

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Einzelnukleotid-Polymorphismus in *TBC1D8B* als genetische
Risikovariante der chronischen Pankreatitis**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinische Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Constantin Zimmer

geboren am 22. Dezember 1988 in Freiburg im Breisgau

Betreuer: Prof. Dr. med. Jonas Rosendahl

Gutachter: PD Dr. rer. nat. Matthias Sandler, Greifswald
Prof. Dr. med. Marino Venerito, Magdeburg

05.10.2021

25.04.2022

Referat und bibliografische Beschreibung

Die chronische Pankreatitis (CP) ist eine entzündliche Erkrankung der Bauchspeicheldrüse, bei der es zu rezidivierenden Schüben oder dauerhaften Oberbauchschmerzen kommt und daher die Lebensqualität von Betroffenen durch die Erkrankung beeinträchtigt wird. Wichtigste Risikofaktoren für die Entstehung einer CP sind das Rauchen, übermäßiger Alkoholkonsum sowie eine Vielzahl von genetischen Risikofaktoren.

Eine im Jahr 2012 durchgeführte genomweite Assoziationsstudie (GWAS) ermittelte drei SNPs, die mit der CP assoziiert sind, deren funktionelle Konsequenz jedoch nicht abschließend geklärt ist. Daher wurden mittels einer bioinformatischen Methode (PMCA) weitere Varianten analysiert, die in einem Kopplungsungleichgewicht stehen und von funktioneller Bedeutung sein könnten. Eine dieser, durch die PMCA identifizierten, Varianten wurde näher untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde ermittelt, ob die x-chromosomale Variante *rs7877190* in *TBC1D8B* einen genetischen Risikofaktor für die Entstehung der CP in der untersuchten Kohorte bei insgesamt 585 Patient*innen darstellt. Ebenso wurde die Beeinflussung der Genexpression dieser Variante im Zellkulturmodell ermittelt.

Zunächst wurde bei CP Patient*innen und Kontrollen die Variante *rs7877190* durch Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) genotypisiert. Von insgesamt 119 Frauen mit einer nicht alkoholischen CP (NACP) wiesen 41 (34,5%) das Risikoallel der Variante *rs7877190* auf. Bei Blutspenderinnen wurde das Risikoallel bei 23,9 % identifiziert. Die Variante *rs7877190* ist bei Frauen, die an einer NACP erkrankten, in der untersuchten Kohorte assoziiert ($p=0,002$, Odds Ratio=1,85; 95% CI = 1,25 – 2,73). In der Patientengruppe der Männer mit einer NACP konnte bei 54 von insgesamt 140 Männern (38,6%) das Risikoallel nachgewiesen werden, wohingegen bei 26,7% (238 von 891) der Männer in der Kontrollgruppe das Risikoallel bestimmt wurde. Auch in dieser Gruppe konnte ein Zusammenhang der Variante mit der NACP gezeigt ($p=0,004$, OR=1,73; 95% CI = 1,19 – 2,50) werden.

Bei an einer alkoholischen CP (ACP) erkrankten Frauen fand sich im Vergleich mit den gesunden Blutspenderinnen kein Unterschied ($p=0,189$). Jedoch zeigte sich eine starke Assoziation der Variante bei an einer ACP erkrankten Männern im untersuchten Patientenkollektiv verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe ($p<0,0001$, OR=1,79; 95% CI = 1,35 – 2,37).

Im HEK-293- sowie im PANC-1-Zellmodell konnte in den durchgeführten Reporter-Experimenten kein Einfluss der Genexpression durch *rs7877190* nachgewiesen werden.

Zimmer, Constantin: Einzelnukleotid-Polymorphismus in *TBC1D8B* als genetische Risikovariante der chronischen Pankreatitis, Halle, Univ. Med. Fak., Diss. 73 Seiten, 2021

INHALTSVERZEICHNIS

Referat und bibliografische Beschreibung
Abkürzungsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Chronische Pankreatitis	1
1.2 Genetische Assoziationen der chronischen Pankreatitis – Autodigestion als pathophysiologisches Konzept	2
1.2.1 Genetische Varianten im kationischen Trypsinogen (<i>PRSS1</i>).....	4
1.2.2 Genetische Varianten im Serinprotease-Inhibitor, Kazal-Typ 1 (<i>SPINK1</i>)	6
1.2.3 Genetische Varianten des Chymotrypsin C (<i>CTRC</i>).....	6
1.2.4 Genetische Varianten der Carboxypeptidase A1 (<i>CPA1</i>).....	7
1.2.5 Genetische Varianten der Carboxylesterlipase (<i>CEL</i>)	8
1.3 Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) zur Identifizierung weiterer Varianten... 8	
1.3.1 Durch GWAS identifizierte Risikovarianten für die Entstehung einer CP.....	10
2. ZIELSTELLUNG	12
3. MATERIALIEN UND METHODEN	13
3.1 Phylogenetic Module Complexity Analysis (PMCA).....	13
3.2 Patient*innen und Blutspender*innen.....	14
3.2.1 Fallzahlplanung	15
3.3 Materialien, Geräte und Programme	15
3.3.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	15
3.3.2 Geräte	17
3.3.3 Oligonukleotide / DNA-Sonden	18
3.3.4 Programme	18
3.4 Methoden	19
3.4.1 DNA-Extraktion	19
3.4.2 Polymerase-Kettenreaktion	19
3.4.3 Gelelektrophorese	20
3.4.4 Herstellung von Agaroseplatten für die Gelelektrophorese	21
3.4.5 Durchführung der Gelelektrophorese	21
3.4.6 Sequenzierung	23
3.5 Genotypisierung mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET).....	24
3.6 Reporter-gen-Analysen in PANC-1- und HEK-293-Zellen.....	27
3.6.1 Zellkultur der PANC-1- und HEK-293-Zellen	29
3.6.2 Herstellung der LB-Ampicillin-Platten zur Kolonisation der Bakterien	30
3.6.3 Restriktionsverdau und Ligation des Vektors	30
3.6.4 Bakterielle Vervielfältigung der Plasmide.....	31
3.6.5 Gewinnung der Plasmid DNA mittels Mini-Präparation.....	32
3.6.6 Transfektion der Zellen	33

3.6.7 Messung der Luciferase-Aktivitäten	34
3.6.8 Berechnung der relativen Reportergergen-Aktivitäten	34
3.7 Statistische Auswertung	35
4. ERGEBNISSE	36
4.1 Ergebnisse der Phylogenetic Module Complexity Analysis (PMCA)	36
4.2 Genotypisierung der Variante <i>rs7877190</i> mittels FRET an genomischer DNA	38
4.2.1 Vergleich des relativen Risikos der untersuchten Variante (<i>rs7877190</i>) mit den zugrunde liegenden Varianten in der ermittelten GWAS in der Kohorte	41
4.3 Beeinflussung der Genexpression durch <i>rs7877190</i>	43
4.3.1 Ergebnisse der Analysen am PANC-1-Zellmodell.....	43
4.3.2. Ergebnisse der Analysen am HEK-293-Zellmodell	44
5. DISKUSSION	46
5.1. Möglichkeiten und Grenzen von GWAS und die Notwendigkeit zur Charakterisierung einer identifizierten Variante auf funktioneller Ebene	47
5.2 Bisherige Erkenntnisse über <i>CLDN2</i> sowie <i>MORC4</i> und die mögliche funktionelle Bedeutung der Gene bei der Entstehung einer CP	48
5.3. <i>rs7877190</i> in <i>TBC1D8B</i> und die „Familie der TBC-Proteine“	50
5.4 Diskussion der Ergebnisse.....	53
5.4.1 <i>rs7877190</i> als genetische Risikovariante der chronischen Pankreatitis	53
5.4.2 Analyse der verwendeten Fallzahl und der Allgemeingültigkeit der ermittelten Assoziation	54
5.4.3 Vergleich des relativen Risikos und Signifikanzniveaus der untersuchten Variante <i>rs7877190</i> mit den SNPs <i>rs7057398</i> sowie <i>rs12688220</i>	55
5.4.4 Diskussion der Ergebnisse der Reportergergen-Aktivität von <i>rs7877190</i> im PANC-1- und HEK-293-Zellkulturmodell.....	56
5.4.5 Methodische Diskussion der Reportergergen-Analysen	58
5.5 Ausblick	59
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	60
7. LITERATURVERZEICHNIS	63
8. THESEN	72

Abbildungen und Tabellen

Selbstständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

ACP	Alkoholische chronische Pankreatitis
aqua dest.	Destilliertes Wasser, lat. <i>aqua destillata</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare, engl. <i>base pairs</i>
C	Celsius
CEL	Carboxylesterlipase
CEL-HYB	Hybridallel aus Carboxylesterlipase und Pseudogen
CELP	Pseudogen Carboxylesterlipase
CI	Konfidenzintervall
CLDN2	Claudin-2
CP	Chronische Pankreatitis
CPA1	Carboxypeptidase A-Typ 1
CPA2	Carboxypeptidase A-Typ 2
CPB1	Carboxypeptidase B-Typ 1
CTRB1	Chymotrypsin B1
CTRB2	Chymotrypsin B2
CTRC	Chymotrypsin C
DMEM	Spezielles Nährmedium für Zellkulturen, engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fetales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
kB	Kilobasen
LD	Kopplungsungleichgewicht, engl. <i>linkage disequilibrium</i>
M	molare Masse
mA	Milliampere

min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µl	Mikroliter
MODY	Juveniler Diabetes, engl. <i>maturity onset Diabetes of the young</i>
MORC4	CW-Type Zink-Finger-Protein 4
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OR	<i>Odds Ratio</i>
p	p-Wert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PMCA	engl. <i>Phylogenetic Module Complexity Analysis</i>
pmol	Pikomol
PRSS1	kationisches Trypsinogen 1
PRSS2	anionisches Trypsinogen 2
Sek.	Sekunden
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus, engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>
SNPs	Einzelnukleotidpolymorphismen (Plural)
SPINK1	Serinproteaseinhibitor, Kazal-Typ 1
TFBS	Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, engl. <i>transcription factor binding sites</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
VNTR	variable Tandemwiederholungen, engl. <i>variable number of tandem repeats</i>
W	Watt

1. EINLEITUNG

1.1 Chronische Pankreatitis

Bei der chronischen Pankreatitis (CP) handelt es sich um eine entzündliche Erkrankung, die durch wiederkehrende Schübe von abdominellen Schmerzen oder durch dauerhafte Schmerzen gekennzeichnet ist (Singer *et al.* 1985). Durch entzündliche Umbauprozesse kommt es zu einem Verlust von Pankreasgewebe, wodurch eine exokrine und/oder endokrine Insuffizienz des Pankreas in der Folge auftreten kann (Singer *et al.* 1985).

Die Inzidenz der CP liegt weltweit in einem Bereich zwischen 1,6-23 pro 100.000 Einwohnern (Beger *et al.* 2013). In den letzten Jahren konnte eine Zunahme der Inzidenz der CP beobachtet werden, was teilweise durch eine verbesserte Diagnosestellung erklärt werden kann. Am häufigsten sind Männer von der Erkrankung betroffen (Dufour, Adamson *et al.* 2003). Der CP kommt eine große sozioökonomische Bedeutung zu, da sie zu den häufigsten gastroenterologischen Diagnosen zählt, die eine stationäre Behandlung der Patient*innen notwendig macht. Laut den Daten des Statistischen Bundesamtes kam es im Jahr 2008 zu 10.267 Krankenhauseinweisungen aufgrund einer CP (Hoffmeister *et al.* 2012). Ebenso kann die CP Ursache einer Arbeits- und Erwerbsunfähigkeit sowie einer früheren Berentung sein.

Der Verlauf eines akuten Schubes bei der CP ist klinisch nicht abschätzbar und die Schwere der Entzündung variiert stark zwischen verschiedenen Patient*innen. Während bei manchen Patient*innen in der Bildgebung nur leichtgradige interstitielle Ödeme des Pankreas nachweisbar sind, kommt es bei anderen Erkrankten zur Ausbildung von Nekrosen, die einen komplizierten Verlauf bedingen können. Die Wahrscheinlichkeit, an einer CP oder deren Folgen zu versterben, liegt bei bis zu 35% und ist somit höher im Vergleich zu beispielweise der Colitis ulcerosa oder des Morbus Crohn (Amman *et al.* 1984; Miyake *et al.* 1987; Lankisch *et al.* 1993). Bei Patient*innen in Industrieländern ist in 70-80% der Fälle ein lang andauernder Alkoholmissbrauch die Ursache der Erkrankung (Beger *et al.* 2013). Interessanterweise entwickeln nur 10% der Patient*innen, die einen langjährigen Alkoholkonsum in ihrer Krankengeschichte aufweisen eine CP (Stigendal *et al.* 1984). Aufgrund dieser Tatsache wird angenommen, dass unter anderem auch genetische Faktoren eine Rolle bei der Entstehung einer alkoholischen CP (ACP) spielen könnten. Dies wurde in einer kürzlich erschienenen genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) bestätigt (Rosendahl *et al.* 2018). Bei etwa 20-25% der CP Fälle kann keine Ursache der Erkrankung identifiziert werden. Diese Fälle werden als idiopathische CP oder nicht-alkoholische CP bezeichnet.

Im Jahre 1952 wurde durch erste Arbeiten von Comfort und Steinberg zur Erforschung der Ätiologie der CP ein bedeutender Grundstein gelegt. Erstmals wurde der Stammbaum einer

Familie, in der mehrere Familienmitglieder unterschiedlicher Generationen an einer CP erkrankt waren, beschrieben. Dies legte den Schluss nahe, dass genetische Ursachen an der Ätiologie der CP beteiligt sind (Comfort *et* Steinberg 1952).

Von einer hereditären oder familiären Pankreatitis spricht man bei Vorliegen einer positiven Familienanamnese, wobei mindestens ein erstgradiger oder zwei oder mehr zweitgradige Verwandte betroffen sein müssen. Die vererbte Form der CP scheint in einigen Fällen einem autosomal dominanten Erbgang zu folgen und weist häufig einen Krankheitsbeginn der betroffenen Patient*innen von unter 20 Jahren auf. *Per definitionem* fehlen dabei Risikofaktoren wie übermäßiger Alkoholkonsum und Rauchen. Sehr selten sind für die Entstehung einer CP eine Pankreasgangstenose beispielsweise nach Trauma, ein Hyperparathyreoidismus sowie eine Hypertriglyceridämie von Bedeutung.

1.2 Genetische Assoziationen der chronischen Pankreatitis – Autodigestion als pathophysiologisches Konzept

Der Hamburger Chemiker Willy Kuhne wies im 19. Jahrhundert in ersten Versuchen die proteinverdauende Eigenschaft des Pankreasenzym Trypsin nach (Busnardo *et al.* 1983). Im Jahre 1815 wurde die Lipase, ein ebenfalls wichtiges Verdauungsenzym des Pankreassekrets, von dem Engländer Alexander Marcet entdeckt. Claude Bernard, ein Physiologe aus Frankreich, konnte durch seine Arbeiten zwischen 1849-1856 zeigen, dass das Pankreassekret für die Verdauung eine wichtige Rolle spielt. Die deutschen Physiologen Johann Eberle und Gabriel Gustav Valentin kamen in der Mitte des 19. Jahrhunderts zu der Überlegung, dass das Pankreassekret an der Emulsion von Fetten beteiligt sein könnte. Claude Bernard schlussfolgerte, dass die gastrische Verdauung ein Vorgang der Vorbereitung sei, da das Sekret des Pankreas in der Lage ist, fettige Nahrungsmittel, die durch den Verdauungstrakt gelangen, in Fettsäuren und Glycerin zu spalten (Busnardo *et al.* 1983).

Diese und weitere Erkenntnisse bildeten die Grundlage für die Hypothese Hans Chiaris, dass eine Pankreatitis durch eine Selbstverdauung des Organs begründet sein könnte (Chiari 1896).

In diesem Kontext hat die Protease Trypsin eine zentrale Rolle. Normalerweise liegt dieses Enzym intrapankreatisch in einer nicht katalytischen, also funktionslosen, Form vor. Erst die Aktivierung durch das Enzym Enteropeptidase (syn. Enterokinase), das im Bürstensaum des Duodenums gebildet und dort sezerniert wird, aktiviert Trypsinogen zu Trypsin, welches wiederum alle proteolytischen Vorläuferenzyme und auch fortwährend sich selbst aktiviert (Steer *et* Meldolesi 1987). Letzteres wird als Autoaktivierung bezeichnet. Somit schützt sich das Pankreas unter physiologischen Bedingungen vor Selbstverdauung durch die Synthese von

inaktiven Vorläuferenzymen, sogenannten Zymogenen, sowie durch die Aktivierung dieser erst im Duodenum. Durch eine niedrige intrapankreatische Calciumkonzentration wird zudem gewährleistet, dass diese Zymogene nicht bereits im Pankreas aktiviert werden (Sutton *et al.* 2003). Weiterhin kann eine Störung des Calciumhaushaltes, die mit einem erhöhten intrazellulären Calciumspiegel einhergeht, ein Risikofaktor für die Entstehung einer Pankreatitis sein (Ward *et al.* 1995).

Ein weiterer Schutzmechanismus ist notwendig, da eine geringe Spontanaktivierung und nachfolgende Autoaktivierung des Trypsinogens unvermeidbar ist. Durch den Serinprotease-Inhibitor, Kazal Typ 1 und Chymotrypsin C (CTRC) besitzt das Pankreas Mechanismen, um aktiviertes Trypsin zu inaktivieren beziehungsweise Trypsinogen zu degradieren.

Unter der Verdauungsenzymkaskade versteht man die nacheinander stattfindende Aktivierung der enzymatischen Vorstufen (Zymogene) in ihre aktivierte Form. Als übergeordnet ist hier die Enterokinase des Duodenums anzusehen. Diese überführt Trypsinogen in das aktive Trypsin. Trypsin wiederum ist in der Lage, andere Zymogene in deren aktivierte Form zu überführen. Abbildung 1 veranschaulicht die erläuterte pankreatische Verdauungsenzymkaskade.

Nimmt man die Selbstverdauungstheorie als Grundlage für die Entstehung einer CP, so stellen alle Gene, die Proteine der Verdauungsenzymkaskade kodieren, biologisch plausible Kandidatengene dar. Mittels dieses hypothesenbasierten Ansatzes wurden in einer Vielzahl von Kandidatengen Veränderungen ermittelt, die das Risiko für die Entstehung einer CP erhöhen.

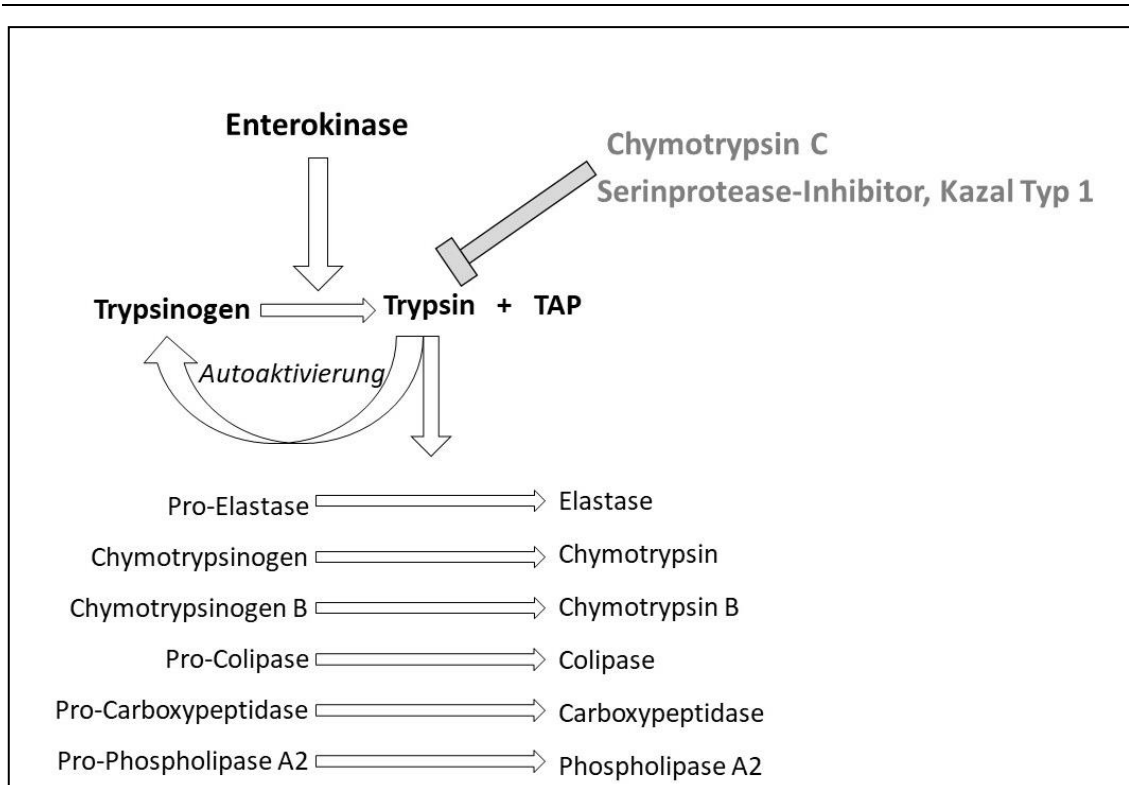


Abbildung 1 modifiziert nach Beger: Die Enterokinase (syn. Enteropeptidase) des Duodenums führt zu einer Spaltung des Trypsinogens in Trypsin und das Trypsin-Aktivierungs-Peptid (TAP). Das aktivierte Trypsin wiederum überführt weitere Enzyme (Proteasen, Lipasen und Elastasen), die als Zymogene vorliegen, in ihren aktiven Zustand. Ebenso führt aktiviertes Trypsin zu einer Autoaktivierung des Trypsinogens. Chymotrypsin C und der Serinprotease-Inhibitor, Kazal Typ 1, wirken inaktivierend auf Trypsin.

1.2.1 Genetische Varianten im kationischen Trypsinogen (*PRSS1*)

Trypsinogen kommt in zwei Unterformen des humanen Pankreas vor, Trypsinogen 1 und 2, wobei Trypsinogen 1 mengenmäßig zwei Drittel ausmacht und Trypsinogen 2 einem Drittel zukommt. (Guy *et al.* 1978). Aus dem Pankreassekret wurden drei unterschiedliche Trypsinogen-Formen isoliert und entsprechend ihrer Eigenschaften im elektrischen Feld benannt. Man spricht daher von einem anionischen, einem kationischen Trypsinogen sowie vom Mesotrypsinogen. Der größte Anteil mit circa 75% wird vom kationischen Trypsinogen gebildet (Guy *et al.* 1978, Rinderknecht *et al.* 1979, 1985). Da das Mesotrypsinogen nur in geringen Konzentrationen vorhanden ist, besteht der übrige Anteil im Wesentlichen aus anionischem Trypsinogen. Die enzymatische Aktivität von anionischem und kationischem Trypsinogen ist gleich, jedoch inaktiviert sich das kationische Trypsinogen geringer und neigt stärker zur Selbstaktivierung (Colomb *et Figarella* 1979).

Im Jahre 1996 gelang es drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander durch Kopplungsanalysen einen Genort für die hereditäre Pankreatitis auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (7q35) zu

identifizieren (Le Bodic *et al.* 1996; Pandya *et al.* 1996; Whitcomb *et al.* 1996 a). Noch im selben Jahr konnte eine Mutation (p.R122H) im Gen des kationischen Trypsinogens als ursächlich für die hereditäre chronische Pankreatitis beschrieben werden (Whitcomb *et al.* 1996 b).

Auf funktioneller Ebene konnte gezeigt werden, dass durch die Variante p.R122H und dem damit einhergehenden Austausch der Aminosäure von Arginin gegen Histidin an Position 122 des Proteins eine CTFC bedingte Degradation von Trypsinogen verhindert wird (Szabó *et Sahin-Tóth* 2012).

Eine weitere genetische Alteration, welche mit der Entstehung einer CP assoziiert ist, stellt die p.N29I-Variante im zweiten Exon des kationischen Trypsinogen dar (Teich, Mössner *et Keim* 1998). Der genaue zugrundeliegende funktionelle Mechanismus ist hierbei noch nicht vollständig geklärt.

Bei einer CP mit positiver Familienanamnese werden diese beiden *PRSS1*-Varianten am häufigsten identifiziert und definieren die hereditäre Pankreatitis. Neben diesen Alterationen gibt es eine Vielzahl von weiteren Varianten im *PRSS1*-Gen, die mit einer CP in signifikanter Assoziation stehen, deren funktionelle Konsequenzen zurzeit jedoch nicht immer ausreichend verstanden sind. Erst kürzlich konnte eine weitere Variante in *PRSS1* identifiziert werden. Die mit der CP assoziierte Variante *p.Glu190Lys* zeigte experimentell eine 2,5-fach höhere Autoaktivierung des die Variante enthaltenen Trypsinogens im Vergleich zum Wildtyp (Jancsó *et al.* 2019).

Insgesamt scheinen *PRSS1*-Mutationen somit zu einer schnelleren Trypsinogen-Aktivierung und/oder Trypsin-Stabilisierung und damit zu einer vermehrten intrapankreatischen Trypsinaktivität zu führen (Rosendahl *et al.* 2007; Teich *et al.* 2006).

Eine Übersicht über die aktuell bekannten genetischen Varianten in *PRSS1* ist auf einer von führenden Forschergruppen eingerichteten Internetseite (<http://www.pancreasgenetics.org/>) hinterlegt.

1.2.2 Genetische Varianten im Serinprotease-Inhibitor, Kazal-Typ 1 (*SPINK1*)

Durch den Serinprotease-Inhibitor, Kazal-Typ 1 (*SPINK1*) verfügt das Pankreas über einen eigenen Mechanismus, um spontan aktiviertes Trypsin zu hemmen und somit einer weiteren Autoaktivierung entgegenzuwirken. *SPINK1* wird auch als pankreatischer sekretorischer Trypsin-Inhibitor (PSTI) oder als tumorassoziiertes Trypsin-Inhibitor (TATI) bezeichnet. Das Enzym wird in den Azinuszellen des Pankreas gebildet und ebenso wie Trypsinogen in Zymogengranula gespeichert.

Im Jahre 1948 isolierten Kazal und seine Mitarbeiter erstmalig das Protein aus dem Sekret des Rinderpankreas. Das Protein ist ebenso in vielen anderen Spezies nachweisbar und wird nicht nur im Pankreas, sondern auch in der Lunge, der Leber, den Nieren, den Ovarien sowie der Brustdrüse gebildet (Shibata *et al.* 1986; Shibata *et al.* 1987).

Witt und seinen Mitarbeitern gelang es im Jahr 2000 in 22 von 96 (23%) pädiatrischen Patient*innen, die an einer CP erkrankt waren, eine Mutation in *SPINK1* nachzuweisen (Witt *et al.* 2000). Bei 18 der 22 Patient*innen wurde ein Basenaustausch von Adenin zu Guanin im Exon 3 identifiziert (c.101A>G). Dieser Basenaustausch führt zu einem Austausch der Aminosäure Asparagin gegen Serin an Position 34 des Proteins (p.N34S) und ist eine häufige Variante bei idiopathischer CP. Die p.N34S-Variante ist neben der idiopathischen CP ebenso mit der ACP assoziiert (Witt *et al.* 2001; Chandak *et al.* 2002; O'Reilly *et al.* 2008).

Im Gegensatz zu *PRSS1* Mutationen wird die p.N34S-Variante bei 0,5 - 2,5% der kaukasischen Bevölkerung in heterozygoter Form gefunden (Ohmuraya *et al.* Yamamura 2011). Dementsprechend ist das relative Risiko für die Entstehung einer CP niedriger als bei *PRSS1*-Mutationen (Schneider 2005, Ohmuraya *et al.* Yamamura 2011). In vitro Analysen der p.N34S-Variante zeigten keinen Einfluss auf die Inhibierung von Trypsin (Kuwata *et al.* 2002). Somit ist die funktionelle Konsequenz der Variante noch nicht vollständig verstanden und möglicherweise liegt ein komplexer Haplotyp vor, in dem die funktionell relevante Variante noch nicht identifiziert wurde.

