotie für p.G60G/p.N34S einen Risikofaktor für chronische Pankreatitis darstellt. Es liegt nahe, dass derartige Synergismen auch bei anderen bekannten Risikovarianten eine Rolle spielen könnten. So wurde gezeigt, dass das Zusammentreffen von *SPINK1*- und *CFTR*-Mutationen das Risiko für chronische Pankreatitis erhöht [76, 164]. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde für die Kombination von seltenen *CTRC*- und *SPINK1*-Varianten beschrieben [165]. Auch über das Vorliegen einer *CTRC*-Variante bei Patienten mit zystischer Fibrose und rekurrierender Pankreatitis wurde bereits berichtet [166, 167]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Trans-Heterozygotie für *CTRC*- und *CFTR*-Varianten signifikant häufiger unter Patienten mit idiopathischer Pankreatitis im Vergleich zu pankreasgesunden Kontrollen vorkommen ($p=0,03$).

CFTR-Mutationen erhöhen das Pankreatitis-Risiko vermutlich durch Senkung des pH-Werts, Erhöhung des Proteingehalts und der Viskosität des Pankreassekretes, was die Obstruktion des Pankreasganges begünstigt. Die veränderte Funktion des Chlorid- und Bikarbonat-Transporters reduziert somit auch die duktale Spülung der Pankreasenzyme. [71] Durch den zusätzlich reduzierten Schutz gegenüber frühzeitiger Autoaktivierung durch *CTRC*-Mutationen, erhöht das trans-heterozygote Vorliegen von *CTRC/CFTR*-Varianten möglicherweise das Risiko für Azinuszellschädigung und die Entwicklung einer chronischen Pankreatitis. Dies unterstreicht die Vermutung, dass Synergismen zwischen den verschiedenen Risikogenen bei der Krankheitsentwicklung von CP wirksam werden und diese einen Anteil der multifaktoriellen Genese dieser Erkrankung ausmachen.

4.6 Ausblick: genomweite Assoziationsstudien (GWAS)

Die Identifikation von neuen Risikovarianten für chronische Pankreatitis stellt weiterhin eine Herausforderung dar. Dies zeigt auch die vorliegende Arbeit, bei der mithilfe eines Kandidatengen-Ansatzes Sequenzvarianten in einer Genom-sequenzierten Kohorte identifiziert und in einer größeren Kohorte mittels Real Time-PCR bestätigt werden sollten. Die Zukunft der Pankreasforschung auf genetischer Ebene gehört wahrscheinlich den

hypothesenfreien Ansätzen genomweiter Assoziationsstudien (GWAS): GWAS beruhen auf dem Prinzip des Linkage Disequilibriums (LD), der nicht-zufälligen Assoziation zwischen Allelen verschiedener Loci [168]. Erste GWAS-Ergebnisse wurden seit dem Jahr 2006 publiziert und auch für die chronische Pankreatitis konnten so neue Risiko-Loci entdeckt werden [93, 169–171]. Dabei stellt sich die Frage, nach welchen Varianten gesucht wird – seltenen, wie z.B. einige *PRSSI*- oder *CPAI*-Varianten, oder häufig vorkommenden, wie z.B. der *CTRC*-Variante p.G60G. Um ein LD herzustellen, wird nach Verbindungen zu bereits genotypisierten SNPs gesucht, die sich auf dem sogenannten SNP-Chip befinden und typischerweise Allelfrequenzen von $>0,05$ aufweisen. Dies erschwert die Identifikation seltener Varianten, da beim LD häufige Varianten häufigen SNPs zugeordnet werden und seltene wiederum seltenen SNPs. [172, 173] Zudem erschweren niedrige Penetranzen von kausalen Mutationen die Herstellung eines LDs [173]. Auch wenn die Zukunft den GWAS gehört, stellen sie besonders kleinere Forschungsteams aktuell vor Herausforderungen bezüglich der Finanzierung und Speicherung von Genomdaten sowie der Expertise in der Verarbeitung und Interpretation. An dieser Stelle verschwimmen zunehmend die Grenzen zwischen medizinischer Forschung und dem Gebiet der Biomathematik.

Ungeklärt ist bisher zudem, weshalb selbst als kausal angesehene, einem autosomal-dominanten Erbmuster folgende *PRSSI*-Mutationen (p.R122H, p.N29I) lediglich eine Penetranz von ca. 80% aufweisen [174–178]. So können unter Umständen nicht-erkrankte Elternteile diese Mutationen an ihre betroffenen Kinder weitergeben. Dies wirft die Frage auf, weshalb Mutationen in einem Individuum einen bestimmten Phänotyp, in diesem Fall den der chronischen Pankreatitis, hervorrufen, es in einem anderen Mutationsträger jedoch nicht zur Ausprägung kommt. Bei einigen Krankheitsbildern, z.B. der Hämochromatose, ermöglichen Varianten in modifizierenden Genen bei Vorliegen einer kausalen Mutation die Ausprägung des Phänotyps [179, 180]. Der Effekt von modifizierenden Genen spielt möglicherweise auch bei der *PRSSI*-Mutation p.A16V eine Rolle, die eine geringere Penetranz als p.R122H oder p.N29I aufweist und nicht zwingend einem autosomal-dominanten Erbmuster folgt [181]. So wurde bei einer Familie mit autosomal-dominanter Vererbung der p.A16V-Mutation bei verschiedenen Familienmitgliedern das gleichzeitige Vorliegen von *SPINK1*- und/oder *CFTR*-Mutationen beschrieben, die vermutlich die Penetranz von p.A16V in dieser Familie erhöhen [182].

Ob modifizierende Gene allein die Erklärung für die reduzierte Penetranz von dominanten *PRSSI*-Mutationen darstellen, ist unklar. Dagegen spricht, dass sich in einer Untersuchung

von monozygoten Zwillingen mit *PRSSI*-Mutation auch unter den Zwillingspaaren eine Penetranz von ca. 80% mit teils divergierendem Phänotyp zeigte. Die Kohortengröße war allerdings vergleichsweise klein (n=11). [183] Die Penetranz scheint also nicht ausschließlich von modifizierenden Genen beeinflusst zu werden. Ein interessanter Ansatz, um die Rolle von modifizierenden Genen zu untersuchen, wäre die Betrachtung von sogenannten Familien-Trios. Diese bestehen aus einem erkrankten Kind mit *PRSSI*-Mutation, einem nicht-erkrankten Elternteil als Träger der Mutation und einem ebenfalls nicht-erkrankten Elternteil ohne dominante *PRSSI*-Mutation. Mithilfe von GWAS könnte nach modifizierenden Genvarianten gesucht werden, die vom nicht-mutationstragenden Elternteil an das betroffene Kind vererbt werden und zur Ausprägung des Phänotyps führen.

