

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene

Entwicklung und klinische Erprobung eines serologischen Tests für *Helicobacter pylori* auf Basis rekombinant hergestellter Antigene

Dirk Christoph Walter

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Gerhard
2. Univ.-Prof. Dr. D. Busch

Die Dissertation wurde am 19.09.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 10.04.2013 angenommen.

Inhalt

1	Zusammenfassung.....	5
1.1	Abstract.....	6
2	Verzeichnis der Abkürzungen.....	7
3	Einführung.....	10
3.1	<i>Helicobacter pylori</i> – Allgemein	10
3.1.1	<i>Helicobacter pylori</i> – Einführung.....	10
3.1.2	<i>Helicobacter pylori</i> – Pathogenese	12
3.1.3	<i>Helicobacter pylori</i> – induzierte Krankheiten.....	13
3.1.4	Die verschiedenen Virulenzfaktoren	14
3.1.5	Immunreaktionen bei <i>Helicobacter pylori</i> Infektion	19
3.2	<i>Helicobacter Pylori</i> - Diagnostik und Therapie	22
3.2.1	Nicht-invasive Methoden	22
3.2.2	Invasive Methoden	25
3.2.3	Derzeitige Therapie-Praxis	27
4	Material und Methoden.....	29
4.1	Material und Geräte.....	29
4.1.1	Plasmide	29
4.1.2	Bakterien.....	32
4.1.3	Antikörper.....	32
4.1.4	Häufig verwendete Puffer und Medien	33
4.1.5	Bakteriennährmedien	36

4.1.6	Chemikalien	36
4.1.7	Geräte	36
4.2	Methoden	39
4.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	39
4.2.2	Molekularbiologische Methoden	41
4.2.3	Analytische Methoden	44
4.2.4	Proteinchemische Methoden	48
4.2.5	Statistische Methoden	51
5	Ergebnisse	54
5.1	Klonierungs-Ergebnisse	54
5.1.1	Auswahl und Herkunft der Antigene	54
5.1.2	Klonieren der ausgewählten Gensequenzen	54
5.1.3	Expression der rekombinant hergestellten Konstrukte.....	56
5.1.4	Aufreinigung der Proteine.....	57
5.1.5	Test der aufgereinigten Proteine im Line Assay	59
5.2	Test des neu hergestellten Lineblots und Vergleich mit anderen diagnostischen Methoden.....	61
5.2.1	Verwendete Seren	61
5.2.2	Pre-Screening der Proben mittels ELISA.....	62
5.2.3	Ergebnisse der Magenbiopsien	65
5.2.4	Immuno-Line blot	67
5.2.5	Der neue Line blot im Vergleich mit dem Lysat blot.....	68
5.2.6	Statistische Werte der getesteten Proteine.....	73

5.2.7	Untersuchung der falsch positiven Seren im ELISA.....	76
6	Diskussion.....	78
6.1	Hintergrund	78
6.2	Technische Probleme und Einordnung der statistischen Ergebnisse.....	79
6.2.1	Technische Probleme.....	79
6.2.2	Mögliches Potenzial im Blotting-Prozess	80
6.2.3	Unklarer Goldstandard in der Literatur	80
6.2.4	Optimierungspotenzial des Testumfangs.....	81
6.3	Geringe Sensitivität des gGT-ELISA	82
6.4	Geringe Spezifität des Mikrogen ELISA.....	83
6.5	Ausblick.....	84
6.5.1	Breitere Anwendung von serologischen <i>H. pylori</i> -Tests.....	84
6.5.2	Einfachere Datengewinnung zur Charakterisierung von <i>H. pylori</i> -Stämmen....	84
6.5.3	Möglichkeit der Risikoprofilerstellung	85
6.5.4	Möglichkeit der Vakzinierung.....	86
6.5.5	Fazit	86
7	Literaturverzeichnis	87
8	Publikationen.....	97
9	Danksagung.....	98

1 Zusammenfassung

Einführung: *Helicobacter pylori* ist ein mikroaerophiles gramnegatives Bakterium, welches den Magen des menschlichen Körpers kolonisieren und ein Leben lang bestehen bleiben kann. Man geht davon aus, dass weltweit bis zu 50% der Menschheit von *H. pylori* betroffen sind. Die Infektion durch das Bakterium führt zu einem erhöhten Risiko für chronische atrophische Gastritis, dem distalen Magenkarzinom und dem MALT-Lymphom. Für einige dieser Erkrankungen konnte eine gehäufte Assoziationen mit bestimmten Antigenen von *H. pylori* nachgewiesen werden. Aktuell wird die Infektion vorwiegend durch Tests im Rahmen einer invasiven Gastroskopie oder einen Atemtest mittels C₁₃-Harnstoff nachgewiesen. Nicht-invasive serologische Nachweise sind ein *H. pylori*-ELISA sowie ein Teststreifen, auf den Bakterienlysat geblottet wurde.

Ziel der Arbeit: Im Rahmen dieser Arbeit sollten Antigene von *H. pylori* rekombinant hergestellt und auf ihre Antigenität überprüft werden. Anschließend sollten diese Proteine auf einen Teststreifen geblottet und der so erhaltene Test an einem Patientenkollektiv klinisch ausgetestet werden. Danach sollten die Ergebnisse des neuen Lineblot mit denen des bisherigen Systems, welches auf Bakterienlysat basiert, statistisch verglichen werden.

