

Genetische Analyse der Hämoxygenase-1 bei verschiedenen Formen der Pankreatitis

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Moritz Jesinghaus, geboren am 23. 07.1984 in Saarlouis

angefertigt am: Department für Innere Medizin, Neurologie und Dermatologie,
Klinik und Poliklinik für Gastroenterologie und Rheumatologie,
Universitätsklinikum Leipzig, AöR
Klinikdirektor Prof. Dr. med. Joachim Mössner

Betreuer: PD Dr. med. Jonas Rosendahl

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 17.12.2013

Inhaltsverzeichnis

Vorbemerkung	3
Bibliographische Beschreibung	4
Abkürzungen/Abbildungen	6
1. Einleitung	9
1.1 Akute Pankreatitis	9
1.2 Chronische Pankreatitis	11
1.3 Genetische Aspekte der Chronischen Pankreatitis	12
<i>1.3.1 Kationisches Trypsinogen (PRSS1)</i>	12
<i>1.3.2 Anionisches Trypsinogen (PRSS2)</i>	14
<i>1.3.3 Serinproteaseinhibitor, Kazal Typ1 (SPINK1)</i>	14
<i>1.3.4 Chymotrypsin C (CTRC)</i>	15
<i>1.3.5 CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)</i>	15
1.4 Hämoxygenase-1	16
<i>1.4.1 Physiologische Bedeutung der Hämoxygenase-1 (HO-1)</i>	16
<i>1.4.2 Genetische Varianten der Hämoxygenase-1</i>	18
<i>1.4.3 Hämoxygenase-1 und Pankreatitis</i>	20
1.5 Hypothese/Fragestellung	21
2. Publikation	22
3. Zusammenfassung der Arbeit	23
4. Literaturverzeichnis	28
5. Danksagung	35
6. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	36
7. Lebenslauf	37

Vorbemerkung

Für diese Dissertationsschrift wurde die Form der Publikationspromotion gewählt. In den eingefügten Originalpublikationen werden alle verwendeten Materialien und Methoden sowie die Ergebnisse beschrieben und ausführlich diskutiert.

Bibliografischer Nachweis der Publikationen:

Sebastian Weis¹, **Moritz Jesinghaus**¹, Peter Kovacs, Dorit Schleinitz, Robert Schober, Claudia Ruffert, Max Herms, Henning Wittenburg, Michael Stumvoll, Matthias Blüher, Robert Grützmann, Hans-Ulrich Schulz, Volker Keim, Joachim Mössner, Peter Bugert, Heiko Witt, Joost P. H. Drenth, Knut Krohn, Jonas Rosendahl (2012): Genetic Analyses of Heme Oxygenase 1 (HMOX1) in Different Forms of Pancreatitis. PLoS ONE 7(5): e37981. doi:10.1371/journal.pone.0037981

¹ geteilte Erstautorenschaft

Bibliographische Beschreibung

Moritz Jesinghaus

37 S¹, 67 L², 2 Abbildungen, 1 Artikel

Genetische Analyse der Hämoxygenase-1 bei verschiedenen Formen der Pankreatitis.

Universität Leipzig, kumulative Dissertation

Referat:

Die Hämoxygenase-1 (HO-1) ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Hämabbaus und ist wichtiger Regulator inflammatorischer Prozesse. Der Verlauf einer experimentellen akuten Pankreatitis (AP) konnte im Tiermodell durch HO-1 Induktion abgemildert werden. Die Aktivierung und Proliferation pankreatischer Stellatum Zellen (PSC) wird durch eine experimentelle HO-1 Induktion inhibiert und kann so möglicherweise vor der Fibrosierung des Pankreasparenchyms bei chronischer Pankreatitis (CP) schützen. Die Transkription der HO-1 wird durch einen *GT*-Repeat beeinflusst, der im Promoter lokalisiert ist. Diese Arbeit untersuchte, ob Varianten des *GT*-Repeat oder weitere genetische Varianten der *HO-1* mit verschiedenen Pankreatitisformen assoziiert sind.

Der *GT*-Repeat und der SNP rs2071746 wurden mit fluoreszenzmarkierten Primern bzw. mit Schmelzkurvenanalyse bei 285 Patienten mit AP, bei 208 Patienten mit alkoholischer CP (ACP), bei 207 mit idiopathischer/hereditärer CP (ICP/HCP), 147 Patienten mit Alkoholischer Leberzirrhose (ALZ) und bei 289 Kontrollen untersucht. Bei den ACP Patienten wurde die *GT*-Repeat Analyse auf insgesamt 446 Patienten erhöht. Zusätzlich wurden die kodierenden *HO-1* Abschnitte mittels DNA-Sequenzierung bei 145 Patienten mit ACP, 138 Patienten mit ICP/HCP, 147 Patienten mit ALZ und bei 151 Kontrollen analysiert. Das Exon 3 wurde darüber hinaus bei zusätzlichen ICP/HP Patienten und Kontrollen untersucht.

Die Längenverteilungen des *GT*-Repeat, die Allelverteilung des SNP rs2071746 und die Verteilung der bei der DNA-Sequenzierung gefundenen synonymen und nicht synonymen Varianten waren bei allen untersuchten Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.

Obwohl die funktionellen Daten einen Einfluss von *HO-1* Varianten auf die Pathogenese der verschiedenen Pankreatitis-Formen nahelegen, konnte unsere umfangreiche genetische Analyse keine Assoziation nachweisen. Genetische Varianten der *HO-1* haben keinen Einfluss auf die Entwicklung einer AP, ACP, ICP/HCP und ALZ.

¹ Seitenanzahl insgesamt

² Zahl der im Literaturverzeichnis ausgewiesenen Literaturangabe

Abkürzungen

ACP = Alkoholische Chronische Pankreatitis

AP = Akute Pankreatitis

AP-1 und 2 = activator protein 1 und 2

ARDS = Acute Respiratory Distress Syndrome

ALZ = Alkoholische Leberzirrhose

CdRE = cadmium-response element

CF = Zystische Fibrose

CFTR = Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

cGMP = Cyclisches Guanosin Monophosphat

CO = Kohlenstoffmonoxid

COPD = Chronisch obstruktive Lungenerkrankung

CoPPIX = Koproporphyrin 9

CP = Chronische Pankreatitis

CTRC = Chymotrypsin C

DIC = Disseminated Intravascular Coagulation

ERCP = Endoskopisch retrograde Cholangio-pankreatikographie

GATA_x = GATA binding proteins

(GT)_n = GT-Repeat

HCP = Hereditäre Chronische Pankreatitis

HDL = High Density Lipoprotein

HIF = hypoxia-inducible factor

HNF-1 und -4 = hepatocyte nuclear factor-1

HO-1 = Hämoxygenase-1
HSC = Hepatische Stellatum Zellen
HSE = heat shock element
HSP = Heat Shock Protein 32
ICP = Idiopathische Chronische Pankreatitis
IL-1/2/6/8/10 = Interleukin 1/2/6/8/10
KHK = Koronare Herzkrankheit
LPS = Lipopolysacharid
MAPK= mitogen aktivierte Proteinkinase
NRE = negative regulatory element
oxLDL= oxidierte Low Density Lipoprotein
P13/AKT = Proteinkinase B
PAF = Plättchen Aktivierender Faktor
PDGF= Platelet Derived Growth Factor
PKC = Proteinkinase C
PRSS1 = Kationisches Trypsinogen
PRSS2 = Anionisches Trypsinogen
PSC = Pankreatische Stern Zellen
PSTI = Pankreatischer Sekretorischer Trypsin Inhibitor
SBE = smad-binding element
SIRS = Systemic Inflammatory Response Syndrome
SNP = Single Nucleotid Polymorphism
Sp1 = specificity protein 1
SPINK1 = Serinproteaseinhibitor Kazal Typ 1

STATx = signal transducer and activator of transcription

StRE = stress-responsive element

TGF- β = Transforming Growth Factor beta

TNF α = Tumor Nekrose Faktor α

USF = upstream stimulatory factor

UV = Ultraviolettstrahlung

Abbildungen

Abbildung 1: Darstellung des HO-1 Signalwegs und seiner intrazellulären/systemischen Wirkungen.....17

Abbildung 2: Darstellung der genomischen Struktur des *HO-1*.....19

1. Einleitung

1.1 Akute Pankreatitis

Die akute Pankreatitis (AP) ist eine entzündliche Erkrankung der Bauchspeicheldrüse die klinisch durch Schmerzen im Oberbauch charakterisiert ist und mit erhöhten Pankreasenzymwerten einhergeht (Caroll *et al.*, 2007). Der Verlauf der AP wird in eine milde, ödematöse und eine schwere, nekrotisierende Form unterteilt (Chen *et al.*, 2007). Ein milder Verlauf ist wesentlich häufiger, lediglich bei 10-20% der Patienten kommt es zu einem komplizierten Verlauf, der mit einer hohen Letalität einhergeht (Van Santvoort *et al.*, 2011).