Da monogenetische Zwillinge in Bezug auf ihren Epigenotyp variieren können, wäre es ebenfalls möglich, dass epigenetische Phänomene, z.B. die herabgesetzte Expression des jeweiligen Allels durch Methylierungsprozesse, die Penetranz von *PRSSI*-Mutationen reduzieren [184–186]. Auch dies scheint nicht die einzige Erklärung für verminderte Penetranzen von kausalen Mutationen darzustellen, da in einer Analyse von Patienten mit dominanten *PRSSI*-Mutationen keine Unterschiede in Bezug auf die Expression zwischen den Probanden mit oder ohne Ausprägung der chronischen Pankreatitis festgestellt werden konnten [187]. Eine andere Erklärung dafür, dass ein Genotyp nicht in jedem Fall in einem Phänotyp resultiert, stellen Gen-Umwelt-Interaktionen dar [188]. So begünstigen Verhaltensweisen wie Alkoholkonsum und Tabakrauchen aber auch Stoffwechseleränderungen wie z.B. Hyperlipidämie und Hyperkalzämie die Entwicklung der chronischen Pankreatitis [141–144, 189–192]. Möglicherweise spielen sie auch eine Rolle bei der Penetranz dominanter *PRSSI*-Mutation und tragen zur Erklärung eines diskordanten Phänotyps bei monogenetischen Zwillingen bei [183]. Außerdem wäre denkbar, dass virale Infektionen einen Einfluss auf die Penetranz ausüben könnten. So wurden z.B. mit einer Epstein-Barr-Virus-Infektion in Zusammenhang stehende Fälle von Pankreatitis beschrieben [193].

Wie bei komplexen Krankheitsbildern üblich, scheinen viele Faktoren zur Entstehung der chronischen Pankreatitis beizutragen und auch der genetische Aspekt dieser Erkrankung bietet der zukünftigen Forschung zahlreiche Anknüpfungspunkte, von denen diese Arbeit hoffentlich einige aufzeigen konnte.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht genetische Risikofaktoren der chronischen Pankreatitis (CP) mithilfe von Next-Generation Sequenzierungsdaten einer Primärkohorte und spezifischer Genotypisierung von Kandidatengenomen in einer Validierungskohorte. Es sollten neue Risikovarianten identifiziert, bereits bekannte bestätigt und mögliche Synergismen bei trans-heterozygoten Merkmalsträgern aufgezeigt werden. Anhand einer Kandidatengenliste, u.a. aus dem Bereich der Proteasen, der Primärziliengene, des Immunsystems und des Fettstoffwechsels, wurden aus den Genom-Sequenzdaten einer Primärkohorte aus Patienten mit idiopathisch-chronischer Pankreatitis (ICP) und pankreasgesunden Kontrollprobanden potenzielle Risikovarianten für die CP zur Validierung ausgewählt. Die Auswertung der Sequenzdaten ergab vier Varianten mit signifikanter Häufung unter den ICP-Patienten (p.V579M [IFT74], p.H3215Y [FAT4], c.1023-8C>T [MAP2K1], p.F20L [FLII]), sowie drei weitere Varianten (p.S65C [HFE], p.F224L [IFT74], p.S522L [ZNF18]), die in der Primärkohorte eine ähnliche Verteilungs-Tendenz zeigten. Im Rahmen einer anschließenden Überprüfung der Sequenzvarianten mittels Real Time-PCR in einer größeren Validierungskohorte bestehend aus ICP-Patienten, Patienten mit alkoholisch-chronischer Pankreatitis (ACP) und gesunden Kontrollen konnten die Ergebnisse der Primärkohorte nicht bestätigt werden. Zwei Varianten (c.1023-8C>T [MAP2K1], p.F20L [FLII]) wurden jedoch ausschließlich bei Patienten mit CP nachgewiesen. In der erweiterten Primärkohorte wurden auch Prävalenz und Synergismen bekannter Risikovarianten für die CP überprüft. Es konnte die SPINK1-Variante p.N34S als Risikofaktor für alkoholisch-chronische Pankreatitis bestätigt werden ($p=0,006$). Die CTRC-Variante p.G60G kam im rezessiven Vererbungs-Modell signifikant häufiger bei Patienten mit ICP vor ($p=0,02$), unter den ACP-Patienten wurde das Signifikanzniveau jedoch nicht erreicht ($p=0,05$). In der Gruppe der CP-Patienten mit p.N34S-Mutation war das trans-heterozygote Vorliegen von p.G60G/p.N34S signifikant mit chronischer Pankreatitis assoziiert, sowohl für heterozygote als auch homozygote Träger der p.G60G-Mutation ($p=0,005$ bzw. $p>0,0001$). Somit konnte p.G60G ebenfalls als Risikofaktor für eine CP bestätigt werden. Die vermutlich Proteinfehlfaltungs-assoziierte CPA1-Variante p.E283K wurde bei einem ICP-Patienten, nicht jedoch bei pankreasgesunden Kontrollen, nachgewiesen. Auch das trans-heterozygote Vorliegen von CTRC- und CFTR-Varianten in dieser Kohorte war signifikant mit idiopathisch-chronischer Pankreatitis assoziiert ($p=0,03$). Für die Identifizierung neuer Risikovarianten waren die zur Verfügung stehenden NGS-Daten der Patientenkohorte nicht ausreichend, jedoch konnte ein

erhöhtes CP-Risiko für spezifische Risikoallele und insbesondere trans-heterozygote Merkmalsträger nachgewiesen werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Whitcomb DC, Frulloni L, Garg P, Greer JB, Schneider A, Yadav D, Shimosegawa T. Chronic pancreatitis: An international draft consensus proposal for a new mechanistic definition. *Pancreatology*. 2016;16:218–24. doi:10.1016/j.pan.2016.02.001.
2. Dufour MC, Adamson MD. The Epidemiology of Alcohol-Induced Pancreatitis. *Pancreas*. 2003;286–90.
3. Ammann RW, Akovbiantz A, Largiader F, Schueler G. Course and outcome of chronic pancreatitis. Longitudinal study of a mixed medical-surgical series of 245 patients. *Gastroenterology*. 1984;86:820–8.
4. Miyake H, Harada H, Kunichika K, Ochi K, Kimura I. Clinical Course and Prognosis of Chronic Pancreatitis. 1987;2:378–85.
5. Lankisch PG, Löhr-Happe A, Otto J, Creutzfeldt W. Natural Course in Chronic Pancreatitis: Pain, Exocrine and Endocrine Insufficiency and Prognosis of the Disease. *Digestion*. 54;1993:148–55.
6. Lowenfels AB, Ammann RW, Andersen JR, Andren-Sandberg A, Cavallini G, Dimagno EP, et al. Pancreatitis and the Risk of Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 1993;328:1433–7.
7. Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2010;24:349–58. doi:10.1016/j.bpg.2010.02.007.
8. Hoffmeister A, Mayerle J, Beglinger C, Büchler MW, Bufler P, Dathe K, et al. S3-Leitlinie Chronische Pankreatitis: Definition, Ätiologie, Diagnostik, konservative, interventionell endoskopische und operative Therapie der chronischen Pankreatitis. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). *Z Gastroenterol*. 2012;50:1176–224. doi:10.1055/s-0032-1325479.
9. Layer P, Holtman G. Pancreatic enzymes in chronic pancreatitis. *International Journal of Pancreatology*. 1994;15:1–11.
10. Haaber AB, Rosenfalck AM, Hansen B, Hilsted J, Larsen S. Bone mineral metabolism, bone mineral density, and body composition in patients with chronic pancreatitis and