Methoden: Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurden mit molekularbiologischen und analytischen Methoden Expressionsvektoren hergestellt, welche DNA von *H. pylori*-Antigenen enthielten. Aus diesen wurden anschließend mittels proteinchemischer Methoden Proteine exprimiert, aufgereinigt und an Seren mit bekanntem *H. pylori*-Status auf ihre Antigenität getestet. Sechs Proteine, welche mit Seren von infizierten Patienten reagierten, wurden für die Herstellung von Lineblot-Prototypen verwendet. Die Herstellung geschah in Zusammenarbeit mit der Firma Mikrogen GmbH. Nach der Austestung an einem Patientenkollektiv wurden die Ergebnisse statistisch ausgewertet und mit etablierten serologischen Testsystemen verglichen.

Ergebnisse: Es konnte ein serologischer Test entwickelt werden, in dem die *H. pylori*-Proteine CagA, VacA, UreA, HcpC, gGT und GroEL auf einen Teststreifen aufgetragen wurden. Alle diese Antigene reagierten positiv mit Serum von infizierten Patienten. Es zeigte sich ein hoch spezifischer und sensitiver Test, durch den es möglich sein wird, vorliegende *H. pylori*-Antigene bei infizierten Patienten besser zu charakterisieren. Weiterhin wird der Test helfen können, bestimmte Antigen-assoziierte Erkrankungsrisiken besser abzuschätzen.

1.1 Abstract

Introduction: *Helicobacter pylori* is a microaerophil, gramnegative bacterium, which can colonize the human gut and persists lifelong. It is estimated that around fifty percent of the world population are hosts of *H. pylori*. The infection leads to an increased risk for chronic atrophic gastritis, distal gut cancer and MALT-lymphoma. Some of these diseases are correlated with certain antigens of *H. pylori*. Currently, the infection is mainly detected via an invasive gastroscopy or a C₁₃-urea breath test. Non-invasive serological tests are a *H. pylori*-ELISA and a test stripe with blotted lysate of *H. pylori*.

Aim: The goal of this dissertation was to produce antigens of *H. pylori* recombinantly and test these on their antigenicity. Afterwards these proteins were to be blotted on a solid phase and the new lineblot tested on a pool of patients. The results had to be compared statistically to the current system, the lysate-blot.

Methods: In the experimental part of this dissertation expression vectors with DNA of *H. pylori*-antigens were produced using biomolecular and analytic methods. Afterwards proteins were expressed and purified with methods of protein chemistry. These proteins were tested on their antigenicity on a pool of patient sera. Prototypes of the new lineblot were produced in collaboration with the company Mikrogen GmbH. The test results were evaluated and statistically compared to other serological test systems.

Results: A serological test was developed which contains the *H. pylori*-proteins CagA, VacA, UreA, HcpC, gGT und GroEL. All of these antigens reacted positive with sera of infected patients. The new lineblot is a highly specific and sensitive test which will help to characterize the antigen-profile of *H. pylori*-infected patients. With this information the test will help to estimate the risk of patients to develop certain antigen-related pathologies.

2 Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
BabA	Blood-group-antigen-binding adhesion
Bis	Bisacrylamid
bp	Base pairs (Basenpaare)
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
<i>cag</i>	Cytotoxin associated gene
CagA	Cytotoxin associated gene A protein
cagPAI	cag-Pathogenitätsinsel
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Erdbeschleunigung
gGT	γ -Glutamyl-Transpeptidase
h	Stunde(n)
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HapA	<i>Helicobacter pylori</i> adhesin A
HcpC	<i>Helicobacter</i> cystein-rich protein C
HRP	Horseradish Peroxidase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kbp	Kilobasenpaare

kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute(n)
MALT	Mucosa associated lymphatic tissue
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NapA	Neutrophil-activating protein
neg	Negativ
Ni-NTA	Nickel Nitroltriessigsäure
NO	Stickstoffmonoxid
NPV	negativer prädiktiver Wert (negative predictive value)
NTA	Nitroltriessigsäure
Omp	Outer membrane protein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potentia hydrogenii
pos	Positiv
PPI	Protonen-Pumpen-Inhibitoren
PPV	Positiver prädiktiver Wert (positive predictive value)
PRR	pattern recognition receptors
PVDF	Polyvinylidifluorid
rcf	relative centrifugal force
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
ROS	reactive oxygen species (reaktiver Sauerstoff)
RT	Raumtemperatur

s/sek	Sekunde(n)
SabA	Sialic acid-binding adhesin A
SDS	Sodium dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline mit Tween
TEMED	N, N, N', N' – Tetramethylethyldiamin
TLR	Toll-like receptor
TMB	Tetramethylbenzidin
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volume/Volume (Volumen/Volumen)
VacA	Vacuolating cytotoxin A
VF	Virulenzfaktoren
WB	Western Blot
w/v	Weight/Volume (Gewicht/Volumen)
w/w	Weight/Weight (Gewicht/Gewicht)