Die Inzidenz der AP in den westlichen Industriestaaten wird mit 40 pro 100.000 Einwohner angegeben (Granger *et al.*, 2005). Die häufigsten Ursachen der AP sind Gallensteine und ein übermäßiger Alkoholkonsum. Andere Ursachen wie anatomische Anomalien, eine Hyperkalziämie, eine Hypertriglyceridämie, Medikamente, ein Trauma oder eine Autoimmunpankreatitis sind selten (Mitchell *et al.*, 2003). Scheinbar erhöht auch das Rauchen das Risiko eine AP zu entwickeln (Sadr-Azodi *et al.*, 2012). Als histopathologische Veränderungen sind bei der milden Verlaufsform der AP entzündliche Infiltrate, ein interstitielles Ödem und fokale Fettgewebnekrosen des Pankreasparenchyms sowie des peripankreatischen Fettgewebes nachweisbar. Bei der nekrotisierenden AP entstehen Nekrosen der Azini und der Langerhans-Inseln. Werden zusätzlich Blutgefäße arrodirt, sind in vielen Fällen Einblutungen in das Pankreasgewebe identifizierbar (Phat *et al.* 1984; Pandol *et al.* 2007).

Die typische klinische Symptomatik der AP ist ein akut einsetzender, persistierender, epigastrisch lokalisierter Oberbauchschmerz, welcher gürtelförmig in den Rücken ausstrahlen kann und häufig von Übelkeit und Erbrechen begleitet wird (Caroll *et al.* 2007). Weiterhin können in einigen Fällen eine prall-elastische Bauchdeckenspannung („Gummibauch“), Meteorismus und Fieber auftreten. Ekchymosen der Haut im Bereich der Flanke oder periumbilical, die sogenannten Grey-Turner- und Cullen-Zeichen, sind nur bei wenigen Patienten nachweisbar.

Zur Diagnosestellung ist in Zusammenschau mit der klinischen Symptomatik die Lipasebestimmung im Serum (> 3-fach der Norm) und die Bildgebung (vorzugsweise eine Abdomensonographie mit Nachweis peripankreatischer Flüssigkeit) im akuten Stadium wegweisend für die Diagnose.

Bei der milden Verlaufsform ist neben einer adäquaten Schmerztherapie, einer ausreichenden Volumengabe und einer Nahrungskarenz in den meisten Fällen keine weitere Therapie notwendig (Chen *et al.*, 2007). Handelt es sich um eine biliäre AP erfolgt in Abhängigkeit der Laborwerte (Cholestase, Anhalt für eine Cholangitis) und der Klinik (SIRS, Sepsis) die Durchführung einer Endoskopisch retrograden Cholangio-pankreatikographie (ERCP) (AWMF Leitlinie, Diagnostik und Therapie von Gallensteinen, 2007). Die schwere Verlaufsform der AP hingegen ist eine lebensgefährliche Erkrankung die mit einer starken Entzündungsreaktion einhergeht und lokale (Nekrosen, Abszesse, Pseudozysten) sowie systemische Komplikationen (ARDS, DIC, SIRS) zur Folge haben kann. Die Letalität dieser Verlaufsform wird mit 10-30% angegeben (Banks, 1994).

Pathophysiologisch könnte die Entwicklung der akuten Pankreatitis durch die Autodigestion des Organs aufgrund vorzeitig aktivierter pankreatischer Proteasen, sowie durch eine nachfolgende Entzündungsreaktion mit leukozytärer Infiltration des Parenchyms und Mediatoraktivierung bedingt sein (Habtezion *et al.*, 2011). Bei der AP scheint ein komplexes Zusammenspiel lokaler und systemischer Entzündungsmediatoren von Bedeutung zu sein, in dem als proinflammatorische Mediatoren Interleukin 1, 6 und 8 (IL-1, IL-6, IL-8), der Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α) und der Plättchen aktivierende Faktor (PAF) zu nennen sind (Granger *et al.*, 2005). Die antiinflammatorische Gegenregulation, welche eine systemische Ausbreitung proinflammatorischer Zytokine verhindern soll, hat Interleukin-10 (IL-10) als Hauptprotagonisten.

Im Gegensatz zur chronischen Pankreatitis (CP) ist bei der AP, abgesehen von der p.N34S *SPINK1* Variante, bis dato keine valide genetische Assoziation beschrieben worden (O'Reilly *et al.*, 2008).

1.2 Chronische Pankreatitis

Die CP ist eine rezidivierend oder kontinuierlich verlaufende entzündliche Erkrankung der Bauchspeicheldrüse (Singer *et al.*, 1985). Der Entzündungsprozess führt zu einem Ersatz des Parenchyms durch Bindegewebe. Dies kann zu einer irreversiblen Insuffizienz der exokrinen (Maldigestion) und der endokrinen Funktion (Diabetes) des Organs führen (DiMagno *et al.*, 1993). Der akute Schub einer CP kann sowohl als milde, interstitiell-ödematöse Entzündung, als auch als schwere, hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis verlaufen. Im fortgeschrittenen Stadium der CP findet sich häufig eine ausgedehnte Fibrose des Pankreas sowie dilatierte und konkrementhaltige Gänge (Klöppel, 2007). Die Fibrosierung des Organs entsteht wahrscheinlich durch die Aktivierung pankreatischer Stellatum-Zellen (PSC) (Omary *et al.*, 2007).

Klinische Merkmale der CP sind abdominale Schmerzen, welche im Schub auftreten aber auch persistieren können, die Maldigestion und ein pankreopriver Diabetes mellitus (Typ IIIc) (Witt *et al.*, 2007). Dieser ist durch Zerstörung der Insulin- und Glucagon produzierenden Zellen des endokrinen Pankreas (A- und B-Zell-Destruktion) gekennzeichnet (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003). Eine Maldigestion tritt im Verlauf der Erkrankung bei einem Teil der Patienten auf und führt in vielen Fällen zu einer Gewichtsabnahme.

In westlichen Industrienationen beträgt die Inzidenz der CP wahrscheinlich zwischen 3,5 und 10 neu aufgetretene Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr (Secknus *et Mössner*, 2000). Die mittlere Prävalenz wird mit etwa 30 pro 100.000 Einwohner angegeben (Teich *et Keim*, 2001). Als häufigste Ursache der CP in Europa und den USA gilt der Alkoholabusus, welcher in 70% der Fälle als kausal angegeben wird. Interessanterweise, entwickeln lediglich 5% der Patienten mit exzessivem Alkoholkonsum eine CP, so dass weitere Risikofaktoren bei diesen Patienten zu vermuten sind. Anatomische Anomalien wie ein Pankreas divisum oder metabolische Störungen wie eine Hypertriglyceridämie oder eine Hyperkalziämie können ebenfalls eine CP hervorrufen, sind aber als seltenere Ursachen anzusehen (Teich *et Keim*, 2001).

Bei in etwa 10-30% der Fälle besteht eine idiopathische CP (ICP) ohne nachweisbare auslösende Faktoren und ohne positive Familienanamnese (DiMagno *et al.*, 1993). Im Jahr 1952 beschrieben Steinberg und Comfort, dass die CP familiär gehäuft auftreten kann und postulierten dass ein genetischer Hintergrund naheliegend sei (Comfort *et Steinberg*, 1952). Diese als hereditäre CP (HCP) bezeichnete Form zeigt in den meisten Fällen ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster (Perrault, 1994).

1.3 Genetische Aspekte der Chronischen Pankreatitis

Hans Chiari vermutete schon im Jahr 1896, dass der CP ein Prozess der Selbstverdauung des Pankreas zugrunde liegt (Chiari, 1896). Die entscheidende Rolle scheint dabei die intrapankreatische Aktivierung von Trypsinogen zur Serinprotease Trypsin zu spielen. Tritt dies ein, aktiviert Trypsin die weiteren Vorläuferenzyme (Zymogene) und initiiert so einen autodigestiven Prozess innerhalb des Organs (Chen *et Férec*, 2009). Die Aktivierung von Trypsin findet normalerweise im Duodenum durch das Enzym Enteropeptidase statt. Diese Aktivierung der Verdauungsenzymkaskade außerhalb des Pankreas, die Sekretion von inaktiven Vorläuferenzymen (Zymogene) sowie intrapankreatische Schutzmechanismen, sollen eine Autodigestion verhindern. Die zu geringem Teil unter physiologischen Bedingungen vorkommende intrapankreatische Aktivierung von Trypsinogen wird zum einen durch den Serin Protease Inhibitor, Kazal Typ 1 (SPINK1), zum anderen durch Autodegradation durch Trypsin selbst und trypsinähnliche Enzyme (z.B. CTSC) gehemmt. Bislang wurden mehrere Gene identifiziert, die mit der Entwicklung einer CP assoziiert sind.