- pancreatic exocrine insufficiency. *International Journal of Pancreatology*. 2000;27:21–7.
11. Siegmund E, Löhr JM, Schuff-Werner P. Die diagnostische Validität nichtinvasiver Pankreasfunktionstests -- Eine Metaanalyse. *Z Gastroenterol*. 2004;42:1117–28. doi:10.1055/s-2004-813604.
 12. Melki G, Laham L, Karim G, Komal F, Kumar V, Barham S, et al. Chronic Pancreatitis Leading to Pancreatogenic Diabetes Presenting in Diabetic Ketoacidosis: A Rare Entity. *Gastroenterology Res*. 2019;12:208–10. doi:10.14740/gr1203.
 13. Ceyhan GO, Bergmann F, Kadıhasanoglu M, Altintas B, Demir IE, Hinz U, et al. Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases. *Gastroenterology*. 2009;136:177-186.e1. doi:10.1053/j.gastro.2008.09.029.
 14. Di Sebastiano P, Fink T, Weihe E, Friess H, Innocenti P, Beger HG, Buchler MW. Immune cell infiltration and growth-associated protein 43 expression correlate with pain in chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 1997;112:1648–55. doi:10.1016/s0016-5085(97)70047-7.
 15. Ammann RW, Muellhaupt B. The Natural History of Pain in Alcoholic Chronic Pancreatitis. 1999;116:1132–40.
 16. Longnecker DS. Role of the Necrosis-Fibrosis Sequence in the Pathogenesis of Alcoholic Chronic Pancreatitis. *Gastroenterology*. 1996;111:258–9.
 17. Sandler M, van den Brandt C, Glaubitz J, Wilden A, Golchert J, Weiss FU, et al. NLRP3 Inflammasome Regulates Development of Systemic Inflammatory Response and Compensatory Anti-inflammatory Response Syndromes in Mice With Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* 2019. doi:10.1053/j.gastro.2019.09.040.
 18. Apte M, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cell: physiologic role, role in fibrosis and cancer. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015;31:416–23. doi:10.1097/MOG.0000000000000196.
 19. Kamisawa T, Chari ST, Giday SA, et. al. Clinical Profile of Autoimmune Pancreatitis and Its Histological Subtypes: An International Multicenter Survey. *Pancreas*. 2011;40:809–14.

20. Carnaille B, Oudar C, Pattou F, Combemale F, Rocha J, Proye C. Pancreatitis and Primary Hyperparathyroidism: Forty Cases. *Aust. N.Z. J. Surg.* 1998;68:117–9.
21. Melitas C, Meiselman M. Metabolic Pancreatitis: Pancreatic Steatosis, Hypertriglyceridemia, and Associated Chronic Pancreatitis in 3 Patients with Metabolic Syndrome. *Case Rep Gastroenterol.* 2018;12:331–6. doi:10.1159/000490042.
22. Ammann RW. A clinically based classification system for alcoholic chronic pancreatitis: summary of an international workshop on chronic pancreatitis. *Pancreas.* 1997;14:215–21. doi:10.1097/00006676-199704000-00001.
23. Lin Y, Tamakoshi A, Hayakawa T, Ogawa M, Ohno Y. Associations of Alcohol Drinking and Nutrient Intake With Chronic Pancreatitis: Findings From a Case-Control Study in Japan. *Gastroenterology.* 2001;96:2622–7.
24. Lévy P, Mathurin P, Roqueplo A, Rueff B, Bernades P. A Multidimensional Case-Control Study of Dietary, Alcohol, and Tobacco Habits in Alcoholic Men with Chronic Pancreatitis. *Pancreas.* 1995;10:231–8.
25. Yadav D, Hawes RH, Brand RE, Anderson MA, Money ME, Banks PA, et al. Alcohol consumption, cigarette smoking, and the risk of recurrent acute and chronic pancreatitis. *Arch Intern Med.* 2009;169:1035–45. doi:10.1001/archinternmed.2009.125.
26. Maisonneuve P, Lowenfels AB, Müllhaupt B, Cavallini G, Lankisch PG, Andersen JR, et al. Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis. *Gut.* 2005;54:510–4. doi:10.1136/gut.2004.039263.
27. van Geenen EJM, Smits MM, Schreuder TCMA, van der Peet DL, Bloemena E, Mulder CJJ. Smoking is related to pancreatic fibrosis in humans. *Am J Gastroenterol.* 2011;106:1161-6; quiz 1167. doi:10.1038/ajg.2011.43.
28. COMFORT MW, STEINBERG AG. Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology.* 1952;21:54–63.
29. Howes N, Lerch MM, Greenhalf W, et al. Clinical and Genetic Characteristics of Hereditary Pancreatitis in Europe. *Clinical Gastroenterology and Hepatology.* 2004;2:252–61.
30. Whitcomb DC, Preston RA, Aston CE, et al. A Gene for Hereditary Pancreatitis Maps to Chromosome 7q35. *Gastroenterology.* 1996;110:1975–80.

31. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet.* 1996;141–5.
32. Rebours V, Boutron-Ruault M-C, Schnee M, Férec C, Maire F, Hammel P, et al. Risk of pancreatic adenocarcinoma in patients with hereditary pancreatitis: a national exhaustive series. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:111–9. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01597.x.
33. 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;30:575–82. doi:10.1002/humu.20853.
34. Witt H, Luck W, Hennies HC, Claßen M, Kage A, Laß U, et al. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2000;25:214–6.
35. Cohn JA, Neoptolemos JP, Feng J, Yan J, Jiang Z, Greenhalf W, et al. Increased risk of idiopathic chronic pancreatitis in cystic fibrosis carriers. *Hum Mutat.* 2005;26:303–7. doi:10.1002/humu.20232.
36. Gorry MC, Ghabbaizedeh D, Furey W, Gates LK, Preston RA, Aston CE, et al. Mutations in the Cationic Trypsinogen Gene Are Associated With Recurrent Acute and Chronic Pancreatitis. *Gastroenterology.* 1997;113:1063–8.
37. Teich N, Mössner J, Keim V. Mutations of the cationic trypsinogen in hereditary pancreatitis. *Hum Mutat.* 1998;12:39–43.
38. Scheele G, Bartelt D, Bieger W. Characterization of human exocrine pancreatic proteins by two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Gastroenterology.* 1981;80:461–73.
39. Rinderknecht H. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Digestive Diseases and Sciences.* 1986;31:314–21. doi:10.1007/bf01318124.
40. Bartelt DC, Shapanka R, Greene LJ. The Primary Structure of the Human Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1977;179:189–99.