3 Einführung

3.1 *Helicobacter pylori* – Allgemein

3.1.1 *Helicobacter pylori* – Einführung

3.1.1.1 *Historisch*

Berichte über Magenbeschwerden in Folge einer bakteriellen Infektion gibt es bereits seit Ende des 19. Jahrhunderts (Bizzozero, 1893;Krienitz, 1906;Doenges, 1938;Freedburg, 1940); jedoch gelang es zu dieser Zeit nicht, das Bakterium zu isolieren und die Lehrmeinung, der Magen sei ein steriles Organ, blieb vorerst erhalten. Dies änderte sich 1983, als die Australier Warren und Marshall erstmals über gramnegative, stäbchenförmige Bakterien im Magen berichteten. Sie fanden diese Bakterien in einer Studie mit 100 Patienten zu einem hohen Prozentsatz bei den Krankheitsbildern aktiv-chronische Gastritis, Ulkus duodeni und Ulkus ventriculi (Warren and Marshall, 1983;Marshall and Warren, 1984). Auf diesen Erkenntnissen aufbauend wagte B. Marshall einen Selbstversuch, indem er Re-Isolate des beschriebenen Keims zu sich nahm. Kurz darauf entwickelte er eine massive Gastritis und erfüllte somit das dritte Koch'sche Postulat (Marshall et al., 1985). Auf Grund des gehäufteten Auftretens in der Nähe des Pylorus und der Spirillen-Form wurde das Bakterium zuerst der Gruppe der Campylobacter zugeordnet und erhielt den Namen *Campylobacter pyloridis* (Marshall and Warren, 1984). Einige Jahre später, nach ausführlicher biochemischer und molekularbiologischer Untersuchung, wurde das Bakterium in *Helicobacter pylori* umgetauft (Goodwin and Armstrong, 1989). Inzwischen umfasst diese Gattung mehr als 25 Spezies (Solnick and Schauer, 2001). Die besondere Bedeutung der wissenschaftlichen Leistung von Warren und Marshall wurde 2005 mit der Vergabe des Nobelpreises für Medizin und Physiologie an die beiden australischen Forscher unterstrichen.

3.1.1.2 *Morphologie*

Helicobacter pylori ist ein gram-negatives, mikroaerophiles, ein- bis dreifach spiralig gewundenes (helicos, griechisch: die Windung) Stäbchen-Bakterium, das den menschlichen Magen besiedeln kann. Es ist ca. 0,6 µm breit, 2,5 - 3 µm lang, zum Teil gekrümmt, beweglich, und unipolar polytrich mit 4 - 6 Geißeln besetzt. Zusätzlich ist es von einer Flagellenhülle ummantelt, die mit der Zellmembran verbunden ist. Die genaue Zusammensetzung dieser Hülle ist bislang nicht bekannt, jedoch lassen sich Ähnlichkeiten

zur äußeren Membran erkennen (Geis et al., 1993); das bislang einzige beschriebene Flagellenhüllen-spezifische Molekül ist das Lipoprotein HpaA (Jones et al., 1997). Auch die Funktion der Hülle ist noch nicht abschließend geklärt, diskutiert wird ein Schutz vor dem sauren Milieu des Magens (Geis et al., 1993). Die charakteristische Stäbchenform von *H. pylori* kann sich unter ungünstigen Bedingungen über Zwischenstadien in eine persistierende kokkoide Form umwandeln, wobei noch nicht klar ist, ob es sich hier um eine dauerhaft lebensfähige und infektiöse Form handelt (Chan et al., 1994). Seine äußere Zellwand ist von einer rund 40 nm dicken Glycocalix umgeben, die sich aus ringähnlichen Untereinheiten mit Durchmessern von 12 - 15 nm zusammensetzt (Goodwin and Worsley, 1993). Phylogenetisch lassen sich die Helicobacteraceae, zusammen mit den Campylobacteraceae den ϵ -Proteobakterien zuordnen (Goodwin and Armstrong, 1989). *H. pylori* ist unter mikroaeroben Bedingungen in reichhaltigen Medien innerhalb von 3 bis 5 Tagen kultivierbar. Die Anzucht erfolgt meist unter komplexen Bedingungen bei Zugabe von 5-10% Pferde- oder Schafsblut (Andersen and Wadstrom, 2001).

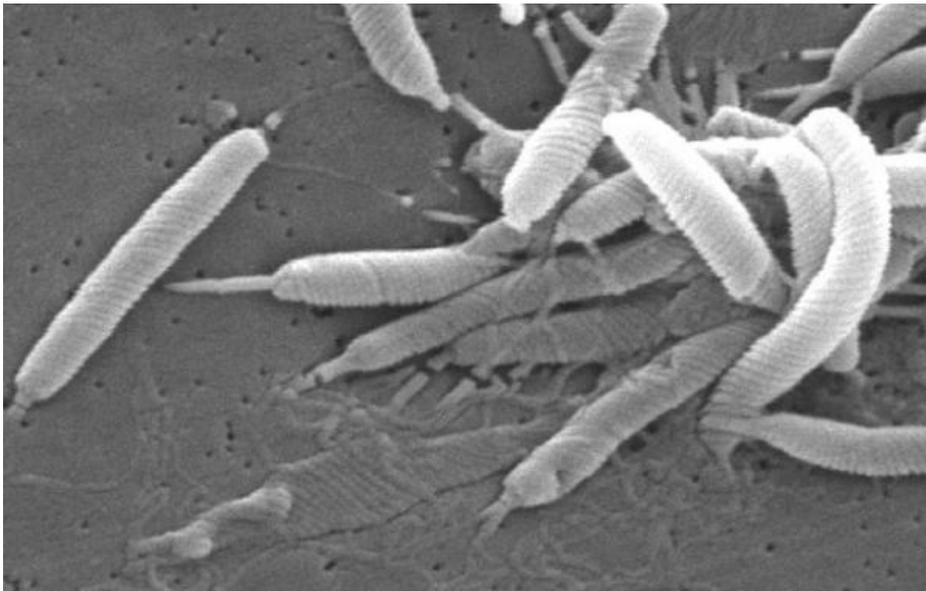


Abbildung 1: Elektronenmikroskopisches Bild von Helicobacter pylori; Quelle: <http://www.sciencedaily.com/releases/2007/07/070716191705.htm>