1.2.3 Genetische Varianten des Chymotrypsin C (*CTRC*)

Mit dem von Rinderknecht und seinen Mitarbeitern beschriebenen Enzym Y verfügt das Pankreas neben *SPINK1* über einen weiteren Mechanismus zur Inhibierung von Trypsin (Rinderknecht *et al.* 1988). Mittlerweile wird dieses Enzym als Chymotrypsin C (*CTRC*) bezeichnet. Das Enzym Chymotrypsin C ist in der Lage, alle Isoformen des humanen Trypsins und Trypsinogens zu spalten und somit zu inaktivieren (Szmola *et al.* Sahin-Tóth 2007).

Allerdings bewirkt die Anwesenheit von *CTRC in vitro* eine gesteigerte Selbstaktivierung einiger mit CP in Assoziation stehender Varianten (p.R122C und p.R122H) des Trypsinogens (Szabó *et Sahin-Tóth* 2012).

Im Jahr 2008 wurden Varianten in den Exonen 2, 3 und 7 von *CTRC* identifiziert, welche mit der CP assoziiert sind (Rosendahl *et al.* 2008). Die zwei häufigsten Risikovarianten für die Entstehung einer CP sind die Variante c.760C>T (p.R254W) und c.738_761del24 (p.K247_R254del), die beide in Exon 7 lokalisiert sind (Rosendahl *et al.* 2008). *In vitro*-Analysen dieser beiden Varianten zeigten eine verminderte Sekretion bzw. Expression von Chymotrypsin C in transfizierten HEK-293T-Zellen (Beer *et al.* 2013). Neben diesen beiden Varianten existieren eine Vielzahl weiterer Varianten des *CTRC*, die mit der CP assoziiert sind. Die Variante p.R254W wurde zusätzlich auch gehäuft in Individuen gefunden, die an einer ACP erkrankt waren (Rosendahl *et al.* 2008).

1.2.4 Genetische Varianten der Carboxypeptidase A1 (*CPA1*)

Zu den Exopeptidasen gehören Carboxypeptidasen, die an der Verdauung beteiligt sind. Bei diesen Enzymen handelt es sich um sogenannte Metalloproteasen, die vom Pankreas sezerniert werden (Vendrell *et al.* 2000). Im humanen Pankreassekret sind drei verschiedene Formen beschrieben. Carboxypeptidasen des A-Types (*CPA1* und *CPA2*) sowie die Carboxypeptidase B. Die beiden Carboxypeptidasen A wirken auf aromatische und aliphatische Aminosäure-Reste, die durch die katalytische Aktivität des Chymotrypsins und verschiedener Elastasen hervorgehen (Vendrell *et al.* 2000). Die Carboxypeptidase B (*CPB1*) hydrolysiert am C-Terminus Lysin- und Arginin-Reste, die aus Proteinspaltungen durch das Trypsin hervorgegangen sind (Vendrell *et al.* 2000).

Im Jahr 2013 gelang es Witt und seinen Mitarbeitern eine starke Assoziation von Varianten der *CPA1* mit der CP, insbesondere bei Patient*innen mit einem frühen Krankheitsbeginn, nachzuweisen (Witt *et al.* 2013). Insgesamt wurden in 944 Proben von Patient*innen 29 Varianten identifiziert, die bei funktionellen Untersuchungen eine enzymatische Aktivität der *CPA1* von unter 20% verglichen zum Wildtyp zeigten (Witt *et al.* 2013). Diese genetischen Abweichungen vom Wildtyp wurden gehäuft in der Kohorte der Patient*innen gefunden, in der die Patient*innen jünger als 20 Jahre alt waren; ein noch stärkerer Zusammenhang zeigte sich bei Patient*innen, die in einem Lebensalter von unter 10 Jahren an einer CP erkrankten (Witt *et al.* 2013). Derzeit wird davon ausgegangen, dass Varianten in *CPA1* eine Fehlfaltung des Proteins verursachen, was wiederum zu einem Stress des Endoplasmatischen Retikulums führt, der sich auf das Entzündungsgeschehen auswirkt. Für die Entstehung einer ACP scheinen *CPA1*-Varianten nicht von Bedeutung zu sein.

1.2.5 Genetische Varianten der Carboxylesterlipase (CEL)

Das Enzym Carboxylesterlipase (CEL), auch als Gallensalz-aktivierte Lipase bezeichnet, kommt im Pankreassekret unterschiedlichster Spezies vor (Lombardo 2001). Eben jenes Enzym spaltet hydrolytisch Cholesterinester, die mit der Nahrung aufgenommen werden, in Cholesterin und langkettige Fettsäuren.

Das dem Enzym zugrunde liegende Gen *CEL* umfasst 11 Exons, wobei im letzten Exon ein *repeat* von 33 nahezu identischen Basen von variabler Länge zu finden ist (*variable number of tandem repeats, VNTR*). Dieser *repeat* kann zwischen elf und einundzwanzig Wiederholungen aufweisen (Raeder *et al.* 2006). Die Variation in der Länge der VNTR-Region ist mit einer exokrinen Dysfunktion des Pankreas assoziiert (Raeder *et al.* 2006). Ebenso ist eine Punktmutation in der VNTR-Region mit einem juvenilen Diabetes (MODY Typ 8, für *engl. maturity onset Diabetes of the young*) assoziiert (Raeder *et al.* 2006).

Auf dem Chromosom 9 ist neben *CEL* noch ein Pseudogen (*CELP*) lokalisiert, das sich insofern von *CEL* unterscheidet, als dass die Exons 2-7 fehlen, ansonsten besteht eine hohe Sequenzhomologie. Durch nicht-allelische homologe Rekombination können *CEL* und *CELP* zu einem Hybridallel (*CEL-HYB*) fusionieren (Fjeld *et al.* 2015). Das *CEL-HYB* findet man im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant häufiger bei Patient*innen mit einer nicht-alkoholischen CP (odds ratio (OR)=5,2) sowie einer ACP (OR=2,3). Somit stellt das *CEL-HYB* einen genetischen Risikofaktor für die Krankheitsentstehung einer CP dar (Fjeld *et al.* 2015). Hinsichtlich des möglicherweise zugrunde liegenden Pathomechanismus zeigte das durch *CEL-HYB* sezernierte Protein *in vitro* eine, verglichen mit dem Wildtyp, geringere Menge, eine reduzierte lipolytische Eigenschaft des Enzyms, eine gesteigerte intrazelluläre Anhäufung sowie eine gesteigerte induzierte Autophagie (Fjeld *et al.* 2015). Folglich stellt das *CEL-HYB*-Allel auf molekularer Ebene einen anderen krankheitsbedingenden Mechanismus dar, als das Protease-Antiprotease-Prinzip in den Kandidatengenen der zuvor genannten Varianten.

1.3 Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) zur Identifizierung weiterer Varianten

Eine andere Möglichkeit, um mit einer Erkrankung assoziierte Varianten zu finden, ist die genomweite Assoziationsstudie (GWAS). Dabei wird die Verteilung von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, *engl. single nucleotide polymorphism*) zwischen an einer bestimmten Erkrankung Betroffenen und einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Bei einem SNP handelt es sich um einen häufig vorkommenden (Allelfrequenz über 1%) Austausch einer Base, wobei die genaue Allelfrequenz nicht einheitlich definiert ist. Diese Einzelnukleotid-Polymorphismen,

die maßgeblich für die genetische Vielfalt innerhalb einer jeweiligen Spezies verantwortlich sind, können sich in einem nicht für ein Protein kodierenden (z.B. Intron), oder in einem kodierenden Abschnitt (Exon) der DNS (Desoxyribonukleinsäure) befinden.

Eine GWAS verläuft in mehreren Schritten. Zunächst werden mittels DNS-Chip-Technologie die Allel-Häufigkeiten von SNPs analysiert. In der Regel werden SNPs mit Allelfrequenzen des seltenen Allels von > 5% untersucht und eine genomweite Signifikanzschwelle mit einem P-Wert von $< 5 \times 10^{-8}$ festgelegt (McCarthy *et al.* 2008, Imamura *et Maeda* 2011). Häufig wird in einer zweiten Phase die DNA-Chip-Analyse erneut unabhängig von der ersten Analyse in einer zweiten Kohorte durchgeführt. Anschließend werden die ermittelten Assoziationen aus der ersten und der zweiten Analyse miteinander verglichen und gegebenenfalls zur Erhöhung der statistischen Power gemeinsam analysiert (Kriebel *et al.* 2012). Abbildung 2 stellt den Ablauf einer GWAS schematisch dar.

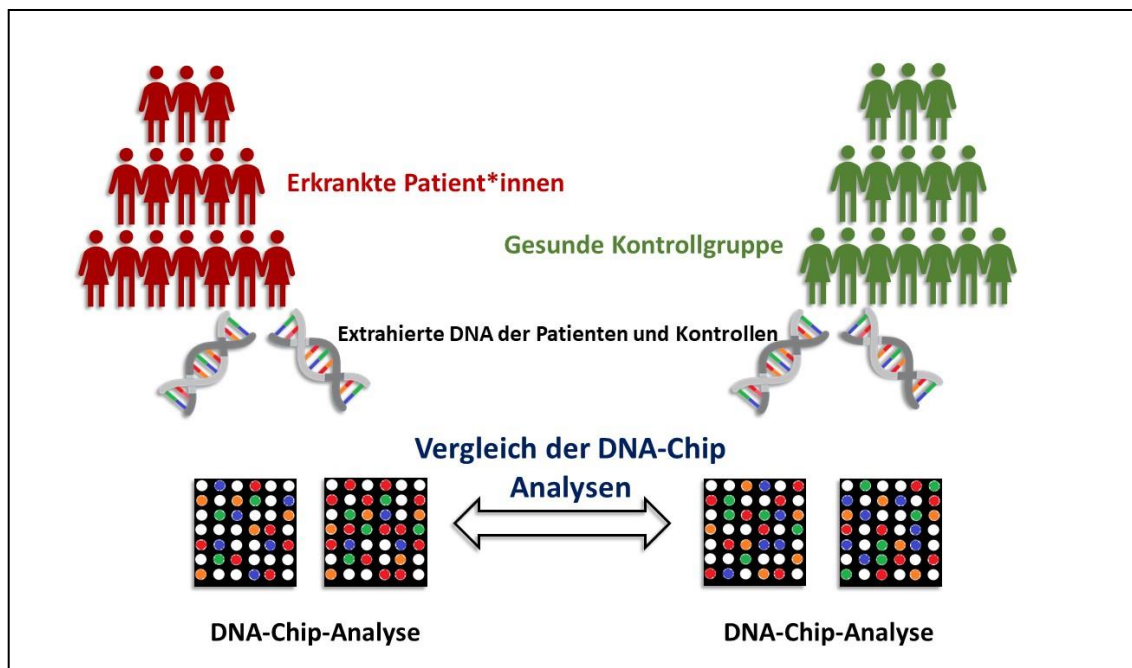


Abbildung 2: Schematische Darstellung zum Ablauf einer GWAS. Genomische DNA von Patient*innen, die von einer bestimmten Erkrankung betroffen sind, wird mit der DNA von nicht erkrankten Menschen aus der Bevölkerung hinsichtlich der Auftretenshäufigkeit von SNPs verglichen. Abbildung modifiziert nach Brose, Internetauftritt der Max-Planck-Gesellschaft. (https://www.mpg.de/10680/Modern_psychiatry, abgerufen am 21.02.2020)

1.3.1 Durch GWAS identifizierte Risikovarianten für die Entstehung einer CP

Im Jahr 2012 wurden drei SNPs mittels einer GWAS identifiziert, die mit der CP assoziiert sind. Bei insgesamt 1.506 Patient*innen mit einer CP oder einer wiederkehrenden akuten Pankreatitis und bei insgesamt 8.567 Kontrollen wurden jeweils 625.739 SNPs untersucht. Es zeigte sich, dass das Minor-Allel (*T*-Allel) des SNP *rs10273639* im *PRSS1-PRSS2*-Lokus auf Chromosom 7 mit einer CP assoziiert ist (odds ratio (OR)=0,73, p-Wert= $2,0 \times 10^{-14}$) und bei Gesunden häufiger vorkommt, als bei Patient*innen (Whitcomb *et al.* 2012). Dementsprechend ist dieses Allel protektiv. Eben jene Variante befindet sich 408 Basenpaare vor der Translations-Initiation von *PRSS1*. Daten zur Genexpression von 69 Gewebeproben aus humanem Pankreas zeigten, dass bei Vorliegen eines homozygoten *C*-Allels ein höheres *PRSS1*-Expressionslevel vorliegt (Whitcomb *et al.* 2012). Weitere veröffentlichte Analysen deuten darauf hin, dass das *A*-Allel von *rs4726576*, das in einem nahezu perfekten *linkage disequilibrium* mit dem *T*-Allel von *rs10273639* steht, für den protektiven Effekt der Variante auf funktioneller Ebene möglicherweise von übergeordneter Bedeutung ist (Boulling *et al.* 2015).

Die Varianten *rs12688220* in *MORC4* (CW-Type Zink-Finger-Protein 4) und *rs7057398* in *CLDN2* (Claudin-2), die sich beide auf dem X-Chromosom im selben Genlokus befinden, sind ebenso mit einer CP assoziiert (Whitcomb *et al.* 2012). Das *C*-Allel von *rs7057398* (OR=1,32, p-Wert= $4,6 \times 10^{-17}$) sowie das *T*-Allel von *rs12688220* (OR=1,39, p= $2,3 \times 10^{-22}$) erhöhen das Risiko für die Erkrankung (Whitcomb *et al.* 2012). In einer weiteren veröffentlichten GWAS bei Patient*innen mit ACP konnten die Assoziationen bestätigt werden (Rosendahl *et al.* 2018). Zusätzlich wurde in dieser GWAS eine Inversion im *CTRB1-CTRB2*-Lokus (Chymotrypsin B1 und B2) als Risikovariante für die Entstehung einer CP identifiziert (Rosendahl *et al.* 2018).

Claudin-2 (*CLDN2*) ist ein struktureller Bestandteil von epithelialen okkludierenden Zellverbindungen (sogenannten *tight-junctions*). Hier sorgt Claudin-2 für eine Kation-Selektivität der *tight-junctions* und wird in den Nieren, der Leber und im Darm exprimiert (Amasheh *et al.* 2002), wohingegen die Expression unter Normalbedingungen im Pankreasgang und in den Inselzellen des Pankreas gering ist (Lee *et al.* 2011). Durch zellulären Stress oder Verletzungen kommt es zu einer Zunahme der Expression in verschiedenen Zellmodellen (Mankertz *et al.* 2004, Mankertz *et al.* 2009, Suzuki *et al.* 2011). Im experimentellen Modell einer akuten Pankreatitis bei Schweinen konnte eine vermehrte Expression von Claudin-2 nachgewiesen werden (Meriläinen *et al.* 2008). Immunhistochemische Färbungen deuten darauf hin, dass es durch die *CLDN2* Variante zu einer Translokation des entsprechenden

Proteins in Richtung der basolateralen Zellmembran von Azinuszellen kommt (Whitcomb *et al.* 2012).

Beim Protein des *MORC4* handelt es sich um ein Zinkfinger-Protein (CW-Typ). Somit könnte es sich hierbei um einen Transkriptionsfaktor handeln. Eine vermehrte Expression von *MORC4* konnte in verschiedenen diffusen B-Zell-Lymphomen ermittelt werden (Liggins *et al.* 2007). Bislang gibt es noch keine Erkenntnisse, die zum Verständnis der Assoziation zwischen der Variante *rs12688220* in *MORC4* und der CP auf funktioneller Ebene beitragen konnten.

2. ZIELSTELLUNG

Während die funktionellen Analysen von *rs10273639* im *PRSS1-PRSS2* Locus den Pathomechanismus der Variante weitestgehend erklären, gibt es bisher keine überzeugenden Ergebnisse hinsichtlich der funktionellen Konsequenz von *rs12688220* im *MORC4* und von *rs7057398* im *CLDN2*. Für die *rs10273639* Variante trifft das bis dato postulierte pathophysiologische Konzept zu, da diese Variante das Gleichgewicht von Proteasen und Anti-Proteasen der Verdauungsenzymkaskade verändert. Bei den *MORC4*- und *CLDN2*-Varianten könnte ein neuer Pathomechanismus zugrunde liegen. Bisher ist es jedoch unklar, ob die mittels GWAS als assoziiert ermittelten SNPs von funktioneller Bedeutung sind, oder ob die assoziierten SNPs nur Stellvertreter anderer gemeinsam vererbter Varianten sind, die bei der Pathogenese der CP eine kausale Relevanz haben.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, mittels bioinformatischer Methoden die funktionell relevante Variante in diesem Locus zu identifizieren. Im nächsten Schritt wird die genetische Assoziation der identifizierten Variante mit der CP in Patient*innen mit ACP und nicht-alkoholischer CP untersucht (NACP). Aufgrund der X-chromosomalen Lokalisation der Variante werden die Analysen gesondert bei Frauen und Männern durchgeführt.

Im nächsten Schritt erfolgt die funktionelle Analyse der Variante. Hier soll die Frage beantwortet werden, ob die Variante in einem Bereich liegt, der für die Regulation der Genexpression von Bedeutung ist.

Zusammengefasst soll

- a.) die funktionell relevante Variante des *MORC4*- und *CLDN2*-Lokus identifiziert,
- b.) auf die Validität ihrer genetischen Assoziation hin untersucht und
- c.) bezüglich ihrer funktionellen Konsequenzen charakterisiert werden.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Phylogenetic Module Complexity Analysis (PMCA)

Durch GWAS konnten eine Vielzahl von SNPs identifiziert werden, die mit unterschiedlichen Erkrankungen assoziiert sind. Diese assoziierten Varianten können in komplexen Haplotypen vererbt werden, sodass in vielen Fällen unklar ist, welche Variante pathophysiologisch relevant ist. So können für die Entstehung einer Erkrankung beispielsweise die durch SNPs verursachte Beeinflussung der cis-Elemente von Bedeutung sein (Claussnitzer *et al.* 2014). Bei den cis-Elementen handelt es sich um einen Bereich in der DNA, der in einem nicht kodierenden Abschnitt liegt und die Expression eines vor oder nach ihm liegenden Gens beeinflusst. Hierbei kann das Gen in unmittelbarer Nähe liegen oder aber mehrere kilo-Basen (kB) entfernt. Die Phylogenetic Module Complexity Analysis (PMCA) ist eine bioinformatische Methode, die in unterschiedlichen Wirbeltierspezies nach einer phylogenetischen Gleichheit von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen (TFBS, engl. *transcription factor binding sites*) sucht. Dabei wird wie folgt vorgegangen:

Wurde ein SNP durch eine GWAS oder eine andere Methodik als mit einer Erkrankung assoziiert identifiziert, so werden weitere SNPs, die mit dem SNP in einem *linkage disequilibrium* stehen, herangezogen. Zunächst wird die den SNP umgebende Gensequenz im menschlichen Genom ermittelt. Diese Sequenz wird anschließend in dem Genom von 15 verschiedenen Wirbeltierarten gesucht. Im nächsten Schritt werden TFBS in jeder orthologen Sequenz ermittelt und sogenannte *TFBSmodule* definiert. Bei diesen *TFBSmodules* handelt es sich um mindestens zwei oder mehrere TFBS in derselben Reihenfolge und in einem bestimmten Abstand, die in allen oder einer Teilmenge der orthologen Sequenzen vorkommen. Nachdem TFBS und *TFBSmodule* bestimmt wurden, wird über eine mehrfache Wiederholung der Analyse und einer komplexen Berechnung eine Unterteilung der SNPs durchgeführt.

Einerseits werden SNPs einer sogenannten *noncomplex region* zugeordnet. In der *noncomplex region* befinden sich all diejenigen SNPs, die durch die Berechnungen der PMCA mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen Einfluss auf die Genregulation haben.

Die andere Gruppe wird von der *complex region* gebildet. In dieser befinden sich SNPs, die mittels PMCA als bedeutend für die Beeinflussung der cis-Elemente und damit der Genexpression identifiziert wurden. Die komplexen Algorithmen der Berechnungen sind in der Publikation von Claussnitzer *et al.* (2014) aufgeführt.

3.2 Patient*innen und Blutspender*innen

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Titel: Erforschung molekulargenetischer Ursachen von Pankreaserkrankungen, Bearbeitungsnummer: 2015-106) genehmigt. Jede Patientin und jeder Patient wurde ausführlich über die genetischen Analysen ärztlich aufgeklärt und unterschrieb im Anschluss an das Gespräch eine Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie. Bei Patient*innen, die das 18. Lebensjahr noch nicht vollendet hatten, wurde die Einverständniserklärung von den Erziehungsberechtigten unterzeichnet. Insgesamt wurden 585 Patient*innen, die an einer chronischen Pankreatitis erkrankt sind, eingeschlossen. Davon war zuvor bei 326 Patient*innen (40 Frauen, Altersmedian 48 Jahre sowie 286 Männern, Altersmedian 49 Jahre) eine ACP diagnostiziert worden. Die restlichen 259 Patient*innen (119 Frauen, Altersmedian 32 Jahre und 140 Männer, Altersmedian 39 Jahre) waren zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses an einer nicht-alkoholischen CP erkrankt.

Die Diagnosestellung der chronischen Pankreatitis erfolgte auf der Grundlage der akzeptierten klinischen Kriterien. Diese umfassen zwei unabhängig voneinander auftretende Episoden von wiederkehrenden Bauchschmerzen, die mit einem mindestens dreifachen Anstieg von Pankreasenzymmarkern, also Alpha-Amylase oder Lipase, im Serum einhergehen. Gestützt wird diese Diagnostik durch bildgebende Verfahren, wie die Abdomensonografie, die Endosonografie, die Computertomografie oder die Magnet-Resonanz-Tomografie, die einen Aufschluss über morphologische, beziehungsweise pathologische Veränderungen des Pankreas geben können. Zu diesen zählen unter anderem Verkalkungen des Organs sowie Pankreasgang-Unregelmäßigkeiten.

Von einem Vorliegen der hereditären CP wurde ausgegangen, wenn die Patient*innen anamnestisch angegeben haben, dass mindestens ein Familienmitglied ersten Grades oder zwei Familienmitglieder zweiten Grades ebenfalls erkrankt waren und die betroffenen Patient*innen keinen anderen Risikofaktor in der Anamnese aufwiesen. Die Diagnose der nicht-alkoholischen CP erfolgte auf dem Boden einer negativen Familienanamnese im Hinblick auf die Erkrankung, bei der zusätzlich weitere Risikofaktoren, wie bestimmte Medikamente, Hyperkalzämie, Traumen, Infektionen und Alkohol gänzlich fehlten.

Neben den DNA-Proben der Patient*innen wurde die Häufigkeitsverteilung der Variante an einer gesunden Kontrollgruppe untersucht. Hierzu diente aus EDTA-Blut isolierte DNA von insgesamt 1.704 (795 Frauen, Altersmedian 57 Jahre, 909 Männer, Altersmedian 60 Jahre) gesunden Blutspender*innen aus Deutschland.

3.2.1 Fallzahlplanung

Vorbereitend auf die Genotypisierung erfolgte eine Fallzahlplanung. Hierzu wurde eine statistische Power von 0,8 (80%) sowie ein Signifikanzniveau (α) von 0,05 gewählt. Als Wahrscheinlichkeiten für das relative Risiko wurde das Allelvorkommen der Risikovarianten von *rs7057398* sowie *rs1268820* zur Berechnung herangezogen. Hierzu wurden die Daten aus der Arbeit von Whitcomb et al. 2012 verwendet. Es wurde mit dem Mittelwert der Allelfrequenzen der beiden Varianten gerechnet.

Die Berechnung der benötigten Fallzahl erfolgte mit dem *Sample size calculator* Version 1.031 (Internetauftritt: <https://homepage.univie.ac.at/robin.ristl/samplesize.php?test=fisbertest>, abgerufen am 17. April 2021). Um eine statistische Power von 80% auf einem 5%igen-Signifikanzniveau zu erzielen, werden laut den Berechnungen 579 Proben für die Genotypisierung benötigt.

3.3 Materialien, Geräte und Programme

3.3.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

0,5 M EDTA Lösung, pH 8,0	SERVA (Heidelberg)
100 Bp (DNA-Leiter, Gelelektrophorese)	BioLabs (Frankfurt am Main)
10X PCR Buffer E complete	GenAxxon Bioscience (Ulm)
14 ml Tubes (LB-Ampicillin-Flüssigkultur)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
24-Well-Platten (Zellkultur)	TPP (Trasadingen, CH)
96-Well-Microplatte PS, U-Boden, transparent, steril	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
96-Well-Microplatte, PS, F-Boden (Kaminform), weiss, LUMITRAC	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
96-Well-PCR-Platten	Kisker Biotech (Steinfurt)
96-Well-Platten (Light Cycler)	Roche (Mannheim)
Agarose	SERVA (Heidelberg)
Ampicillin	SERVA (Heidelberg)
Arctic Phosphatase	New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA)

BigDye Terminator 3.1 (Sequenzierung)	Applied Biosystems (Darmstadt)
Borsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DF-Taq polymerase S	GenAxxon Bioscience (Ulm)
DMEM (Zellkultur + Reportergenassay)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DNeasy Blood & Tissue Kit (DNA-Extraktion)	Qiagen (Hilden)
dNTP Mix (PCR)	Promega (Mannheim)
Dual-Glo-Luciferase-Assay-Kit	Promega (Mannheim)
E. coli Bakterien; JM109	Promega (Mannheim)
Ethidiumbromidlösung	Roth (Karlsruhe)
Fetales Kälberserum (FKS) Superior (Zellkultur)	Merck (Darmstadt)
FuGENE HD (Transfektionsreagenz)	Promega (Mannheim)
Hefe Extrakt	neoFroxx (Einhausen)
KpnI (Restriktionsendonuklease)	New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA)
NaAc (3 M)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Pepton	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
pGL4.23 (DNA-Vektor)	Promega (Mannheim)
pGL4.74 (DNA-Vektor)	Promega (Mannheim)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Rapid DNA Ligation Kit	Roche (Mannheim)
SOC-Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Sodiumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Sucrose	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
SuRE/Cut Puffer L	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
T4-Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA)
T4-Polynukleotid-Kinase-Puffer	New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA)
T75 Zellkulturflaschen	TPP (Trasadingen, CH)
Trisbase	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

3.3.2 Geräte

ABI 3100 Genetic Analyzer (Sequenzierung)	Applied Biosystems (Darmstadt)
Alpha manager HP – Multiimage II (Gelelektrophorese)	Alpha Innotec (Kasendorf)
Biofuge pico (Zentrifuge)	Heraeus Instruments (Hanau)
Biophotometer 6131	Eppendorf (Köln)
C25KC Incubator Shaker (Schüttler für Bakterien)	New Brunswick Scientific (Edison, New Jersey, USA)
CASYton (Zellzählung)	OLS OMNI Life Science (Bremen)
Elektrophoresis Power Supply – EPS 3501 XL (Spannungsgenerator Gelelektrophorese)	Amersham pharmacia biotech (Little Chalfont, UK)
Eppendorf Centrifuge 5430R (Zentrifuge)	Eppendorf (Köln)
Flex Cycler	Analytik Jena (Jena)
Function Line B6 (Brutschrank Bakterien)	Heraeus Instruments (Hanau)
HERAcell 150 (Inkubierschrank)	Heraeus Instruments (Hanau)
HERAsafe KS (Zellkulturbank)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Infinite Reader M200	Tecan (Crailsheim)
LightCycler 480	Roche (Mannheim)
Nanovue Plus (Photometer)	Biochrom (Cambridge, UK)
Olympus CK40 (Mikroskop)	Olympus (Hamburg)
Panasonic Pro II 1400 (Mikrowelle)	Panasonic (Kadoma, JP)
Thermocycler 2720	Applied Biosystem (Darmstadt)
Thermomixer Compact	Eppendorf (Köln)

3.3.3 Oligonukleotide / DNA-Sonden

Alle Oligonukleotide und DNA-Sonden wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen.