41. Rinderknecht H, Stace NH, Renner IG. Effects of chronic alcohol abuse on exocrine pancreatic secretion in man. *Digestive Diseases and Sciences*. 1985;30:65–71. doi:10.1007/bf01318373.
42. Szabó A, Sahin-Tóth M. Increased activation of hereditary pancreatitis-associated human cationic trypsinogen mutants in presence of chymotrypsin C. *J Biol Chem*. 2012;287:20701–10. doi:10.1074/jbc.M112.360065.
43. Szabó A, Sahin-Tóth M. Determinants of chymotrypsin C cleavage specificity in the calcium-binding loop of human cationic trypsinogen. *FEBS J*. 2012;279:4283–92. doi:10.1111/febs.12018.
44. Szmola R, Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C (caldecrin) promotes degradation of human cationic trypsin: Identity with Rinderknecht's enzyme Y. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:11227-11232.
45. Nemoda Z, Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C (caldecrin) stimulates autoactivation of human cationic trypsinogen. *J Biol Chem*. 2006;281:11879–86. doi:10.1074/jbc.M600124200.
46. Geisz A, Hegyi P, Sahin-Tóth M. Robust autoactivation, chymotrypsin C independence and diminished secretion define a subset of hereditary pancreatitis-associated cationic trypsinogen mutants. *FEBS J*. 2013;280:2888–99. doi:10.1111/febs.12292.
47. Kereszturi E, Sahin-Tóth M. Intracellular autoactivation of human cationic trypsinogen mutants causes reduced trypsinogen secretion and acinar cell death. *J Biol Chem*. 2009;284:33392–9. doi:10.1074/jbc.M109.056812.
48. Witt H, Luck W, Becker M, Böhmig M, Kage M, Truninger K, et al. Mutation in the SPINK1 Trypsin Inhibitor Gene, Alcohol Use, and Chronic Pancreatitis. *Journal of the American Medical Association*. 2001;285:2716–7.
49. Kuwata K, Hirota M, Shimizu H, et. al. Functional analysis of recombinant pancreatic secretory trypsininhibitor protein with amino-acid substitution. *Journal of Gastroenterology*. 2002;37:928–34.
50. Király O, Wartmann T, Sahin-Tóth M. Missense mutations in pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) cause intracellular retention and degradation. *Gut*. 2007;56:1433–8. doi:10.1136/gut.2006.115725.

51. Boulling A, Le Maréchal C, Trouvé P, Raguénès O, Chen J-M, Férec C. Functional analysis of pancreatitis-associated missense mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) gene. *European Journal of Human Genetics*. 2007;936–42.
52. Boulling A, Masson E, Zou W-B, Paliwal S, Wu H, Issarapu P, et al. Identification of a functional enhancer variant within the chronic pancreatitis-associated SPINK1 c.101AG (p.Asn34Ser)-containing haplotype. *Hum Mutat*. 2017;38:1014–24. doi:10.1002/humu.23269.
53. Pfützer RH, Barmada MM, Brunskill AP, Finch R, Hart PS, Neoptolemos J, et al. SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 2000;119:615–23. doi:10.1053/gast.2000.18017.
54. Kereszturi E, Király O, Sahin-Tóth M. Minigene analysis of intronic variants in common SPINK1 haplotypes associated with chronic pancreatitis. *Gut*. 2009;58:545–9. doi:10.1136/gut.2008.164947.
55. Zou W-B, Boulling A, Masson E, Cooper DN, Liao Z, Li Z-S, et al. Clarifying the clinical relevance of SPINK1 intronic variants in chronic pancreatitis. *Gut*. 2016;65:884–6. doi:10.1136/gutjnl-2015-311168.
56. Lavoie C, Paiement J. Topology of molecular machines of the endoplasmic reticulum: a compilation of proteomics and cytological data. *Histochem Cell Biol*. 2008;129:117–28. doi:10.1007/s00418-007-0370-y.
57. Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev*. 2006;86:1133–49. doi:10.1152/physrev.00015.2006.
58. Balázs A, Hegyi P, Sahin-Tóth M. Pathogenic cellular role of the p.L104P human cationic trypsinogen variant in chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016;310:G477-86. doi:10.1152/ajpgi.00444.2015.
59. Witt H, Beer S, Rosendahl J, Chen J-M, Chandak GR, Masamune A, et al. Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. *Nat Genet*. 2013;45:1216–20. doi:10.1038/ng.2730.
60. Kujko AA, Berki DM, Oracz G, Wejnarska K, Antoniuk J, Wertheim-Tysarowska K, et al. A novel p.Ser282Pro CPA1 variant is associated with autosomal dominant hereditary pancreatitis. *Gut*. 2017;66:1728–30. doi:10.1136/gutjnl-2017-313816.

61. Rosendahl J, Witt H, Szmola R, Bhatia E, Ozsvári B, Landt O, et al. Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2008;40:78–82. doi:10.1038/ng.2007.44.
62. Masson E, Chen J-M, 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. doi:10.1007/s00439-007-0459-3.
63. Beer S, Zhou J, Szabó A, Keiles S, Chandak GR, Witt H, Sahin-Tóth M. Comprehensive functional analysis of chymotrypsin C (CTRC) variants reveals distinct loss-of-function mechanisms associated with pancreatitis risk. *Gut.* 2013;62:1616–24. doi:10.1136/gutjnl-2012-303090.
64. Szabó A, Ludwig M, Hegyi E, Szépeová R, Witt H, Sahin-Tóth M. Mesotrypsin Signature Mutation in a Chymotrypsin C (CTRC) Variant Associated with Chronic Pancreatitis. *J Biol Chem.* 2015;290:17282–92. doi:10.1074/jbc.M114.618439.
65. Szmola R, Sahin-Tóth M. Pancreatitis-associated chymotrypsinogen C (CTRC) mutant elicits endoplasmic reticulum stress in pancreatic acinar cells. *Gut.* 2010;59:365–72. doi:10.1136/gut.2009.198903.
66. Paliwal S, Bhaskar S, Mani KR, Reddy DN, Rao GV, Singh SP, et al. Comprehensive screening of chymotrypsin C (CTRC) gene in tropical calcific pancreatitis identifies novel variants. *Gut.* 2013;62:1602–6. doi:10.1136/gutjnl-2012-302448.
67. LaRusch J, Lozano-Leon A, Stello K, Moore A, Muddana V, O'Connell M, et al. The Common Chymotrypsinogen C (CTRC) Variant G60G (C.180T) Increases Risk of Chronic Pancreatitis But Not Recurrent Acute Pancreatitis in a North American Population. *Clin Transl Gastroenterol.* 2015;6:e68. doi:10.1038/ctg.2014.13.
68. Raeder H, Johansson S, Holm PI, Haldorsen IS, Mas E, Sbarra V, et al. Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *Nat Genet.* 2006;38:54–62. doi:10.1038/ng1708.
69. Xiao X, Jones G, Sevilla WA, Stolz DB, Magee KE, Haughney M, et al. A Carboxyl Ester Lipase (CEL) Mutant Causes Chronic Pancreatitis by Forming Intracellular Aggregates That Activate Apoptosis. *J Biol Chem.* 2016;291:23224–36. doi:10.1074/jbc.M116.734384.

70. Fjeld K, Weiss FU, Lasher D, Rosendahl J, Chen J-M, Johansson BB, et al. A recombined allele of the lipase gene CEL and its pseudogene CELP confers susceptibility to chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2015;47:518–22. doi:10.1038/ng.3249.
71. Ko SBH, Azuma S, Yoshikawa T, Yamamoto A, Kyokane K, Ko MSH, Ishiguro H. Molecular mechanisms of pancreatic stone formation in chronic pancreatitis. *Front Physiol.* 2012;3:415. doi:10.3389/fphys.2012.00415.
72. Paris J, Farriaux JP, Gérard A, Merveille P. Etude des pancréatopathies observées dans les trois générations d'une même famille. *Lille Med.* 1969;14:588–94.
73. Ooi CY, Dorfman R, Cipolli M, Gonska T, Castellani C, Keenan K, et al. Type of CFTR mutation determines risk of pancreatitis in patients with cystic fibrosis. *Gastroenterology.* 2011;140:153–61. doi:10.1053/j.gastro.2010.09.046.
74. 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;121:1310–9. doi:10.1053/gast.2001.29673.
75. Weiss FU, Simon P, Bogdanova N, Mayerle J, Dworniczak B, Horst J, Lerch MM. Complete cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene sequencing in patients with idiopathic chronic pancreatitis and controls. *Gut.* 2005;54:1456–60. doi:10.1136/gut.2005.064808.
76. Rosendahl J, Landt O, Bernadova J, et al. SPINK1, CTRC and PRSS1 variants in chronic pancreatitis: is the role of mutated CFTR overestimated? *Gut.* 2013;62:582–92.
77. LaRusch J, Jung J, General IJ, Lewis MD, Park HW, Brand RE, et al. Mechanisms of CFTR functional variants that impair regulated bicarbonate permeation and increase risk for pancreatitis but not for cystic fibrosis. *PLoS Genet.* 2014;10:e1004376. doi:10.1371/journal.pgen.1004376.
78. Wheatley DN. Primary cilia in normal and pathological tissues. *Pathobiology.* 1995;63:222–38. doi:10.1159/000163955.
79. Rosenbaum JL, Witman GB. Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:813–25. doi:10.1038/nrm952.