Was den Stoffwechsel betrifft, wird *H. pylori* den chemoorganischen Mikroorganismen zugeordnet; die wichtigste Energiequelle stellt Glucose dar, Mehrfachzucker können nicht transportiert werden (Mendz et al., 1993; Tomb et al., 1997).

3.1.1.3 Epidemiologie

Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass *H. pylori* den Menschen wahrscheinlich bereits seit der Entstehung der Spezies *Homo sapiens* begleitet hat (Falush

et al., 2003).

Die *H. pylori*-Infektion ist die häufigste chronisch bakterielle Infektion des Menschen (Cave et al., 1996). Sie tritt weltweit auf, jedoch besteht eine große Diskrepanz in der Prävalenz zwischen verschiedenen Ländern und unterschiedlichen Populationen innerhalb eines Landes.

Die Prävalenz variiert nach geographischer Region, Alter und sozioökonomischen Status (Malaty and Graham, 1994). Sie liegt bei ca. 20-30% in der westlichen Welt und bei ca. 80% in den Entwicklungsländern, was auf einen Zusammenhang der Infektionsrate mit den hygienischen Standards schließen lässt (Megraud et al., 1989;Graham et al., 1991;Malaty et al., 1992). Der hohe Durchseuchungsgrad erklärt die enorme volkswirtschaftliche Bedeutung der *H. pylori*-Infektion, die sozioökonomischen Folgekosten sind beträchtlich. So geht man allein in den USA von Ulkus assoziierten Kosten von mehr als 6 Mrd. US\$ aus (CDC: Economics of peptic ulcer disease and *H. pylori* infection).

Die Infektion kann während der Kindheit erworben werden und ein ganzes Wertsleben andauern. Innerhalb von Familien wurde eine erhöhte Infektionsrate (Cluster) beschrieben (Drumm et al., 1990;Malaty et al., 1992), wobei die Mutter meist die Hauptinfektionsquelle darstellt (Perez-Perez et al., 2004). Die Bakterien können sowohl von Erbrochenem als auch vom Stuhl von Infizierten während Krankheitsepisoden kultiviert werden (Parsonnet et al., 1999), so dass ein oral-oral sowie fäkal-oraler Übertragungsweg diskutiert wird.

Allgemein lässt sich sagen, dass die Prävalenz auch stark mit sozioökonomischen Faktoren korreliert. So wurden eine enge Wohndichte, Anzahl an Geschwistern, Geburtsreihenfolge, Teilung von Betten und fehlendes fließendes Wasser mit einem erhöhten Vorkommen der *H. pylori*-Infektion verbunden (Webb et al., 1994).

3.1.2 Helicobacter pylori– Pathogenese

Die Magenschleimhaut wehrt sich durch vielfältige Schutzmechanismen gegen das Eindringen von Mikroorganismen, wobei sich *H. pylori* an diese ökologische Nische hochgradig adaptiert und Gegenmaßnahmen entwickelt hat.

Die Infektion durch *H. pylori* führt in der Regel zu einer chronischen Infektion des Magens, die allerdings in mehr als 80% der Fälle klinisch inapparent bleibt (Suerbaum and Michetti, 2002;Portal-Celhay and Perez-Perez, 2006). Beim Rest der Fälle kann die Infektion zu einer chronisch aktiven Entzündung, einem MALT-Lymphom oder über eine chronisch atrophische

Entzündung der Magenschleimhaut bis zum Magenkarzinom verlaufen (Uemura et al., 2001). Die kurze akute Gastritis wurde bisher nur in einigen Studien in Form einer akzidentellen Infektion sowie bei Marshalls Selbstversuch beschrieben (Marshall et al., 1985). Sie zeichnet sich histologisch durch eine massive Invasion der Magenschleimhaut durch polymorphkernige Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Monozyten aus (Rossi et al., 2000).