Polymerase Kettenreaktion	5'ACCCATACCgATCATCAgCA3' (Primer F - <i>TBC1D8B</i> , Intron 1) 5'CTAAATTgggAgAgATCAgCA3' Rückwärts (Primer R- <i>TBC1D8B</i> , Intron 1)
Genotypisierung mittels FRET	5'CTCACCATCCCCgAgTACC-FL (Sonde) (Variante <i>rs7877190</i> in <i>TBC1D8B</i> , Intron 1) LC640 – 5'ACTCCATCCCATCCCCATACg-PH (Anker) (Variante <i>rs7877190</i> in <i>TBC1D8B</i> , Intron 1)
Reportergen-Assay	5'ACggTACCggAgTgggTACgCggggATggT3' (<i>TBC1D8B</i> , Intron 1, Wildtyp) 5'ACggTACCggAgTgggTACTCggggATggT3' (<i>TBC1D8B</i> , Intron 1, Variante <i>rs7877190</i>) 5'ACCATCCCCgCgTACCCACTCCggTACCgT3' (<i>TBC1D8B</i> , Intron 1, Wildtyp) 5'ACCATCCCCgAgTACCCACTCCggTACCgT3' (<i>TBC1D8B</i> , Intron 1, Variante <i>rs7877190</i>)
Sequenzierung	5'CTAgCAAATAggCTgTCCC3' (DNA-Plasmid pGL4.23)

3.3.4 Programme

BioEdit	Version 7.0.5.3
LightCycler 480 Software	Version LCS480 1.5.1.62
SPSS Statistics von IBM	Version 20
Alpha Imager HP Software	Version 2.1.3
Sample size calculator	Version 1.031

3.4 Methoden

3.4.1 DNA-Extraktion

Aus dem venösen EDTA-Blut der Patient*innen sowie der Kontrollgruppe wurde genomische DNA extrahiert. Zur DNA-Extraktion wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Im Hinblick auf die Vorgehensweise wurde sich an das mitgelieferte Protokoll der Firma gehalten. Nach der Extraktion der DNA erfolgte die Messung der Konzentration am Biophotometer 6131 der Firma Eppendorf (Köln). Die extrahierte genomische DNA lagerte bei -20°C , wobei kleinere Mengen entnommen und für die unmittelbare Verarbeitung bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden.

3.4.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Erfindung der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) im Jahre 1983 durch Kary Mullis (Mullis *et al.*, 1986) war ein bedeutungsvoller Wendepunkt, um neue Erkenntnisse im Bereich der Genetik zu erhalten. Die PCR ermöglicht es, eine bestimmte Basensequenz *in vitro* innerhalb kurzer Zeit exponentiell zu vervielfältigen.

Um eine Polymerase-Kettenreaktion durchführen zu können, benötigt man neben der DNA-Sequenz (*Template*), die man *in vitro* vervielfältigen möchte, spezifische Primer, Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs), Reaktionspuffer und das Enzym DNA-Taq-Polymerase. Zur Durchführung eines Replikations-Zyklus mittels PCR sind drei Schritte nötig.

Im ersten Schritt, dem Schmelzen der DNA, wird der DNA-Doppelstrang bei Temperaturen zwischen $94-96^{\circ}\text{C}$ durch Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen in DNA-Einzelstränge überführt. Der darauffolgende zweite Schritt ist die sogenannte Primerhybridisierung (engl. *primer annealing*). Hierbei kommt es zum Anlagern der Primer- also kurzen DNA-Abschnitten, die jeweils spezifisch an einen definierten Bereich am *Template* binden. In der Regel wird je ein Primer verwendet, der am Anfang der zu vervielfältigenden Sequenz (Vorwärtsprimer) und ein Primer, der am Ende der Ausgangssequenz liegt (Rückwärtsprimer). Haben die Primer erfolgreich an den definierten spezifischen Abschnitt der DNA gebunden, so kann der dritte Schritt erfolgen- die Elongation.

Hierbei sorgt das Enzym Taq-Polymerase dafür, dass die vorliegenden Einzelstränge mit den gebundenen Primern jeweils vom 5'- zum 3'-Ende hin komplementiert werden und somit aus den zwei vorliegenden Einzelsträngen zwei Doppelstränge entstehen. Sind diese drei Schritte nacheinander erfolgt, so spricht man von einem PCR-Zyklus. In der Regel werden bei einer PCR

zwischen 25 bis 30 solcher Zyklen durchgeführt. Bei beispielsweise 30 durchgeführten Zyklen eines DNA-Abschnittes erhält man am Ende 2^{30} DNA-Doppelstränge.

Mittels PCR wurde in dieser Arbeit eine 211 Basenpaare umfassende DNA-Sequenz vervielfältigt, welche für die Genotypisierung der Variante verwendet wurde. Dabei erfolgte die Herstellung des Reaktionsansatzes pro DNA-Replikat wie folgt:

0,125 μ l DF-Taq polymerase S, 2,5 μ l dNTPS (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,5 μ l Reaktionspuffer (10X PCR Buffer E complete mit 25mM $MgCl_2$), 1,5 μ l Vorwärtsprimer (5'ACCCATACCgATCATCAgCA3') sowie 0,5 μ l Rückwärtsprimer (5'CTAAATTgggAgAgATCAgCA3'). Pro Reaktionsansatz wurde 1 μ l Template eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit 17,875 μ l *aqua dest.* auf ein Gesamtvolumen von 25 μ l aufgefüllt. Das asymmetrische Primerverhältnis wurde gewählt, da unter diesen Bedingungen das beste PCR-Produkt entstand und die Schmelzkurve am aussagekräftigsten war, sprich die verschiedenen Genotypen am besten diskriminierte. Je Well einer 96-Well-PCR-Platte (Kisker Biotech, Steinfurt) wurde das Template vorgelegt und ein Reaktionsansatz hinzugegeben. Die PCR wurde im Thermocycler 2720 (Applied Biosystem, Weiterstadt) mit folgendem Programm durchgeführt:

Initialisierung zur vollständigen Trennung der DNA-Doppelstränge für 5 min bei 95°C. Im Anschluss daran folgten 30 Zyklen mit je: 10 Sek. Denaturierung bei 95°C, 30 Sek. Primer-Annealing bei 51°C und im Anschluss 60 Sek. Elongation bei 72°C. Nach Ablauf der 30 Zyklen wurde eine einmalige letzte Elongation für 4 min bei 72°C durchgeführt. Nach der Durchführung der PCR wurden die Proben bis zur Entnahme aus dem Gerät auf eine Temperatur von 4°C gekühlt.

3.4.3 Gelelektrophorese

Durch Auftragen von 16 PCR-Produkten von einer zuvor durchgeführten PCR in einer 96-Well-Platte wurde stichprobenartig mittels Gelelektrophorese überprüft, ob die PCR erfolgreich war und ob die amplifizierten Abschnitte die erwartete Länge aufwiesen. Zum Vergleich diente eine 100-Basenpaar-DNA-Leiter (NEB BioLabs, Frankfurt am Main), von der 2 μ l aufgetragen wurden. Bei Vorliegen der entsprechenden erwarteten Banden wurde von einer erfolgreichen PCR-Amplifikation ausgegangen und die Produkte wurden für die weiteren Experimente herangezogen.

3.4.4 Herstellung von Agaroseplatten für die Gelelektrophorese

Für die Herstellung der Agaroseplatten und als Laufpuffermedium zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde im Vorfeld TBE-Puffer hergestellt. Zur Herstellung einer 5%igen TBE-Puffer-Stammlösung wurden 108 g Trisbase, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0) vermischt und mit zwei Litern *aqua dest.* auf eine 5%ige Lösung aufgefüllt. Diese Stammlösung diente dann zur Herstellung der Agarose-Gelplatte, wobei sie nochmals auf eine 0,5%ige Lösung 1:10 verdünnt wurde.

Von dieser 0,5%igen Lösung wurden 70 ml zusammen mit 0,7 g Agarose Pulver (Agarose SERVA Wide Range, Heidelberg) in ein Kolbenglas gegeben. Dieses Gemisch kochte anschließend in der Mikrowelle (Panasonic Pro II 1400) für wenige Sekunden, bis sich das Agarose-Pulver vollständig löste und nur noch eine klare Flüssigkeit zu sehen war. Unter vorsichtigem Schwenken kühlte die heiße Agaroselösung kurz etwas ab und es wurde ein Tropfen einer 0,025%igen Ethidiumbromidlösung (Roth, Karlsruhe) hinzugegeben. Im Anschluss hieran wurde die warme und noch flüssige Lösung in eine Gelkammer gefüllt (Peqlab Biotechnologie, Erlangen), in die zuvor drei Kämme in definiertem Abstand gesteckt worden waren. Nach Abkühlen der Lösung und somit Aushärten des Gels wurden die Kämme entnommen und es entstanden pro Reihe je 18 Aussparungen, in die die PCR-Produkte beziehungsweise die DNA-Leiter gegeben werden konnte.

3.4.5 Durchführung der Gelelektrophorese

Nach Aushärtung der Gelplatten und Entfernung der Kämme wurden die Gelplatten in mit 0,5%igem TBE-Puffer ausgefüllte Elektrophoresekammern (Peqlab, Erlangen) gelegt. Die erste Aussparung pro Reihe diente jeweils der Verwendung der DNA-Leiter, während in die letzte Aussparung bei der PCR mitgeführtes reines H₂O mit Primern als Negativkontrolle pipettiert wurde. Die 16 übrigen Öffnungen zwischen DNA-Leiter und Negativkontrolle wurden mit je 5 µl PCR-Produkt befüllt, das mit 2 µl DNA-Probenpuffer eingefärbt wurde. Der DNA-Probenpuffer wurde zuvor aus einer Mischung aus 4 g Sucrose, 500 µl 10% Natriumdodecylsulfat, 5 mg Bromphenolblau und 400 µl 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0) hergestellt, die mit 10 ml *aqua dest.* aufgefüllt wurde.

Nachdem alle drei Reihen eines Gels jeweils mit DNA-Leiter, eingefärbten PCR-Produkten und Negativkontrollen befüllt worden waren, erfolgte die Durchführung der Gelelektrophorese durch Anlegen einer Spannung von 110 Volt bei 150 mA und 100 W über einen Zeitraum von 30

min mit dem Spannungsgenerator (Elektrophoresis Power Supply –EPS 3501 XL–, Amersham pharmacia biotech, Little Chalfont, UK).

Im Anschluss an die Wanderung der DNA-Fragmente im elektrischen Feld erfolgte die Auswertung der durchgeführten Gelelektrophorese. Hierzu wurde die Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids mit UV-Licht einer Wellenlänge von 312 nm angeregt und unter der entsprechenden Kamera (Alpha manager HP – Multiimage II, Alpha Innotec (Kasendorf) fotografiert sowie anschließend ausgewertet. Abbildung 3 zeigt die Fotografie einer durchgeführten Gelelektrophorese in invertierter Farbe zur besseren Darstellbarkeit.

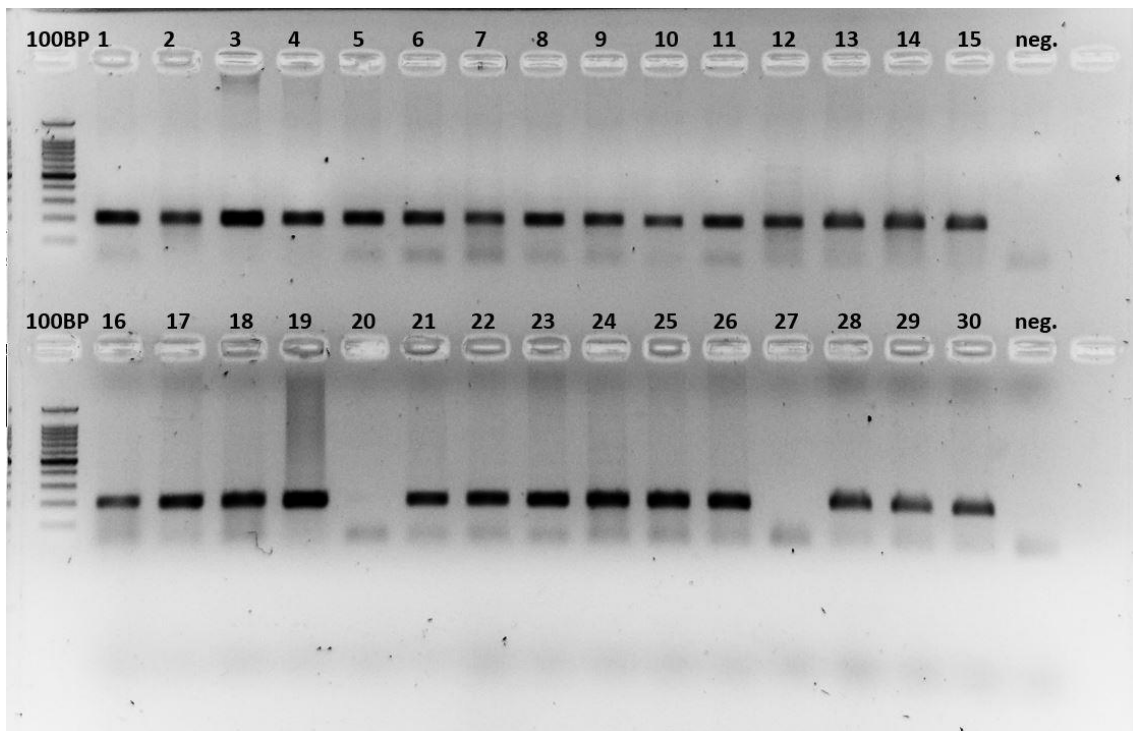


Abbildung 3: Agarose-Gel Elektrophorese des 211 Basenpaare langen Fragmentes (zur besseren Darstellbarkeit ist die Farbe im Vergleich zu den Originalaufnahmen invertiert). In den ersten Geltaschen wurde als Bezugspunkt eine Basenleiter mit je 100-Basenpaar-Fragmente aufgetragen (**100BP**). Die Beschriftungen der weiteren Aussparungen beziehen sich auf die Lokalisationen der 96-Well-PCR-Platten und ist fortlaufend durchnummeriert. In die jeweils letzte belegte Aussparung einer Reihe wurde die bei der PCR mitgeführte Negativkontrolle (**neg.**) aufgetragen. In der oberen und unteren Reihe wurden PCR-Produkte aus zwei verschiedenen PCR-Platten überprüft. Die PCR der Produkte mit den Nummern **20** und **27** der unteren Reihe funktionierte nicht.

3.4.6 Sequenzierung

Um sicherzustellen, dass ein PCR-Produkt sowie ein in ein Plasmid eingebrachter DNA-Abschnitt die erwartete Basenabfolge enthält, ist die von Sanger und seinen Mitarbeitern etablierte Didesoxymethode zur Sequenzierung seit vielen Jahren internationaler Standard in der Molekularbiologie (Sanger *et al.*, 1977). Dieser Methode bediente man sich auch in der vorliegenden Arbeit, um das mit den gewählten Primern amplifizierte PCR-Produkt vor der Genotypisierung auf das Vorliegen der korrekten Basensequenz zu überprüfen und um die hergestellten Plasmide für die Reporteragen-Assay-Experimente (siehe Abschnitt 2.4.6) zu analysieren.

Zur Durchführung der Sequenzierung eines PCR-Produktes wurde ein 10 µl-Ansatz verwendet: Dieser setzte sich folgendermaßen zusammen: 1 µl H₂O, 1µl BigDye (Applied Biosystems, Weiterstadt), 2µl 5X Puffer, 1µl Primer (10µM) und 5µl PCR-Produkt, das zuvor mit H₂O im Verhältnis 1 zu 10 verdünnt wurde. Die Sequenzierungsreaktion wurde im FlexCycler (Analytik Jena, Jena) entsprechend des folgenden Programms durchgeführt:

Initialisierung bei 96°C für 2 min; im Anschluss daran 25 Zyklen mit je 10 Sek. Denaturierung bei 96°C, 10 Sek. Primerannealing bei 50°C und 4 min Elongation bei 60°C. Im Anschluss an die Zyklen erfolgte eine letzte Elongation für 5 min bei 60°C und am Ende der Zyklen eine Kühlung des Produktes auf 10°C.

Ein Plasmid, das mittels pGL4.23-Vektor (Promega, Madison, Wisconsin, USA) hergestellt wurde (siehe Abschnitt 2.4.6.1), konnte ebenfalls durch den oben beschriebenen Reaktionsansatz für die Sequenzierung vorbereitet werden. Jedoch wurde kein verdünntes PCR-Produkt verwendet, sondern 300 ng des in H₂O gelösten Plasmides. Der Rest des Reaktionsansatzes wurde mit 10 µl *aqua dest.* aufgefüllt. Die Durchführung der Sequenzierungsreaktion erfolgte ebenfalls im FlexCycler mit folgendem Programm:

Initialisierung bei 96°C für 2 min; darauf folgend 25 Zyklen mit je 10 Sek. Denaturierung bei 96°C, 10 Sek. Primerannealing bei 50°C und vierminütiger Elongation bei 60°C. Im Anschluss an die Zyklen erfolgte eine letzte Elongation für 5 min bei 60°C und abschließend eine Kühlung des Produktes auf 10°C.

Das durch die Sequenzierungsreaktion erhaltene Produkt wurde nach der Durchführung der Sequenzierungsreaktion mittels Natriumacetat-Fällung aufgereinigt. Zu den 10 µl des Produktes der Sequenzierungsreaktion wurde 1 µl NaAc und 30 µl 96%iges Ethanol zugegeben und für wenige Sekunden (5-10 Sek.) mittels Vortexmischer auf mittlerer Stufe durchmischt. Nach der Durchmischung inkubierte das Reagenz über einen Zeitraum von 15 min bei Raumtemperatur und wurde dann für 15 min bei 13.000 U/min zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus Instruments,

Hanau). Hiernach wurde der Überstand vorsichtig mittels Pipette entnommen, dem verbliebenen Pellet wurden 50 µl 70%iger Ethanol hinzugefügt und erneut bei 13.000 U/min für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand nochmals vorsichtig verworfen und die Eppendorftubes wurden an einem dunklen und trockenen Ort für zwei Stunden offen liegen gelassen, sodass der Rest des Ethanols verdampfen konnte.

Das schlussendlich erhaltene Pellet wurde durch Kapillar-Sequenzierung (ABI 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert und die Sequenz ausgewertet. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm BioEdit (Version 7.0.5.3).

Abbildung 4 dient der Veranschaulichung der erhaltenen Sequenzen und der dabei untersuchten Variante.

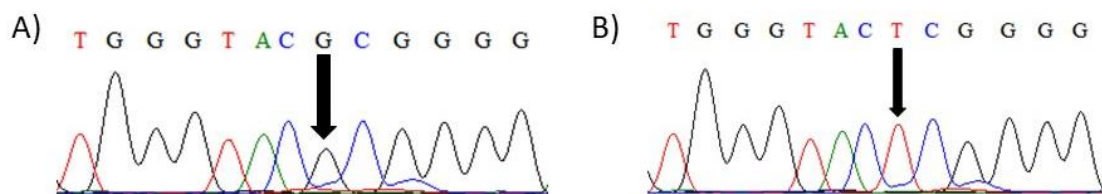


Abbildung 4: Elektropherogramm des Wildtyps (A) und der Variante *rs7877190* (B) in *TBC1D8B* (Intron 1), NCBI Referenz Sequenz nach HGVS: NC_000023.11:g.106803427G>T
Der Pfeil in der Abbildung markiert die SNP-spezifische Position, wobei beim Wildtyp die Base Guanin (G) vorliegt. Bei der Variante ist an der gleichen Position die Base Thymin (T) in der Sequenzfolge enthalten.

3.5 Genotypisierung mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

Eine genetische Alteration kann mit der im Abschnitt 2.4.4 beschriebenen Methode der Sequenzierung nach Sanger untersucht werden. Dieses Verfahren ist jedoch bei einer großen Fallzahl sehr aufwendig und kostenintensiv. Möchte man die Häufung eines SNP in einer größeren Kohorte untersuchen, so eignet sich hierzu ebenso die sogenannte Schmelzkurvenanalyse mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET).

Dabei werden zwei kurze mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte DNA-Oligonukleotide benötigt, die spezifisch an eine DNA-Komplementärsequenz binden – eine sogenannte Donor- und Akzeptorsonde. Diese beiden fluoreszenzmarkierten Sonden binden räumlich nah beieinander auf dem zu untersuchenden DNA-Abschnitt, sodass das Fluorescein-Molekül der Donorsonde so nah wie möglich bei der Akzeptorsonde liegt, die den Akzeptorfarbstoff LightCycler Red 640 (LC-Red640) enthält. Wird nun das Fluorescein der Donorsonde mit Licht einer Wellenlänge von 470 nm angeregt, so kommt es zu einem Fluoreszenz-

Resonanzenergietransfer wobei Energie auf die in der Nähe liegende Akzeptorsonde übertragen wird. Hierdurch kommt es zu einer Aussendung von Fluoreszenzsignalen der Akzeptorsonde mit einer Wellenlänge von 640 nm. Sind nun also Donor- und Akzeptorsonde an dem spezifischen DNA-Abschnitt gebunden, so wird Licht mit einer Wellenlänge von 470 nm ausgesendet und durch den Energietransfer Licht mit einer Wellenlänge von 640 nm empfangen. Löst man die Bindung der Donorsonde an einem DNA-Abschnitt, so unterbricht der Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer und die Akzeptorsonde wird nicht mehr angeregt, was eine Änderung der Fluoreszenzaussendung zur Folge hat.

Da die Bindung von Oligonukleotiden an DNA-Stränge temperaturabhängig ist, macht man sich dieses Prinzip bei der Ermittlung von SNPs zu Nutze. Indem eine Donorsonde hinsichtlich ihrer Oligonukleotidsequenz eine bestimmte Basenabfolge enthält, bindet diese beispielsweise spezifisch an einen homozygoten Wildtyp. Liegt nun im Bereich der Bindungsstelle eine andere Base, als die des Wildtyps vor, so wird eine niedrigere Temperatur benötigt, um die Donorsonde von ihrer Bindung mit dem DNA-Abschnitt „abzuschmelzen“.

Mittels LightCycler 480 (Roche, Mannheim) wird diese Änderung des Förster-Resonanzenergietransfer in Abhängigkeit der Temperatur herangezogen, um sogenannte Schmelzkurven darzustellen, mit deren Hilfe man die verschiedenen Genotypen einer Variante voneinander unterscheiden kann.

In dieser Arbeit wurde die Schmelzkurvenanalyse mittels FRET wie folgt durchgeführt:

Die Donor- und Akzeptorsonde stammten von der Firma TIB MOLBIOL in Berlin (genaue Sequenzen in Abschnitt 2.3.3).

Beide Sonden lagen in einer Konzentration von 1 nM vor, wurden in 200 µl *aqua dest.* gelöst und mittels Vortexmischer auf mittlerer Stufe kurz durchmischt. Von dieser Stammlösung wurden je 1,5 µl entnommen und nochmals mit 20 µl *aqua dest.* verdünnt. Die Verdünnungen der jeweiligen Donor- und Akzeptorsonde wurden mit einem Volumen von 1,5 µl in jedes Well einer 96-Well-Platte für den LightCycler (LightCycler-Platte, Roche, Mannheim) pipettiert.

Nachdem Donor- und Akzeptorsonde vorlagen, wurde je Well 4,5 µl des zuvor mittels Gelelektrophorese überprüften PCR-Produktes sowie die Negativkontrollen hinzugefügt. Auf die 96-Well-Light-Cycler-Platten wurden anschließend die mitgelieferten hitzestabilen Folien vorsichtig aufgeklebt und das Gemisch aus PCR-Produkt sowie den beiden Sonden in der Zentrifuge (Centrifuge 5430R, Eppendorf, Köln) kurz mit 2000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde die Platte in den LightCycler 480 eingelegt und die Schmelzkurvenanalyse mit den folgenden Parametern durchgeführt:

1. Auftrennung der DNA-Doppelstränge bei 95°C für 1 min (Rampe: 4,40 °C/s)
2. Abkühlung DNA-Doppelstränge auf 40°C zur Bindung der Sonden für 1 min (Rampe: 2,20 °C/s)
3. Kontinuierliche Temperaturerhöhung (Aufschmelzen der DNA) bis zu einer Zieltemperatur von 70°C (Rampe: 0,19 °C/s, drei Fluoreszenzmessungen (*acquisitions*) je 1 °C Temperaturunterschied)
4. Erneute Abkühlung der DNA auf 40°C für 30 Sek. (Rampe: 2,20 °C/s)

Die im LightCycler 480 gemessenen Werte wurden mittels Software (LightCycler 480 Software, Version LCS480 1.5.1.62) grafisch dargestellt. Abbildung 5 zeigt solch eine erhaltene Schmelzkurve beispielhaft.

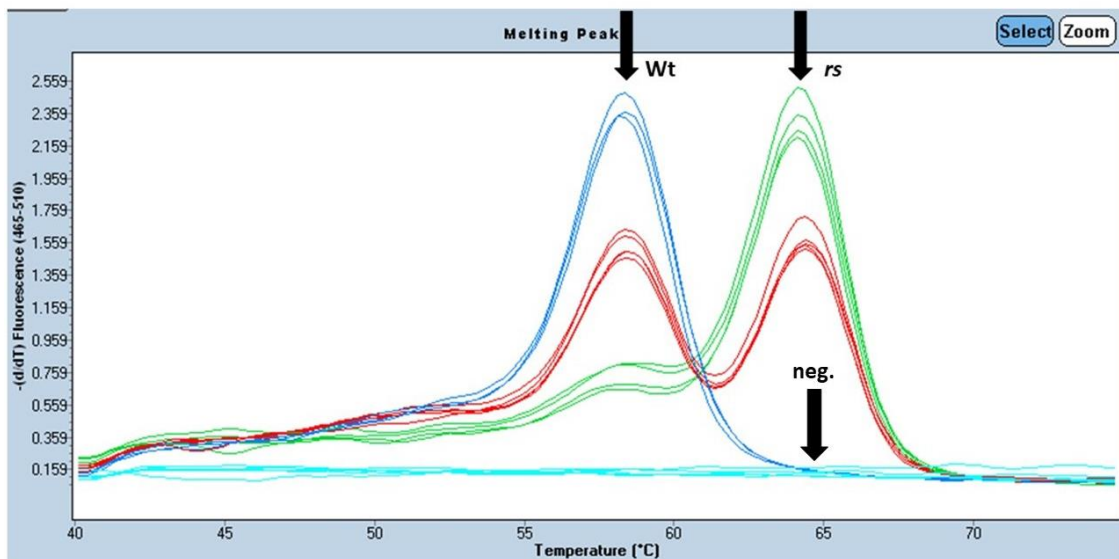


Abbildung 5: Die eingesetzte Donor-Sonde wurde so hergestellt, dass sie vollständig mit der Sequenz der Variante, *rs7877190* in *TBC1D8B* (Gen Referenz: NC_000023.11:g.106803427G>T) übereinstimmt. Daher wird eine höhere Temperatur benötigt, um die Bindung der beiden komplementären DNA-Sequenzen voneinander zu trennen. Beim Wildtyp wird ein Basenpaar nicht gebunden, sodass die Donor-Sonde bei einer niedrigeren Temperatur von dem DNA-Strang gelöst wird. Auf der Ordinate ist die relative Fluoreszenzänderung aufgetragen. Die Abszisse bezieht sich auf die Temperatur. In der Abbildung sind die Kurven der Träger des Wildtyps (**Wt**), der homozygoten Variante (**rs**) sowie die mitgeführten Negativkontrollen (**neg.**) aufgetragen. Zwischen den Kurven des Wildtyps und der Variante finden sich die zweigipfeligen Kurven der heterozygoten Trägerinnen (nur Frauen).

Um sicherzustellen, dass beim Übertragen der PCR-Produkte in die Wells der LightCycler-Platten keine Fehler in der Reihenfolge und somit der Zuordnung entstehen, wurden interne Kontrollen mitgeführt, die im Anschluss bei der Auswertung untereinander verglichen wurden.