80. Anvarian Z, Mykytyn K, Mukhopadhyay S, Pedersen LB, Christensen ST. Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15:199–219. doi:10.1038/s41581-019-0116-9.
81. Pazour GJ, Dickert BL, Vucica Y, Seeley ES, Rosenbaum JL, Witman GB, Cole DG. *Chlamydomonas* IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene *tg737*, are required for assembly of cilia and flagella. *J Cell Biol.* 2000;151:709–18. doi:10.1083/jcb.151.3.709.
82. Lin F, Hiesberger T, Cordes K, Sinclair AM, Goldstein LSB, Somlo S, Igarashi P. Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:5286–91. doi:10.1073/pnas.0836980100.
83. Fick GM, Johnson AM, Hammond WS, Gabow PA. Causes of death in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 1995;5:2048–56.
84. Torra R, Nicolau C, Badenas C, Navarro S, Perez L, Estivill X, Darnell A. Ultrasonographic study of pancreatic cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin Nephrol.* 1997;47:19–22.
85. Silverman JF, Prichard J, Regueiro MD. Fine needle aspiration cytology of a pancreatic cyst in a patient with autosomal dominant polycystic kidney disease. A case report. *Acta Cytol.* 2001;45:415–9. doi:10.1159/000327641.
86. Igarashi P, Somlo S. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:2384–98. doi:10.1097/01.asn.0000028643.17901.42.
87. Basar O, Ibis M, Ucar E, Ertugrul I, Yolcu OF, Koklu S, et al. Recurrent pancreatitis in a patient with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Pancreatology.* 2006;6:160–2. doi:10.1159/000090258.
88. Cano DA, Sekine S, Hebrok M. Primary cilia deletion in pancreatic epithelial cells results in cyst formation and pancreatitis. *Gastroenterology.* 2006;131:1856–69. doi:10.1053/j.gastro.2006.10.050.
89. Biesecker LG, Green RC. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N Engl J Med.* 2014;370:2418–25. doi:10.1056/NEJMra1312543.

90. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008;456:53–9. doi:10.1038/nature07517.
91. Chen Y-C, Liu T, Yu C-H, Chiang T-Y, Hwang C-C. Effects of GC bias in next-generation-sequencing data on de novo genome assembly. *PLoS One*. 2013;8:e62856. doi:10.1371/journal.pone.0062856.
92. Bahlo M, Bennet MF, Degorski P, Tankard RM, Delatycki MB, Lockhart PJ. Recent advances in the detection of repeat expansions with short-read next-generation sequencing. *F1000 Research*. 2018.
93. Whitcomb DC, LaRusch J, Krasinskas AM, Klei L, Smith JP, Brand RE, et al. Common genetic variants in the CLDN2 and PRSS1-PRSS2 loci alter risk for alcohol-related and sporadic pancreatitis. *Nat Genet*. 2012;44:1349–54. doi:10.1038/ng.2466.
94. Mayerle J, Schnekenburger J, Krüger B, Kellermann J, Ruthenbürger M, Weiss FU, et al. Extracellular cleavage of E-cadherin by leukocyte elastase during acute experimental pancreatitis in rats. *Gastroenterology*. 2005;129:1251–67. doi:10.1053/j.gastro.2005.08.002.
95. Derikx MH, Kovacs P, Scholz M, Masson E, Chen J-M, Ruffert C, et al. Polymorphisms at PRSS1-PRSS2 and CLDN2-MORC4 loci associate with alcoholic and non-alcoholic chronic pancreatitis in a European replication study. *Gut*. 2015;64:1426–33. doi:10.1136/gutjnl-2014-307453.
96. Giri AK, Midha S, Banerjee P, Agrawal A, Mehdi SJ, Dhingra R, et al. Common Variants in CLDN2 and MORC4 Genes Confer Disease Susceptibility in Patients with Chronic Pancreatitis. *PLoS One*. 2016;11:e0147345. doi:10.1371/journal.pone.0147345.
97. Rosendahl J, Kirsten H, Hegyi E, Kovacs P, Weiss FU, Laumen H, et al. Genome-wide association study identifies inversion in the CTRB1-CTRB2 locus to modify risk for alcoholic and non-alcoholic chronic pancreatitis. *Gut*. 2018;67:1855–63. doi:10.1136/gutjnl-2017-314454.
98. Wiegers U, Hilz H. A New Method Using 'Proteinase K' To Prevent mRNA Degradation During Isolation From HeLa Cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971;44:513–9.
99. Zeugin J, Hartley J. Ethanol Precipitation of DNA. *Focus*. 1985;7:1–2.

100. Aaij C, Borst P. The Gel Electrophoresis of DNA. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1972:192–200.
101. Hui L, DelMonte T, Ranade K. Genotyping using the TaqMan assay. *Current protocols in human genetics*. 2008:Unit 2.10. doi:10.1002/0471142905.hg0210s56.
102. Aoun E, Chang C-CH, Greer JB, Papachristou GI, Barmada MM, Whitcomb DC. Pathways to injury in chronic pancreatitis: decoding the role of the high-risk SPINK1 N34S haplotype using meta-analysis. *PLoS One*. 2008;3:e2003. doi:10.1371/journal.pone.0002003.
103. Hanson EH, Imperatore G, Burke W. HFE Gene and Hereditary Hemochromatosis. *American Journal of Epidemiology*. 2001;154:193–206.
104. Lindstrand A, Frangakis S, Carvalho CMB, Richardson EB, McFadden KA, Willer JR, et al. Copy-Number Variation Contributes to the Mutational Load of Bardet-Biedl Syndrome. *American journal of human genetics*. 2016;99:318–36. doi:10.1016/j.ajhg.2015.04.023.
105. Saburi S, Hester I, Fischer E, Pontoglio M, Eremina V, Gessler M, et al. Loss of Fat4 disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease. *Nat Genet*. 2008;40:1010–5. doi:10.1038/ng.179.
106. Bi W, Yan J, Stankiewicz P, et al. Genes in a Refined Smith-Magenis Syndrome Critical Deletion Interval on Chromosome 17p11.2 and the Syntenic Region of the Mouse. *Genome Research*. 2002:713–28.
107. May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, et al. Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLII for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:5752–6.
108. Nemeth BC, Sahin-Tóth M. Human cationic trypsinogen (PRSS1) variants and chronic pancreatitis. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2014;306:466–73.
109. Brown JM, Cochran DA, Craige B, Kubo T, Witman GB. Assembly of IFT trains at the ciliary base depends on IFT74. *Curr Biol*. 2015;25:1583–93. doi:10.1016/j.cub.2015.04.060.
110. Carroll TJ, Yu J. The kidney and planar cell polarity. *Curr Top Dev Biol*. 2012;101:185–212. doi:10.1016/B978-0-12-394592-1.00011-9.