Nach der oralen Aufnahme orientiert sich der Keim chemotaktisch in Richtung der im Vergleich zum sauren Milieu des Magens eher neutralen Magenoberfläche und dringt in die ca. 500 µm dicke Mukusschicht ein. Durch ihren unipolaren Geißelapparat sind die Bakterien besonders befähigt, sich durch die visköse Mukusschicht zum Epithel hin fortzubewegen. Der größere Teil der Bakterien bleibt im Magenschleim und vermehrt sich hier, der andere Teil kolonisiert das Mukosaepithel und kann dort eine zellschädigende Wirkung entwickeln. Für das Überleben von *H. pylori* im sauren Lumen des Magens stellt das Enzym Urease einen essentiellen Faktor dar. Durch die Spaltung von Harnstoff in Ammoniak und Hydrogencarbonat kann ein niedriger pH-Wert in der Umgebung auf ein neutrales Niveau wie im Zytoplasma des Bakteriums angepasst werden (Marshall et al., 1990; Stingl et al., 2002). Die Aufnahme des Harnstoffes wird durch den Protonen-getriebenen Transportkanal Urel geregelt, der sich durch steigende H⁺-Konzentrationen öffnet (Weeks et al., 2000). Weitere diskutierte Effekte der Urease sind eine Apoptose-Induktion (Fan et al., 2000; Igarashi et al., 2001) sowie eine zytotoxische Wirkung, welche durch die Produktion von Ammoniak (Suzuki et al., 1992) vermittelt wird. Bei der Bindung an das Mukosaepithel helfen dem Bakterium Adhäsine, so vermitteln z.B. die Proteine SabA und BabA die Bindung an glykosylierte Blutgruppenantigene (Ilver et al., 1998; Mahdavi et al., 2002). Durch Rekombination verschiedener Adhäsionsgene können sich die Bakterien an Wirtsepithelzellen adaptieren. Generell besitzt *H. pylori* eine hohe Mutationsrate sowie die Fähigkeit, auf effiziente Art DNA-Fragmente anderer *H. pylori*-Stämme aufzunehmen, was zu einer hohen Vielfalt an Stämmen führt (Suerbaum et al., 1998; Falush et al., 2001). Für die Zellschädigung werden Zytotoxine, Enzyme (Urease, Phospholipasen) sowie die entzündliche Reaktion mit Freisetzung von Mediatoren (TNFα, Interleukine) als ursächlich angesehen (Leunk et al., 1988; Figura et al., 1989).

3.1.3 Helicobacter pylori – induzierte Krankheiten

H. pylori wird als die Hauptursache für die aktiv-chronische Gastritis (früher Typ-B Gastritis), das distale Magenkarzinom sowie das MALT-Lymphom des Magens angesehen.

Die *H. pylori*-induzierte Gastritis ist mit 80-90% die häufigste aller Gastritis-Formen (Stolte, 1990), weitere Ursache sind v.a. die nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR). Dies konnte zum Einen durch Selbstversuche (Marshall et al., 1985; Morris et al., 1991) sowie zum Anderen durch immunologische Studien gezeigt werden: Patienten mit chronisch-aktiver Gastritis haben deutlich erhöhte IgG- und IgA-Werte, die nach erfolgter Eradikation signifikant abfallen (Van Bohemen et al., 1989). Über die chronische Entzündung kann die Infektion in 0,1-0,4 % der Fälle zum Magenkarzinom führen, wobei hier die distale und nicht die proximale Form gemeint ist. Auf Grund dieses Zusammenhangs wurde *H. pylori* 1994 von der WHO als Karzinogen erster Klasse eingestuft. Magenkarzinome weisen mit fast 500.000 pro Jahr die zweithäufigste Ursache eines Krebstodes weltweit auf. Weiterhin induziert *H. pylori* über die Stimulation von MALT die Ausbildung von MALT-Lymphomen des Magens (Isaacson, 1994). Low-grade Lymphome können durch Eradikation geheilt werden, jedoch besteht auch die Möglichkeit zur Transformation zum high-grade Tumor, der eine operative und/oder Radiochemotherapie notwendig macht. In jüngerer Zeit wurde zunehmend eine Wirkung der *H. pylori*-Infektion auf Organe außerhalb des Gastrointestinaltraktes diskutiert. So werden verschiedene Hautkrankheiten, die thrombozytische Purpura (Fujimura, 2005), kardiovaskuläre und cerebrovaskuläre Erkrankungen (Pellicano et al., 2003a; Pellicano et al., 2003b; Gasbarrini et al., 2004) in Zusammenhang mit *H. pylori* gesehen.

Jedoch könnte die Infektion auch eine protektive Wirkung gegenüber manchen Erkrankungen haben. So zeigen einige Studien eine negative Korrelation zwischen *H. pylori* und schweren Formen der Reflux-Ösophagitis und den Folgestadien Barrett-Ösophagus und Karzinom des ösophago-gastralen Übergangs; jedoch ist dieser Zusammenhang nicht bewiesen und befindet sich noch in der Diskussion (Nardone et al., 2004). Zusätzlich existieren Studien, die einen möglichen inversen Zusammenhang zwischen *H. pylori*-Infektion und Asthma sowie Allergien nahe legen (Chen and Blaser, 2007; Blaser et al., 2008). So könnte v.a. die Infektion in der Kindheit mit einem erniedrigten Risiko für Asthma und Allergien verbunden sein (Lang, 2007).

3.1.4 Die verschiedenen Virulenzfaktoren

3.1.4.1 Allgemein

Virulenzfaktoren lassen sich als Faktoren oder Merkmale definieren, deren Verlust zu einer signifikanten Verminderung der Pathogenität eines Erregers führen würde (Salysers et al., 1994). Allgemein lassen sich Virulenzfaktoren in drei Gruppen einteilen: Kolonisationsfaktoren helfen bei der Besiedelung des Wirtsorganismus, gewebeschädigende

Faktoren führen zur Entstehung von Krankheiten und Persistenzfaktoren sorgen für die Aufrechterhaltung einer Infektion trotz Abwehrmechanismen des Wirts.

Um Virulenzfaktoren charakterisieren zu können, müssen diese zunächst anhand des beobachteten biologischen Effekts identifiziert werden. Anschließend kann der Virulenzfaktor rekombinant hergestellt und *in vitro* charakterisiert werden. Desweiteren können isogene Mutationsstämme hergestellt werden, welche sich durch das Fehlen des Virulenzfaktors auszeichnen.