3.6 Reporter-Gen-Analysen in PANC-1- und HEK-293-Zellen

Bei einem Reporter-Gen handelt es sich um eine kodierende Sequenz eines Enzyms mit bekannter Aktivität, mit dessen Hilfe die Expression einer anderen Basensequenz ermittelt werden kann. Wird hinter die Sequenz eines zu untersuchenden DNA-Abschnitts oder eines genregulatorischen Bereichs (Transkriptions- *enhancer* oder *silencer*) ein Reporter-Gen eingebracht, so kann über die Expression des bekannten Reporter-Gens ein Rückschluss auf die Beeinflussung der Expression durch die eingefügte DNA-Sequenz gezogen werden. Schematisch wird dieses Prinzip in Abbildung 6 dargestellt.

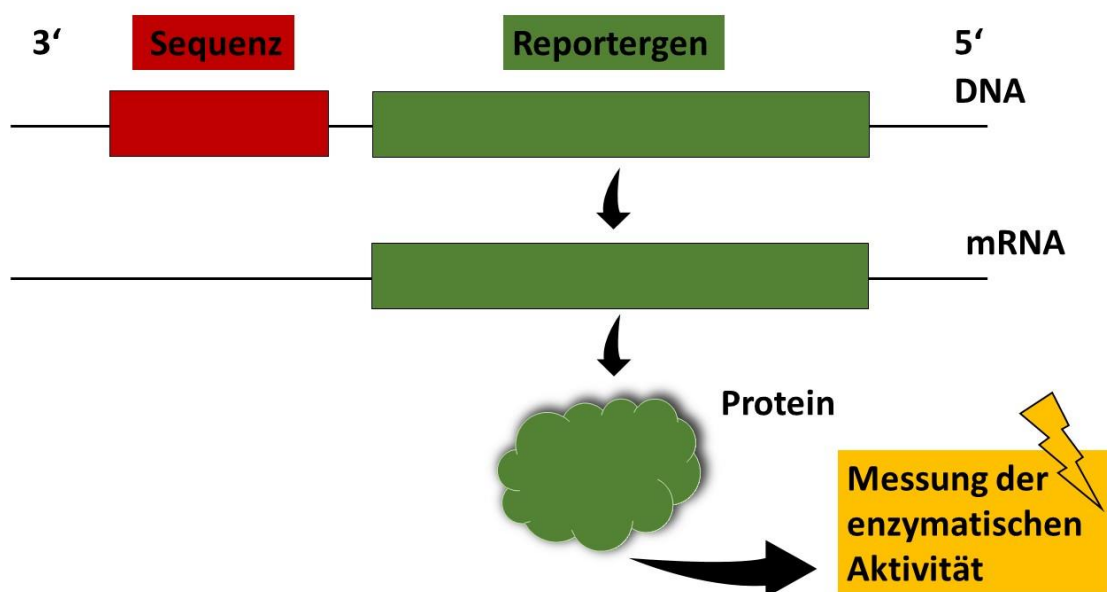


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Prinzips der Reporter-Gen-Analysen. Der zu untersuchende DNA-Abschnitt (**Sequenz**, rot) wird in die DNA in Leserichtung vor ein **Reporter-Gen** (grün) eingebracht. Beeinflusst die Sequenz die Regulation der Transkription, so wirkt sich dies auf die Menge der mRNA aus. Da diese mRNA im Zuge der Translation letztendlich in das Protein mit einer bekannten enzymatischen Aktivität überführt wird, kann durch die Messung eben jener Aktivität, ein Rückschluss auf die Beeinflussung der Expression durch die eingebrachte DNA-Sequenz gezogen werden. Durch Splicing wird der regulatorische Bereich nicht in die Basenabfolge der mRNA überführt.

Zur Durchführung der Experimente in der vorliegenden Arbeit wurde das Dual-Glo-Luciferase-Assay-Kit (Promega, Mannheim) verwendet. Die Zusammensetzung aus Reagenzien ermöglicht es, durch die Verwendung eines synthetisch hergestellten Gens des Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) den Einfluss einer DNA-Sequenz auf die Expression zu untersuchen. Die DNA-Plasmide (pGL4.23, Promega, Mannheim), welche die untersuchte Variante beziehungsweise den Wildtyp vor dem Gen der Luciferase enthielten, wurden jeweils separat in die unterschiedlichen

Zelllinien transfiziert. Abbildung 7 stellt das verwendete Plasmid skizziert dar. Neben dem modifizierten DNA-Plasmid wurde zusätzlich jeweils ein nicht modifiziertes Plasmid zur Kontrolle (pGL4.74, Promega, Mannheim) ebenfalls mittels Transfektion in die Zelle eingeschleust. In diesem Kontrollplasmid war ein Luciferase-Gen der Leuchtqualle (*Renilla reniformis*) enthalten, das unter entsprechenden Bedingungen, wie die Luciferase des Leuchtkäfers, zur Biolumineszenz befähigt ist. Abbildung 8 zeigt die biochemische Reaktionsgleichung der beiden verwendeten Luciferasen.

Die Mitführung des Kontrollplasmides ermöglicht die Ermittlung der Effizienz der Transfektion des Plasmides in die Zellen, auf welche die zu untersuchende Aktivität normiert werden muss, um aussagekräftige Messwerte erhalten zu können.

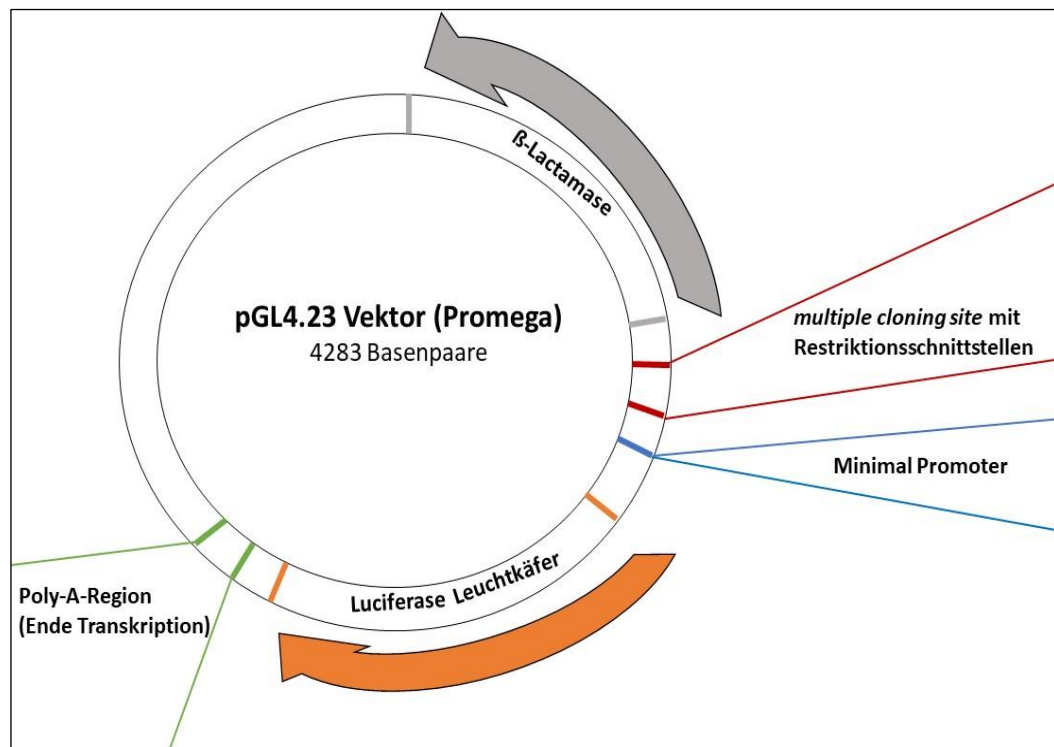


Abbildung 7: Skizzierte Darstellung des verwendeten DNA-Plasmides (pGL4.23, Promega Mannheim). In Rot dargestellt ist der Bereich der *multiple cloning site*, in die mithilfe von Restriktionsendonukleasen die untersuchte Sequenz eingebracht wurde. Der blau markierte Bereich stellt den sogenannten *Minimal Promoter* dar, der die Transkription ermöglicht, sofern es sich bei der eingebrachten Sequenz nicht um eine Basenabfolge handelt, die die Transkription reguliert. Orange dargestellt ist der das Luciferase-Gen beinhalten Bereich. Eine sogenannte Poly-A-Region beendet die Transkription und beinhaltet eine Sequenz zur sogenannten Polyadenylierung. Im grauen Abschnitt befindet sich die kodierende Region der β -Lactamase (Ampicillin-Resistenz).

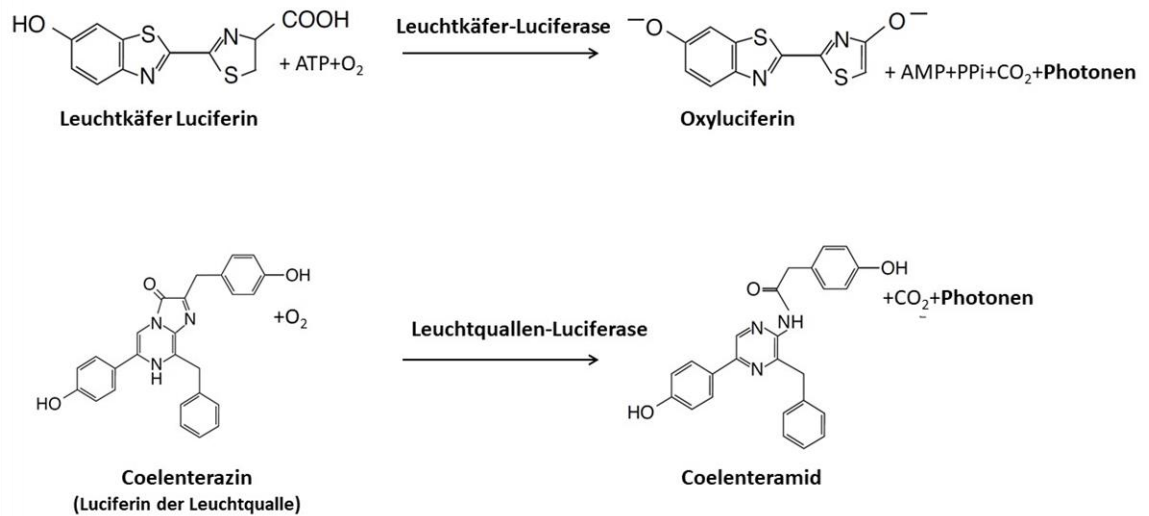


Abbildung 8: Reaktionsgleichungen der Reaktionen durch die Leuchtkäfer- und Leuchtquallen-Luciferase. Bei Vorhandensein von Luciferin sowie Mg^{2+} , ATP und O_2 überführt die Leuchtkäfer Luciferase das Luciferin in Oxyluciferin wobei Photonen entstehen. Die Leuchtquallen-Luciferase benötigt zum Reaktionsablauf neben dem Substrat Coelenterazin lediglich O_2 . Nach Ablauf der Reaktion entstehen ebenso Photonen. Mittels Messung der Photonen kann- bei Vorliegen der für die Reaktion nötigen Substrate im Überschuss- auf den Gehalt der jeweiligen Luciferasen geschlossen und dadurch die Genexpression im Verhältnis quantifiziert werden.

(Abbildung modifiziert nach dem Herstellerprotokoll (Promega), Quelle: https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-glo-luciferase-assay-system-protocol.pdf?rev=3f5ca2862b6047a8b4c3a31126ea310e&sc_lang=en, zuletzt abgerufen am 18.08.2021)

3.6.1 Zellkultur der PANC-1- und HEK-293-Zellen

Die Experimente zur Untersuchung der Beeinflussung der Expression durch die Variante wurden mit PANC-1- und HEK-293-Zellen durchgeführt.

Bei der HEK-293-Zelllinie handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen, die sich seit ihrer Erstbeschreibung (Graham *et al.* 1977) zu einem Standard in Laboren auf der ganzen Welt etabliert hat. HEK-293-Zellen lassen sich gut transfizieren, sind im Vergleich zu anderen Zelllinien recht robust und einfach in der Kultivierung.

Die PANC-1-Zelllinie entstammt ursprünglich dem undifferenzierten Pankreaskarzinom eines 56-jährigen Mannes (Lieber *et al.* 1975). Bei dieser Zelllinie handelt es sich um epitheliale und adhärent wachsende Zellen aus dem Pankreasgang, die ebenfalls gut transfizierbar sind und sich für spezifische Fragestellungen hinsichtlich der Pathogenese von Erkrankungen des Pankreas eignen.

Beide Zelllinien wurden im Einfriermedium (40% Medium + 50% FKS + 10% DMSO) in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Beim Auftauen der Zellen im Wasserbad wurde das Einfriermedium zügig durch das Auswaschen mit Kulturmedium (DEMEM, 10% FKS) entfernt, die Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen und in T75 Kulturflaschen (mit Filterkappen) überführt. Dabei wurden, für beide Zelllinien jeweils gleich, je 10^6 Zellen in eine T75 Kulturflasche eingesät. Diese Kulturen dienten der Weiterführung und kontinuierlichen Verfügbarkeit der Zellen und lagerten bei 37°C und 5% CO_2 im Zellschrank (HERAcell 150, Heraeus Instruments, Hanau). Jeden zweiten Tag wurde das verbrauchte Kulturmedium durch frisches ersetzt. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar Air Flow Bank (HERAsafe KS, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) durchgeführt.

3.6.2 Herstellung der LB-Ampicillin-Platten zur Kolonisation der Bakterien

Zunächst wurden 5 g Pepton, 2,5 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl und 7,5 g Agar vermischt, dem Gemisch 500 ml *aqua dest.* hinzugefügt und daraufhin für 20 min bei 121°C autoklaviert. Nach diesem Vorgang wurde der Ansatz im Wasserbad auf 60°C abgekühlt und das zuvor unter sterilen Bedingungen filtrierte Antibiotikum, Ampicillin, in einer Konzentration von $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ hinzugefügt. Das noch warme Agar-Gemisch wurde, unter der Berücksichtigung, dass keine Luftblasen entstehen, in runde Plastischalen mit einem Durchmesser von 9 cm gefüllt. Nach dem vollständigen Erkalten konnten die Platten direkt beimpft oder für maximal vier Wochen bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

3.6.3 Restriktionsverdau und Ligation des Vektors

Um die Variante hinsichtlich der Beeinflussung der Expression mit dem Wildtyp zu vergleichen, wurde eine 30 Basenpaar lange Sequenz, die die Variante, beziehungsweise den Wildtyp enthielt (Sequenz der Primer siehe Abschnitt 2.3.3), jeweils in einen DNA-Vektor (pGL4.23, Promega, Mannheim) ligiert. Als Vorlage für die Sequenz diente genomische DNA aus dem Patient*innenkollektiv, die zuvor mittels Sequenzierung hinsichtlich des Vorkommens der Variante beziehungsweise des Wildtyps charakterisiert worden war. Als Restriktionsenzym diente *KpnI*.

Das PCR-Produkt aus der zuvor durchgeführten PCR wurde mittels Gelelektrophorese überprüft (siehe Abschnitt 2.4.3.3) und im Anschluss hieran aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Das ausgeschnittene DNA-Fragment wurde im nächsten Schritt vom Agarosegel getrennt. Für diese Aufreinigung des PCR-Produktes aus dem Agarosegel wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend des Herstellerprotokolls verwendet.

Nachfolgend wurde das aufgereinigte PCR-Produkt sowie der DNA-Vektor in einer Konzentration von jeweils 1 µg DNA und 10 Units (1 µl) Restriktionsenzym (*KpnI*, NEB) nach Herstellerangaben mit 5 µl 10X SuRE/Cut Puffer L, 2 µl NaCl (2,5M) und 13 µl *aqua dest.* aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei einer Temperatur von 37°C im Thermomixer (Thermomixer Compact, Eppendorf) inkubiert.

Gemäß Herstellerprotokoll erfolgte die Dephosphorylierung des Vektors, um Plasmide, bei denen nicht ausreichend der Restriktionsverdau erfolgt ist, auszusortieren. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Dephosphorylierung des Vektors (pGL4.23) indem 90 µl des Vektors mit 10 µl 10X Puffer und 3 µl Arctic Phosphatase (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) über einen Zeitraum von einer Stunde und 20 min bei 37° C im Thermomixer Compact inkubiert wurden. Hieran anschließend wurde das Gemisch für 5 min auf eine Temperatur von 70°C erwärmt, um die Phosphatase zu denaturieren.

Die Ligationsreaktion, bei der das PCR-Produkt letztendlich in den Vektor eingebracht wurde, erfolgte unter der Verwendung des Rapid DNA Ligation Kit (Roche, Mannheim). Hierbei wurden gemäß Herstellerprotokoll 50 ng des dephosphorylierten Vektors, 150 ng des PCR-Produktes 10 µl 2X-Ligations-Puffer sowie 1 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl) zusammengegeben. Nach Auffüllen des Ansatzes mit *aqua dest.* auf ein Volumen von 50 µl inkubierte der für die Ligation benötigte Reaktionsansatz für 5 min bei Raumtemperatur.

3.6.4 Bakterielle Vervielfältigung der Plasmide

Um die Plasmide in die entsprechenden Bakterienzellen zu überführen, wurden superkompetente *E. coli* Bakterien (JM109, Promega, Mannheim) verwendet.

Zu Beginn wurden hierzu in ein 1,5-ml-Eppendorftube 2 µl der aus dem Ligationsansatz stammenden DNA vorgelegt und 50 µl der Bakteriensuspension hinzu pipettiert. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock für 90 Sek. bei 42°C im Wasserbad ausgesetzt, woraufhin der Reaktionsansatz erneut für 5 min auf Eis inkubierte.

Im nächsten Schritt wurden 950 µl SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) auf die Bakterienkolonien gegeben und die Kolonien mit Medium über einen Zeitraum von einer Stunde bei 37°C im Schüttler (C25KC Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) bei 220 U/min bebrütet. Nach der Bebrütung erfolgte die Beimpfung, indem ein Transformationsansatz auf zwei LB-Ampicillin-Platten verteilt wurde.

Hierfür wurden zunächst 100 µl des Transformationsansatzes auf einer LB-Ampicillin-Platte ausgestrichen. Der verbliebene Rest des Ansatzes wurde bei 3500 U/min für 3 min zentrifugiert

und der Überstand vorsichtig verworfen. Das im Eppendorftube verbliebene Pellet wurde mit etwas SOC-Medium resuspendiert. Mittels Drigalski-Spatel wurde daraufhin die Bakteriensuspension gleichmäßig auf der zweiten LB-Ampicillin-Platte ausgestrichen, bis die Oberfläche der Agarplatte trocken war. Im Anschluss wurden beide LB-Ampicillin-Platten im Brutschrank (Function Line B6, Heraeus Instruments, Hanau) für 24 Stunden bei 37°C ohne CO₂ Begasung ruhen gelassen.

Nach dieser Zeitspanne wurden die Einzelkolonien zur weiteren Präparation in Flüssigkeitskultur überführt. Hierzu wurde mit einer Pasteur-Einmalpipette eine Einzelkolonie aufgenommen und in 5 ml LB-Ampicillin-Flüssigkeitskultur gegeben. Die Herstellung der LB-Ampicillin-Flüssigkeitskultur erfolgte wie im Abschnitt 2.4.6.2 beschrieben, jedoch mit der Ausnahme, dass bei der LB-Ampicillin-Flüssigkeitskultur kein Agar hinzugegeben wurde.

Für die LB-Ampicillin-Flüssigkeitskultur wurden 14-ml-Röhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen), die einen Zwei-Positionen-Verschluss hatten, verwendet. Das Gemisch wurde für weitere 24 Stunden bei 37°C in einem Orbitalschüttler (C25KC Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) bei 220 U/min inkubiert.

3.6.5 Gewinnung der Plasmid DNA mittels Mini-Präparation

Nach 24-stündiger Inkubation wurden Aliquote der Bakterien samt Flüssigkeitskultur in ein 2-ml-Eppendorftube überführt und für 2 min bei 13 000 U/min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig entfernt, sodass nur noch das Bakterienpellet am Boden des Mikroreaktionsgefäßes (Eppendorftube) verblieb.

Die Präparation der Plasmide aus dem Bakterienpellet wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Plasmide wurden in je 50 µl *aqua dest.* eluiert. Nach der dreifachen photometrischen Messung der Konzentration am Nanovue Plus (Biochrom, Cambridge UK) wurden die Plasmide auf eine Konzentration von 150 ng/µl eingestellt und bei -20°C gelagert.

Um sicherzustellen, dass bei den aufgeführten Schritten der jeweilige DNA-Abschnitt erfolgreich in das Plasmid eingebracht wurde, diente die Sequenzierung (siehe Abschnitt 2.4.4) jeweils als Erfolgskontrolle.

3.6.6 Transfektion der Zellen

Vorbereitend wurde mit dem CASYton-Zählgerät (OLS OMNI Life Science, Bremen) die Zellzahl bestimmt. Bei ausreichender Zellzahl wurden die Zellen vorbereitend im Hinblick auf die Transfektion in 24-Well-Platten, Wachstumsfläche 1,864 cm² (TPP, Trasadingen, CH) in je 500 µl vorgelegtes Kulturmedium ausgesät. Dabei wurde für die HEK-293-Zellen eine Zellzahl von 2×10^5 Zellen und für die PANC-1-Zellen eine Zellzahl von 1×10^5 Zellen pro Well bestimmt. Im Vorfeld der Experimente wurde diese anfängliche Zelldichte mit besten Ergebnissen hinsichtlich der Transfektion mittels GFP-Messung (grün fluoreszierendes Protein) festgelegt.

Die ausgesäten Zellen in 500 µl Kulturmedium ruhten für 24 Stunden im Inkubationsschrank (HERAcell 150, Heraeus Instruments, Hanau) bei 37°C und 5% CO₂. Am Folgetag wurden vor der Transfektion die Zellen im Mikroskop (Olympus CK40, Olympus, Hamburg) betrachtet. Waren die Zellen vital und in etwa zu 80% konfluent gewachsen, so konnten die Zellen transfiziert werden.

Für die Transfektion der Zellen wurde im ersten Schritt in 1,5-ml-Eppendorftubes 600 ng der Plasmid-DNA (aus dem pGL4.23 Promega-Vektor, in die zuvor die Variante oder der Wildtyp kloniert worden waren) vorgelegt. Um die Effektivität der Transfektion bestimmen zu können, wurde als Kontrollplasmid ein nicht modifiziertes Plasmid (pGL4.74, Promega, Mannheim), in einer Konzentration von 60 ng zusätzlich in das Eppendorftube pipettiert. Nachdem beide Plasmide in das Eppendorftube vorgelegt wurden, erfolgte die Zugabe von 5 µl DMEM (ohne FKS). Nach kurzem vorsichtigem Durchmischen sowie anschließendem abzentrifugieren, wurden in die Eppendorfröhrchen jeweils 1,8 µl FuGENE® HD Transfektionsreagenz (Promega, Mannheim) pipettiert. Nach der Zugabe des Transfektionsreagenz in das Gemisch wurde dieses mit der Pipettenspitze vermengt, indem mehrmals auf und ab pipettiert wurde. Das Volumen des Gemischs wurde so bestimmt, dass die Plasmide in der jeweiligen Konzentration vorlagen, wobei der Rest mit einem variablen Volumen DMEM aufgefüllt wurde und nach Zugabe der 1,8 µl des Transfektionsreagenz ein Gesamtvolumen von 30 µl vorlag. Nach Zugabe und Durchmischung des Transfektionsreagenz, inkubierte der Ansatz bei Raumtemperatur für 10 min.

Im anschließenden Schritt wurde der Transfektionsansatz jeweils in die Wells der 24-Well-Platten, in denen sich die vitalen und konfluent gewachsenen Zellen befanden, pipettiert. Die Platte wurde kurz behutsam geschwenkt und im Anschluss für 24 Stunden in den Inkubator (HERAcell 150, Heraeus Instruments, Hanau), bei 37°C und 5% CO₂, gestellt.

3.6.7 Messung der Luciferase-Aktivitäten

Nach Inkubation wurden die transfizierten Zellen nochmals unter dem Mikroskop überprüft. Bei vitalen sowie konfluent gewachsenen Zellen wurden die Überstände in den Wells der 24-Well-Platte unter der Zellkulturbank (HERAsafe KS, Thermo Scientific, Schwerte) abgesaugt. Pro Well wurden 100 µl DMEM (ohne FKS, auf Raumtemperatur equilibriert) zugegeben. Für die Messung der Luciferase-Aktivitäten wurde das Dual-Glo-Luciferase-Assay-Kit (Promega, Mannheim) verwendet. 100 µl eines nach Herstellerangaben angefertigten Luciferase-Substrates mit Puffer wurden zu dem vorgelegten DMEM und den transfizierten Zellen hinzugegeben. Vorsichtig wurde dieser Ansatz geschwenkt und für 10 min bei Raumtemperatur unter der Zellkulturbank inkubiert. Daran anschließend wurden die 200 µl eines Wells auf insgesamt drei Wells einer 96-Well-Platte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) aufgeteilt. Hierzu wurde ein Well der Zellkulturplatte gründlich resuspendiert und auf je dreimal 60 µl verteilt, wobei in die ersten drei Wells der Messplatte reines DMEM als Negativkontrolle gegeben wurde. Die Negativkontrolle lag in gleichem Volumen vor wie die überführten Zelllysate und wurde im weiteren Experiment gleich behandelt.

Nach Übertragung der Zelllysate auf die Messplatte, wurde die Messung im Infinite Reader M200 (Tecan, Crailsheim) mit entsprechenden Einstellungen dreifach durchgeführt.

Das zuvor nach Herstellerangaben vorbereitete Stop&Glo-Reagenz (Promega, Mannheim) des Dual-Glo-Luciferase-Assay-Kits wurde nach dreimaligem Messen der Biolumineszenz der Leuchtkäfer-Luciferase in jedes Well der Messplatte pipettiert (30 µl pro Well). Durch Hinzugeben des Stop&Glo-Reagenz wurde die Aktivität der Leuchtkäfer-Luciferase sehr stark herabgesetzt, wobei gleichzeitig durch Zugabe der entsprechenden Substrate die Luciferase der Leuchtqualle aktiviert wurde. Nachdem das Stop&Glo-Reagenz in jedes Well gegeben wurde, inkubierte die Messplatte erneut für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Messplatte dreifach kurz hintereinander gemessen, um über die ermittelte Biolumineszenz die Aktivität der Leuchtqualen-Luciferase zu bestimmen.

3.6.8 Berechnung der relativen Reporter-Gen-Aktivitäten

Um die relativen Reporter-Gen-Aktivitäten zu bestimmen, wurden anfangs die Mittelwerte berechnet. Ein Zelllysate mit einem zuvor transfizierten Plasmid wurde zur Messung auf je drei Wells aufgeteilt, die für die beiden verschiedenen Luciferasen je drei Mal gemessen wurden. Es ergaben sich somit jeweils insgesamt neun Messwerte für die Leuchtkäfer- (**LK**) und die Leuchtqualen-Luciferase (**LQ**) pro Zellreihe und Negativkontrolle. Vom Mittelwert der jeweiligen Messwerte der Leuchtkäfer-Luciferase einer zuvor transfizierten Zellreihe wurde der

Mittelwert der Negativkontrolle abgezogen. Mit den Messwerten der Leuchtqualen-Luciferase wurde ebenso verfahren. Beide Mittelwerte minus der Negativkontrolle wurden ins Verhältnis zueinander gesetzt, um die relative Reporter-gen-Aktivität zu bestimmen. Die Berechnung der relativen Reporter-genaktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Relative Reporter-genaktivität} = \frac{(\text{MITTELWERT LuciLK} - \text{MITTELWERT neg.})}{(\text{MITTELWERT LuciLQ} - \text{MITTELWERT neg.})}$$

3.7 Statistische Auswertung

Zur Beantwortung der Frage, ob die mittels PMCA identifizierte Variante mit der CP statistisch assoziiert ist, wurde der Fisher-Exakt-Test herangezogen. Dabei wurden p-Werte unter 0,05 als statistisch signifikant betrachtet. Die Berechnungen hierfür erfolgten mit dem Statistik-Programm SPSS Statistics von IBM (Version 20).