1.3.1 Kationisches Trypsinogen (PRSS1)

Das kationische Trypsinogen (*PRSS1*) ist die am häufigsten im menschlichen Körper vorkommende Isoform des Trypsinogens. Der Anteil des kationischen Trypsinogens im Pankreassekret beträgt bis zu 60%, der des anionischen Trypsinogens bis zu 40%. Mesotrypsinogen, die dritte Isoform, findet sich in nur sehr geringen Konzentrationen (Scheele *et al.*, 1981). Die Einteilung der Trypsinogen-Isoformen wurde aufgrund des Wanderungsverhaltens im elektrischen Feld aufgestellt.

Obwohl Trypsinogen als inaktiver Vorläufer des Trypsins angesehen wird, hat es die Fähigkeit sich selbst beziehungsweise andere Trypsinogenmoleküle zu Trypsin zu aktivieren (Chen *et Férec*, 2009). Dem kationischen Trypsinogen wird eine stärkere Neigung zur Selbstaktivierung und eine geringere zur Inaktivierung zugeschrieben (Colomb *et al.*, 1978, 1979).

Drei verschiedene Arbeitsgruppen lokalisierten 1996 auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (7q35) einen Genlocus für die HCP (Le Bodic *et al.*, 1996; Pandya *et al.*, 1996; Whitcomb *et al.*, 1996A). Noch im selben Jahr entdeckten Whitcomb *et al.* bei einer italienischen und vier amerikanischen Familien an diesem Genlocus die Missense-Mutation p.R122H des *PRSSI* (Whitcomb *et al.*, 1996). Diese führt zu einem Austausch von Arginin zu Histidin an Position 122 des Trypsins. Da dieses Arginin die primäre Angriffsstelle für die Autolyse von Trypsin darstellt, wird vermutet, dass die Mutation die Inaktivierung von vorzeitig intrapankreatisch aktiviertem Trypsin stört (Whitcomb *et al.*, 1996). Eine weitere mit HCP assoziierte Mutation des *PRSSI* ist die Mutation p.N29I, welche im Jahr 1997 entdeckt wurde (Gorry *et al.*, 1997), wobei 29I-Trypsinogen eine stärkere Autoaktivierung zugeschrieben wird (Sahin-Toth *et al.*, 2000). Ein indirekter Effekt auf die autolytische Aktivität wird kontrovers diskutiert, kann aber nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden (Whitcomb *et al.* 1996).

Die hauptsächlich mit Idiopathischer CP (ICP) assoziierte *PRSSI*-Variante p.A16V wurde erstmals 1999 bei 4 von 44 pädiatrischen Patienten mit CP ohne Familienanamnese entdeckt (Witt *et al.*, 1999). Beim 16V-Trypsinogen liegt einen Aminosäureaustausch im Aktivierungspeptid vor, der zu einer vierfach schnelleren Aktivierung durch Chymotrypsin-C im Vergleich zu Wildtyp *PRSSI* führt (Nemoda *et Sahin-Toth*, 2006). Diese *PRSSI* Varianten stellen Mechanismen verstärkter Trypsinaktivität dar, die zur Entwicklung einer CP prädisponieren können. Im Jahr 2006 entdeckten Le Maréchal *et al.* eine Triplikation eines 605kb Segments im Bereich des Genlokus für humanes Trypsinogen (7q35) bei fünf französischen Familien mit HCP (Le Maréchal *et al.*, 2006). Diese Triplikation und zusätzlich eine Duplikation, wurde später auch bei französischen Patienten mit ICP entdeckt (Masson *et al.*, 2008). Beide Varianten scheinen über einen Gen-Dosis Effekt eine höhere Trypsinaktivität zu verursachen.

Zusammengefasst können *PRSSI* Mutationen zu erhöhter Trypsinstabilität und verstärkter Trypsinaktivierung führen und sind daher prädisponierend für die Entwicklung vor allem einer HCP.

1.3.2 Anionisches Trypsinogen (PRSS2)

Das Gen für das anionische Trypsinogen (*PRSS2*) findet sich ebenfalls auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (7q35) und die Mutation p.G191R im *PRSS2* schützt vor der Entwicklung einer CP (Witt *et al.*, 2006). Diese Variante wurde bei gesunden Kontrollen signifikant häufiger als bei Patienten mit CP nachgewiesen. Rekombinantes 191R-Trypsin zeigte bei Untersuchungen einen völligen Verlust der Enzymaktivität. Dieser ist durch eine neue proteolytische Spaltstelle bedingt, welche das Enzym hoch-sensitiv für eine autokatalytische Proteolyse werden lässt. Im Gegensatz zum kationischen Trypsinogen sind für das anionische Isoenzym keine Mutationen bekannt, die für die Entwicklung einer CP prädisponieren (Chen *et al.*, 1999).

1.3.3 Serinproteaseinhibitor, Kazal Typ1 (SPINK1)

Der Serin Protease Inhibitor, Kazal Typ1, wurde erstmals 1948 aus dem Rinderpankreas isoliert (Kazal *et al.*, 1948) und ist auch unter dem Namen pankreatischer sekretorischer Trypsin-Inhibitor bekannt (PSTI). *SPINK1* wird sowohl in den Azinuszellen des exokrinen Pankreas als auch in verschiedenen anderen Geweben wie Leber, Lunge und Ovarien exprimiert (Shibata *et al.*, 1986). *SPINK1* ist ein potenter Inhibitor der intrapankreatischen Trypsinaktivität. Eine spezifische Bindungsstelle für Trypsin im aktiven Zentrum von *SPINK1* ermöglicht die Bildung eines Trypsin-Inhibitor Komplexes. Die Hemmung der Enzymaktivität durch den *SPINK1*-Trypsin Komplex ist temporär, da Trypsin selbst mittels Degradation des Inhibitormoleküls die vorausgegangene Trypsinaktivität wiederherstellt (Laskowski *et al.*, 1953). Die häufigste *SPINK1*-Variante p.N34S findet sich vor allem bei Patienten mit ICP (15-40%) und alkoholischer (5,8%) CP (Witt *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000; Witt *et al.*, 2001). Die Mutation führt zu einem Asparagin zu Serin Austausch an Position 34 des Proteins.

Da rekombinant exprimiertes 34S-SPINK1 im Gegensatz zum Wildtyp keine verminderte Trypsininhibition zeigt (Kuwata *et al.*, 2002), ist der zur CP führende Pathomechanismus letztendlich noch unklar. Vermutlich führt erst die Kombination mit anderen genetischen Varianten und (oder) Umweltfaktoren zum Phänotyp der CP. Zahlreiche weitere seltene Varianten des *SPINK1* sind bekannt, deren Bedeutung bis auf wenige Ausnahmen (z.B. c.27delC, p.L14P und p.L14R) bislang nicht geklärt ist.

1.3.4 Chymotrypsin C (CTRC)

Chymotrypsin C ist ein Enzym, welches hochspezifisch humanes Trypsinogen, aber auch Trypsin degradiert (Szabo *et Sahin-Toth*, 2012) und identisch ist mit dem von Rinderknecht entdeckten Enzym Y (Szmola *et Sahin-Toth*, 2007). Hohe Kalzium-Konzentrationen schützen Trypsin vor einer Degradierung durch CTRC. Die *CTRC*-Varianten p.R254W und p.K247_R254del, welche „loss of function“-Varianten sind und mit einer verminderten Sekretion und/oder Aktivität des CTRC einhergehen, wurden sowohl bei Patienten mit ICP/HCP als auch bei Patienten mit ACP statistisch signifikant häufiger gefunden als bei gesunden Kontrollpersonen (Rosendahl *et al.*, 2008).

1.3.5 CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)

CFTR kodiert für einen cAMP-abhängigen Chlorid-Kanal und genetische Veränderungen des *CFTR* wurden im Jahr 1989 als Ursache der Zystischen Fibrose (CF) identifiziert (Riordan *et al.*, 1989). 1998 wurde erstmalig eine Assoziation von *CFTR*-Varianten zur CP von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen beschrieben (Sharer *et al.*, 1998; Cohn *et al.*, 1998). Die genetische Assoziation wurde in neueren Studien bestätigt, jedoch bleibt die Relevanz vieler *CFTR*-Varianten bei CP unklar ebenso wie der Einfluss von *CFTR*-Varianten auf die Pathogenese der CP wahrscheinlich geringer ist als bisher angenommen (Rosendahl *et al.*, 2012).