3.1.4.2 Die „CagA pathogenicity island“

Dies ist der wahrscheinlich am besten erforschte Virulenzfaktor von *H. pylori* (Censini et al., 1996): Die cytotoxin-associated gene - pathogenicity island (cag-PAI). *H. pylori*-Stämme, die diese Genregion aufweisen, sind signifikant häufiger mit peptischen Ulzera und Adenokarzinomen des Magens assoziiert als solche Stämme, denen diese Region fehlt (Blaser et al., 1995; Nomura et al., 2002; Atherton, 2006). Die Cag Pal umfasst ungefähr 30 Gene, die neben dem namensgebenden *cagA* (3.1.4.3) auch für das Type 4 Secretion System (T4SS) codieren. Dieses System ähnelt einer Art molekularen Spritze, welche das Protein CagA in das epitheliale Cytosol des Wirts injiziert (Odenbreit et al., 2000; Asahi et al., 2000; Stein et al., 2000). Die Präsenz des T4SS stellt den Hauptstimulus der pro-inflammatorischen Cytokinexpression des Epithels und der Entzündung der Magenschleimhaut dar.

3.1.4.3 The cytotoxin associated gene (CagA)

Der Transport des 130 kDa großen CagA in das epitheliale Zytosol des Wirts zieht Änderungen der Zelle nach sich, welche dem Bakterium wahrscheinlich bei der Besiedelung des Magens zuträglich sind. Das injizierte CagA wird im Zytosol erkannt und wie wirtseigene intrazelluläre Signalmoleküle durch Phosphorylierung aktiviert (Stein et al., 2002; Selbach et al., 2003). Durch verschiedene Interaktionen kann CagA so zur Zerstörung von Tight Junctions, Gewebeschaden, morphologischen Änderungen der Zelle oder auch zur Proliferation führen (Mimuro et al., 2002; Amieva et al., 2003).

In westlichen Ländern ließ sich zeigen, dass ca. 70% aller *H. pylori*-Stämme CagA-positiv sind; bei Kulturen aus Patienten mit Magen- und/oder Duodenalgeschwüren sind es mehr als 90%. Einige Studien haben gezeigt, dass mit der Anzahl der Phosphorylierungen auch die Pathogenität des jeweiligen CagA ansteigt (Yamaoka et al., 1999; Azuma et al., 2002; Argent et al., 2004).

3.1.4.4 The vacuolating cytotoxin (VacA)

Das vakuolisierende Zytotoxin (VacA) liegt zunächst als 140 kDa großes Precursorprotein vor. Als reifes Toxin besteht es aus zwei Domänen der Größe 37 kDa und 55 kDa. Der kleinere Teil ist notwendig für die Ausbildung von Membranporen, der größere Teil für die Bindung an Zelloberflächen.

VacA hat zahlreiche Effekte auf das Magenepithel, die mehr eine zellschädigende, als eine pro-inflammatorische Wirkung besitzen. Aktivierte Formen von VacA sind vermehrt assoziiert mit erhöhtem Krebsrisiko. VacA bewirkt *in vitro* eine Zellschädigung, die sich morphologisch an einer Vakuolisierung des Cytoplasmas zu erkennen gibt (Cover and Blaser, 1992). Bei Genomanalysen besitzen zwar alle *H. pylori*-Stämme ein VacA-Gen, jedoch nur 50% eine vakuolisierende Aktivität. Für die unterschiedliche Aktivität könnten Allelvariationen verantwortlich sein, welche anhand zweier variabler Bereiche des Gens in s1 und s2 bzw. m1 und m2 unterschieden werden (Cover *et al.*, 1994; Atherton *et al.*, 1995). Für VacA konnten verschiedene Effekte nachgewiesen werden. So wurde die Bildung anionenselektiver Poren (Szabo *et al.*, 1999) sowie eine Apoptoseinduktion in Epithelzellen (Kuck *et al.*, 2001; Cover *et al.*, 2003) beschrieben. Im Mongolian Gerbil-Modell konnten durch die orale Gabe von VacA Ulzera ausgelöst werden (Ogura *et al.*, 2000). Antigen-Präsentation durch B-Lymphozyten sowie eine T-Lymphozytenaktivierung (Gebert *et al.*, 2003) können durch VacA inhibiert werden. Besonders starke vakuolisierende Aktivität konnte bei der gleichzeitigen Anwesenheit von CagA beobachtet werden. Stämme mit der Kombination von VacA und CagA konnten analog dazu mit besonders schwerwiegender Klinik in Form von Ulzera und Magenkarzinomen assoziiert werden (Xiang *et al.*, 1995).

Das in dieser Arbeit verwendete VacA wurde von der Firma Mikrogen GmbH bereit gestellt. Es handelt sich dabei um die variable m1-Region des VacA. Es wurden also von dem 1296 Aminosäuren großen Protein nur die Aminosäuren 34 bis 763 verwendet worden.