Die statistische Berechnung der relativen Reporter-gen-Aktivitäten erfolgte mittels zweiseitigem Mann-Whitney-U-Test. Auch hierbei wurden p-Werte unter 0,05 als signifikant angesehen. Der Mann-Whitney-U-Test wurde mit dem Programm auf folgender Webseite durchgeführt: <http://www.socscistatistics.com/tests/mannwhitney/>.

4. ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der Phylogenetic Module Complexity Analysis (PMCA)

Unter Verwendung des im Internet frei zugänglichen Programms HaploReg (<https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>), das mit den Daten des *1000 Genomes Project* rechnet, wurden SNPs identifiziert, die mit den SNPs des *CLDN2*- (*rs7057398*) und *MORC4*-Lokus (*rs12688220*) in einem *linkage disequilibrium* (LD) stehen.

Von einem LD wurde ausgegangen, wenn galt $r^2 > 0,50$. Der Datensatz der ermittelten SNPs im LD diene als Grundlage für die Durchführung der PMCA.

Die Berechnung durch die PMCA lieferte insgesamt 6 Varianten, die anhand von bioinformatischer Analysen hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Histonmodifikation – und somit auf die Transkription – bewertet wurden.

Für den assoziierten SNP, *rs7057398*, des *CLDN2*-Lokus konnten die Varianten *rs12837024* ($r^2=0,89$; $D'=0,98$), *rs73247960* ($r^2= 0,76$ $D'=0,95$), *rs73247968* ($r^2= 0,59$ $D'=0,98$) sowie *rs7877190* ($r^2=0,73$ $D'=0,95$) als gekoppelt und mittels PMCA von möglicher funktioneller Bedeutung für die Transkription identifiziert werden. Diese Varianten stehen ebenso in einem *linkage disequilibrium* (LD) mit *rs12688220* des *MORC4*-Lokus, jedoch mit unterschiedlichen Maßzahlen für die Vererbungswahrscheinlichkeit: *rs12837024* ($r^2=0,80$ $D'=0,95$), *rs7057398* ($r^2=0,72$; $D'=0,94$), *rs73247960* ($r^2=0,52$ $D'=0,74$), *rs73247968* ($r^2=0,56$ $D'=0,86$) und *rs7877190* ($r^2=0,63$ $D'=0,79$). Die weiteren Varianten und ihre Vererbungswahrscheinlichkeiten sowie die bioinformatisch ermittelten Daten sind in Tabelle 1 dargestellt.

Aufgrund der *in silico* ermittelten Beeinflussung der Histonmodifikation – und somit der Transkription – in unterschiedlichen Zellen durch die Variante *rs7877190* im ersten Intron von *TBC1D8B* ist sie möglicherweise von funktioneller Relevanz.

Den Berechnungen zufolge ist die Beeinflussung der Histonmodifikationen H3K4me3, H3K4me1, H3K9ac und H3K27me3 durch die Variante *rs7877190* sehr wahrscheinlich. Dabei ist hervorzuheben, dass H3K4me3 und H3K9ac in sekretorischen Zellen des Pankreas vorkommen. Durch die Berechnungen der PMCA unter Berücksichtigung der Auswirkung auf die Histonmodifikation wurde die Variante *rs7877190* in *TBC1D8B* für weitere funktionelle Untersuchungen ausgewählt.

Tabelle 1: Übersicht der mit CP assoziierten SNPs und gekoppelten Varianten sowie deren ermittelte Auswirkung auf die Histonmodifikation

Lokus	SNP	Proxy	r ²	D'	Proxy Allel	H3K4me3 Pankreas	H3K4me3 Leber	H3K4me1 Leber	H3K4me3 Fettzellen	H3K4me1 Fettzellen	H3K4me1 Monozyten	H3K4me3 T-Zellen	H3K4me1 T-Zellen	H3K4me3 Pankreas (Langerhans-Inseln)	H3K9ac Pankreas (Langerhans-Inseln)	H3K4me1 T-Helfer-Zellen	H3K27me3 T-Helfer-Zellen
CLDN2-MORC4	rs7057398	rs12837024	0,89	0,98	C	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
CLDN2-MORC4	rs7057398	rs7057398	1	1	T	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CLDN2-MORC4	rs7057398	rs73247960	0,76	0,95	C	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-
CLDN2-MORC4	rs7057398	rs73247968	0,59	0,98	C	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
CLDN2-MORC4	rs7057398	rs7877190	0,73	0,95	G	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MORC4	rs12688220	rs12837024	0,80	0,95	C	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
MORC4	rs12688220	rs7057398	0,72	0,94	T	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MORC4	rs12688220	rs73247960	0,52	0,74	C	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-
MORC4	rs12688220	rs73247968	0,56	0,86	C	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
MORC4	rs12688220	rs7877190	0,63	0,79	G	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Proxy Allel: dasjenige Allel der Variante, welches für die Berechnungen herangezogen wurde

Histonmodifikationen = H3K4me1: Methylierung des Lysins an Position 4 des Histon 3; H3K4me3: Trimethylierung des Lysins an Position 4 des Histon 3, H3K9ac: Actetylierung des Lysins an Position 9 des Histon 3; H3K27me3: Trimethylierung des Lysins an Position 27 des Histon 3

Die Zahl **1** in den Spalten der Histonmodifikationen bedeutet, dass anhand der bioinformatischen Berechnungen eine Beeinflussung der Histonmodifikationen durch die Variante anzunehmen ist.

4.2 Genotypisierung der Variante *rs7877190* mittels FRET an genomischer DNA

Bei insgesamt 585 an einer CP erkrankten Patient*innen und 1.678 gesunden Kontrollen wurde mittels FRET eine Genotypisierung der Variante *rs7877190* durchgeführt. Dabei wurden die CP-Patient*innen nochmals nach Ätiopathogenese ihrer Erkrankung in die 326 Patient*innen umfassende Subgruppe der ACP (40 Frauen, Altersmedian 48 Jahre sowie 286 Männer, Altersmedian 49 Jahre) und die Gruppe aus 259 Patient*innen mit einer nicht alkoholischen CP (NACP) (119 Frauen, Altersmedian 32 Jahre und 140 Männer, Altersmedian 39 Jahre) unterteilt. Die 1.678 gesunden Blutspender*innen umfassende Kontrollgruppe setzte sich zusammen aus 787 Frauen (Altersmedian 57 Jahre) und 891 Männern (Altersmedian 60 Jahre).

Da die Variante *rs7877190* in *TBC1D8B* auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, besitzt jede Frau zwei Allele, wobei Männer nur homozygot sein können. Daher erfolgte die Berechnung der Allelverteilung gesondert für Frauen und für Männer.

In der Kohorte der Patient*innen mit einer NACP wiesen von insgesamt 119 Frauen 41 (34,5%) das Risikoallel der Variante *rs7877190* auf. In der Kontrollgruppe der Frauen wurde das Risikoallel mittels Schmelzkurvenanalyse bei 23,9% (376 von insgesamt 1.574 Allelen) der Blutspenderinnen ermittelt. Bei der Berechnung des relativen Risikos und der Signifikanz mittels Fisher-Exakt-Test im rezessiven Modell resultierte in der untersuchten Gruppe der Frauen mit NACP ein signifikanter p-Wert ($p=0,002$, $OR=1,85$; 95% CI = 1,25 – 2,73).

Bei den Männern aus der Patientengruppe mit einer NACP wiesen von insgesamt 140 Männern 54 (38,6%) das Risikoallel auf, wohingegen bei 26,7% (238 von 891) der Männer in der Kontrollgruppe das Risikoallel bestimmt wurde. Auch in der Gruppe der an NACP erkrankten Männern konnte ein signifikanter p-Wert ermittelt ($p=0,004$, $OR=1,73$; 95% CI = 1,19 – 2,50) werden.

In der Gruppe der insgesamt 40 Frauen, die an einer ACP erkrankt waren, konnte bei 23 Patientinnen (28,8%) das Risikoallel der Variante mittels Genotypisierung beobachtet werden, während 23,9% der gesunden Kontrollen das Risikoallel aufwiesen. Statistisch ergab sich hierbei keine signifikante Risikoerhöhung. Abbildung 9a stellt die prozentuale Häufigkeitsverteilung des Risikoallels von *rs7877190* bei den erkrankten Frauen im Vergleich zu den gesunden Blutspenderinnen grafisch dar.

Bei den 286 an ACP erkrankten Männern wurde das Risikoallel von *rs7877190* bei 113 (39,5%) Patienten identifiziert. In der gesunden Kontrollgruppe der Männer wurde die Variante bei 238 von insgesamt 891 (26,7%) Blutspendern nachgewiesen. Hieraus ergibt sich in der Gruppe der an einer ACP erkrankten Männern eine OR von 1,79 (95% CI = 1,35 – 2,37) sowie ein hoch signifikanter p-Wert ($p<0,0001$). Abbildung 9b stellt die Häufigkeitsverteilung der untersuchten Variante bei den erkrankten Männern in Vergleich zur Gruppe der gesunden Blutspender grafisch dar. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Genotypisierung für beide Geschlechter dargestellt.

Tabelle 2: Ergebnisse der Genotypisierung der Variante *rs7877190* an Patient*innen und gesunden Kontrollen

	G (=Wildtyp)	T (=Risikoallel)	p-Wert	Odds Ratio	95% - Konfidenzintervall
NACP					
Frauen	156/238 (65,5%)	82/238 (34,5%)	0,002	1,85	1,25 – 2,73
Männer	86/140 (61,4%)	54/140 (38,6%)	0,004	1,73	1,19 – 2,50
ACP					
Frauen	57/80 (71,3%)	23/80 (28,8%)	0,189	1,53	0,81 – 2,89
Männer	173/286 (60,5%)	113/286 (39,5%)	<0,0001	1,79	1,35 – 2,37
Kontrollen					
Frauen	1198/1.574 (76,1%)	376/1.574 (23,9%)			
Männer	653/891 (73,3%)	238/891 (26,7%)			

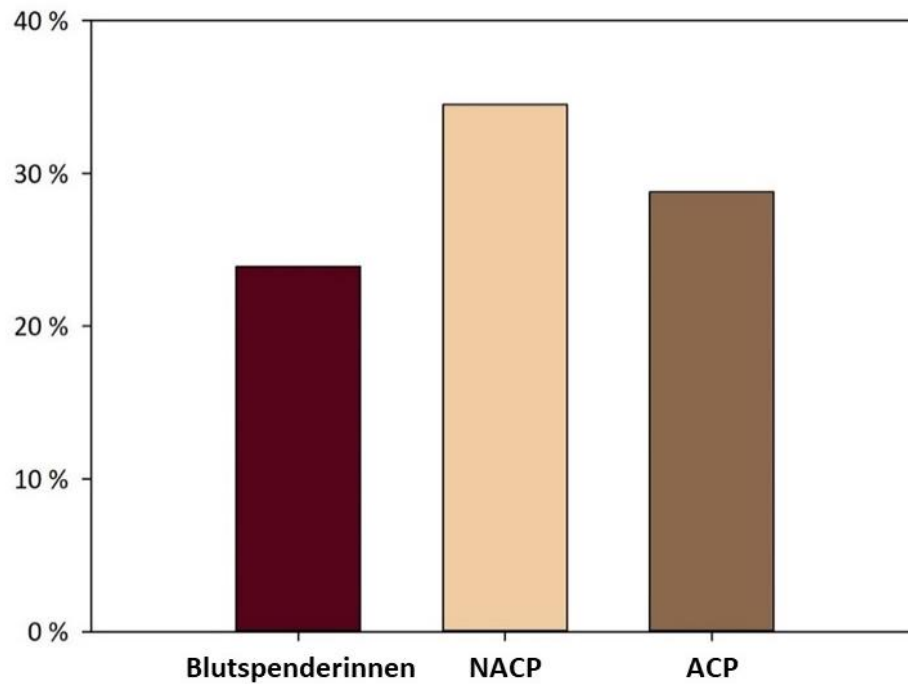


Abbildung 9a: Prozentuale Häufigkeitsverteilung des Risikoallels (T) von *rs7877190* bei **Frauen** in der Gruppe der gesunden (**Blutspenderinnen**) und Patientinnen mit **NACP** oder **ACP**. Die p-Werte sowie jeweilige OR-Werte finden sich in Tabelle 2.

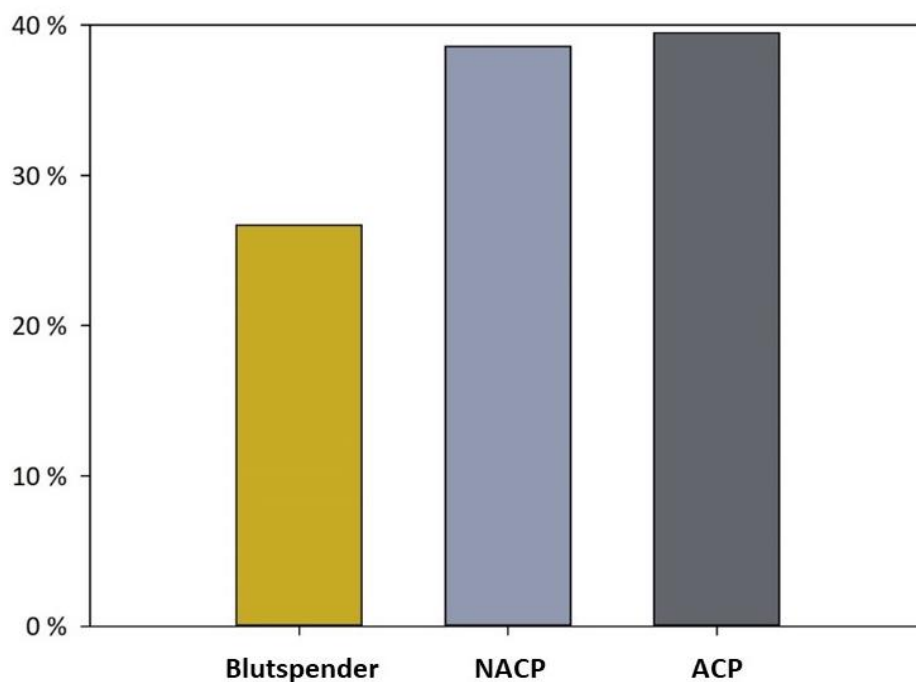


Abbildung 9b: Prozentuale Häufigkeitsverteilung des Risikoallels (T) von *rs7877190* in der Gruppe der gesunden (**Blutspender**), an einer **NACP** und an **ACP** erkrankten **Männern**. Die p-Werte sowie jeweilige OR-Werte finden sich in Tabelle 2.

4.2.1 Vergleich des relativen Risikos der untersuchten Variante (*rs7877190*) mit den zugrunde liegenden Varianten in der ermittelten GWAS in der Kohorte

Die zugrunde liegenden SNPs (*rs12688220* und *rs7057398*) wurden mittels FRET ebenso in dem in der Arbeit verwendeten Patient*innenkollektiv ermittelt, um einerseits die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der GWAS zu überprüfen und um das jeweilige Risiko, die Signifikanzniveaus und die Konfidenzintervalle miteinander vergleichen zu können.

In dem untersuchten Patient*innenkollektiv ist *rs12688220* und *rs7057398* bei Männern und Frauen ebenfalls mit einer NACP assoziiert. Für *rs12688220* ergibt sich in der Gruppe der Frauen mit einer NACP eine OR=1,53 ($p=0,0003$; 95% CI = 1,22 – 1,93) und in der Gruppe der an einer NACP erkrankten Männern OR=1,34 ($p=0,028$; 95% CI = 1,04 – 1,74). Ebenso ist *rs12688220* mit einer ACP bei Frauen (OR=1,88; $p<0,0001$; 95% CI = 1,30 – 2,72) und Männern (OR=2,27; $p<0,0001$; 95% CI = 1,87 – 2,75) in der untersuchten Kohorte assoziiert.

In der untersuchten erkrankten Kohorte fand sich ebenso ein signifikanter Unterschied der Allelhäufigkeit des Risikoallels von *rs7057398* in der Gruppe der an NACP erkrankten Frauen (OR=1,61; $p<0,0001$; 95% CI = 1,28 – 2,03) und Männern mit derselben Erkrankung (OR=1,34; $p=0,025$; 95% CI = 1,04 – 1,74). Ebenso fand sich im Patient*innenkollektiv eine Assoziation von *rs7057398* mit der ACP bei Frauen (OR=2,50; $p<0,0001$; 95% CI = 1,76 – 3,52) und Männern (OR=2,00; $p<0,0001$; 95% CI = 1,65 – 2,44). In Tabelle 3 sind die jeweiligen Werte für *rs7057398*, *rs12688220* und *rs7877190* für die einzelnen Gruppen aufgelistet und gegenübergestellt.

Tabelle 3: Ergebnisse der Genotypisierung der Varianten *rs12688220*, *rs7057398* und *rs7877190* in der der Arbeit zugrunde liegenden Patient*innenkohorte

	<i>rs12688220</i>			<i>rs7057398</i>			<i>rs7877190</i>		
	OR	p-Wert	CI	OR	p-Wert	CI	OR	p-Wert	CI
Frauen ACP	1,88	<0,0001	1,30 – 2,72	2,5	<0,0001	1,76 – 3,52	1,53	0,189	0,81 – 2,89
Frauen NACP	1,53	0,0003	1,22 – 1,93	1,61	<0,0001	1,28 – 2,03	1,85	0,002	1,25 – 2,73
Männer ACP	2,27	<0,0001	1,87 – 2,75	2,00	<0,0001	1,65 – 2,44	1,79	<0,0001	1,35 – 2,37
Männer NACP	1,34	0,028	1,04 – 1,74	1,34	0,025	1,04 – 1,74	1,73	0,004	1,19 – 2,50

4.3 Beeinflussung der Genexpression durch *rs7877190*

4.3.1 Ergebnisse der Analysen am PANC-1-Zellmodell

In insgesamt acht voneinander unabhängigen Analysen wurde je ein modifiziertes Plasmid mit dem Risikoallel von *rs7877190* sowie dem Wildtyp in PANC-1-Zellen transfiziert und hinsichtlich der Auswirkung der Variante auf die Genexpression untersucht.

Die mittleren Reportergenaktivitäten bei den Analysen im PANC-1-Zellmodell unterschieden sich nicht signifikant ($p=0,81$). Für den Wildtyp (G-Allel) lag der Mittelwert bei 37,87, wobei sich für die Variante ein Mittelwert von 37,79 ergab. Der jeweilige Median der Werte sowie der Standardfehler sind in Tabelle 4 aufgeführt. Abbildung 10a stellt die Ergebnisse grafisch dar.

Tabelle 4: Relative Reportergen-Aktivitäten der einzelnen Experimente an PANC-1-Zellen sowie Mittelwert, Median und Standardfehler

	Kontroll-Plasmid pGL4.23	<i>rs7877190</i> G (Wildtyp)	<i>rs7877190</i> T (Risikoallel)
Experiment 1	40,24	42,06	29,14
Experiment 2	41,83	24,75	24,93
Experiment 3	34,55	26,56	30,88
Experiment 4	58,13	22,87	32,64
Experiment 5	68,92	28,20	24,99
Experiment 6	106,34	70,10	80,12
Experiment 7	121,97	71,92	55,07
Experiment 8	23,07	16,52	24,58
Mittelwert der relative Reportergen- Aktivitäten	61,88	37,87	37,79
Median	49,98	27,38	30,01
Standardfehler	11,71	7,17	6,55

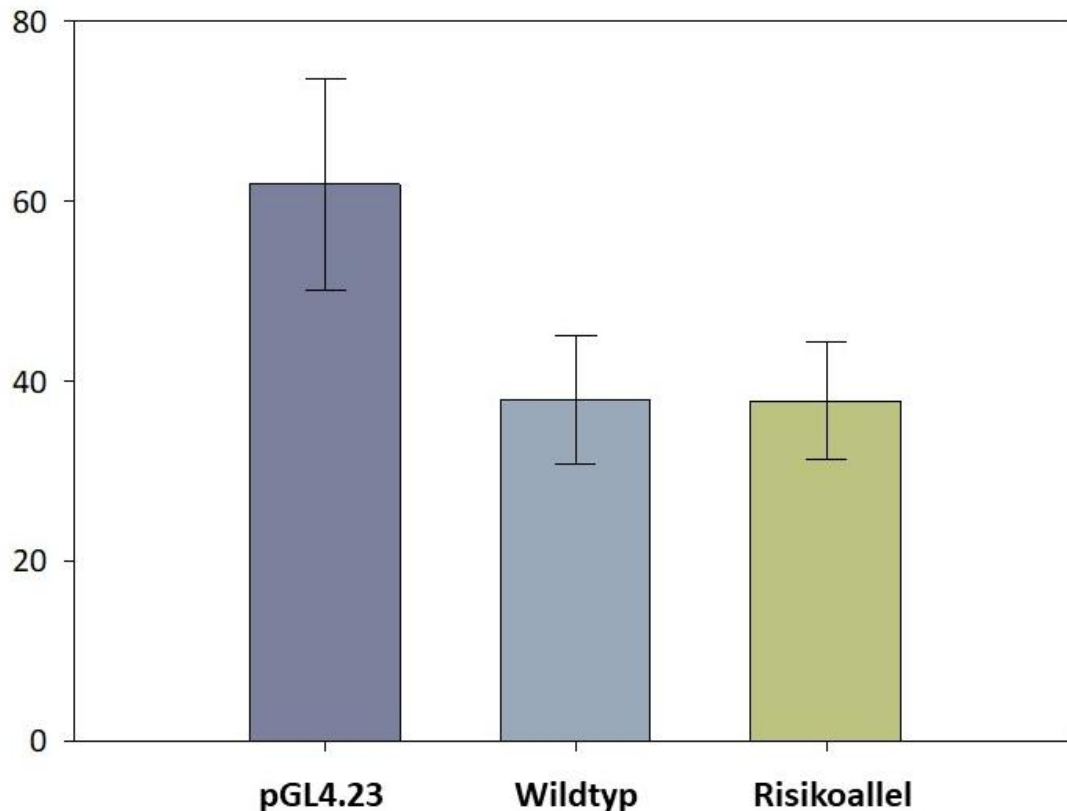


Abbildung 10a: Balkendiagramm der Mittelwerte samt Standardfehler der relativen Reportergen-Aktivitäten des Kontrollplasmids (**pGL4.23**), des **Wildtyps** der Variante *rs7877190* sowie des **Risikoallels** an Analysen der **PANC-1-Zelllinie**.

4.3.2. Ergebnisse der Analysen am HEK-293-Zellmodell

Hinsichtlich der Vorgehensweise der Transfektion in die Zellen sowie der Messungen der relativen Aktivitäten wurde mit den HEK-293-Zellen gleich wie mit PANC-1-Zellen verfahren. Die Experimente, bei denen das jeweilige modifizierte Plasmid in HEK-293-Zellen transfiziert wurde, erfolgten sieben Mal.

Auch im HEK-293-Zellmodell konnte keine signifikante Beeinflussung der Reportergen-Aktivität durch die Variante festgestellt werden ($p=0,065$). Der Mittelwert der Reportergen-Aktivitäten des Wildtyps in HEK-293-Zellen betrug 2,65, wohingegen die gemittelten Luciferase-Aktivitäten für die Risikovariante bei 2,50 lagen. Die einzelnen Werte inklusive Median und Standardfehler der Experimente an HEK-293-Zellen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Relative Reporter-Gen-Aktivitäten der einzelnen Experimente an HEK-293-Zellen sowie Mittelwerte, Median und Standardfehler

	Kontroll-Plasmid pGL4.23	<i>rs7877190</i> G (Wildtyp)	<i>rs7877190</i> T (Risikoallel)
Experiment 1	1,42	1,72	1,59
Experiment 2	0,47	1,52	1,34
Experiment 3	0,52	1,76	1,19
Experiment 4	11,08	3,05	3,34
Experiment 5	13,35	3,21	2,45
Experiment 6	6,95	4,74	3,50
Experiment 7	8,64	2,57	4,08
relative Reporter-Gen-Aktivitäten Mittelwert	6,06	2,65	2,50
Median	6,95	2,57	2,45
Standardfehler	1,86	0,40	0,41

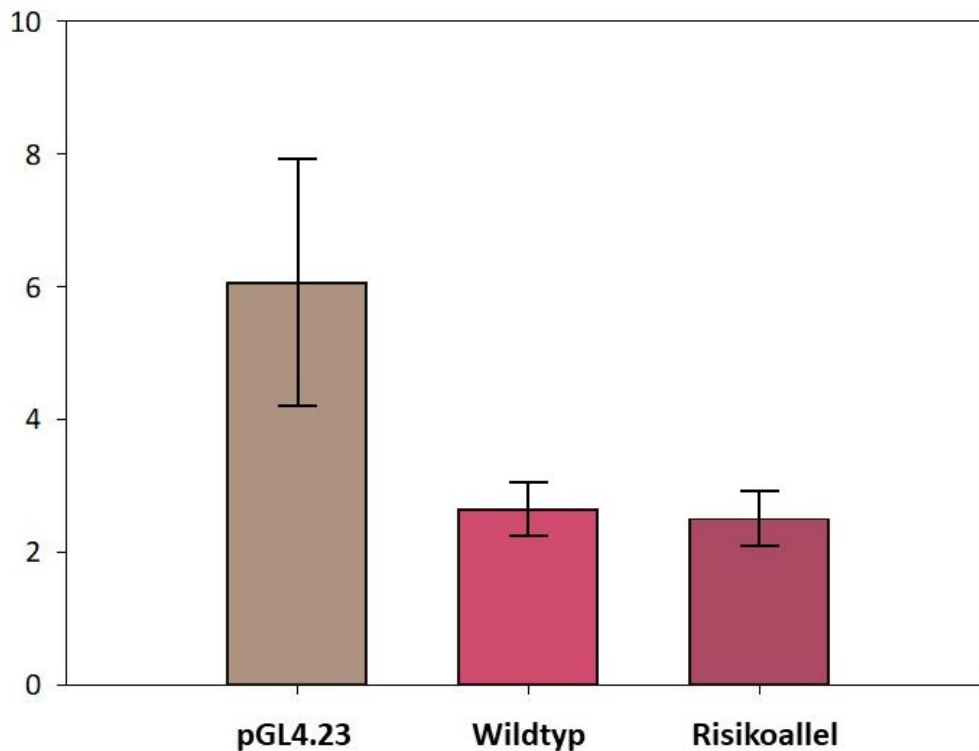


Abbildung 10b: Balkendiagramm der Mittelwerte samt Standardfehler der relativen Reporter-Gen-Aktivitäten des Kontrollplasmids (**pGL4.23**), des **Wildtyps** der Variante *rs7877190* sowie des **Risikoallels** an Analysen der **HEK-293-Zelllinie**.

5. DISKUSSION

Eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) zur Untersuchung von Risikovarianten der CP identifizierte eine Assoziation mit SNPs im *MORC4*- (*rs7057398*), *CLDN2*- (*rs12688220*) und *PRSS1-PRSS2*-Lokus (*rs10273639*) (Whitcomb *et al.* 2012). In weiteren Arbeiten konnten diese Assoziationen auch in anderen Kohorten aus Indien, Europa und Japan repliziert werden (Avanthi *et al.* 2015, Derikx *et al.* 2015, Masamune *et al.* 2015). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die von Whitcomb *et al.* identifizierten Varianten im *CLDN2*-, *MORC4*- sowie *PRSS1-PRSS2*-Lokus signifikant gehäuft bei Patient*innen vorkommen, die an einer akuten Pankreatitis erkrankt waren (Weiss *et al.* 2018).

