

Az elért eredmények rövid ismertetése:

### **1.év**

Ebben a periódusban a krónikus pankreatitisszel összefüggésbe hozható hasnyálmirigy eredetű tripszin inhibitor (SPINK1) mutációk azonosítását kezdtük meg. Célunk olyan genetikai variánsok felderítése volt, melyek a SPINK1 gén promoter illetve 5' upstream régiójában található. Ennek megvalósítására 400 beteg illetve kontroll egyén SPINK1 génjének mintegy 10 kb upstream régiójának DNS szekvencia-analízisébe kezdtünk.

A pankreasz betegek nyilvántartására létrehoztuk az ORSZÁGOS PANKREÁSZ REGISZTER-t ([www.pancreas.hu](http://www.pancreas.hu)) továbbá a GENETIKAI ÉS SZÖVETBANK-ot mely működéséhez megkapta a szükséges engedélyeket az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságától (TÜKEB-22254-1/2012/EKU). A tudományos kutatási célra történő humán minták gyűjtésére és tárolására az ÁNTSZ Országos Tisztiorvosi Hivatal biobanki tevékenységre vonatkozó működési engedélyét is megkaptuk (IF 702-19/2012).

100 krónikus pankreatitises betegből, illetve kontroll egyénből a betegtájékoztatót és a beleegyező nyilatkozat aláírását követően vérvételt végeztünk, majd a vérmintákat az SZTE I. sz. Belgyógyászati Klinika Sejtélettani Laboratóriumában az előírásoknak megfelelően elhelyeztük. Ezt követően az összegyűjtött mintákból QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) segítségével DNS-t izoláltunk, majd a SPINK1 gén 5'upstream régiójára a szekvenálást megkezdtük. Oligo 5.0 software-rel tervezett specifikus primerekkel a PCR technika segítségével sokszorosítottuk a kívánt DNS szakaszt. A megtisztított amplikonokat DNS szekvencia-analízisre küldtünk, melynek eredményét a Chromas 2.1 software segítségével értékeltük.

## 2.év

A második évben folytattuk a pankreatikus szekretoros tripszin inhibitor fehérjét kódoló *SPINK1* gén promoter régiójának mutáció analízisét. 100 krónikus pankreatitises beteg és 100 kontroll egyénből a DNS izolálást követően szekvencia analízist végeztünk a *SPINK1* promoter régió ~1 kb szakaszán. A DNS szekvenálás során 5 variánst azonosítottunk a *SPINK1* promoter régiójában, melyek közül 2 (c.-253T>C, c.-807C>T) gyakori polimorfizmus, 3 variáns (c.-14G>A, c.-108G>T, c.-215G>A) kizárólag a beteg csoportban volt fellelhető. Ezen mutációk előfordulása nagyon ritka, közülük 2 klinikai jelentősége ismeretlen. A leggyakoribb *SPINK1* mutáció p.N34S jelenlétét restriktív fragmentumhossz polimorfizmus módszerrel teszteltük. A vizsgált kohortban 3/70 krónikus pankreatitises beteg és 0/70 kontroll egyén hordozza a p.N34S mutációt heterozigóta formában ( $P = 0,243$ ). A promóter variánsok és a p.N34S mutáció asszociációját nem igazoltuk.

Ebben a periódusban továbbá megkezdtük a *SPINK1* gén promoter régiójában azonosított variánsok funkcionális analízisét, így első lépésben az analízis kivitelezéséhez szükséges konstrukciók létrehozását. A *SPINK1* gén promoter régiójának mintegy ~600 bp szakaszára az azonosított variánsok pozíciójának megfelelően mutagén primereket terveztünk, majd 2 lépéses PCR mutagenezis segítségével létrehoztuk a variánsokat tartalmazó *SPINK1* promoter DNS szakaszt. HINDIII és KPNI restriktív klónozó helyeket használva PROMEGA pGL3(C) reporter vektorokba ligáltuk a *SPINK1* promoter vad típusú-, illetve a PCR mutagenezissel létrehozott promoter variánsokat tartalmazó DNS szekvenciát. Az így létrehozott plazmid-konstrukciókat QIAGEN HiSpeed Plasmid Midi kit segítségével preparáltuk. A mutagenezis sikerességéről minden esetben szekvenálással is meggyőződünk.

### 3.év

A harmadik évben folytattuk a *SPINK1* promóter mutációk analízisét. A DNS szekvenálás során összesen 6 különböző variánst azonosítottunk. A c.-807C>T variáns gyakorisága a krónikus pankreatitiszos betegcsoportban és a kontroll csoportban azonos volt (21% illetve 17.5%, p=0.45), ezen polimorfizmusnak nincs klinikai jelentősége. A c.-253T>C egy ismert gyakori polimorfizmus, mely azonban az általunk vizsgált betegcsoportban szignifikánsan gyakrabban fordult elő, mint a kontroll csoportban (19% illetve 10%, p=0.015). További 4 ritka variánst azonosítottunk kizárólag a betegcsoportban (c.-14G>A, c.-108G>T, c.-215G>A, c.-246A>G), melyek krónikus pankreatitisszel való asszociációját funkcionális analízis során vizsgáltuk.

A luciferáz riportter funkcionális analízis során 3 mutációnál (c.-14G>A (80%), c.-108G>T (31%) és c.-246A>G (54%)) azonosítottunk szignifikánsan csökkent promóter aktivitást a vad típushoz képest. A c.-215G>A variáns esetében kétszeresére (201%) nőtt a promóter aktivitás, míg a c.-253T>C polimorfizmus változatlan promóter aktivitást mutatott.

A fenti eredmények alapján két új patogén variánst (108G>T és c.-246A>G) azonosítottunk a *SPINK1* promóter régióban, melyek hozzájárulhatnak a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásához. A c.-215G>A variáns minden esetben asszociált egy már korábban azonosított patogén intronikus mutációval (c.194+2T>C), melynek szerepe ismert krónikus pankreatitisz kiváltásában. A c.-253T>C variáns gyakori előfordulása a vizsgált betegcsoportban meglepő, funkcionális eredményeink azonban nem igazolták patogenitását.

Az eredményeinket összefoglaló közlemény jelenleg elbírálás alatt áll:

Hegy E, Geisz A, Sahin-Tóth M, Derikx M, Németh BC, Balázs A, Hritz I, Izbéki F, Halász A, Párniczky A, Takács T, Kelemen D, Sarlós P, Hegyi P, Czákó L. *SPINK1* promóter variants in chronic pancreatitis. *Pancreas*, in press, 2015.