3.1.4.5 Blood group antigen-binding adhesin A (BabA)

Das 78 kDa große Adhesin BabA wurde auf der äußeren Membran von *H. pylori* gefunden und isoliert. Es ist ein Adhäsion, welches das Lewis b Antigen und ABO Blutgruppen-Antigene erkennt (Ilver *et al.*, 1998). Die Bindung BabA-Le^b gilt als eine der am besten charakterisierten Adhäsion-Rezeptor-Interaktionen bei *H. pylori*. Die Präsenz des BabA kodierenden Gens babA2 konnte signifikant mit duodenalem Ulkus und Adenokarzinom assoziiert werden (Gerhard *et al.*, 1999; Rad *et al.*, 2009). Auf der anderen Seite ließen sich jedoch auch Stämme, welche sich durch eine niedrige Expression von BabA und fehlende

Le^b-Bindungsaktivität auszeichneten, stärker mit schweren klinischen Verläufen assoziieren als Stämme, die eine Le^b-Bindungsaktivität aufwiesen (Fujimoto et al., 2007; Yamaoka, 2008).

3.1.4.6 Neutrophil-activating Protein A (NapA)

Das Neutrophile aktivierende Protein A ist ein 150 kDa großes Protein, welches seine Wirkung durch die verstärkte Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an endotheliale Zellen erzielt (Dundon et al., 2001; Montecucco and de Bernard, 2003). Ebenso ist es in der Lage, die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen durch Neutrophile zu induzieren (Evans Jr et al., 1995; Satin et al., 2000). Es befindet sich im Zytosol von *H. pylori* und wird bei Autolyse freigesetzt. Anschließend ist es in der Lage an die bakterielle Oberfläche zu binden und als ein Adhäsion zu funktionieren, indem es die Bindung zu Muzin vermittelt (Namavar et al., 1998). Ebenso konnte gezeigt werden, dass NapA Mastzellen stimuliert und eine koordinierte Expression von koagulierenden und antifibrinolytischen Faktoren induziert, womit NapA einen weiteren Beitrag zur Entzündungsreaktion in der Magenmukosa leistet (Montemurro et al., 2002).

3.1.4.7 Urease A/B

Die Urease ermöglicht es *H. pylori* in sauren Milieus zu überleben. Urease Deletions-Mutanten waren im Tiermodell nicht in der Lage den Magen zu kolonisieren (Eaton et al., 1991; Tsuda et al., 1994; Andrutis et al., 1995). Es gibt sieben Gene im Urease cluster (Labigne et al., 1991). UreA und UreB kodieren strukturelle Untereinheiten der Urease. UreE, F, G und H kodieren zusätzliche Proteine, die alle zur Synthese der aktiven Urease notwendig sind. Eine Funktion dieser Proteine ist die Aufnahme von Ni²⁺, dem Cofaktor von Urease (Volland et al., 2003). Die beiden Untereinheiten der Urease sind 29 (Urease A) und 67 kDa (Urease B) groß. Die *H. pylori* Urease hat ihr Optimum im neutralen Bereich und ist irreversibel inaktiv, wenn der pH-Wert unter 4,5 sinkt (Dunn et al., 1990; Scott et al., 1998). Der Großteil der Urease ist intrabakteriell, ein Teil jedoch ist nach einer 24-48h Kultur auch an der Oberfläche des Bakteriums zu finden (Hawtin et al., 1990).

3.1.4.8 Gamma-glutamyltranspeptidase (gGT)

Die *H. pylori* gGT gehört zur Superfamilie der N-terminalen nucleophilen Hydrolasen. Es existiert ein (inaktiver) 60 kDa Precursor, welcher nach intramolekularer Autoprocessing zu einem voll aktiven Heterodimer wird, zusammengesetzt aus einer 40 kDa und einer 20 kDa Untereinheit. Nach der Prozessierung katalysiert die gGT die Hydrolyse der gamma-

glutamyl-Brücke im Glutathion, wie sie dies auch im Gewebe von Säugetieren macht (Tate and Meister, 1981). Im Gegensatz zu den gGTs aus Eukaryoten, die membranassoziierte gGTs besitzen wird die gGT des *H. pylori* möglicher Weise sezerniert. Weiterhin wurde beschrieben, dass die gGT einen potenten T-Zell-inhibitorischen-Effekt besitzt (Gerhard *et al.*, 2005b), bei dem die immunsuppressive Wirkung abhängig ist von der Aktivität des Enzyms (Schmees *et al.*, 2007b). Wenn in dieser Arbeit im Folgenden von gGT die Rede ist, so ist damit immer die H.p.-gGT und nicht die humane gGT gemeint.

3.1.4.9 *H. pylori* adhesion protein A (HpaA)

Das Adhäsionsprotein HpaA ist ungefähr 29 kDa groß, befindet sich in der äußeren Membran des Bakteriums und spielt eine wichtige Rolle beim Annäherungsprozess von *H. pylori* an Epithelgewebe. Im Mausmodell erwies sich HpaA als essentiell für die Kolonisierung von *H. pylori* (Carlsohn *et al.*, 2006). Was die genaue Funktion betrifft, ist ein besonderer Schutz des Flagellums in der Diskussion, jedoch ist dies im Detail noch nicht abschließend geklärt.

3.1.4.10 GroEL (p58)

Das Protein GroEL oder auch p58 ist 54- 62 kDa groß und gehört zur Familie der Chaperone. Es kann große makromolekulare Ansammlungen bilden. Auf dem in dieser Arbeit getesteten Lineblot wird GroEL als p58 bezeichnet.