Da es für diese mittels GWAS identifizierten SNPs im *CLDN2*- und *MORC4*-Locus keine eindeutigen Erkenntnisse für deren funktionelle Konsequenzen bei der Krankheitsentstehung gibt, sollten weitere SNPs auf funktioneller Ebene charakterisiert werden, die mit den in der GWAS identifizierten Varianten in einem *linkage disequilibrium* (LD) stehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die mit *rs7057398* und *rs12688220* in einem LD stehende Variante *rs7877190* mittels PMCA identifiziert und *in silico* hinsichtlich ihres Einflusses auf die für die Transkription bedeutsame Histonmodifikation charakterisiert. Bei den Berechnungen ergab sich eine hohe Wahrscheinlichkeit für einen Einfluss von *rs7877190* auf die Transkription und somit auf die Genregulation. Dementsprechend könnte diese Variante funktionell relevant sein.

Die ermittelte Variante liegt in *TBC1D8B*, einem Gen, das für ein Protein aus der Familie der TBC-Proteine kodiert. Eben jenes Protein könnte möglicherweise, wie andere TBC-Proteine auch, am Vesikeltransport in den Azinuszellen des Pankreas beteiligt sein. Da der Vesikeltransport innerhalb der Azinuszelle ein wichtiger Bestandteil der Zell-Homöostase ist, ist das *TBC1D8B*-Gen biologisch plausibel.

Zusammengefasst zeigte die *rs7877190* Variante in der vorliegenden Arbeit eine Assoziation mit der CP, deren Stärke in etwa in dem Bereich der *rs7057398* und *rs12688220* Varianten lag. So war bei Frauen und Männern, die an einer NACP erkrankt waren, die Variante *rs7877190* mit der Erkrankung assoziiert. Ebenso findet sich in der Gruppe der Männer mit einer ACP eine signifikante Assoziation der Variante mit der CP. Frauen, die an einer ACP erkrankt waren, besaßen im Vergleich zur Kontrollgruppe kein signifikant häufigeres Vorkommen des Risikoallels ($p=0,189$). Abschließend konnte durch Reporter-gen-Analysen unter Zuhilfenahme von Reporter-gen-Assays (Luciferasen) sowohl im PANC-1-, als auch im HEK-293-Zellkulturmodell keine Beeinflussung der Genexpression durch die Variante ermittelt werden.

5.1. Möglichkeiten und Grenzen von GWAS und die Notwendigkeit zur Charakterisierung einer identifizierten Variante auf funktioneller Ebene

Die mittels GWAS als assoziiert identifizierten Varianten stehen rein mathematisch in einem Zusammenhang mit der untersuchten Erkrankung. Allerdings müssen die Resultate einer GWAS stets kritisch hinterfragt werden. Drei wesentliche Aspekte sind dabei für das Verständnis der Aussagekraft von Erkenntnissen aus GWAS von Bedeutung.

Einerseits geben die Analysen keinerlei Information über die funktionelle Konsequenz eines assoziierten SNP, sondern bilden lediglich einen statistischen Zusammenhang ab. Andererseits werden durch die DNA-Chip-Analyse seltene Varianten, die mit einer Minor-Allel-Häufigkeit von unter 5% in der Bevölkerung vorkommen, in der Regel nicht untersucht. Des Weiteren sind Bereiche mit mehreren SNPs, die zusammen vererbt werden, sogenannte Haplotypen, von Bedeutung. Ein assoziierter SNP ohne funktionellen Effekt kann stellvertretend für einen anderen SNP mit funktionellen Konsequenzen in statistischem Zusammenhang stehen. Daher sollte bei den als assoziiert ermittelten SNPs einer GWAS auch immer diejenigen SNPs mit in Betracht gezogen werden, die mit dem assoziierten SNP in einem sogenannten *linkage disequilibrium* stehen. Ein *linkage disequilibrium* liegt dann vor, wenn sich zwei Allele auf einem Chromosom nah beieinander befinden, sodass es häufiger zu einer gemeinsamen Vererbung der beiden Allele kommt, als dies nach den Mendelschen Gesetzen der Fall wäre (Manolio 2010).

Weiterhin muss darauf hingewiesen werden, dass für die Zuverlässigkeit von GWAS eine ausreichend große Fallzahl notwendig ist und eine Erhöhung der Fallzahl z.B. im Rahmen einer Meta-GWAS neue Assoziationen aufdecken kann. Konkret sei hier die erste GWAS bei Patient*innen mit einer CP von Whitcomb *et al.* aus dem Jahre 2012 mit der GWAS von Rosendahl *et al.* aus dem Jahr 2018 einander gegenübergestellt. Während die GWAS von Whitcomb *et al.* 1.506 CP-Patient*innen umfasste, wurden von Rosendahl *et al.* insgesamt 1.959 erkrankte Personen eingeschlossen. In der bislang größten GWAS im Hinblick auf die CP wurde, neben den zuvor von Whitcomb *et al.* ermittelten Varianten, eine weitere Variante in *CTRB1-CTRB2*-Lokus identifiziert, die in der GWAS von Whitcomb *et al.* nicht ermittelt wurde (Rosendahl *et al.* 2018). Folglich können in GWAS durch eine kleine Fallzahl Assoziationen in manchen Fällen unentdeckt bleiben.

Des Weiteren müssen die in einer GWAS als assoziiert ermittelten Varianten nicht zwingend funktionell relevant sein. Daher ist eine weitere Analyse des Lokus in vielen Fällen notwendig, um die relevante Variante zu identifizieren. In einer Arbeit konnten Boulling *et al.* im Jahre 2015 die Assoziation der Variante *rs10273639* in *PRSS1-PRSS2* nach DNA-Sequenzierung von 287 Patient*innen, die an einer CP erkrankt waren, bestätigen. Dabei wurde eine weitere Variante (*rs4726576*) ermittelt, die mit *rs10273639* in einem perfekten LD steht. Es konnte gezeigt werden, dass das Minor-Allel der Variante *rs4726576*, die sich 204 Basenpaare *upstream* des Translations-Initiations-Codons von *PRSS1* befindet,

die Gen-Expression *in vitro* reduziert und daher auf funktioneller Ebene für den protektiven Effekt, der mit ihr in einem LD stehenden Variante, verantwortlich sein könnte (Boulling *et al.* 2015). Auf diesem Weg konnte gezeigt werden, dass die mittels der GWAS identifizierte Variante funktionell mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Relevanz hat.

Allerdings gibt es in den meisten Fällen eine große Anzahl an gekoppelten Varianten – alle hiervon zu untersuchen wäre ein sehr teures und zeitaufwendiges Unterfangen. Daher sind bioinformatische Methoden, wie beispielsweise die PMCA unter Einbeziehung von *in-silico*-Analysen der Histonmodifikation von großer Bedeutung, um eine Vorauswahl hinsichtlich der funktionellen Bedeutung der Variante treffen zu können.

5.2 Bisherige Erkenntnisse über *CLDN2* sowie *MORC4* und die mögliche funktionelle Bedeutung der Gene bei der Entstehung einer CP

Claudin-2 ist ein elementarer Bestandteil der apikalen Zell-Zell-Verbände – sogenannter *tight-junctions*. Unter Normalbedingungen ist die *CLDN2*-Expression verbunden mit der epithelialen Durchlässigkeit des proximalen Tubulus und der Bowman-Kapsel des Nephrons (Kiuchi-Saishin *et al.* 2002). Ebenso sorgt *CLDN2* für eine Kation-Selektivität der *tight-junctions* und wird neben den Nieren noch in der Leber sowie im Darm exprimiert (Amasheh *et al.* 2002).

Durch zellulären Stress oder Verletzungen kommt es zu einer Zunahme der Expression in verschiedenen Zellmodellen (Mankertz *et al.* 2004, Mankertz *et al.* 2009, Suzuki *et al.* 2011). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass verglichen mit gesunden Mäusen, bei von allergischen Erkrankungen des Dünndarms betroffenen Mäusen *CLDN2* signifikant höher exprimiert wird (Liu *et al.* 2013).

Doch auch bei entzündlichen Darmerkrankungen des Menschen ist Claudin-2 von funktioneller Relevanz. Bei Patient*innen, die an einem aktiven Schub eines Morbus Crohn litten, konnte eine deutlich erhöhte Vorkommen von Claudin-2 nachgewiesen werden (Zeissig *et al.* 2007). Ebenso gibt es eine Variante, *rs12014762*, in *CLDN2*, die als ein Risikofaktor für Morbus Crohn in einer schwedischen Kohorte identifiziert werden konnte (Söderman *et al.* 2013). Zudem konnte gezeigt werden, dass es zu einer signifikanten Zunahme des Proteins Claudin-2 im HT-29/B6 Zellkulturmodell kommt, wenn die Zellen mit dem Entzündungsmediator TNF α behandelt werden (Zeissig *et al.* 2007). Interferon- γ führte hingegen in der Zellkultur zu einer Abnahme der Expression von Claudin-2 (Zeissig *et al.* 2007).

Doch auch andere Zytokine haben einen Einfluss auf die Expression von Claudin-2. Die Konzentration des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) korreliert mit der Menge des durch Caco-2-Zellen produzierten Claudin-2 (Suzuki, Yoshinaga *et al.* Tanabe 2011). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es durch Interleukin-22 (IL-22) zu einer Vermehrung von Claudin-2 im Caco-Zellkulturmodell und in Epithelzellen des Kolons von Mäusen kommt (Wang *et al.* 2017).

Gleichwohl ist Claudin-2 auf zellulärer Ebene nicht nur bei entzündlichen Prozessen von Bedeutung. Einerseits scheint ein absoluter Claudin-2-Mangel zu einer Verminderung des Gallenflusses und somit mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Cholesterol-Gallensteinen einherzugehen (Matsumoto *et al.* 2014).

Andererseits ist Claudin-2 für verschiedene Tumorentitäten von Bedeutung. Bei Patient*innen, die an einem Magenkarzinom erkrankt waren, konnte eine verminderte Expression von Claudin-2 im erkrankten Magengewebe nachgewiesen werden (Lin *et al.* 2013). Im angrenzenden, nicht betroffenen Gewebe des Magens, wurde Claudin-2 in einem hohen Maße exprimiert (Lin *et al.* 2013).

Bei Patient*innen mit einer aktinischen Keratose und einem Plattenepithelkarzinom der Haut zeigte sich die Expression von Claudin-2 im erkrankten Gewebe deutlich erhöht (Hintsala *et al.* 2013). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Claudin-2 zu einer durchlässigeren epithelialen Barriere führt, die letztendlich in einer Hautschädigung mündet (Hintsala *et al.* 2013).

Personen, die an einem Kaposi-Sarkom und einer HIV-Infektion erkrankt waren, zeigten eine verminderte *CLDN2* Expression im Tumorgewebe (Tan *et al.* 2014). Bei Patientinnen mit einem metastasierten Mammakarzinom kam es in Lebermetastasen des Primärtumors zu einer signifikanten Erhöhung von *CLDN2* (Kimburg *et al.* 2014). Ebenso kam das Claudin-2 Protein gehäuft in Primärtumoren bei Frauen vor, die im Krankheitsverlauf Lebermetastasen entwickelten (Kimburg *et al.* 2014).

Auch beim Kolorektalen Karzinom (KRK) ist *CLDN2* von Bedeutung. Claudin-2 konnte in mit einem KRK in Zusammenhang stehenden Karzinom-assoziierten Fibroblasten nachgewiesen werden (Mezheyeuski *et al.* 2018). Ein Vorkommen von Claudin-2 in den Fibroblasten ist assoziiert mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben der KRK-Patient*innen, die mit 5-FU und Oxaliplatin therapiert wurden (Mezheyeuski *et al.* 2018).

Unter Normalbedingungen ist die Expression von *CLDN2* im Pankreasgang und in den Inselzellen des Pankreas gering (Lee *et al.* 2011). Jedoch konnte im experimentellen Modell einer akuten Pankreatitis bei Schweinen eine vermehrte Expression von Claudin-2 nachgewiesen werden (Meriläinen *et al.* 2008).

Bei der Untersuchung, ob die Variante *rs12688220* in *CLDN2* eine Auswirkung auf die Expression von *CLDN2* hat, konnte durch Analysen von humanem Pankreasgewebe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Whitcomb *et al.* 2012). Ebenso konnte *CLDN2* in Makrophagen des Pankreasgewebe von Patient*innen mit einer CP nachgewiesen werden (Whitcomb *et al.* 2012). Zudem deuten immunhistochemische Färbungen darauf hin, dass es durch die Variante zu einer Translokation des *CLDN2* in Richtung der basolateralen Zellmembran von Azinuszellen des humanen Pankreas kommt (Whitcomb *et al.* 2012). An dieser Stelle sei jedoch erwähnt, dass Analysen an humanem Pankreasgewebe viele mögliche Fehlerquellen mit sich bringen. Dies ist der Tatsache

geschuldet, dass die Proteasen des Pankreassekretes *ex vivo* zu einem raschen Selbstverdau des Gewebes führen und somit ein Untergang von Pankreaszellen trotz entsprechender Behandlung (schneller Transport, rasche Kühlung) nahezu unvermeidlich ist.

Beim Protein des *MORC4* handelt es sich um ein Zinkfinger-Protein (CW-Typ), welches daher ein Transkriptionsfaktor sein könnte. Eine vermehrte Expression von *MORC4* konnte in verschiedenen diffusen B-Zell-Lymphomen ermittelt werden (Liggins *et al.* 2007). Ebenso konnte vor kurzem eine Expression von *MORC4* in Brustkrebszellen nachgewiesen werden (Yang *et al.* 2019). Dabei war eine Überexpression von *MORC4* mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen assoziiert (Yang *et al.* 2019).

Bislang gibt es noch keine Erkenntnisse, die zum Verständnis der Assoziation zwischen der Variante *rs12688220* in *MORC4* und der CP auf funktioneller Ebene beitragen konnten.

Die bisherigen Erkenntnisse sollen an dieser Stelle mehrere Aspekte hervorheben. Einerseits konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass *CLDN2* in Zusammenhang mit einer Vielzahl von Erkrankungen steht. Insbesondere die Tatsache, dass sich die Menge des Proteins Claudin-2 durch Zytokine regulieren lässt, könnte im Zuge des Entzündungsprozesses bei der CP eine Rolle spielen. Ebenso relevant für die Inflammation ist möglicherweise die Bedeutung von Claudin-2 für die Permeabilität von Zellverbänden. Diese Thesen sind jedoch sehr vage.

Da noch keine funktionellen Erklärungen für den Zusammenhang zwischen *rs12688220* sowie *rs7057398* und der CP vorliegen, bedarf es weiterer Untersuchungen. Ebenso könnte es jedoch, wie schon geschildert, sein, dass *CLDN2* und *MORC4* bei der Ätiopathogenese der CP keine Rolle spielen. Die in beiden Genen identifizierten SNPs wären demnach nur stellvertretend für SNPs, die mit den Varianten in einem LD stehen.

5.3. *rs7877190* in *TBC1D8B* und die „Familie der TBC-Proteine“

Die untersuchte Variante *rs7877190* in *TBC1D8B* liegt X-chromosomal im ersten Intron des Gens. *TBC1D8B* enthält 22 Exons bei einer Länge von 73.477 Basenpaaren (NCBI Gen-ID: 54885, NCBI Gen Referenz: NC_000023.11(106802673..106876150)). Bei *rs7877190* handelt es sich um einen Einzelnukleotid-Polymorphismus. Das Minor-Allel (T) kommt mit einer Frequenz von 23,8% bei Menschen mit einem europäischen Hintergrund vor (Datenbank: 1000 Genomes Project, Abecasis *et al.* 2010). *TBC1D8B* kodiert ein Protein aus der sogenannten „TBC-Familie“. Zu dieser Proteinfamilie gehören 42 verschiedene Mitglieder.

Die TBC- (*Tre-2/Bub2/Cdc16*) Domäne von Proteinen wurde ursprünglich als ein konservierter Bereich im Produkt des *Tre-2*-Onkogens und dem Zellzyklus-Regulator *Bub2* und *Cdc16* der Hefe identifiziert (Richardson *et al.* 1995). Mittlerweile ist die TBC-Domäne eine allgemein anerkannte Proteinstruktur von ca. 200 Aminosäuren, die in allen eukaryotischen Zellen vorkommt (Fukuda 2011).

Indem einige der TBC-Proteine als indirekt inaktivierende Enzyme auf Rab-Proteine („Ras-related in brain“) einwirken, sind sie beim Membran- und Vesikeltransport in eukaryotischen Zellen von Bedeutung (Fukuda 2008). TBC-Proteine führen zu einer Aktivierung von GTP-asen (GAP), welche wiederum das Guanosintriphosphat (GTP) der Rab-Proteine in das energetisch schwächere Guanosindiphosphat (GDP) überführen und somit die Rab-Proteine in ihrer Funktion hemmen.

Durch Beteiligung der TBC-Proteine am zellulären Membran- und Vesikeltransport sind sie für das Verständnis der Pathogenese verschiedener Erkrankungen auf zellulärer Ebene von Bedeutung. Abbildung 11 stellt die Signalkaskade des Vesikeltransportes im Hinblick auf die Rab-Proteine und die Interaktion mit den TBC-Proteinen dar.

Das Protein von *TBC1D4* ist am insulin-abhängigen Transport des Glucose-Transporters 4 (GLUT4) an die Plasmamembran in Adipozyten beteiligt (Kane *et al.* 2002). Somit hat das *TBC1D4*-Protein einen wichtigen Einfluss auf die Glukosehomöostase. Eine Mutation (p.Arg363Ter), die zu einem vorzeitigen Stopcodon in *TBC1D4* führt und dadurch ein fehlerhaftes Protein zur Folge hat, wurde in einer Familie gefunden, deren Mitglieder an einer Insulinresistenz erkrankt waren und bei denen es zu starken postprandialen Insulinausschüttungen kam (Dash *et al.* 2009). An der Translokation des GLUT4-Transporters in Muskelzellen ist ebenso das *TBC1D1*-Protein beteiligt (Peck *et al.* 2009). Genetisch veränderte Mäuse ohne *TBC1D1* zeigten in Experimenten ein reduziertes Körpergewicht und in isolierten Skelettmuskelzellen war eine Zunahme der Fettsäureoxidation sowie eine Abnahme der Glukoseaufnahme feststellbar (Chadt *et al.* 2008). Einige Mutationen in *TBC1D1* bewirken zudem eine vermehrte Nutzung von Fett durch Skelettmuskelzellen und verhindern dadurch das Entstehen von Adipositas bei stark fetthaltiger Kost im Mausmodell (Chadt *et al.* 2008). Anhand dieser Beispiele soll die Bedeutung der TBC-Proteine bei der Entstehung von Erkrankungen auf molekularer Ebene verdeutlicht werden.

In der Arbeit von Whitcomb und seinen Mitarbeitern (Whitcomb *et al.* 2012) wurde postuliert, dass *TBC1D8B* im Pankreas nicht von Bedeutung sei. Jedoch wird *TBC1D8B* laut Datenbank (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000133138-TBC1D8B/tissue>) im Pankreas exprimiert. Ebenso wurde in unserem Forschungslabor *TBC1D8B* mittels real time PCR in Proben von humanem Pankreasgewebe nachgewiesen (unpublizierte Daten).

Das bislang wenig erforschte *TBC1D8B*-Protein sowie dessen X-chromosomal gelegenes Gen konnte vor Kurzem in einer Arbeit erstmals zum Verständnis eines Erkrankungsmechanismus beitragen. Beim steroidrefraktären nephrotischen Syndrom mit fokaler und segmentaler Glomerulosklerose wurden

Missens-Mutationen in *TBC1D8B* in zwei Familien identifiziert (Dorval *et al.* 2019). Das TBC1D8B-Protein konnte mittels Immunfluoreszenz in humanen Glomeruli nachgewiesen werden und die Mutation in *TBC1D8B* zeigte strukturelle Veränderungen der Podozyten (Dorval *et al.* 2019). Zudem wurde in der Arbeit gezeigt, dass *TBC1D8B* am Recycling von Transportvesikeln in Zellen beteiligt ist, indem das Protein mit Rab11b interagiert (Dorval *et al.* 2019). Abbildung 11 stellt die enzymatische Eigenschaft der TBC-Proteine und ihre Wechselwirkung auf die Rab-Proteine schematisch dar.

Diese neuen Erkenntnisse sind in der Gesamtheit ein sehr wichtiger und interessanter Ansatz, da das TBC1D8B-Protein auch für den intrapankreatischen Transport von Zymogengranula mitverantwortlich sein könnte. Hierzu könnte im Hinblick auf weitere Untersuchungen ebenfalls *TBC1D8B* bei mehreren Patient*innen sequenziert und mit gesunden Kontrollen verglichen werden. Sollte sich eine Mutation in *TBC1D8B* finden, die in Assoziation mit der CP steht, müsste diese funktionell charakterisiert werden, um eine Bedeutung auf pathophysiologischer Ebene nachweisen zu können.

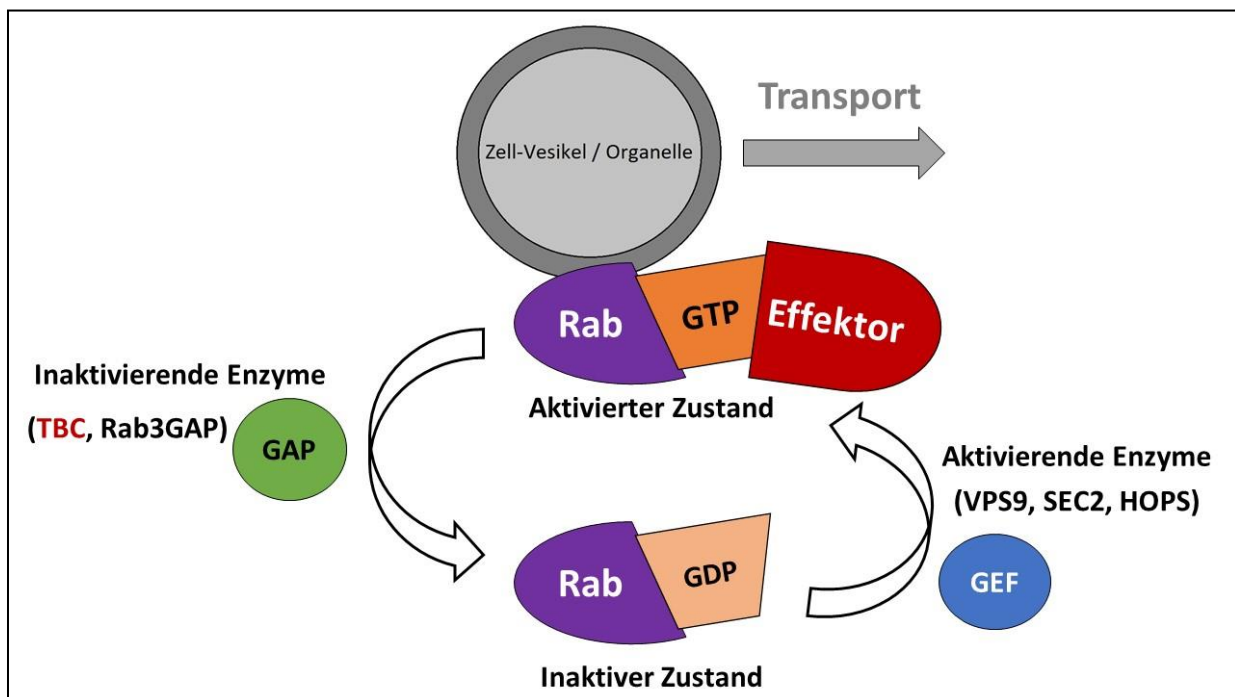


Abbildung 11: Über eine Aktivierung von GTP-asen (GAP) durch die TBC-Proteine werden mittels Spaltung des energiereichen Guanosintri-phosphat (GTP) in das energetisch ärmere Guanosindiphosphat (GDP) Rab-Proteine inaktiviert und somit der Vesikel-Transport unterbrochen. Abbildung modifiziert nach Fukuda (2011).

5.4 Diskussion der Ergebnisse

5.4.1 *rs7877190* als genetische Risikovariante der chronischen Pankreatitis

Die mittels PMCA identifizierte Variante *rs7877190* in *TBC1D8B* ist bei Frauen und Männern mit einer NACP assoziiert. Ebenso erhöht das Risikoallel bei Männern signifikant die statistische Wahrscheinlichkeit, an einer ACP zu erkranken. In der Gruppe der Frauen mit einer ACP fand sich kein signifikant höheres Vorkommen des Risikoallels in der Gruppe der Patientinnen im Vergleich mit den gesunden Kontrollen. Dies kann zweierlei Gründe haben.

Einerseits war die untersuchte Fallzahl der Frauen, die an einer ACP erkrankt waren, in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den anderen Gruppen der Erkrankten gering und umfasste nur 40 Patientinnen. Möglicherweise ist der nicht signifikante Unterschied daher nur zufällig und könnte sich bei einer Vergrößerung des Patientinnenkollektivs der Frauen mit ACP als signifikant erweisen.

Andererseits liegt *rs7877190* in *TBC1D8D* auf dem X-Chromosom, von dem gesunde Frauen zwei aufweisen, Männer hingegen jedoch nur eines besitzen. Denkbar wäre die Tatsache, dass heterozygote Frauen das Risikoallel mit dem ebenfalls vorhandenen Wildtyp ausgleichen können, je nachdem welches X-Chromosom inaktiviert wird. Um dies zu validieren, müsste die Genotypisierung von *rs7877190* an Frauen mit einer ACP in einer höheren Fallzahl erneut erfolgen. Die kleine Anzahl an ACP Patientinnen ist der Tatsache geschuldet, dass die ACP bei Frauen seltener vorkommt als bei Männern und im Zuge dieser Arbeit nicht mehr Probandinnen gewonnen werden konnten. Jedoch ist an dieser Stelle noch hervorzuheben, dass die von Whitcomb *et al.* ermittelte Assoziation der Varianten mit einer CP in der europäischen Bevölkerung nur teilweise reproduziert werden konnte (Derikx *et al.* 2015). Dabei fand sich keine Assoziation von *rs7057398* mit der ACP in der Gruppe der erkrankten Frauen (Derikx *et al.* 2015). Dementsprechend könnte auch die Variante *rs7877190* bei Frauen mit einer ACP tatsächlich nicht assoziiert sein.

Für die vorliegende Arbeit ist der Vergleich der Assoziationen der von Whitcomb *et al.* beschriebenen SNPs *rs7057398* und *rs12688220* mit *rs7877190* von Bedeutung, da die Varianten untereinander nicht immer gemeinsam vererbt werden, sondern lediglich die Vererbungswahrscheinlichkeit größer ist als 50%. Zudem können die Informationen aus den genetischen Datenbanken die Realität nicht gänzlich abbilden.

In der Arbeit von Whitcomb *et al.* ergab sich für *rs7057398* eine Odds ratio (OR) von 1,32 ($p=4,6 \times 10^{-17}$) und für *rs12688220* OR=1,39 ($p=2,36 \times 10^{-22}$).

Das relative Risiko an einer CP zu erkranken ist für *rs7877190* höher, als für *rs7057398* sowie für *rs12688220*.

Bei Frauen mit einer NACP liegt sie bei $OR=1,85$ ($p=0,002$; 95% CI = 1,25 – 2,73), bei Männern mit einer NACP gilt $OR=1,73$ ($p=0,004$; 95% CI = 1,19 – 2,50). Bei Männern mit einer ACP beträgt die OR 1,79 ($p<0,0001$, 95% CI = 1,35 – 2,37).

Allerdings beinhalten die 95%igen Konfidenzintervalle der ORs von *rs7877190* auch die ORs der ursprünglichen beiden SNPs, die in einem LD mit *rs7877190* stehen.

Jedoch ist an dieser Stelle hervorzuheben, dass in der ersten CP-spezifischen GWAS die Fallzahl fast dreimal so groß war, als in der vorliegenden Arbeit. Ebenso wurden Patient*innen, die an einer rezidivierenden akuten Pankreatitis erkrankt waren, miteinbezogen. Bei der Untersuchung der Assoziation von *rs7877190* mit der CP wurden im Zuge dieser Arbeit ausschließlich Patient*innen eingeschlossen, die an einer CP erkrankt waren. Die Tatsache, dass in der GWAS von Whitcomb *et al.* Patient*innen aus den Vereinigten Staaten von Amerika eingeschlossen wurden, scheint hinsichtlich der ethnischen Differenzen keine Rolle zu spielen, da lediglich Patient*innen mit ursprünglich europäischer Herkunft untersucht wurden. Diese europäische Abstammung wurde nicht erfragt, sondern genetisch validiert, sodass mögliche Fehlerquellen bei dieser Auswahl im Vorfeld verringert wurden.