1.4 Hämoxxygenase-1

1.4.1 Physiologische Bedeutung der Hämoxxygenase-1 (HO-1)

Hämoxxygenasen (HO) sind die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme des Häm-Abbaus. Sie katalysieren die Reaktion von Häm zu Eisen, Biliverdin und Kohlenmonoxid (CO) (Pae *et al.*, 2004). Das entstehende Biliverdin wird durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin umgewandelt (siehe Abbildung 1). Beim Menschen wurden bislang die Isoformen HO-1 und HO-2 identifiziert (Trakshel *et al.*, 1986). Im Gegensatz zur konstitutiv exprimierten HO-2, ist die HO-1 ein durch variable Stimuli (beispielsweise Lipopolysaccharid, IL-10, Häm, Hypoxie etc.) induzierbares Stressprotein (Heat Shock Protein 32, HSP32). In mehreren Studien wurden antiinflammatorische und antioxidative Eigenschaften der HO-1 beschrieben (Lee *et al.*, 2002; Pae *et al.*, 2004). Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass die HO-1 intrazellulärer Mediator des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 ist. Dieses bewirkt eine verminderte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 oder TNF α und mildert so den Verlauf einer Entzündungsreaktion. Pae *et al.* postulierten einen inhibitorischen Effekt der HO-1 auf die Proliferation von CD-4⁺ T-Zellen. Laut ihren Untersuchungen supprimiert das von der HO-1 gebildete CO die Produktion von Interleukin-2 (IL-2) in T-Zellen und wirkt so hemmend auf deren Proliferation (Pae *et al.*, 2004). Im Mausmodell entwickelten HO-1 defiziente Tiere gehäuft chronische Entzündungen und waren anfälliger für die Entwicklung einer experimentellen Sepsis (Poss *et al.*, 1997). Ein in einer Kasuistik beschriebener Patient mit einer angeborenen HO-1-Defizienz verstarb im Alter von 6 Jahren an den Folgen chronischer Entzündungsprozesse (Kawashima *et al.*, 2002).

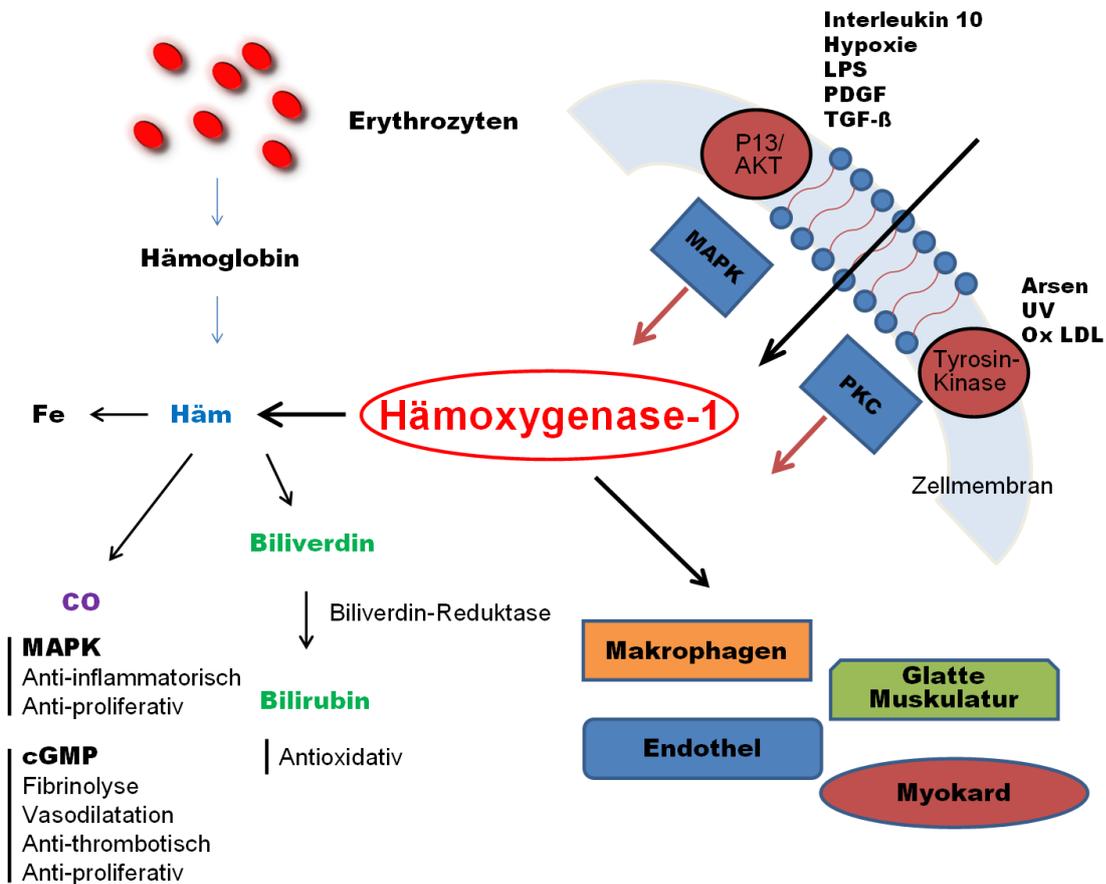


Abbildung 1: Die Abbildung beschreibt den HO-1 Signalweg und seine verschiedenen Effekte. HO-1 ist durch eine Vielzahl von Stimuli wie z.B. Zytokine, oxidativen Stress, Endotoxin, Häm in oder über verschiedene Signalkaskaden aktivierbar. HO-1 katalysiert die Reaktion von Häm zu Eisen, Kohlenstoffmonoxid (CO) und Biliverdin. Biliverdin wird dann durch Reduktion zu Bilirubin umgesetzt. Die entstehenden Metaboliten der HO-1 Reaktion sind für die antiinflammatorischen und antiproliferativen Effekte verantwortlich. P13/AKT= Proteinkinase B; PKC= Proteinkinase C; LPS= Lipopolysaccharid; PDGF= Platelet Derived Growth Factor; TGF-β= Transforming Growth Factor beta; MAPK= mitogen aktivierte Proteinkinase; UV= Ultraviolettstrahlung; oxLDL= oxidierte Low Density Lipoprotein; CO= Kohlenstoffmonoxid; cGMP= Cyclisches Guanosin Monophosphat (modifiziert nach Wang *et* Chau 2002)

1.4.2 Genetische Varianten der Hämoxygenase-1

Beim Menschen ist das Ausmaß der auf einen Stimulus folgenden HO-1 Expression individuell unterschiedlich und wird durch genetische Faktoren beeinflusst (Exner *et al.*, 2004). Bis dato sind zwei funktionell wichtige Polymorphismen, welche im Promoter und in der 5'-UTR (untranslated) Region des *HO-1* auf Chromosom 22 liegen, beschrieben.

Die Lokalisation des GT-Repeat und die genomische Struktur des *HO-1* Gen sowie die Lokalisation bestimmter Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren ist in der Abbildung 2 zu erkennen.

Bei einem *GT*-Längenpolymorphismus zeigten Individuen mit einer Repeatlänge <25 (S-Allel) auf diverse Stimuli eine höhere HO-1 Antwort als Individuen mit ≥ 25 Repeats (L-Allel) (Yamada *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002).

Bei S-Allel Trägern war bei experimentellen *in-vitro* Studien in Lymphoblasten Zelllinien die *HO-1* mRNA-Konzentration und die durch oxidativen Stress ausgelöste enzymatische Aktivität signifikant höher als bei L-Allel Trägern (Hirai *et al.*, 2003). Längenunterschiede des *GT*-Repeats scheinen bei verschiedenen Erkrankungen (Koronare Herzkrankheit, Restenose nach Ballonangioplastie; Lungenemphysem) den Verlauf zu beeinflussen, wobei teilweise inkongruente Daten vorliegen (Exner *et al.*, 2004). Neben dem *GT*-Repeat beeinflusst ein „single nucleotide polymorphism“ (SNP) (g.4613A>T, rs2071746) die Expression der HO-1. Inwieweit diese Variante die Krankheitsentstehung bei arterieller Hypertonie und bei koronarer Herzkrankheit verändert, ist aber bisher nicht eindeutig geklärt (Ono *et al.*, 2003, 2004).