111. Satir P, Satir BH. The conserved ancestral signaling pathway from cilium to nucleus. *J Cell Sci* 2019. doi:10.1242/jcs.230441.
112. Cowin AJ, Lei N, Franken L, Ruzehaji N, Offenhäuser C, Kopecki Z, Murray RZ. Lysosomal secretion of Flightless I upon injury has the potential to alter inflammation. *Commun Integr Biol*. 2012;5:546–9. doi:10.4161/cib.21928.
113. Yoshida K. Identification and characterization of human ZNF18 gene in silico. *Int J Mol Med*. 2005;15:545–8.
114. Tryka KA, Hao L, Sturcke A, Jin Y, Wang ZY, Ziyabari L, et al. NCBI's Database of Genotypes and Phenotypes: dbGaP. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:D975-9. doi:10.1093/nar/gkt1211.
115. Faber J, Fonseca LM. How sample size influences research outcomes. *Dental Press J Orthod*. 2014;19:27–9. doi:10.1590/2176-9451.19.4.027-029.ebo.
116. Weiss FU, Schurmann C, Guenther A, Ernst F, Teumer A, Mayerle J, et al. Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status and blood group B are associated with elevated serum lipase activity in asymptomatic subjects, and an increased risk for chronic pancreatitis: a genetic association study. *Gut*. 2015;64:646–56. doi:10.1136/gutjnl-2014-306930.
117. Yang Y, Kim SC, Yu T, Yi Y-S, Rhee MH, Sung G-H, et al. Functional roles of p38 mitogen-activated protein kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:352371. doi:10.1155/2014/352371.
118. Cseh B, Doma E, Baccarini M. "RAF" neighborhood: protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. *FEBS Lett*. 2014;588:2398–406. doi:10.1016/j.febslet.2014.06.025.
119. Dabrowski A. Exocrine pancreas; molecular basis for intracellular signaling, damage and protection--Polish experience. *J Physiol Pharmacol*. 2003;54 Suppl 3:167–81.
120. Kim H. Cerulein Pancreatitis: Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis. *Gut and Liver*. 2008;2:74–80.
121. Halbrook CJ, Wen H-J, Ruggeri JM, Takeuchi KK, Zhang Y, Di Magliano MP, Crawford HC. Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Activity Maintains Acinar-to-Ductal Metaplasia and Is Required for Organ Regeneration in Pancreatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2017;3:99–118. doi:10.1016/j.jcmgh.2016.09.009.

122. Young A, Lyons J, Miller AL, Phan VT, Alarcón IR, McCormick F. Ras Signaling and Therapies. *Cancer Res.* 2009;102:1–17. doi:10.1016/S0065-230X(09)02001-6.
123. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin JW, Arnheim N, Perucho M. Most Human Carcinomas of the Exocrine Pancreas Contain Mutant c-K-ras Genes. *Cell.* 1988;53:549–54.
124. Yanagisawa A, Ohtake K, Ohashi K, Hori M, Kitagawa T, Sugano H, Kato Y. Frequent c-Ki-ras Oncogene Activation in Mucous Cell Hyperplasias of Pancreas Suffering from Chronic Inflammation. *Cancer Res.* 1993;53:953–6.
125. Campbell HD, Fountain S, McLennan IS, Berven LA, Crouch MF, Davy DA, et al. Fliih, a gelsolin-related cytoskeletal regulator essential for early mammalian embryonic development. *Mol Cell Biol.* 2002;22:3518–26. doi:10.1128/mcb.22.10.3518-3526.2002.
126. Lee Y-H, Stallcup MR. Interplay of Fli-I and FLAP1 for regulation of beta-catenin dependent transcription. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:5052–9. doi:10.1093/nar/gkl652.
127. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene.* 2017;36:1461–73. doi:10.1038/onc.2016.304.
128. Modi S, Kir D, Banerjee S, Saluja A. Control of Apoptosis in Treatment and Biology of Pancreatic Cancer. *J Cell Biochem.* 2016;117:279–88. doi:10.1002/jcb.25284.
129. Hu Y, Wan R, Yu G, Shen J, Ni J, Yin G, et al. Imbalance of Wnt/Dkk negative feedback promotes persistent activation of pancreatic stellate cells in chronic pancreatitis. *PLoS One.* 2014;9:e95145. doi:10.1371/journal.pone.0095145.
130. Xiao W, Jiang W, Shen J, Yin G, Fan Y, Wu D, et al. Retinoic Acid Ameliorates Pancreatic Fibrosis and Inhibits the Activation of Pancreatic Stellate Cells in Mice with Experimental Chronic Pancreatitis via Suppressing the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *PLoS One.* 2015;10:e0141462. doi:10.1371/journal.pone.0141462.
131. Keefe MD, Wang H, La O J-P de, Khan A, Firpo MA, Murtaugh LC. β -catenin is selectively required for the expansion and regeneration of mature pancreatic acinar cells in mice. *Dis Model Mech.* 2012;5:503–14. doi:10.1242/dmm.007799.
132. Wang T, Chuang T-H, Ronni T, Gu S, Du Y-C, Cai H, et al. Flightless I homolog negatively modulates the TLR pathway. *J Immunol.* 2006;176:1355–62. doi:10.4049/jimmunol.176.3.1355.

133. Vaure C, Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol.* 2014;5:316. doi:10.3389/fimmu.2014.00316.
134. Li H-G, Zhou Z-G, Li Y, Zheng X-L, Lei S, Zhu L, Wang Y. Alterations of Toll-like receptor 4 expression on peripheral blood monocytes during the early stage of human acute pancreatitis. *Digestive Diseases and Sciences.* 2007;52:1973–8. doi:10.1007/s10620-006-9211-4.
135. Sawa H, Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Shinzeki M, Nakajima T, Kuroda Y. Role of toll-like receptor 4 in the pathophysiology of severe acute pancreatitis in mice. *Surg Today.* 2007;37:867–73. doi:10.1007/s00595-007-3520-x.
136. Xiping Z, Dijiong W, Jianfeng L, Qihui C, Jing Y, Penghui J, et al. Effects of *Salvia miltiorrhizae* on ICAM-1, TLR4, NF-kappaB and Bax proteins expression in multiple organs of rats with severe acute pancreatitis or obstructive jaundice. *Inflammation.* 2009;32:218–32. doi:10.1007/s10753-009-9124-4.
137. Gao R, Zhu J, Zhang X, et al. Up-regulation of Toll-like Receptor 4 Signaling Pathway in Human Chronic Pancreatitis. *Am J Gastroenterol.* 2011;106:64.
138. COMFORT MW, GAMBILL EE, BAGGENSTOSS AH. Chronic relapsing pancreatitis; a study of 29 cases without associated disease of the biliary or gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* 1946;6:376–408.
139. Ammann RW, Muellhaupt B. Progression of alcoholic acute to chronic pancreatitis. *Gut.* 1994;35:552–6. doi:10.1136/gut.35.4.552.
140. Kristiansen L, Grønbaek M, Becker U, Tolstrup JS. Risk of pancreatitis according to alcohol drinking habits: a population-based cohort study. *American Journal of Epidemiology.* 2008;168:932–7. doi:10.1093/aje/kwn222.
141. Pandol SJ, Periskic S, Gukovsky I, Zaninovic V, Jung Y, Zong Y, et al. Ethanol diet increases the sensitivity of rats to pancreatitis induced by cholecystokinin octapeptide. *Gastroenterology.* 1999;117:706–16. doi:10.1016/s0016-5085(99)70465-8.
142. Gukovskaya AS, Hosseini S, Satoh A, Cheng JH, Nam KJ, Gukovsky I, Pandol SJ. Ethanol differentially regulates NF-kappaB activation in pancreatic acinar cells through calcium and protein kinase C pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286:G204-13. doi:10.1152/ajpgi.00088.2003.