Aufgrund der Tatsache, dass GWAS-Daten mit einer Genotypisierung von einem Patientenkollektiv, das gerade mal ein Drittel so groß ist, nur bedingt miteinander verglichen werden können, wurde die in dieser Arbeit untersuchte Kohorte von Patient*innen sowie die Kontrollen ebenso hinsichtlich der Varianten *rs7057398* und *rs12688220* untersucht, um die ORs sowie das Signifikanzniveau besser mit den Daten für *rs7877190* vergleichen zu können.

5.4.2 Analyse der verwendeten Fallzahl und der Allgemeingültigkeit der ermittelten Assoziation

Bei der Fallzahlberechnung ergab sich eine notwendige Probenanzahl von 579, um eine statistische Power von 80% zu erreichen, siehe Abschnitt 3.2.1.

Jedoch lag zum Zeitpunkt der Untersuchung nur genomische DNA von insgesamt 159 Frauen und 426 Männern vor. Hiermit mag die errechnete nötige Gesamtzahl zwar erfüllt sein, allerdings erfolgte die Berechnung der Allele aufgrund der X-chromosomalen Position der Variante für Männer und Frauen getrennt. Zudem wurde nicht nur nach Geschlechtern getrennt gerechnet, sondern ebenso nach der jeweiligen Ätiologie der Pankreatitis (ACP und NACP) mit entsprechend kleineren Kohorten. Somit wurden in dieser Arbeit weniger Proben untersucht, als die ermittelte Fallzahlplanung verlangt hätte. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass nicht mehr genomische DNA vorlag, die hätte untersucht werden können. Um die Assoziation zu bestätigen, wäre die Untersuchung einer Replikationskohorte möglich.

Eine Ausweitung der Analysen auf insgesamt 579 Patienten erscheint nicht notwendig, da die Assoziation in den untersuchten Kohorten (bis auf die Kohorte der Frauen mit einer ACP) stabil waren. Zur Fallzahlplanung wurden die Allelhäufigkeiten von *rs7057398* sowie *rs1268820* aus der Arbeit von Whitcomb *et al.* (2012) herangezogen.

Betrachtet man das ermittelte Allelvorkommen der Variante von *rs787710* in der untersuchten Kohorte, so ergeben sich bis auf eine Ausnahme – der Gruppe der an ACP erkrankten Frauen – akzeptable Werte der statistischen Power. Für die Gruppe der NACP bei Frauen liegt die statistische Power bei 95,82%, wohingegen sie bei den Frauen mit einer ACP bei 77,02 % liegt. In der Gruppe der an NACP erkrankten Männern liegt die statistische Power bei 82,86 % und bei Männern mit einer ACP bei 96,92 %.

Die Berechnung der statistischen Power erfolgte mit dem *Sample size calculator* Version 1.031 (Internetauftritt: <https://homepage.univie.ac.at/robin.ristl/samplesize.php?test=fishtest>, abgerufen am 14. Juli 2021).

Aufgrund der verwendeten niedrigeren Fallzahl, als in der Fallzahlplanung vorgesehen, erhebt diese Arbeit trotz der guten statistischen Power in den Subgruppen keinen allgemeingültigen Anspruch. Es handelt sich um eine vergleichende Analyse der Allelhäufigkeit und Signifikanz in der untersuchten Kohorte.

5.4.3 Vergleich des relativen Risikos und Signifikanzniveaus der untersuchten Variante *rs7877190* mit den SNPs *rs7057398* sowie *rs12688220*

In Tabelle 3 dieser Arbeit sind die jeweiligen ORs, Konfidenzintervalle sowie p-Werte der einzelnen Varianten in der untersuchten Kohorte gegenübergestellt.

Für die Gruppe der Männer mit einer NACP ergibt sich für *rs7877190* (OR=1,73; p=0,004; 95% CI = 1,19 – 2,50), *rs7057398* (OR=1,34; p=0,025; 95% CI = 1,04 – 1,74) sowie für *rs12688220* (OR=1,34; p=0,028; 95% CI = 1,04 – 1,74) hinsichtlich der Werte für das relative Risiko kein signifikanter Unterschied. Die einzelnen ermittelten ORs liegen in den jeweiligen Konfidenzintervallen der Werte für die anderen Varianten.

Gleichermaßen verhält es sich bei an NACP erkrankten Frauen. Auch in dieser Gruppe gibt es keinen signifikanten Unterschied der ORs und die Konfidenzintervalle überschneiden sich. Das relative Risiko der Varianten *rs7877190* (OR=1,85; p=0,002; 95% CI = 1,25 – 2,73), *rs7057398* (OR=1,61; p<0,0001; 95% CI = 1,28 – 2,03) und *rs12688220* (OR=1,53; p=0,0003; 95% CI = 1,22 – 1,93) ist in etwa gleich.

In der Gruppe der an einer ACP erkrankten Männern gibt es jedoch einen Unterschied. Während sich die Konfidenzintervalle der ermittelten relativen Risikos für *rs12688220* (OR=2,27; p<0,0001; 95% CI = 1,87 – 2,75) und *rs7057398* (OR=2,00; p<0,0001; 95% CI = 1,65 – 2,44) überlappen und die OR-Werte

somit annähernd als gleichwertig betrachtet werden können, ist das relative Erkrankungsrisiko für *rs7877190* (OR=1,79; $p < 0,0001$; 95% CI = 1,35 – 2,37) geringer. Die ermittelte OR für *rs7877190* ist kleiner als die untere Grenze des Konfidenzintervalls von *rs12688220*. In der Schlussfolgerung ist daher das relative Risiko für Männer, an einer ACP zu erkranken, durch das Risikoallel der Variante *rs12688220* etwas größer als für *rs7877190*.

Ein weiterer Unterschied findet sich in der Gruppe der an einer ACP erkrankten Frauen. Das Risikoallel der Variante *rs7877190* ist in dieser Gruppe von Erkrankten nicht mit einer ACP assoziiert (OR=1,53; $p = 0,189$; 95% CI = 0,81 – 2,89). Allerdings zeigte sich eine signifikante Häufung der Risikovarianten *rs7057398* (OR=2,50; $p < 0,0001$; 95% CI = 1,76 – 3,52) und *rs12688220* (OR=1,88; $p < 0,0001$; 95% CI = 1,30 – 2,72) bei an einer ACP erkrankten Patientinnen in der untersuchten Kohorte. Allerdings könnte dieses Ergebnis auch nur ein Zufall sein, erklärt durch die geringe Fallzahl in dieser Gruppe. Diese Annahme wird durch die Tatsache untermauert, dass Derikx *et al.* in ihrer GWAS im Jahre 2015 keine Assoziation des Risikoallels von *rs7057398* bei an einer ACP erkrankten Frauen nachweisen konnten. Für *rs12688220* fand sich jedoch bei Patientinnen mit einer ACP ein signifikanter Unterschied. Um präzise analysieren zu können, welche der drei Risikovarianten bei an einer ACP erkrankten Frauen in statistischer Assoziation steht, wird eine Genotypisierung einer größeren Fallzahl nötig sein.

5.4.4 Diskussion der Ergebnisse der Reporter-gen-Aktivität von *rs7877190* im PANC-1- und HEK-293-Zellkulturmodell

In Abschnitt 3.3. dieser Arbeit sind die Ergebnisse der Reportgen-Analysen und die Untersuchung einer möglichen Beeinflussung des Risikoallels *rs7877190* dargestellt.

Sowohl im PANC-1, als auch im HEK-293-Zellkulturmodell konnte kein signifikanter Unterschied einer Genexpression durch das Risikoallel der untersuchten Variante in *TBC1D8B* ermittelt werden. Dieses Ergebnis ist, im Hinblick auf die Einordnung im Gesamtzusammenhang, aus unterschiedlichen Perspektiven zu betrachten.

Einerseits sind Zellkulturmodelle ein nicht immer genaues Abbild der Realität, da nicht alle in einem Organismus relevanten Regulations-Mechanismen wie Zytokine, Immunzellen und Stoffwechselprodukte gänzlich vorhanden sind. Das *TBC1D8B*-Protein wird zwar in den PANC-1- und HEK-293-Zellen exprimiert (Quelle: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000133138-TBC1D8B/cell>), allerdings besteht die Möglichkeit, dass die *in vitro* Expression des Proteins im Gegensatz zu der *in vivo* Expression niedriger ist. Wie bereits erwähnt, sind Untersuchungen an humanem Pankreasgewebe *in vitro* erschwert, da sich das Pankreasgewebe außerhalb des Körpers sehr rasch selbst verdaut.

Die Tatsache, dass im humanen Organismus Zytokine, Immunzellen und Stoffwechselprodukte im Gegensatz zur Zellkultur vollständig vorhanden sind, ist insbesondere bei der Ätiopathogenese der CP von entscheidender Bedeutung. Alkoholkonsum und das Rauchen sowie die dabei zugeführten Noxen

und die entstehenden Stoffwechselprodukte sind, wie eingangs geschildert, als exogene Risikofaktoren zu betrachten. Es wäre folglich denkbar, dass die untersuchte Variante in *TBC1D8B* erst durch die entsprechenden Schadstoffe beziehungsweise deren Metabolite einen Einfluss auf die Genregulation hat. Um dies zu untersuchen, sollte die Variante erneut in Zellen transfiziert werden. Zusätzlich könnte die Zellkultur mit Alkohol, Acetaldehyd (einem Stoffwechselprodukt des Ethanols im menschlichen Körper) sowie Zigarettenextrakt behandelt werden, um eine Beeinflussung der Genexpression durch die entsprechenden Noxen untersuchen zu können. Auch hier muss kritisch angemerkt werden, dass die *in-vitro*-Analysen bei Behandlung mit Zigarettenextrakt oder Alkohol bezüglich ihrer Aussagekraft eingeschränkt sind.

Bislang ist die Ätiopathogenese der ACP nur wenig verstanden. Allerdings wird aktuell davon ausgegangen, dass der Alkoholkonsum die Azinuszellen vulnerabler macht, indem der Alkohol Abwehrmechanismen gegen Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER) negativ beeinflusst (Pandol *et al.* 2010). Bei dem sogenannten endoplasmatischen Stress handelt es sich um Proteinefehlfaltungen, die sich im endoplasmatischen Retikulum anlagern (Oakes *et Papa* 2015). Bleibt nun die Menge der fehlgefalteten Proteine über einen längeren Zeitraum bestehen und damit der ER-Stress groß, so führt dies zu einer intrazellulären Signalkaskade, die den Zelluntergang in Gang setzt (Oakes *et Papa* 2015). Bei der CP spielt eben dieser über Proteinefehlfaltung bedingte endoplasmatische Stress bei der Krankheitsentstehung eine Rolle. Zuerst konnte diese Tatsache für Varianten in *PRSS1* gezeigt werden (Kereszturi *et al.* 2009). Weiterhin konnten im Jahr 2013 Varianten in *CPA1* nachgewiesen werden, die mit einer Proteinefehlfaltung und somit mit einem erhöhten ER-Stress einhergehen (Witt *et al.* 2013). Ebenso kommt es durch Mutationen in *CEL* zu einem durch Fehlfaltung induzierten ER-Stress und somit zur Apoptose von Zellen (Xiao *et al.* 2016).

Anhand der dargelegten Erläuterungen und Beispiele wäre es möglich, dass *rs7877190* oder eine mit dieser in einem LD stehenden Variante ebenso über eine Fehlfaltung auf Proteinebene zu einem erhöhten ER-Stress führt und somit die Pathogenese einer CP begünstigt. Um dies zu überprüfen, müssten weitere Experimente folgen und die in der GWAS identifizierten Varianten sollten im Hinblick auf eine mögliche strukturelle Veränderung der jeweiligen Proteine (Claudin-2 und *TBC1D8B*) untersucht werden. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, da die Varianten nicht in kodierenden Abschnitten liegen. Gerade bei *TBC1D8B* (*rs7877190*) wäre jedoch aufgrund der Lokalisation im Intron ein aberrantes Splicing mit konsekutivem Proteinverlust oder Fehlfaltung denkbar.

5.4.5 Methodische Diskussion der Reporter-Gen-Analysen

Hinsichtlich der durchgeführten Reporter-Gen-Analysen mittels Luciferase-Aktivitäten gilt es verschiedene Aspekte kurz zu beleuchten.

Die Entscheidung zur Transfektion der Zellen fiel mit dem Dual-Glo-Luciferase-Assay-Kit (Promega, Mannheim) auf eine nicht liposomale Transfektion, um die Zell-Toxizität so gering wie möglich zu halten und um eine hohe Effizienz der Transfektion zu erzielen.

Allerdings unterlagen die absolut ermittelten Lumineszenzen einem hohen Schwankungsbereich (stellenweise 8-fach). Dies spiegelt sich auch in den ermittelten relativen Werten wider (siehe Abschnitt 3.3.1 und Abschnitt 3.3.2). Obwohl nach Erarbeitung der Methode nicht vom Standard abgewichen wurde, unterlagen die einzelnen Messwerte starken Schwankungen. Die Transfektionseffizienz konnte über den zweiten eingebrachten Kontrollvektor (pGL4.74) überprüft werden und war für die Experimente jeweils ausreichend. Ebenso waren die Zellen vital und nicht von Mykoplasmen befallen. Jedoch ist die Arbeit mit Zellkulturen sehr eingeschränkt steuerbar und vielzähligen exogenen und endogenen Faktoren unterworfen und somit nur eine „Teilabbildung der Realität“.

Weiterhin ist die Tatsache von Bedeutung, dass durch das Einbringen der Variante und dem entsprechendem Wildtyp in das Plasmid nur eine sehr kurze Sequenz (30 bp) gewählt wurde. Möglicherweise ist der Einfluss auf die Expression erst in einem größeren DNA-Abschnitt nachweisbar. Die Variante zeigte in den Reporter-Gen-Experimenten in dieser vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die Expression der Luciferase. Möglicherweise beeinflusst sie *in vivo* jedoch die Expression eines Bereichs, der weiter *up-* oder *downstream* der Sequenz liegt.

Um den Einfluss der Variante auf die Expression nochmals genauer zu untersuchen, sollten die Versuche mit einem größerem DNA-Abschnitt, sowie an weiteren Zelllinien wiederholt werden.

5.5 Ausblick

Derzeit deutet vieles darauf hin, dass der grundlegende Pathomechanismus für die Entstehung einer CP die Selbstverdauung des Organs ist (Mayerle *et al.* 2019). Das Pankreas besitzt unter normalen Bedingungen eine Vielzahl von Schutzmechanismen gegen diesen organgefährdenden Selbstverdau. Durch Speicherung der Verdauungsenzyme als inaktive Zymogene schützt sich das Organ selbst und besitzt mit dem Proteinaseinhibitor *SPINK1* einen eigenen molekularen Schutzmechanismus. Die sogenannten Kandidatengene *PRSS1*, *SPINK1*, *CTRC*, *CPA1* und *CEL*, die allesamt an der Verdauungsenzymkaskade beteiligt sind, spielen bei der Ätiopathogenese der CP eine bedeutende Rolle. Weitere mittels GWAS identifizierte Varianten in *CLDN2*, *MORC4* sowie *CTRB1-CTRB2* sind hinsichtlich ihrer funktionellen Relevanz für die Krankheitsentstehung beziehungsweise -begünstigung noch nicht vollständig auf funktioneller Ebene verstanden. Durch die Aufklärung der Funktionen ergeben sich möglicherweise neue Erkenntnisse über die Pathogenese der CP.

Nur in wenigen Fällen einer idiopathischen CP mit frühem Krankheitsbeginn sind ausschließlich genetische Varianten ursächlich. Vielmehr ist die CP eine multifaktorielle Erkrankung, die entsteht, wenn exogene Faktoren, wie Alkohol und Rauchen mit einer genetischen Prädisposition zusammentreffen.

Bis heute ist es nahezu unmöglich, Untersuchungen an humanem Pankreasgewebe durchzuführen, da sich dieses nach dem Tod oder *ex vivo* unmittelbar selbst verdaut und somit experimentell nur bedingt übertragbare Aussagen getroffen werden können. Zuletzt sollten die entsprechenden Noxen wie Alkohol oder die Schadstoffe des Rauchens immer in die experimentellen Arbeiten mit einbezogen werden, um mögliche Mechanismen, die nur durch Anwesenheit der Noxen entsprechend verändert werden, identifizieren zu können.

Für die in den GWAS als mit der Erkrankung assoziiert identifizierten Varianten sollten weitere Varianten, die gehäuft gemeinsam vererbt werden, untersucht und funktionell charakterisiert werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die chronische Pankreatitis (CP) ist eine entzündliche Erkrankung, die durch wiederkehrende Schübe von abdominellen Schmerzen oder durch dauerhafte Schmerzen gekennzeichnet ist. Bedingt durch inflammatorische Umbauprozesse kommt es zu einem Verlust von Pankreasgewebe, wodurch häufig eine exokrine und/oder endokrine Insuffizienz des Pankreas in der Folge auftritt.

Ein übermäßiger Alkoholkonsum sowie das Rauchen gelten als exogene Risikofaktoren bei der Entstehung der CP. Neben diesen exogenen Krankheitsursachen sind genetische Alterationen, insbesondere bei der hereditären Pankreatitis, von übergeordneter Bedeutung. Hierbei konnten in den letzten drei Dekaden Mutationen in den Genen *PRSS1*, *SPINK 1*, *CTRC*, *CPA 1* sowie *CEL* als mit der CP assoziiert identifiziert werden. Außer *CEL* sind die Proteine dieser Gene jeweils an Verdauungsvorgängen beteiligt. Die Mutationen in den Genen der Proteine, die an der Verdauung beteiligt sind, führen zusammengefasst und übergeordnet zu einer Störung in der Regulation des Schutzes des Pankreas vor dem Organ-Selbstverdau und sind somit kausal an der Entstehung einer CP beteiligt.

Mittels einer Genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) konnten zwei genetische Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) als mit der CP assoziiert beschrieben werden, die in Genen lokalisiert sind, welche nicht unmittelbar an der Verdauungskaskade beteiligt sind. Bei diesen Varianten handelt es sich um *rs12688220* in *MORC4* und *rs7057398* in *CLDN2* (Whitcomb *et al.* 2012). Die funktionelle Relevanz der beiden Varianten hinsichtlich der Entstehung einer CP ist bislang noch nicht ausreichend verstanden. Möglicherweise scheinen andere in einem *linkage disequilibrium* (LD) stehende Varianten, die demzufolge gemeinsam vererbt werden, von funktioneller Bedeutung zu sein.

Durch Gendatenbanken (HaploReg) wurden weitere SNPs, die mit den in der GWAS identifizierten Varianten gemeinsam gehäuft vererbt werden, ermittelt und mit Hilfe einer bioinformatischen Methode (*Phylogenetic Module Complex Analysis*, PMCA) auf ihre mögliche funktionelle Bedeutung hin untersucht. Hierbei zeigte sich für die Variante *rs7877190* in *TBC1D8B* eine potenzielle Relevanz für die Pathogenese der CP.

Anhand genomischer DNA von erkrankten Patient*innen wurde diese Variante mittels Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) genotypisiert und die Auftretenswahrscheinlichkeit bei erkrankten Menschen mit gesunden Blutspendern verglichen. Die erkrankten Personen wurden in die Subgruppen der alkoholischen (ACP) und der nichtalkoholischen chronischen Pankreatitis (NACP) unterteilt. Da es sich um eine auf dem X-Chromosom lokalisierte Variante handelt, erfolgte die Auswertung getrennt für Frauen und Männer.

Von insgesamt 119 Frauen mit einer NACP wiesen 41 (34,5%) das Risikoallel der Variante *rs7877190* auf. In der Kontrollgruppe der Frauen wurde das Risikoallel bei 23,9% (376 von insgesamt 1.574 Allelen)

der Blutspenderinnen identifiziert. Die Variante *rs7877190* ist bei Frauen, die an einer NACP erkrankten, assoziiert ($p=0,002$, Odds Ratio=1,85; 95% CI = 1,25 – 2,73).

In der Patientengruppe der Männer mit einer NACP wiesen von insgesamt 140 Männern 54 (38,6%) das Risikoallel auf, wohingegen bei 26,7% (238 von 891) der Männer in der Kontrollgruppe das Risikoallel bestimmt wurde. Auch in der Gruppe der an NACP erkrankten Männern konnte ein signifikanter Zusammenhang der Variante mit der NACP gezeigt ($p=0,004$, OR=1,73; 95% CI = 1,19 – 2,50) werden.

Bei an einer ACP erkrankten Frauen fand sich im Vergleich mit den gesunden Blutspenderinnen kein signifikanter Unterschied ($p=0,189$).

Allerdings zeigte sich eine starke Assoziation der Variante bei an einer ACP erkrankten Männern ($p<0,0001$, OR=1,79; 95% CI = 1,35 – 2,37).

In der untersuchten Kohorte wurden zudem die in der GWAS identifizierten Varianten *rs12688220* und *rs7057398* genotypisiert und die Ergebnisse mit den Daten für *rs7877190* verglichen. Im Gegensatz zu *rs7877190* zeigten sich die Varianten *rs12688220* und *rs7057398* bei Frauen mit einer ACP als assoziiert. Hinsichtlich der OR konnten keine relevanten Unterschiede der drei Varianten innerhalb der untersuchten Kohorte ermittelt werden.

Zur Charakterisierung der möglichen funktionellen Relevanz von *rs7877190* wurde mittels Luciferase-Reportergen-Analysen an HEK-293- und PANC-1-Zellmodell die Auswirkung der Genexpression durch die Variante untersucht. Durch Transfektion in die jeweilige Zelllinie wurden Plasmide, die vor der Luciferase eine Basensequenz der Variante beziehungsweise den entsprechenden Wildtyp erhielten, in die PANC-1- sowie HEK-293-Zellen eingebracht. Durch Messung der Luciferase-Aktivitäten der Leuchtkäfer- und Leuchtquallen-Luciferasen konnten die Mittelwerte der relativen Aktivitäten in Abhängigkeit vom eingebrachten Wildtyp sowie der Variante ermittelt werden.

Im HEK-293- sowie im PANC-1-Zellmodell konnte in den durchgeführten Reportergen-Experimenten kein Einfluss der Genexpression durch *rs7877190* nachgewiesen werden.

Schlussfolgernd ist festzuhalten, dass die untersuchte Variante *rs7877190* in unserer Kohorte mit einer NACP bei Frauen sowie einer ACP und einer NACP bei Männern assoziiert ist. In der untersuchten Kohorte fand sich keine signifikante Assoziation der Variante bei Frauen mit einer ACP. Eine Beeinflussung der Genexpression in den Zelllinien HEK-293- und PANC-1-Zellen konnte nicht gezeigt werden.

Aufgrund der Tatsache, dass die bei GWAS als assoziiert identifizierten SNPs *rs12688220* und *rs7057398* bislang hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Ätiopathogenese bei der CP nicht auf funktioneller Ebene entsprechend charakterisiert sind, sind weitere Untersuchungen hierzu nötig. Insgesamt stehen viele Varianten mit den beiden SNPs in einem *linkage disequilibrium*, sodass bis zum

endgültigen Verständnis der übergeordneten Mechanismen auf funktioneller Ebene wahrscheinlich noch viele weitere Untersuchungen sowohl *in silico* als auch *in vitro* nötig sind.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abecasis G R, Altshuler D, Auton A *et al.* (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467(7319): 1061–1073
- Aghdassi A A, Weiss F U, Mayerle J *et al.* (2015) Genetic susceptibility factors for alcohol-induced chronic pancreatitis. *Pancreatology* 15(4 Suppl): S23-31
- Alikanoglu A S, Gunduz S, Demirpence O *et al.* (2015) Expression pattern and prognostic significance of claudin 1, 4 and 7 in pancreatic cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 16(10): 4387–4392
- Amasheh S, Meiri N, Gitter A H *et al.* (2002) Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 115(24): 4969–4976
- Ammann R W, Akovbiantz A, Largiader F *et al.* (1984) Course and outcome of chronic pancreatitis. Longitudinal study of a mixed medical-surgical series of 245 patients. *Gastroenterology* 86(5): 820–828
- Amoozadeh Y, Dan Q, Xiao J *et al.* (2015) Tumor necrosis factor- α induces a biphasic change in claudin-2 expression in tubular epithelial cells. *Am J Physiol, Cell Physiol* 309(1): 38-50
- Angsuwatcharakon P, Sodsai P, Rerknimitr R *et al.* (2018) The Polymorphisms at PRSS1-PRSS2 and MORC4 Loci and the Risk of Post-ERCP Pancreatitis. *Gastroenterol Res Pract* 2018: 1064783
- Avanthi S U, Ravi Kanth V V, Agarwal J *et al.* (2015) Association of claudin2 and PRSS1-PRSS2 polymorphisms with idiopathic recurrent acute and chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 30(12): 1796–1801
- Beer S, Zhou J, Szabó A *et al.* (2013) Comprehensive functional analysis of chymotrypsin C (CTRC) variants reveals distinct loss-of-function mechanisms associated with pancreatitis risk. *Gut* 62(11): 1616–1624
- Beger H G, Hrsg. (2013) *Erkrankungen des Pankreas*. Springer, Berlin
- Borka K, Kaliszky P, Szabó E *et al.* (2007) Claudin expression in pancreatic endocrine tumors as compared with ductal adenocarcinomas. *Virchows Arch* 450(5): 549–557
- Boulling A, Sato M, Masson E *et al.* (2015) Identification of a functional PRSS1 promoter variant in linkage disequilibrium with the chronic pancreatitis-protecting rs10273639. *Gut* 64(11): 1837–1838
- Busnardo A C, DiDio L J, Tidrick R T *et al.* (1983) History of the pancreas. *Am J Surg* 146(5): 539–550
- Campa D, Pastore M, Capurso G *et al.* (2017) Do pancreatic cancer and chronic pancreatitis share the same genetic risk factors? A PANcreatic Disease ReseArch (PANDoRA) consortium investigation. *Int J Cancer* 142(2): 290-296
- Chadt A, Leicht K, Deshmukh A *et al.* (2008) Tbc1d1 mutation in lean mouse strain confers leanness and protects from diet-induced obesity. *Nat Genet* 40(11): 1354–1359