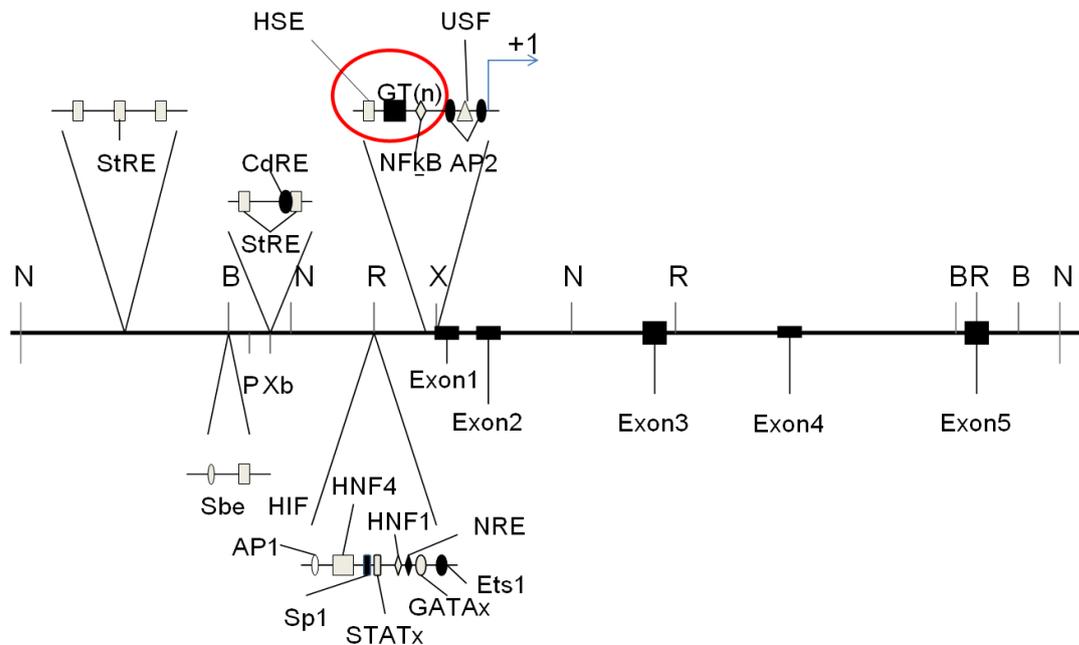


Abbildung 2: Darstellung der genomischen Struktur des *HO-1* Gens. Der *GT*-Repeat des *HO-1* (roter Kreis) befindet sich im Promoterbereich. Im Bereich des Repeats sind Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren (z.B. HIF etc.) lokalisiert. Weiterhin sind wichtige Angriffspunkte von Restriktionsenzymen aufgeführt (siehe Abkürzungen). Abkürzungen: StRE= stress-responsive element; CdRE= cadmium-responze element; HSE= heat shock element; (GT)*n*= *GT*-Repeat; AP-1 und 2= activator protein 1 und 2; USF= upstream stimulatory factor; HIF= hypoxia-inducible factor; SBE= smad-binding element; HNF-1 und -4= hepatocyte nuclear factor-1 und -4; Sp1= specificity protein 1; STATx= signal transducer and activator of transcription; GATAx= GATA binding proteins; NRE= negative regulatory element. Abkürzungen der Restriktionsenzyme: N (NheI), R (EcoRI), X (XhoI), Xb (XbaI), P (PstI), B (BamHI) (modifiziert nach Sikorski *et al.*, 2004).

1.4.3 Hämoxxygenase-1 und Pankreatitis

Im Jahr 1997 konnten Sato *et al.* im Tiermodell während einer experimentellen AP in Insel-, als auch in Azinuszellen des Pankreas eine erhöhte HO-1 Expression nachweisen (Sato *et al.*, 1997). Sie mutmaßten, dass der erhöhte HO-1-Spiegel einen zellulären Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress während einer AP darstellt. Weiterhin können Hämin-aktivierte Makrophagen durch nachfolgende HO-1 Expression den Verlauf einer experimentellen AP positiv beeinflussen (Nakamichi *et al.*, 2005).

Bei Patienten mit einer AP wird die Expression von HO-1 induziert und diese Induktion scheint den Verlauf der Erkrankung zu begünstigen. Interessanterweise, kann Panhämatin HO-1 *in-vitro* induzieren und stellt somit möglicherweise eine Therapieoption dar (Habtezion *et al.*, 2010). Eine aktuelle Untersuchung zeigte, dass eine HO-1 Aktivierung durch intravenös appliziertes Panhämatin bei tierexperimenteller AP die Letalität signifikant reduziert. Durch die Applikation konnte zudem eine Verbesserung des Verlaufes der Erkrankung auch bei Gabe nach Beginn der AP erreicht werden. Zusätzlich ließ sich eine Reduktion des leukozytären Entzündungszellinfiltrates sowie der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine nachweisen (Habtezion *et al.*, 2011). Weiterhin konnte im Tiermodell bei Ratten die Induktion der HO-1 das Transplantatüberleben bei experimenteller Pankreastransplantation durch Verhinderung einer Transplantatpankreatitis verbessern (Becker *et al.*, 2007).

Die Aktivierung und Proliferation Pankreatischer Sternzellen (PSC) ist ein zentraler Prozess bei der Fibrosierung des Pankreas, der häufig bei CP beobachtet werden kann. Eine Aktivierung des HO-1-Systems *in-vitro* inhibiert die Proliferation der PSC durch Hemmung des sogenannten „Extracellular Signal Regulated Kinase Pathway 1/2“ (Schwer *et al.*, 2008). Somit könnte die HO-1 Aktivierung auch die Fibrosierung bei CP verhindern.

1.5 Hypothese/Fragestellung

Das Protein Hämoxxygenase-1 spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation von Entzündungsvorgängen. Die Expression der HO-1 führt zu einer verminderten Expression oder Wirkung pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-2, IL-6 und TNF α) und dient als intrazellulärer Mediator für anti-inflammatorische Botenstoffe (IL-10).

Bei der AP konnten mehrere unabhängige Arbeitsgruppen einen positiven Einfluss auf die Ausprägung der Entzündungsreaktion oder den Verlauf der Erkrankung durch die Aktivierung des HO-1 Systems nachweisen. Möglicherweise wird auch die Entzündungsreaktion eines akuten Schubes der CP durch eine Aktivierung des HO-1 Systems günstig beeinflusst. Die HO-1 vermittelte Suppression von PSC kann weiterhin zu einer Verminderung der Fibrose bei CP beitragen und somit auch den Verlauf der CP verbessern.

Das Ziel unserer Untersuchungen war es herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Formen der Pankreatitis und genetischen Varianten der *HO-1* gibt. Diese genetischen Varianten könnten über eine unterschiedliche Aktivierung (vermehrt oder vermindert) des HO-1 Systems verschieden Pankreatitis-Formen in ihrer Entstehung beeinflussen. Hierbei wurden in einem ersten Schritt Längenvarianten des *GT*-Repeats im Promoter, die die Expression der HO-1 regulieren und mit verschiedenen Krankheitsentitäten assoziiert sind, umfangreich untersucht. Zusätzlich wurde die in der 5'-UTR gelegene Variante rs2071746 analysiert, da diese Variante möglicherweise ebenfalls die HO-1 Expression beeinflusst. Als weiterer Schritt wurde in den verschiedenen Patientengruppen eine vollständige DNA Sequenzierung der kodierenden Abschnitte und der Intron/Exon-Übergänge durchgeführt, um mögliche assoziierte seltene Varianten als auch mögliche assoziierte SNPs der *HO-1* zu identifizieren.

Mit dem gewählten Ansatz kann eine umfassende genetische Analyse der *HO-1* ermöglicht werden, die mögliche Assoziationen zu verschiedenen Pankreatitis-Formen aufdeckt. Im Falle einer nachgewiesenen Assoziation in unserem Kollektiv, wird eine Replikation in einer zweiten, unabhängigen Kohorte durchgeführt. Bei grenzwertigen Befunden (*p*-Werten) wird die untersuchte Patientenzahl erhöht.