143. Li HS, Zhang JY, Thompson BS, Deng XY, Ford ME, Wood PG, et al. Rat mitochondrial ATP synthase ATP5G3: cloning and upregulation in pancreas after chronic ethanol feeding. *Physiol Genomics*. 2001;6:91–8. doi:10.1152/physiolgenomics.2001.6.2.91.
144. Gorelick FS. Alcohol and zymogen activation in the pancreatic acinar cell. *Pancreas*. 2003;27:305–10. doi:10.1097/00006676-200311000-00006.
145. Whitcomb DC. Gene-environment factors that contribute to alcoholic pancreatitis in humans. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21 Suppl 3:S52-5. doi:10.1111/j.1440-1746.2006.04583.x.
146. Sandler M, Dummer A, Weiss FU, Krüger B, Wartmann T, Scharffetter-Kochanek K, et al. Tumour necrosis factor α secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice. *Gut*. 2013;62:430–9. doi:10.1136/gutjnl-2011-300771.
147. Xue J, Sharma V, Hsieh MH, Chawla A, Murali R, Pandol SJ, Habtezion A. Alternatively activated macrophages promote pancreatic fibrosis in chronic pancreatitis. *Nat Commun*. 2015;6:7158. doi:10.1038/ncomms8158.
148. Lugea A, Gukovsky I, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Nonoxidative ethanol metabolites alter extracellular matrix protein content in rat pancreas. *Gastroenterology*. 2003;125:1845–59. doi:10.1053/j.gastro.2003.09.021.
149. Apte MV, Phillips PA, Fahmy RG, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, et al. Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. *Gastroenterology*. 2000;118:780–94. doi:10.1016/s0016-5085(00)70148-x.
150. Apte MV, Pirola RC, Wilson JS. Mechanisms of alcoholic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25:1816–26. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06445.x.
151. Sarles H. Chronic calcifying pancreatitis--chronic alcoholic pancreatitis. *Gastroenterology*. 1974;66:604–16.
152. Corrao G, Bagnardi V, Zambon A, Arico S. Exploring the dose-response relationship between alcohol consumption and the risk of several alcohol-related conditions: a meta-analysis. *Addiction*. 1999;94:1551–73. doi:10.1046/j.1360-0443.1999.9410155111.x.

153. Yadav D, Papachristou GI, Whitcomb DC. Alcohol-associated pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am.* 2007;36:219-38, vii. doi:10.1016/j.gtc.2007.03.005.
154. Teich N, Mössner J, Keim V. Screening for mutations of the cationic trypsinogen gene: are they of relevance in chronic alcoholic pancreatitis? *Gut.* 1999;44:413–6. doi:10.1136/gut.44.3.413.
155. Perri F, Piepoli A, Stanziale P, Merla A, Zelante L, Andriulli A. Mutation analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, the cationic trypsinogen (PRSS1) gene, and the serine protease inhibitor, Kazal type 1 (SPINK1) gene in patients with alcoholic chronic pancreatitis. *Eur J Hum Genet.* 2003;11:687–92. doi:10.1038/sj.ejhg.5201035.
156. Monaghan KG, Jackson CE, KuKuruga DL, Feldman GL. Mutation analysis of the cystic fibrosis and cationic trypsinogen genes in patients with alcohol-related pancreatitis. *Am J Med Genet.* 2000;94:120–4. doi:10.1002/1096-8628(20000911)94:2<120::aid-ajmg4>3.0.co;2-n.
157. J Threadgold, W Greenhalf, I Ellis, N Howes, M M Lerch, P Simon, J Jansen, R Charnley, R Laugier, L Frulloni, A Oláh, M Delhay, I Ihse, O B Schaffalitzky de Muckadell, Å Andrén-Sandberg, C W Imrie, J Martinek, T M Gress, R Mountford, D Whitcomb, J P Neoptolemos. The N34S mutation of SPINK1 (PSTI) is associated with a familial pattern of idiopathic chronic pancreatitis but does not cause the disease. *Gut.* 2002;675–81.
158. Drenth JPH, te Morsche R, Jansen, J B M J. Mutations in serine protease inhibitor Kazal type 1 are strongly associated with chronic pancreatitis. *Gut.* 2002;50:687–92. doi:10.1136/gut.50.5.687.
159. Ward LD, Kellis M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:D930-4. doi:10.1093/nar/gkr917.
160. Derikx MHM, Szmola R, Te Morsche, Rene H M, Sunderasan S, Chacko A, Drenth JPH. Tropical calcific pancreatitis and its association with CTRC and SPINK1 (p.N34S) variants. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009;21:889–94. doi:10.1097/MEG.0b013e32832183cf.

161. Vendrell J, Querol E, Avilés FX. Metalloproteases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2000;1477:284–98. doi:10.1016/s0167-4838(99)00280-0.
162. 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. *J Biol Chem*. 2011;286:1819–27. doi:10.1074/jbc.M110.187369.
163. Hegyi E, Sahin-Tóth M. Human CPA1 mutation causes digestive enzyme misfolding and chronic pancreatitis in mice. *Gut*. 2019;68:301–12. doi:10.1136/gutjnl-2018-315994.
164. Schneider A, LaRusch J, Sun X, Aloe A, Lamb J, Hawes R, et al. Combined bicarbonate conductance-impairing variants in CFTR and SPINK1 variants are associated with chronic pancreatitis in patients without cystic fibrosis. *Gastroenterology*. 2011;140:162–71. doi:10.1053/j.gastro.2010.10.045.
165. Hegyi E, Sahin-Tóth M. Genetic Risk in Chronic Pancreatitis: The Trypsin-Dependent Pathway. *Digestive Diseases and Sciences*. 2017;62:1692–701. doi:10.1007/s10620-017-4601-3.
166. Tomaiuolo AC, Sofia VM, Surace C, Majo F, Genovese S, Petrocchi S, et al. Relationship between CFTR and CTRC variants and the clinical phenotype in late-onset cystic fibrosis disease with chronic pancreatitis. *J Mol Diagn*. 2015;17:171–8. doi:10.1016/j.jmoldx.2014.11.007.
167. Sofia VM, Surace C, Terlizzi V, Da Sacco L, Alghisi F, Angiolillo A, et al. Trans-heterozygosity for mutations enhances the risk of recurrent/chronic pancreatitis in patients with Cystic Fibrosis. *Mol Med*. 2018;24:38. doi:10.1186/s10020-018-0041-6.
168. Hartl DL, Clark AG. *Principles of population genetics*: Sinauer associates Sunderland, MA; 1997.
169. Dewan A, Liu M, Hartman S, Zhang SS-M, Liu DTL, Zhao C, et al. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science*. 2006;314:989–92. doi:10.1126/science.1133807.
170. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai J-Y, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308:385–9. doi:10.1126/science.1109557.

171. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447:661–78. doi:10.1038/nature05911.
172. Wray NR. Allele frequencies and the r^2 measure of linkage disequilibrium: impact on design and interpretation of association studies. *Twin Res Hum Genet*. 2005;8:87–94. doi:10.1375/1832427053738827.
173. Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI, Yang J. Five years of GWAS discovery. *American journal of human genetics*. 2012;90:7–24. doi:10.1016/j.ajhg.2011.11.029.
174. Sossenheimer MJ, Aston CE, Preston RA, Gates LK, JR, Ulrich CD, Martin SP, et al. Clinical characteristics of hereditary pancreatitis in a large family, based on high-risk haplotype. The Midwest Multicenter Pancreatic Study Group (MMPSG). *Am J Gastroenterol*. 1997;92:1113–6.
175. Sibert JR. Hereditary pancreatitis in England and Wales. *Journal of Medical Genetics*. 1978;15:189–201. doi:10.1136/jmg.15.3.189.
176. Kattwinkel J, Lapey A, Di Sant'Agnese PA, Edwards WA. Hereditary pancreatitis: three new kindreds and a critical review of the literature. *Pediatrics*. 1973;51:55–69.
177. Solomon S, Whitcomb DC. Genetics of pancreatitis: an update for clinicians and genetic counselors. *Curr Gastroenterol Rep*. 2012;14:112–7. doi:10.1007/s11894-012-0240-1.
178. Sánchez-Ramírez CA, Flores-Martínez SE, García-Zapién AG, Montero-Cruz SA, Larrosa-Haro A, Sánchez-Corona J. Screening of R122H and N29I mutations in the PRSS1 gene and N34S mutation in the SPINK1 gene in Mexican pediatric patients with acute and recurrent pancreatitis. *Pancreas*. 2012;41:707–11. doi:10.1097/MPA.0b013e31823cd873.
179. Dipple KM, McCabe ER. Phenotypes of patients with "simple" Mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers, and systems dynamics; 2000 Jun.
180. Altès A, Bach V, Ruiz A, Esteve A, Felez J, Remacha AF, et al. Mutations in HAMP and HJV genes and their impact on expression of clinical hemochromatosis in a cohort of 100 Spanish patients homozygous for the C282Y mutation of HFE gene. *Ann Hematol*. 2009;88:951–5. doi:10.1007/s00277-009-0705-y.

181. Grocock CJ, Rebours V, Delhaye MN, Andrén-Sandberg A, Weiss FU, Mountford R, et al. The variable phenotype of the p.A16V mutation of cationic trypsinogen (PRSS1) in pancreatitis families. *Gut*. 2010;59:357–63. doi:10.1136/gut.2009.186817.
182. Moran RA, Quesada-Vazquez N, Sinha A, de-Madaria E, Singh VK. High Penetrance of the PRSS1 A16V Mutation in a Kindred With SPINK1 N34S and CFTR TG11-5T Co-mutations. *Pancreas*. 2016;45.
183. Amann ST, Gates LK, Aston CE, Pandya A, Whitcomb DC. Expression and penetrance of the hereditary pancreatitis phenotype in monozygotic twins. *Gut*. 2001;48:542–7.
184. Galetzka D, Hansmann T, El Hajj N, Weis E, Imscher B, Ludwig M, et al. Monozygotic twins discordant for constitutive BRCA1 promoter methylation, childhood cancer and secondary cancer. *Epigenetics*. 2012;7:47–54. doi:10.4161/epi.7.1.18814.
185. Turker MS, Bestor TH. Formation of methylation patterns in the mammalian genome. *Mutat Res*. 1997;386:119–30. doi:10.1016/s1383-5742(96)00048-8.
186. Yoder JA, Bestor TH. Genetic analysis of genomic methylation patterns in plants and mammals. *Biol Chem*. 1996;377:605–10.
187. Khalid A, Finkelstein S, Thompson B, Kelly L, Hanck C, Godfrey TE, Whitcomb DC. A 93 year old man with the PRSS1 R122H mutation, low SPINK1 expression, and no pancreatitis: insights into phenotypic non-penetrance. *Gut*. 2006;55:728–31. doi:10.1136/gut.2005.067959.
188. Hunter DJ. Gene-environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet*. 2005;6:287–98. doi:10.1038/nrg1578.
189. Lin Y, Tamakoshi A, Hayakawa T, Ogawa M, Ohno Y. Cigarette smoking as a risk factor for chronic pancreatitis: a case-control study in Japan. Research Committee on Intractable Pancreatic Diseases. *Pancreas*. 2000;21:109–14. doi:10.1097/00006676-200008000-00001.
190. Prinz RA, Aranha GV. The association of primary hyperparathyroidism and pancreatitis. *Am Surg*. 1985;51:325–9.
191. Krüger B, Albrecht E, Lerch MM. The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis. *Am J Pathol*. 2000;157:43–50. doi:10.1016/S0002-9440(10)64515-4.

192. Pretis N de, Amodio A, Frulloni L. Hypertriglyceridemic pancreatitis: Epidemiology, pathophysiology and clinical management. *United European Gastroenterol J.* 2018;6:649–55. doi:10.1177/2050640618755002.
193. Kottanattu L, Lava SAG, Helbling R, Simonetti GD, Bianchetti MG, Milani GP. Pancreatitis and cholecystitis in primary acute symptomatic Epstein-Barr virus infection - Systematic review of the literature. *J Clin Virol.* 2016;82:51–5. doi:10.1016/j.jcv.2016.06.017.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mir Zeit nehmen, denjenigen zu danken, die diese Dissertation ermöglicht haben und mich auf diesem Weg unterstützt und begleitet haben.

Zunächst möchte ich Herrn Professor Dr. Markus M. Lerch für die Möglichkeit, zu diesem Thema zu promovieren und die Betreuung meiner Arbeit herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Frank Ulrich Weiß, der in den vergangenen drei Jahren mit unermüdlicher Geduld für einen roten Faden bei der Arbeit im Labor, in den Untiefen von Excel und Linux und bei der Verfassung dieser Arbeit gesorgt hat und stets ein offenes Ohr für meine zahlreichen Fragen hatte. Die humorvolle Zusammenarbeit hat über so manche Phase der Verzögerung, die zu Forschungsprojekten eben dazugehören, hinweggeholfen.

Ich bedanke mich herzlich bei dem gesamten Laborteam der Klinik für Innere Medizin A für die kollegiale Hilfsbereitschaft. Besonders hervorheben möchte ich Frau Diana Krüger, die mir bei jeglichen methodischen Fragestellungen stets mit Rat und Tat zu Seite stand.

Abschließend möchte ich der Exzellenzinitiative des Landes Mecklenburg-Vorpommern für die Förderung im Rahmen des Forschungsverbundprojektes PePPP, Proteinfehlfaltung, ER-Stress und Proteindegradation – Entwicklung einer systematischen Pipeline für individualisierte Therapien bei erblichen Leber- und Pankreaserkrankungen, danken.