- Chandak G R, Idris M M, Reddy D N *et al.* (2002) Mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (PSTI/SPINK1) rather than the cationic trypsinogen gene (PRSS1) are significantly associated with tropical calcific pancreatitis. *J Med Genet* 39(5): 347–351
- Chen J, Luo X, Xie G *et al.* (2016) Functional Analysis of SNPs in the ERCC5 Promoter in Advanced Colorectal Cancer Patients Treated With Oxaliplatin-Based Chemotherapy. *Medicine (Baltimore)* 95(19): e3652
- Chiari H (1896) Über Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Zeitschrift für Heilkunde* (17): 69–96
- Claussnitzer M, Dankel S N, Klocke B *et al.* (2014) Leveraging cross-species transcription factor binding site patterns: from diabetes risk loci to disease mechanisms. *Cell* 156(1-2): 343–358
- Cohn J A, Friedman K J, Noone P G *et al.* (1998) Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med* 339(10): 653–658
- Colomb E, Figarella C (1979) Comparative studies on the mechanism of activation of the two human trypsinogens. *Biochim Biophys Acta* 571(2): 343–351
- Comfort M W, Steinberg A G (1952) Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology* 21(1): 54–63
- Dash S, Sano H, Rochford J J *et al.* (2009) A truncation mutation in TBC1D4 in a family with acanthosis nigricans and postprandial hyperinsulinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(23): 9350–9355
- Deng Y, Li Z (2019) Effects of PRSS1-PRSS2 rs10273639, CLDN2 rs7057398 and MORC4 rs12688220 polymorphisms on individual susceptibility to pancreatitis. *Genomics* 112(1): 848-852
- Derikx M H, Kovacs P, Scholz M *et al.* (2015) Polymorphisms at PRSS1-PRSS2 and CLDN2-MORC4 loci associate with alcoholic and non-alcoholic chronic pancreatitis in a European replication study. *Gut* 64(9): 1426–1433
- Dorval G, Kuzmuk V, Gribouval O *et al.* (2019) TBC1D8B Loss-of-Function Mutations Lead to X-Linked Nephrotic Syndrome via Defective Trafficking Pathways. *Am J Hum Genet* 104(2): 348–355
- Dufour M C, Adamson M D (2003) The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas* 27(4): 286–290
- Fjeld K, Weiss F U, Lasher D *et al.* (2015) A recombined allele of the lipase gene CEL and its pseudogene CELP confers susceptibility to chronic pancreatitis. *Nat Genet* 47(5): 518–522
- Fukuda M (2008) Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell Mol Life Sci* 65(18): 2801–2813
- Fukuda M (2011) TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab? *Biosci Rep* 31(3): 159–168
- Giri A K, Midha S, Banerjee P *et al.* (2016) Common Variants in CLDN2 and MORC4 Genes Confer Disease Susceptibility in Patients with Chronic Pancreatitis. *PLoS ONE* 11(1): e0147345
- Gould S J, Subramani S (1988) Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Analytical Biochemistry* 175(1): 5–13

- Graham F L, Smiley J, Russell W C *et al.* (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36(1): 59–74
- Gullo L, Barbara L, Labò G (1988) Effect of cessation of alcohol use on the course of pancreatic dysfunction in alcoholic pancreatitis. *Gastroenterology* 95(4): 1063–1068
- Guy O, Lombardo D, Bartelt D C *et al.* (1978) Two human trypsinogens. Purification, molecular properties, and N-terminal sequences. *Biochemistry* 17(9): 1669–1675
- Hardy J, Singleton A (2009) Genomewide association studies and human disease. *N Engl J Med* 360(17): 1759–1768
- Hintsala H-R, Siponen M, Haapasaari K-M *et al.* (2013) Claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in solar keratosis and squamocellular carcinoma of the skin. *Int J Clin Exp Pathol* 6(12): 2855–2863
- Hoffeister A, Mayerle J, Beglinger C *et al.* (2012) S3-Leitlinie Chronische Pankreatitis: Definition, Ätiologie, Diagnostik, konservative, interventionell endoskopische und operative Therapie der chronischen Pankreatitis. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). *Z Gastroenterol* 50(11): 1176–1224
- Holczbauer Á, Gyöngyösi B, Lotz G *et al.* (2013) Distinct claudin expression profiles of hepatocellular carcinoma and metastatic colorectal and pancreatic carcinomas. *J Histochem Cytochem* 61(4): 294–305
- Hong G, Qiu H, Wang C *et al.* (2017) The Emerging Role of MORC Family Proteins in Cancer Development and Bone Homeostasis. *J Cell Physiol* 232(5): 928–934
- Imamura M, Maeda S (2011) Genetics of type 2 diabetes. *Endocr J* 58(9): 723–739
- Jancsó Z, Oracz G, Kujko A A *et al.* (2019) Novel Pathogenic PRSS1 Variant p.Glu190Lys in a Case of Chronic Pancreatitis. *Front Genet* 10: 46
- Johansson B B, Torsvik J, Bjorkhaug L *et al.* (2011) Diabetes and pancreatic exocrine dysfunction due to mutations in the carboxyl ester lipase gene-maturity onset diabetes of the young (CEL-MODY): a protein misfolding disease. *J Biol Chem* 286(40): 34593–34605
- Kane S, Sano H, Liu S C H *et al.* (2002) A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain. *J Biol Chem* 277(25): 22115–22118
- Kazal L A, Spicer D S, Brahinsky R A (1948) Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from pancreas. *J Am Chem Soc* 70(9): 3034–3040
- Kereszturi E, Szmola R, Kukor Z *et al.* (2009) Hereditary pancreatitis caused by mutation-induced misfolding of human cationic trypsinogen. *Hum Mutat* 30(4): 575–582
- Kimbung S, Kovács A, Bendahl P-O *et al.* (2014) Claudin-2 is an independent negative prognostic factor in breast cancer and specifically predicts early liver recurrences. *Mol Oncol* 8(1): 119–128
- Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M *et al.* (2002) Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 13(4): 875–886

- Kriebel J, Illig T, Grallert H (2012) Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) — Möglichkeiten und Grenzen. *Biospektrum* 18(5): 508–510
- Krishnan M, McCole D F (2017) T cell protein tyrosine phosphatase prevents STAT1 induction of claudin-2 expression in intestinal epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 1405(1): 116–130
- Kristiansen L, Gronbaek M, Becker U *et al.* (2008) Risk of pancreatitis according to alcohol drinking habits: a population-based cohort study. *Am J Epidemiol* 168(8): 932–937
- Kuwata K, Hirota M, Shimizu H *et al.* (2002) Functional analysis of recombinant pancreatic secretory trypsin inhibitor protein with amino-acid substitution. *J Gastroenterol* 37(11): 928–934
- Lameris A L, Huybers S, Kaukinen K *et al.* (2013) Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 48(1): 58–69
- Lankisch P G, Lohr-Happe A, Otto J *et al.* (1993) Natural course in chronic pancreatitis. Pain, exocrine and endocrine pancreatic insufficiency and prognosis of the disease. *Digestion* 54(3): 148–155
- Le Bodic L, Bignon J D, Ragueneas O *et al.* (1996) The hereditary pancreatitis gene maps to long arm of chromosome 7. *Hum Mol Genet* 5(4): 549–554
- Lee J H, Kim K S, Kim T-J *et al.* (2011) Immunohistochemical analysis of claudin expression in pancreatic cystic tumors. *Oncol Rep* 25(4): 971–978
- Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W *et al.* (1975) Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer* 15(5): 741–747
- Liggins A P, Cooper C D O, Lawrie C H *et al.* (2007) MORC4, a novel member of the MORC family, is highly expressed in a subset of diffuse large B-cell lymphomas. *Br J Haematol* 138(4): 479–486
- Lin Z, Zhang X, Liu Z *et al.* (2013) The distinct expression patterns of claudin-2, -6, and -11 between human gastric neoplasms and adjacent non-neoplastic tissues. *Diagn Pathol* 8: 133
- Liu X, Yang G, Geng X-R *et al.* (2013) Microbial products induce claudin-2 to compromise gut epithelial barrier function. *PLoS ONE* 8(8): e68547
- Lombardo D (2001) Bile salt-dependent lipase: its pathophysiological implications. *Biochim Biophys Acta* 1533(1): 1–28
- Mankertz J, Amasheh M, Krug S M *et al.* (2009) TNF α up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Cell Tissue Res* 336(1): 67–77
- Mankertz J, Hillenbrand B, Tavalali S *et al.* (2004) Functional crosstalk between Wnt signaling and Cdx-related transcriptional activation in the regulation of the claudin-2 promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun* 314(4): 1001–1007
- Manolio T A (2010) Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* 363(2): 166–176

- Masamune A, Nakano E, Hamada S *et al.* (2015) Common variants at PRSS1-PRSS2 and CLDN2-MORC4 loci associate with chronic pancreatitis in Japan. *Gut* 64(8): 1345–1346
- Matsumoto K, Imasato M, Yamazaki Y *et al.* (2014) Claudin 2 deficiency reduces bile flow and increases susceptibility to cholesterol gallstone disease in mice. *Gastroenterology* 147(5): 1134-45
- Mayerle J, Hoffmeister A, Werner J *et al.* (2013) Chronic pancreatitis-definition, etiology, investigation and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 110(22): 387–393
- Mayerle J, Sendler M, Hegyi E *et al.* (2019) Genetics, Cell Biology, and Pathophysiology of Pancreatitis. *Gastroenterology* 156(7): 1951-1968.e1
- McCarthy M I, Abecasis G R, Cardon L R *et al.* (2008) Genome-wide association studies for complex traits. *Nat Rev Genet* 9(5): 356–369
- Meriläinen S, Mäkelä J, Anttila V *et al.* (2008) Acute edematous and necrotic pancreatitis in a porcine model. *Scand J Gastroenterol* 43(10): 1259–1268
- Mezheyeuski A, Strell C, Hrynchuk I *et al.* (2018) Treatment-related survival associations of claudin-2 expression in fibroblasts of colorectal cancer. *Virchows Arch* 472(3): 395–405
- Miyake H, Harada H, Kunichika K *et al.* (1987) Clinical course and prognosis of chronic pancreatitis. *Pancreas* 2(4): 378–385
- Mössner J, Rosendahl J (2015) Chronische Pankreatitis: Ätiologie, Pathogenese und Genetik. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. - http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-54676-1_114-1/fulltext.html, zuletzt abgerufen am 20.07.2021
- Mullis K, Faloona F, Scharf S *et al.* (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 (1): 263–273
- Oakes S A, Papa F R (2015) The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol* 10: 173–194
- Ohmuraya M, Yamamura K-i (2011) Roles of serine protease inhibitor Kazal type 1 (SPINK1) in pancreatic diseases. *Exp Anim* 60(5): 433–444
- O'Reilly D A, Witt H, Rahman S H *et al.* (2008) The SPINK1 N34S variant is associated with acute pancreatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20(8): 726–731
- Paliwal S, Bhaskar S, Nageshwar Reddy D *et al.* (2016) Association Analysis of PRSS1-PRSS2 and CLDN2-MORC4 Variants in Nonalcoholic Chronic Pancreatitis Using Tropical Calcific Pancreatitis as Model. *Pancreas* 45(8): 1153–1157
- Pandol S J, Gorelick F S, Gerloff A *et al.* (2010) Alcohol abuse, endoplasmic reticulum stress and pancreatitis. *Dig Dis* 28(6): 776–782
- Pandya A, Blanton S H, Landa B *et al.* (1996) Linkage studies in a large kindred with hereditary pancreatitis confirms mapping of the gene to a 16-cM region on 7q. *Genomics* 38(2): 227–230

- Peck G R, Chavez J A, Roach W G *et al.* (2009) Insulin-stimulated phosphorylation of the Rab GTPase-activating protein TBC1D1 regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 284(44): 30016–30023
- Pereira-Leal J B, Seabra M C (2001) Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* 313(4): 889–901
- Pfutzer R H, Barmada M M, Brunskill A P *et al.* (2000) SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 119(3): 615–623
- Phillips A E, LaRusch J, Greer P *et al.* (2018) Known genetic susceptibility factors for chronic pancreatitis in patients of European ancestry are rare in patients of African ancestry. *Pancreatology* 18(5): 528-535
- Raeder H, Johansson S, Holm P I *et al.* (2006) Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *Nat Genet* 38(1): 54–62
- Raphael K L, Willingham F F (2016) Hereditary pancreatitis: current perspectives. *Clin Exp Gastroenterol* 9: 197–207
- Richardson P M, Zon L I (1995) Molecular cloning of a cDNA with a novel domain present in the *tre-2* oncogene and the yeast cell cycle regulators BUB2 and *cdc16*. *Oncogene* 11(6): 1139–1148
- Rinderknecht H, Adham N F, Renner I G *et al.* (1988) A possible zymogen self-destruct mechanism preventing pancreatic autodigestion. *Int J Pancreatol* 3(1): 33–44
- Rinderknecht H, Renner I G, Carmack C (1979) Trypsinogen variants in pancreatic juice of healthy volunteers, chronic alcoholics, and patients with pancreatitis and cancer of the pancreas. *Gut* 20(10): 886–891
- Rinderknecht H, Stace N H, Renner I G (1985) Effects of chronic alcohol abuse on exocrine pancreatic secretion in man. *Dig Dis Sci* 30(1): 65–71
- Rosendahl J, Bödeker H, Mössner J *et al.* (2007) Hereditary chronic pancreatitis. *Orphanet J Rare Dis* 2: 1
- Rosendahl J, Kirsten H, Hegyi E *et al.* (2017) Genome-wide association study identifies inversion in the CTRB1-CTRB2 locus to modify risk for alcoholic and non-alcoholic chronic pancreatitis. *Gut* 67(10): 1855-1863
- Rosendahl J, Landt O, Bernadova J *et al.* (2013) CFTR, SPINK1, CTRC and PRSS1 variants in chronic pancreatitis: is the role of mutated CFTR overestimated? *Gut* 62(4): 582–592
- Rosendahl J, Witt H, Szmola R *et al.* (2008) Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* 40(1): 78–82
- Sahin-Tóth M (2017) Genetic risk in chronic pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 33(5): 390–395
- Sakaguchi T, Gu X, Golden H M *et al.* (2002) Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1 α . *J Biol Chem* 277(24): 21361–21370

-
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A R (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463–5467
- Schaaf CP, Zschocke J (2018) *Basiswissen Humangenetik*, 3. Aufl. Springer Berlin
- Schneider A (2005) Serine protease inhibitor kazal type 1 mutations and pancreatitis. *Clin Lab Med* 25(1): 61–78
- Sharer N, Schwarz M, Malone G *et al.* (1998) Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med* 339(10): 645–652
- Shibata T, Ogawa M, Matsuda K *et al.* (1986) Purification and characterization of pancreatic secretory trypsin inhibitor in human gastric mucosa. *Clin Chim Acta* 159(1): 27–36
- Shibata T, Ogawa M, Takata N *et al.* (1987) Distribution of pancreatic secretory trypsin inhibitor in various human tissues and its inactivation in the gastric mucosa. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 55(2): 243–248
- Shimizu Y, Furuya H, Tamashiro P M *et al.* (2018) Genetic deletion of sphingosine kinase 1 suppresses mouse breast tumor development in an HER2 transgenic model. *Carcinogenesis* 39(1): 47–55
- Singer M V, Gyr K, Sarles H (1985) Revised classification of pancreatitis. Report of the Second International Symposium on the Classification of Pancreatitis in Marseille, France, March 28-30, 1984. *Gastroenterology* 89(3): 683–685
- Söderman J, Norén E, Christiansson M *et al.* (2013) Analysis of single nucleotide polymorphisms in the region of CLDN2-MORC4 in relation to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 19(30): 4935–4943
- Steer M L, Meldolesi J (1987) The cell biology of experimental pancreatitis. *N Engl J Med* 316(3): 144–150
- Stigendal L, Olsson R (1984) Alcohol consumption pattern and serum lipids in alcoholic cirrhosis and pancreatitis. A comparative study. *Scand J Gastroenterol* 19(5): 582–587
- Sutton R, Criddle D, Raraty M G T *et al.* (2003) Signal transduction, calcium and acute pancreatitis. *Pancreatology* 3(6): 497–505
- Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S (2011) Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J Biol Chem* 286(36): 31263–31271
- Szabó A, Sahin-Tóth M (2012) Increased activation of hereditary pancreatitis-associated human cationic trypsinogen mutants in presence of chymotrypsin C. *J Biol Chem* 287(24): 20701–20710
- Szmola R, Sahin-Toth M (2007) Chymotrypsin C (caldecrin) promotes degradation of human cationic trypsin: identity with Rinderknecht's enzyme Y. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(27): 11227–11232
- Takigawa M, Iida M, Nagase S *et al.* (2017) Creation of a Claudin-2 Binder and Its Tight Junction-Modulating Activity in a Human Intestinal Model. *J Pharmacol Exp Ther* 363(3): 444–451

- Tan X, Egami H, Ishikawa S *et al.* (2004) Arrangement of expression and distribution of tight junction protein claudin-1 in cell dissociation of pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 25(6): 1567–1574
- Tan X, Li D, Wang X *et al.* (2014) Claudin-2 downregulation by KSHV infection is involved in the regulation of endothelial barrier function. *J Cutan Pathol* 41(8): 630–639
- Tang X-Y, Zou W-B, Masson E *et al.* (2018) The CTRB1-CTRB2 risk allele for chronic pancreatitis discovered in European populations does not contribute to disease risk variation in the Chinese population due to near allele fixation. *Gut* 67(7): 1368–1369
- Teich N, Mössner J, Keim V (1998) Mutations of the cationic trypsinogen in hereditary pancreatitis. *Hum Mutat* 12(1): 39–43
- Teich N, Rosendahl J, Toth M *et al.* (2006) Mutations of human cationic trypsinogen (PRSS1) and chronic pancreatitis. *Hum Mutat* 27(8): 721–730
- Van Itallie C M, Holmes J, Bridges A *et al.* (2008) The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J Cell Sci* 121(3): 298–305
- Vendrell J, Querol E, Aviles F X (2000) Metalloproteases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties. *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2): 284–298
- Wang M, Kaufman R J (2016) Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* 529(7586): 326–335
- Wang Y, Mumm J B, Herbst R *et al.* (2017) IL-22 Increases Permeability of Intestinal Epithelial Tight Junctions by Enhancing Claudin-2 Expression. *J Immunol* 199(9): 3316–3325
- Ward, J. B.; Petersen, O. H.; Jenkins, S. A.; Sutton, R. (1995): Is an elevated concentration of acinar cytosolic free ionised calcium the trigger for acute pancreatitis? *Lancet* 346 (8981), S. 1016–1019.
- Weiss F U, Hesselbarth N, Párnitzky A *et al.* (2018) Common variants in the CLDN2-MORC4 and PRSS1-PRSS2 loci confer susceptibility to acute pancreatitis. *Pancreatology* 486 (18): 477-481
- Weiss F U, Skube M E, Lerch M M (2018) Chronic pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterology* 34 (5): 322-329
- Whitcomb D C, Gorry M C, Preston R A *et al.* (1996) Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 14(2): 141–145 (b)
- Whitcomb D C, LaRusch J, Krasinskas A M *et al.* (2012) Common genetic variants in the CLDN2 and PRSS1-PRSS2 loci alter risk for alcohol-related and sporadic pancreatitis. *Nat Genet* 44(12): 1349–1354
- Whitcomb D C, Preston R A, Aston C E *et al.* (1996) A gene for hereditary pancreatitis maps to chromosome 7q35. *Gastroenterology* 110(6): 1975–1980 (a)
- Witt H, Apte M V, Keim V *et al.* (2007) Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology* 132(4): 1557–1573

-
- Witt H, Beer S, Rosendahl J *et al.* (2013) Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. *Nat Genet* 45(10): 1216–1220
- Witt H, Luck W, Becker M *et al.* (2001) Mutation in the SPINK1 trypsin inhibitor gene, alcohol use, and chronic pancreatitis. *JAMA* 285(21): 2716–2717
- Witt H, Luck W, Hennies H C *et al.* (2000) Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* 25(2): 213–216
- Witt H, Sahin-Tóth M, Landt O *et al.* (2006) A degradation-sensitive anionic trypsinogen (PRSS2) variant protects against chronic pancreatitis. *Nat Genet* 38(6): 668–673
- Xiao X, Jones G, Sevilla W A *et al.* (2016) A Carboxyl Ester Lipase (CEL) Mutant Causes Chronic Pancreatitis by Forming Intracellular Aggregates That Activate Apoptosis. *J Biol Chem* 291(44): 23224–23236
- Xiao Y, Yuan W, Yu B *et al.* (2017) Targeted Gene Next-Generation Sequencing in Chinese Children with Chronic Pancreatitis and Acute Recurrent Pancreatitis. *J Pediatr* 191: 158-163
- Yadav D, Hawes R H, Brand R E *et al.* (2009) Alcohol consumption, cigarette smoking, and the risk of recurrent acute and chronic pancreatitis. *Arch Intern Med* 169(11): 1035–1045
- Yang Z'a, Zhuang Q, Hu G *et al.* (2019) MORC4 is a novel breast cancer oncogene regulated by miR-193b-3p. *J Cell Biochem* 120(3): 4634–4643
- Zeissig S, Bürgel N, Günzel D *et al.* (2007) Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 56(1): 61–72
- Zhang Y-g, Wu S, Lu R *et al.* (2015) Tight junction CLDN2 gene is a direct target of the vitamin D receptor. *Sci Rep* 5: 10642

8. THESEN

1. Die chronische Pankreatitis (CP) ist eine schwerwiegende und lebenszeitverkürzende Erkrankung, die häufig eine stationäre Krankenhausbehandlung notwendig macht und bei Betroffenen mit einem hohen Leidensdruck, bedingt durch Schmerzen und Arbeitsunfähigkeit, einhergeht.
2. Als gesicherte Risikofaktoren für die Entstehung einer CP zählen Alkoholkonsum, das Rauchen sowie eine Vielzahl genetischer Risikofaktoren. Derzeit wird davon ausgegangen, dass es im Zuge einer CP zur einem Selbstverdau des Organs durch Störungen in Homöostase der Verdauungsenzym-Aktivierung und -Inaktivierung kommt.
3. Es wird im Wesentlichen zwischen einem „Trypsin-abhängigen“ und einem „Trypsin-unabhängigen“ Weg bei der Entstehung einer CP unterschieden. Beim „Trypsin-abhängigen“ Weg liegen die genetischen Alterationen in den Genen der Verdauungsenzyme beziehungsweise deren Gegenspielern, wie dem kationischen Trypsinogen (*PRSS1*), der Serinprotease-Inhibitor, Kazal-Typ 1 (*SPINK1*) sowie dem Chymotrypsin C (*CTRC*).
4. Mittels Genomweiter Assoziationsstudien konnten weitere genetische Risikovarianten identifiziert werden, die jedoch nicht in Genen gelegen sind, deren Produkte an der pankreatischen Verdauungsenzymkaskade beteiligt sind. Hierbei handelt es sich um zwei x-chromosomal gelegene Varianten im *MORC4*- (*rs12688220*) sowie im *CLDN2*-Lokus (*rs7057398*).
5. Die funktionellen Daten der beiden Varianten erklären die Ätiopathogenese der CP durch diese SNPs nur unzureichend. Möglicherweise sind daher andere Varianten, die mit den beiden assoziierten Varianten gemeinsam vererbt werden, also in einem *linkage disequilibrium* (LD) stehen, von funktioneller Bedeutung.
6. Es sollten weitere Varianten auf ihre genetische Assoziation hin untersucht und funktionell charakterisiert werden, um zu klären, ob die beiden SNPs im *MORC4*- und *CLDN2*-Lokus nur „Stellvertreter“ einer anderen Variante mit funktioneller Konsequenz sind.
7. Eine in einem LD stehende Variante, *rs7877190*, wurde durch komplexe bioinformatische Analysen ausgewählt. Sie ist in dem untersuchten Patient*innenkollektiv bei Frauen mit einer NACP sowie bei Männern mit einer NACP und ACP häufiger zu finden und stellt im Vergleich mit Blutspender*innen in der untersuchten Kohorte statistisch ein erhöhtes Risiko dar, an der CP zu erkranken. Die Variante *rs7877190* ist in dem untersuchten Patient*innenkollektiv in drei von vier analysierten Subgruppen mit einer CP assoziiert.
8. Bei Frauen, die an einer ACP litten, ist *rs7877190* nicht mit einer CP assoziiert.

9. Im Zellkulturmodell konnte sowohl am PANC-1, als auch an HEK-293-Zellkulturmodell keine Beeinfluss der Genexpression durch die Variante *rs7877190* gezeigt werden.

Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: pankreatische Verdauungsenzymkaskade	4
Abbildung 2: schematischer Ablauf einer GWAS	9
Abbildung 3: Gelelektrophorese des PCR Produktes.....	22
Abbildung 4: Elektropherogramm, Sequenzierung der Variante und Wildtyp.....	24
Abbildung 5: Schmelzkurvenanalyse der Variante sowie Wildtyp am LightCycler 480.....	26
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Prinzips der Reporter-gen-Analysen.....	27
Abbildung 7: Skizzierte Darstellung pGL4.23-Vektor (Promega)	28
Abbildung 8: Reaktionsgleichungen Luciferasen	29
Abbildung 9a: Prozentuales Vorkommen des Risikoallels von <i>rs7877190</i> bei Frauen.....	40
Abbildung 9b: Prozentuales Vorkommen des Risikoallels von <i>rs7877190</i> bei Männern	40
Abbildung 10a: Mittelwerte der Reporter-gen-Aktivitäten an PANC-1-Zelllinie	44
Abbildung 10b: Mittelwerte der Reporter-gen-Aktivitäten an HEK-293-Zelllinie	45
Abbildung 11: Darstellung der enzymatischen Eigenschaft der TBC-Proteine.....	52
Tabelle 1: Übersicht der mit CP assoziierten SNPs und gekoppelten Varianten sowie deren ermittelte Auswirkung auf die Histonmodifikation	37
Tabelle 2: Ergebnisse der Genotypisierung der Variante <i>rs7877190</i>	39
Tabelle 3: Ergebnisse der Genotypisierung der Varianten <i>rs12688220</i> , <i>rs7057398</i> und <i>rs7877190</i> in der der Arbeit zugrunde liegenden Patient*innenkohorte.....	42
Tabelle 4: Relative Reporter-gen-Aktivitäten der einzelnen Experimente an PANC-1-Zellen sowie Mittelwert, Median und Standardfehler.....	43
Tabelle 5: Relative Reporter-gen-Aktivitäten der einzelnen Experimente an HEK-293-Zellen sowie Mittelwerte, Median und Standardfehler.....	45

Selbstständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, Constantin Zimmer, geboren am 22. Dezember 1988 in Freiburg im Breisgau, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „*Einzelnukleotid-Polymorphismus in TBC1D8B als genetische Risikovariante der chronischen Pankreatitis*“ selbstständig, ohne fremde und unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Ebenso erkläre ich, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben. Weiterhin erkläre ich, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen beziehungsweise ein Promotionsverfahren eröffnet wurde und dass die vorgelegte Arbeit auch nicht im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zwecke einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde.

Ferner erkläre ich, dass die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen eingehalten wurden.

Datum

Unterschrift

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Jonas Rosendahl danke ich für die Überlassung des Themas und die sehr gute Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Bedanken möchte ich mich insbesondere für sein großes Engagement, sein Teilen von Begeisterung an wissenschaftlichen Fragestellungen und für seine stets positive Art. Als Forscher, Arzt und Mensch ist Herr Prof. Dr. med. Jonas Rosendahl ein Vorbild für mich geworden. Er hat mein Interesse für die Innere Medizin gefestigt und somit meinen weiteren beruflichen Werdegang mit beeinflusst.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Helmut Laumen bedanke ich mich für die hilfreiche Mitbetreuung der Arbeit, das Erklären von für mich zunächst komplex erscheinenden genetischen Zusammenhängen sowie die Überlassung der Ergebnisse der PMCA.

Frau Claudia Ruffert gilt noch ein besonderer Dank für die Einarbeitung im Gastroenterologischen Forschungslabor und das Beibringen der Methoden. Ich danke Frau Ruffert ebenso für die insgesamt freudige, produktive und lebhaftige Zeit im Forschungslabor, an die mich immer wieder gerne im Guten zurückerinnere.

Meinen Eltern, Frau Barbara Zimmer und Herrn Christian Zimmer, danke ich für ihre liebe- und vertrauensvolle Art, mich auf meinem Weg zu unterstützen und zu begleiten. Indem mir meine Eltern ihre bedingungslose Liebe und eine gute Ausbildung ermöglicht haben, legten Sie die wichtigsten Grundsteine für meine Zukunft. Ihr habt mir immer vertraut und immer an mich geglaubt. Ich bin euch unendlich dankbar.

Meiner Ehefrau, Jeannine Zimmer, danke ich für ihre Unterstützung, Begleitung und Geduld im Hinblick auf die Fertigstellung dieser Arbeit. Schwierige Phasen hinsichtlich der Entstehung der Dissertation hat sie stets abgefangen und mit ihrem ausgleichenden Wesen ein Vorankommen an der vorliegenden Arbeit wieder ermöglicht. Es ist ein sehr großes Geschenk, dich immer an meiner Seite zu haben. Ich danke auch unserer kleinen Tochter Alma. Für Ihr Lachen, ihren Entdeckungsdrang und ihre ungezähmte Lebensfreude, die sie mit uns teilt.

Dir, Alma, widme ich diese Arbeit.