2. Publikation

Titel: Genetic analyses of heme oxygenase 1 (HMOX1) in different forms of pancreatitis

Autoren: Sebastian Weis¹, **Moritz Jesinghaus¹**, Peter Kovacs, Dorit Schleinitz, Robert Schober, Claudia Ruffert, Max Herms, Henning Wittenburg, Michael Stumvoll, Matthias Blüher, Robert Grützmann, Hans-Ulrich Schulz, Volker Keim, Joachim Mössner, Peter Bugert, Heiko Witt, Joost PH Drenth, Knut Krohn, Jonas Rosendahl

Zeitschrift: PLoS One

Publikationsdatum: 30. Mai. 2012 (Epub)

ISSN: 1932-6203

DOI: 10.1371/journal.pone.0037981

Pubmed-ID: 20948383

Literaturangaben: 25

Sprache: Englisch

Impact Factor: 4,092

Erscheinungsweise: open-access online Publikation

Begutachtung: peer-reviewed

3. Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Genetische Analyse der Hämoxygenase-1 bei verschiedenen Formen der Pankreatitis

eingereicht von:

Moritz Jesinghaus

angefertigt am:

Department für Innere Medizin, Neurologie und Dermatologie,

Klinik und Poliklinik für Gastroenterologie und Rheumatologie, Universitätsklinikum
Leipzig, AöR

betreut von:

PD Dr. med. Jonas Rosendahl

Monat und Jahr

Juli 2012

Die AP ist eine entzündliche Erkrankung der Bauchspeicheldrüse. Diese kann als milde, meist selbstlimitierende oder als schwere, potentiell lebensgefährliche Verlaufsform auftreten (Chen *et al.*, 2007). In den westlichen Industrienationen sind Gallensteine und Alkoholmissbrauch die häufigsten Ursachen einer AP. Die CP ist eine rezidivierende Entzündung der Bauchspeicheldrüse die in vielen Fällen zu irreversibler Schädigung sowohl des exokrinen als auch des endokrinen Pankreas führt. In den Industrienationen ist der chronische Alkoholabusus die häufigste Ursache einer CP (Teich *et Keim*, 2001). Genetische Assoziationen wurden für die ICP und HCP beschrieben (Chen *et Férec C*, 2009), wohingegen bei akuter- und alkoholischer chronischer Pankreatitis wenig über die genetischen Hintergründe bekannt ist.

Zwei Isoformen der Hämoxxygenase (HO), die HO-1 und die HO-2, sind beim Menschen bekannt (Trakshel *et al.*, 1986). Im Gegensatz zur konstitutiv exprimierten HO-2, ist die HO-1 ein durch variable Stimuli (beispielsweise LPS, IL-10, Hämin oder Hypoxie) induzierbares Stressprotein (Heat Shock Protein 32, HSP32). Die HO-1 nimmt eine Schlüsselrolle bei der Regulation entzündlicher Prozesse ein. In mehreren Studien wurden antiinflammatorische und antioxidative Eigenschaften der HO-1 beschrieben (Lee *et al.*, 2004). Der zelluläre HO-1 Gehalt wird von der transkriptionellen Aktivität der Zellen bestimmt und ist von einem *GT*-Repeat im Promoter reguliert. Dieser Repeat wird, je nach Länge, in ein kurzes ($S < 25$) und ein langes ($L \geq 25$) Allel eingeteilt. Einem kurzem *GT*-Repeat wird eine höhere HO-1 Aktivität zugeschrieben (Kimpara *et al.*, 1997).

Unsere Studie untersuchte ob ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Formen der Pankreatitis und genetischen Varianten der *HO-1* vorliegt. In den letzten Jahren zeigten verschiedene Untersuchungen, dass die HO-1-Induktion sowohl die Entstehung, als auch den Schweregrad einer AP beeinflussen kann (Habtezion *et al.*, 2011). Durch Inhibition der PSCs kann eine HO-1 Induktion ebenfalls in die Pathogenese der CP eingreifen (Schwer *et al.*, 2008).

Eine Vorbehandlung mit Hämin, mit der darauffolgenden Einwanderung HO-1 exprimierender Makrophagen, erwies sich als protektiv in Bezug auf die Entwicklung einer experimentellen AP (Habtezion *et al.*, 2011). Durch Induktion der HO-1 konnte sowohl eine Senkung der proinflammatorischen Zytokine, als auch eine Verminderung der Neutrophilenmigration in das Pankreas erreicht werden. Somit können zwei wichtige Faktoren der Pathogenese durch eine gesteigerte HO-1 Aktivität begrenzt werden.

Ein kurzer *GT*-Repeat (S-Allel) im HO-1 Promoter ist mit erhöhter HO-1 Aktivität, ein langer (L-Allel) mit verminderter HO-1 Aktivität verbunden (Chen *et al.*, 2002). Somit wäre das Vorhandensein von S-Allelen ein möglicherweise protektiver Effekt. Dementsprechend müsste das L-Allel bei den untersuchten Patienten häufiger als bei Kontrollen vorliegen. Die Verteilung von S/L Allelen bei AP/CP Patienten, sowie bei Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose (ALZ; im Manuskript ALC) zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied verglichen mit gesunden Kontrollen.

Somit scheinen Varianten des *GT*-Repeats für die Pathogenese der verschiedenen Pankreatitisformen sowie der ALZ keine Rolle zu spielen. Interessanterweise zeigte unsere Analyse eine geringe Anreicherung von S-Allelen bei den AP-Patienten verglichen mit den Kontrollen. Dies ist insofern überraschend, da das S-Allel für erhöhte HO-1 Aktivität steht und in präklinischen Studien erhöhte HO-1 Spiegel protektiv bei experimenteller AP waren. Bei ACP-Patienten zeigte sich bei unserer ersten Untersuchungsreihe von 208 Patienten das S-Allel häufiger als bei Kontrollen (34,9% bei ACP, 29,9% bei Kontrollen; p-Wert 0,1). Daher weiteten wir unsere Untersuchung des *GT*-Repeats auf 238 weitere ACP-Patienten aus und konnten so eine Assoziation sicher ausschließen (p-Wert 0,4).

Um ein weiteres Kollektiv von Patienten mit Alkoholmissbrauch zu untersuchen, wählten wir Patienten mit einer ALZ ohne nachgewiesene AP oder CP aus. Dies diente hauptsächlich dazu eine mögliche Assoziation in der AP und der ACP Gruppe im Vergleich zu gesunden Kontrolle in einem zweiten Kontrollkollektiv zu bestätigen oder auszuräumen. Weiterhin liegt bei der ALZ ebenso wie bei der CP, eine starke Aktivierung von ortständigen Bindegewebszellen (Hepatische Stellatum Zellen, HSC) vor (Woo *et al.*, 2008; Sanchez-Valle *et al.*, 2012).

Eine HO-1 Induktion im Mausmodell durch CoPPIX-Gabe (Koproporphyrin 9) führte zu einer verminderten Aktivierung der HSC's und zur Rückbildung einer bereits bestehenden hepatischen Fibrosierung (Barikbin *et al.*, 2012). Die antifibrotischen Eigenschaften der HO-1 in beiden Organen scheinen jedoch bei beiden untersuchten Krankheitsformen nicht durch Längenvarianten des *GT*-Repeats beeinflusst zu werden. Da auch für die ALZ-Patienten keine unterschiedliche Verteilung der S- und L-Allele vorlag, scheint auch hier der *GT*-Repeat für die Krankheitsentstehung nicht von Bedeutung zu sein.

Frühere Studien zeigten bei diversen anderen Krankheitsbildern eine Assoziation zu Längenvarianten des *GT*-Repeat. Kenada *et al.* beschrieben ein geringeres Risiko für die Entwicklung einer KHK bei Patienten mit kurzem *GT*-Repeat bei der Untersuchung von asiatischen Hochrisikogruppen wie Diabetikern oder Rauchern (Kenada *et al.*, 2002). Bei der Untersuchung einer kaukasischen KHK-Hochrisikogruppe sowie kaukasischen Kontrollen konnte dieses Ergebnis nicht reproduziert werden.

Bei den Trägern des S-Allels der kaukasischen Gruppe ließen sich lediglich erhöhte Bilirubin- und HDL-Werte nachweisen (Endler *et al.*, 2004). Auch eine Assoziation mit der COPD ist für den *GT*-Repeat beschrieben. Ein L-Allel des Repeats fand sich in dieser Studie gehäuft bei Rauchern, die eine COPD entwickelt haben, während das S-Allel sich häufiger bei den nicht erkrankten Rauchern fand (Yamada *et al.*, 2000).

Bei der Untersuchung des *GT*-Repeats bei pädiatrischen Malariapatienten aus Gambia, wurde dem S-Allel eine Assoziation mit einem schweren Verlauf der Malaria zugeschrieben (Walther *et al.*, 2012). Dies steht im Gegensatz zu den protektiven Eigenschaften bei anderen Krankheitsbildern und ist möglicherweise durch die Herkunft und Umweltfaktoren beeinflusst. Diese Arbeit lässt eventuell die Vermutung zu, dass der *GT*-Repeat in bestimmten Populationen vor Infektionen schützen bzw. diese positiv beeinflussen kann und in unseren Regionen von geringer Bedeutung ist. Auch die inkongruenten Daten der Assoziationen des *GT*-Repeats bei anderen Erkrankungen zeigen, dass in manchen Fällen die beschriebenen Assoziationen wahrscheinlich nur einen untergeordneten Wert in der Entstehung der „assozierten“ Erkrankungen haben. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass eine pathogenetische Bedeutung des *GT*-Polymorphismus bei europäischen Patienten mit verschiedenen Pankreatitisformen sowie mit der ALZ nicht vorliegt. Ob der *GT*-Repeat möglicherweise in anderen Populationen von Patienten mit verschiedenen Formen einer Pankreatitis eine Rolle spielt, ist spekulativ.

Bei der Analyse des SNP2071746 ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten mit AP/CP/ALZ. Dieser SNP scheint mit erhöhter HO-1 Expression einherzugehen. Für Träger dieser Variante wurde eine geringere Inzidenz der KHK beschrieben (Ono *et al.*, 2004), wie eine höhere Inzidenz für Hypertonie bei Frauen in einer japanischen Patientengruppe (Ono *et al.*, 2003). Es muss angemerkt werden, dass die Daten dieses SNP widersprüchlich und nicht eindeutig interpretierbar sind. Unsere Untersuchungen zeigen jedoch keine Assoziation dieser Variante bei verschiedenen Formen der Pankreatitis und der ALZ.

In den vergangenen Jahren wurden bei Patienten mit ICP/HCP immer wieder seltene genetische Varianten in verschiedenen Genen beschrieben (*PRSSI*, *SPINK1*, *CFTR*, etc.). Um herauszufinden bzw. auszuschließen das seltene *HO-1*-Varianten eine pathogenetische Rolle bei verschiedenen Formen der Pankreatitis haben, untersuchten wir bei verschiedenen Pankreatitis-Gruppen, den ALZ Patienten sowie bei gesunden Kontrollen die kodierenden Abschnitte der *HO-1*. Dabei wiesen wir sowohl synonyme (kein Aminosäureaustausch), als auch nicht synonyme (Aminosäureaustausch) *HO-1*-Varianten nach. Allerdings zeigte keine der entdeckten Varianten, weder die synonymen als auch die nicht-synonymen, eine Assoziation mit den verschiedenen Formen der Pankreatitis (ICP/HCP, ACP). Dieser Sachverhalt bestätigte sich selbst nach Erhöhung der Probenanzahl für einzelne Varianten, die in den ersten Untersuchungen grenzwertige p-Werte aufwiesen. Dies war der Fall bei der Untersuchung mehrerer Varianten im Exon 3 (c.379G>T, c.407G>A, c.577C>T), bei denen wir unsere Analyse von 145 auf 466 ACP-Patienten und von 138 auf 238 ICP/HCP Patienten ausdehnten. Die erweiterte Untersuchung des Exon 3 zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Patientengruppen und gesunden Kontrollen.

Unsere Ergebnisse machen es sehr unwahrscheinlich das seltene genetische Varianten der *HO-1* für die Entwicklung einer ICP/HCP oder ACP bedeutsam sind. Gleiches gilt für die untersuchten Patienten mit ALZ.

Als Schlussfolgerung bleibt, dass *HO-1* Varianten bei AP/CP und ALZ in unserem untersuchten Kollektiv keine Relevanz für die Krankheitsentstehung haben. Nichtsdestotrotz kann eine pharmakologische Induktion der HO-1 einen therapeutischen Effekt bei AP/CP haben. Aufgrund der präklinischen Studien, welche einer exogenen HO-1 Induktion einen protektiven Effekt bei AP zuschreiben, werden hier sicherlich weitere Forschungsarbeiten vorangetrieben.

4. Literaturverzeichnis

AWMF Leitlinie, Diagnostik und Therapie von Gallensteinen, 2007

Banks PA; Acute pancreatitis: medical and surgical management. *Am J Gastroenterol* 1994 Aug; 89(8 Suppl): 78-85.

Barikbin R, Neureiter D, Wirth J, et al. Induction of heme oxygenase 1 prevents progression of liver fibrosis in Mdr2 knockout mice. *Hepatology* 2012; 55(2):553-62

Becker T, Zu Vilsendorf AM, Terbish T, et al. Induction of heme oxygenase-1 improves the survival of pancreas grafts by prevention of pancreatitis after transplantation. *Transplantation* 2007; 84(12):1644-55.

Carroll JK, Herrick B, Gipson T, et al. Acute pancreatitis: Diagnosis, Prognosis and Treatment. *Fam Am Physician* 2007; 75(10):1513-20.

Chen CC, Wang SS, Lee FY. Action of Antiproteases on the Inflammatory Response in Acute Pancreatitis. *Journal of the Pancreas* 2007; 8(4 Suppl):488-94.

Chen JM, Audrezet MP, Mercier B, et al. Exclusion of anionic trypsinogen and mesotrypsinogen involvement in hereditary pancreatitis without cationic trypsinogen gene mutations. *Scand J Gastroenterol.* 1999; 34(8):831-2.

Chen JM, Férec C. Chronic pancreatitis: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009; 10:63-87.

Chen YH, Lin SJ, Lin MW, et al. Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Hum Genet.* 2002; 111(1):1-8

Chiari H. Über Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Zeitschrift für Heilkunde* 1896; 17:69-96.

Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, et al. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *New Engl J Med* 1998; 339:653-658.

Colomb E, Guy O, Deprez P, et al. The two human trypsinogens: Catalytic properties of the corresponding trypsins. *Biochem Biophys Acta* 1978; 525:186-193.

Colomb E, Figarella C. Comparative studies on the mechanism of activation of the two human trypsinogens. *Biochem Biophys Acta* 1979; 571: 343-351.

Comfort MW, Steinberg AG. Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology* 1952; 21:54-63.

DiMagno EP. A short, eclectic history of exocrine pancreatic insufficiency and chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 1993; 104(5):1255-62.

Endler G, Exner M, Schillinger M, et al. A microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with increased bilirubin and HDL levels but not with coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 2004; 91(1): 155-61.

Exner M, Minar E, Wagner O, et al. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37(8) :1097-104.

Gorry MC, Ghabbaizedeh D, Furey W, et al. Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 1997;113(4): 1063-8.

Granger J., Remick D. Acute pancreatitis: models, markers and mediators. *Shock* 2005 Dec; 24 Suppl 1:45-51.

Habtezion A, Kwan R, Akhtar E, et al. Panhematin provides a therapeutic benefit in experimental pancreatitis. *GUT* 2011; 60(5):671-9.

Habtezion A, Kwan R, Yang AL, et al. Heme oxygenase-1 is induced in peripheral blood mononuclear cells of patients with acute pancreatitis: a potential therapeutic target. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011; 300(1):G12-20

Hirai H, Kubo H, Yamaya M, et al. Microsatellite polymorphism in heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to oxidant-induced apoptosis in lymphoblastoid cell lines. *Blood* 2003; 102(5):1619-21

Kaneda H, Ohno M, Taguchi J, et al. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with coronary artery disease in Japanese patients with coronary risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22(10):1680-5.

Kawashima A, Oda Y, Yachie A, et al. Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Hum Pathol.* 2002; 33(1):125-30.

Kazal LA , Spicer DS, Brahinsky RA. Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from the pancreas. *J Am Chem Soc* 1948; 70:304-340.

Kimpara T, Takeda A, Watanabe K, et al. Microsatellite polymorphism in the human heme oxygenase-1 gene promoter and its application in association studies with Alzheimer and Parkinson disease. *Hum Genet* 1997: 145-147.

Klöppel G. Chronic pancreatitis, pseudotumors and other tumor-like lesions. *Modern Pathology* 2007; 20 Suppl 1: S113-31.

Kuwata K, Hirota M, Shimizu H, et al. Functional analysis of recombinant pancreatic secretory trypsin inhibitor protein with amino-acid substitution. *J Gastroenterol.* 2002; 37(11): 928-34.

Laskowski M, Wu FC. Temporary inhibition of trypsin. *J Biol Chem* 1953; 204: 797-805.

Le Bodic L, Bignon JD, Raguénès O, et al. The hereditary pancreatitis gene maps to long arm of chromosome 7. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 549-554.

Le Maréchal C, Masson E, Chen JM, et al. Hereditary pancreatitis caused by triplication of the trypsinogen locus. *Nat Genet.* 2006; 38(12):1372-4.

Lee TS, Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med.* 2002; 8(3):240-6.

Masson E, Le Maréchal C, Delcenserie R, et al. Hereditary pancreatitis caused by a double gain-of-function trypsinogen mutation. *Hum Genet* 2008; 123:521–529

Mitchell RM, Byrne MF, Baillie J. Pancreatitis. *Lancet* 2003; 361(9367):1447-55. Review.

Nakamichi I, Habtezion A, Zhong B, et al. Hemin-activated macrophages home to the pancreas and protect from acute pancreatitis via heme oxygenase-1 induction. *J Clin Invest.* 2005; 115(11):3007-14.

Nemoda Z, Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C (caldecrin) stimulates autoactivation of human cationic trypsinogen. *J Biol Chem* 2006; 281:11879-11886.

O'Reilly DA, Witt H, Rahman SH, et al. The SPINK1 N34S variant is associated with acute pancreatitis. *Eur J of Gastroenterol Hepatol* 2008; 726-731

Omary MB, Lugea A, Lowe AW, et al. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *The Journal of Clinical Investigation* 2007;117(1): 50-9.

Ono K, Goto Y, Takagi S, et al. A promoter variant of the heme oxygenase-1 gene may reduce the incidence of ischemic heart disease in Japanese. *Atherosclerosis.* 2004; 173(2): 315-319

Ono K, Mannami T, Iwai N. Association of a promoter variant of the haeme oxygenase-1 gene with hypertension in women. *J Hypertens.* 2003; 21(8): 1497-503.

Pae HO, Oh GS, Choi BM, et al. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J Immunol.* 2004; 172(8):4744-51.

Pandol SJ, Raraty M. Pathobiology of alcoholic pancreatitis. *Pancreatology* 2007 2007; 7(2-3):105-14.

Pandya A, Blanton SH, Landa B, et al. Linkage studies in a large kindred with hereditary pancreatitis confirms mapping of the gene to a 16-cM region on 7q. *Genomics* 1996; 38: 227-230..

Perrault J. Hereditary pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am* 1994; 23:743–752.

Phat VN, Guerrieri MT, Alexandre JH, et al. Early histological changes in acute necrotizing hemorrhagic pancreatitis. A retrospective pathological study of 20 total pancreatectomy specimens. *Pathol Res Pract* 1984; 178(3):273-9

- Poss KD, Tonegawa S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(20):10925-30
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245:1066-1073
- Rosendahl J, Witt H, Szmola R, et al. Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet*. 2008; 40(1):78-82
- Rosendahl J, Landt O, Bernadova J, et al. CFTR, SPINK1, CTRC and PRSS1 variants in chronic pancreatitis: is the role of mutated CFTR overestimated? *GUT*. 2012
- Sadr-Azodi O, Andrén-Sandberg Å, Orsini N, et al. Cigarette smoking, smoking cessation and acute pancreatitis: a prospective population-based study. *Gut*. 2012; 61(2):262-7.
- Sahin-Tóth M, Tóth M. Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278:286-289.
- Sánchez-Valle V, Chávez-Tapia NC, Uribe M, et al. Role of Oxidative Stress and Molecular Changes in Liver Fibrosis: A Review. *Curr Med Chem*. 2012
- Sato H, Siow RC, Bartlett S, et al. Expression of stress proteins heme oxygenase-1 and -2 in acute pancreatitis and pancreatic islet betaTC3 and acinar AR42J cells. *FEBS Lett*. 1997; 405(2):219-23.
- Scheele GA, Bartelt D, Bieger W. Characterization of human exocrine pancreatic proteins by two-dimensional isoelectric focusing/SDS gel electrophoresis. *Gastroenterology* 1981; 80: 461-473.
- Schwer CI, Guerrero AM, Humar M, et al. Heme oxygenase-1 inhibits the proliferation of pancreatic stellate cells by repression of the extracellular signal-regulated kinase1/2 pathway. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 327(3):863-71
- Secknus R, Mössner J. Changes in incidence and prevalence of acute and chronic pancreatitis in Germany. *Chirurg*. 2000 ; 71(3):249-52

Sharer N, Schwartz M, Malone G, et al. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *New Engl J Med* 1998; 339:645-652.

Shibata T, Ogawa M, Matsuda K, et al. Purification and characterisation of pancreatic secretory trypsin inhibitor in human gastric mucosa. *Clin Chim Acta* 1986; 159:27-36.

Sikorski EM, Hock T, Hill-Kapturczal N, et al. The story so far: molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F425–F441, 2004

Singer MV, Gyr K, Sarles H. Revised classification of pancreatitis. Report of the Second International Symposium on the Classification of Pancreatitis in Marseille, France, March 28-30, 1984. *Gastroenterology* 1985; 89(3):683-5.

Szabó A, Sahin-Tóth M. Increased Activation of Hereditary Pancreatitis-associated Human Cationic Trypsinogen Mutants in Presence of Chymotrypsin C. *J Biol Chem.* 2012; 287(24):20701-10.

Szmola R, Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C (caldecrin) promotes degradation of human cationic trypsin: identity with Rinderknecht's enzyme Y. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(27):11227-32..

Teich N, Keim V. Pathogenetic concepts of chronic pancreatitis. *Zentralbibliothek Chirurg* 2001 126: 884-888

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003 Jan;26 Suppl 1:S5-20.

Trakshel GM, Kutty RK, Maines MD. Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform. *J Biol Chem.* 1986; 261(24):11131-7.

Van Santvoort HC, Bakker OJ, Bollen TL, et al. A conservative and minimally invasive approach to necrotizing pancreatitis improves outcome; *Gastroenterology* 2011; 141(4):1254-63.

- Walther M, De Caul A, Aka P, et al. HMOX1 gene promoter alleles and high HO-1 levels are associated with severe malaria in Gambian children. *PLoS Pathog.* 2012; e1002579
- Wang CY, Chau LY. Heme Oxygenase-1 in Cardiovascular Diseases: Molecular Mechanisms and Clinical Perspectives. *Chang Gung Med J* 2010
- Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996; 14:141-145.
- Whitcomb DC, Preston RA, Aston CE, et al. A gene for hereditary pancreatitis maps to chromosome 7q35. *Gastroenterology* 1996; 110:1975-1980.
- Witt H, Luck W, Becker M. A signal peptide cleavage site mutation in the cationic trypsinogen gene is strongly associated with chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1999; 117:7-10.
- Witt H, Luck W, Becker M, Böhmig M, et al. Mutation in the SPINK1 trypsin inhibitor gene, alcohol use, and chronic pancreatitis. *JAMA.* 2001; 285(21):2716-7.
- Witt H, Sahin-Tóth M, Landt O, et al. A degradation-sensitive anionic trypsinogen (PRSS2) variant protects against chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2006; 38:668-673.44
- Witt H, Apte MV, Keim V, et al. Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology.* 2007; 132(4):1557-73.
- Woo SW, Lee SH, Ko G, et al. Isoliquiritigenin inhibits cell proliferation by a heme oxygenase-dependent pathway in rat hepatic stellate cells. *Planta Med;* 74(8):834-9.
- Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet;* 66(1):187-95.

5. Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Jonas Rosendahl, der mich mit seinem Fachwissen, seinem Scharfsinn und seiner Genauigkeit durch diese Promotion geführt hat. Im Laufe der Arbeit habe ich in ihm nicht nur ein medizinisches Vorbild, sondern vor allem einen freundschaftlichen Wegbegleiter hinzugewonnen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Claudia Ruffert, die mich im Laufe der Promotion unglaublich unterstützt hat und mir stets eine große Hilfe war.

Des Weiteren auch ein herzlicher Dank an Herrn Dr. med. Sebastian Weis für die Unterstützung und wichtige Literaturhinweise.

Herrn Prof. Dr. med. Joachim Mössner, in dessen Klinik ich diese Promotion durchführen durfte, danke ich für die freundliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Alexander Weissgerber, der sich in einer für mich schweren Zeit als wahrer Freund erwiesen hat.

Abschliessend bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, Dres. med. Dirk und Cornelia Jesinghaus, denen ich diese Arbeit widme. Ihre Unterstützung, ihr Rat und ihr Verständnis waren für mich Zeit meines Lebens von unschätzbarem Wert.

6. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Datum: Leipzig, den 15.07.2012

Moritz Jesinghaus

7. Lebenslauf

Persönliche Daten: Moritz Jesinghaus

Geboren am 23.07.1984 in Saarlouis

Ledig

Eltern: Dr. med. Dirk Jesinghaus

Dr. med. Cornelia Jesinghaus

Schulische Ausbildung

1990-1994: Grundschule Saarbrücken-Bübingen

1994-1995: Ludwigsgymnasium Saarbrücken

1995-2004: Gymnasium am Rotenbühl, Saarbrücken

Hochschulausbildung

2004-2006: Universität des Saarlandes, Studium der Betriebswirtschaftslehre

2006-2006: Universität Regensburg, Beginn des Medizinstudiums

Seit 2006: Universität Leipzig

2008: Bestehen der ersten ärztlichen Prüfung mit der Note 2,0