3.1.4.11 *Helicobacter* cystein-rich-protein C (HcpC)

Die Familie der *Helicobacter* cystein-rich-proteins (Hcp) ist eine der größten Protein-Familien, die für die δ - und ϵ -Proteobakterien spezifisch sind (Mittl *et al.*, 2003). Das 76 kDa große HcpC wurde vermehrt in Assoziation mit *H. pylori* Membranen entdeckt, jedoch konnte noch keine genaue Funktion nachgewiesen werden (Sabarth *et al.*, 2002; Bumann *et al.*, 2002). Es wurde allerdings in einer immunologischen Studie verstärkt bei Patienten mit Magenkrebs gefunden (Haas *et al.*, 2002).

3.1.4.12 Outer membrane proteins (OMP's)

Die sogenannten OMP's (outer membrane proteins) befinden sich in der äußeren Membran von *H. pylori* und können Funktionen wie Adhäsion, Eisentransport, strukturelle Stabilität sowie auch Virulenz aufweisen. Ebenso könnten sie aber auch, durch ihre Exposition an der Bakterienoberfläche, als Antigen fungieren. Massenspektrometrisch konnten 30 von 33 theoretisch bestätigten OMP's näher charakterisiert und beschrieben werden (Carlsohn *et*

al., 2006). Bereits erwähnt wurde BabA, welches auch als Omp28 in der Literatur beschrieben wird.

3.1.4.13 Weitere

Neben den genannten Virulenzfaktoren existieren noch weitere, auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird. So existieren beispielsweise Mechanismen zur molekularen Mimikry und Immunmodulation (Appelmeik et al., 1996). Weiterhin könnte die Entledigung von hochreaktiven Sauerstoff-Radikalen durch die Enzyme Katalase und Superoxid-Dismutase sowie Komponenten der bakteriellen Hitzeschockantwort zum bakteriellen Überleben und zur Wirtsschädigung beitragen (Tomb et al., 1997).

3.1.5 Immunreaktionen bei *Helicobacter pylori* Infektion

H. pylori stimuliert sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunantwort. Der erste Kontakt mit Epithelzellen des Magens löst die angeborene Erkennung von Erregern aus. Der Umfang dieser ersten Immunantwort kann ein entscheidender Faktor für das klinische Bild einer *H. pylori* Infektion sein. Angesichts der erwähnten, wahrscheinlich mehrere 100.000 Jahre währenden Co-Evolution von *H. pylori* und dem Menschen war der gewöhnliche Zustand des menschlichen Magens wohl eine chronische *H. pylori* Infektion. Dies lässt darauf schließen, dass das Bakterium es geschafft hat, sich in besonderem Maße an die Immunantwort des menschlichen Körpers anzupassen und evtl. diese sogar zu beeinflussen.

3.1.5.1 Angeborene Immunantwort

Die *H. pylori*-Kolonisation der Magen-Mukosa stimuliert die angeborene Abwehr des Wirts, die Expression proinflammatorischer und antibakterieller Faktoren durch die Magenschleimhaut wird angeregt (Jung et al., 1997). Aus dieser ersten Verteidigung des menschlichen Körpers entsteht eine akute Gastritis. Die nun infiltrierenden Entzündungszellen werden weiterhin von *H. pylori* stimuliert, was den Grad der Entzündung weiter verstärken kann (Yamaoka et al., 1997). Die angeborene Immunantwort spielt eine zentrale Rolle für die Schwere der Klinik und im Besonderen auch für die mögliche Ausbildung eines Magenkarzinoms.

Eine entscheidende Rolle bei der angeborenen Immunantwort spielen die PRRs (pattern recognition receptors), welche durch PAMPs (pathogen associated molecular patterns) aktiviert werden. Der am besten untersuchte PRR ist der TLR (Toll-like receptor), Proteine

dieser Familie (11 verschiedene Proteine sind bekannt) können auf der Zell-Oberfläche des Wirts exprimiert sein und spezifisch verschiedene PAMPs erkennen. Es konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass *H. pylori* TLR 2, TLR 4, TLR 5 und TLR 9 stimulieren kann (Gewirtz *et al.*, 2004;Ishihara *et al.*, 2004;Ding *et al.*, 2005;Torok *et al.*, 2005;Rad *et al.*, 2009); jedoch gibt es hierzu noch kontrovers geführte Diskussionen und es wird noch weiter an der genauen TLR-Stimulation durch *H. pylori* geforscht.

Ein anderer Weg der angeborenen Immunabwehr läuft über sezernierte antimikrobielle Peptide. So konnten im Magensaft von *H. pylori*-Patienten u.a. erhöhte Werte von humanem β -Defensin und α -Defensin 1-3 der Neutrophilen Granulozyten gemessen werden (Isomoto *et al.*, 2005).

Durch die vom Magenepithel sezernierten Zytokine und Chemokine werden Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten in die entzündete Mukosa gelockt. Je höher der Grad dieser Entzündungszellen ist, desto stärker ist auch die Ausprägung der Entzündung (Ernst and Gold, 2000). Einige Gruppen konnten zeigen, dass Dendritische Zellen (DCs) aktiviert werden und Zytokine sezernieren, z.B. IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und TNF- α , wenn man sie mit *H. pylori* co-kultiviert (Hafsi *et al.*, 2004;Kranzer *et al.*, 2005).

Phagozytose ist ein zusätzlicher, wichtiger Mechanismus der angeborenen Immunabwehr. In von *H. pylori* infizierter Magenschleimhaut sind meist erkennbare Mengen eines phagozytären Infiltrates zu entdecken. *H. pylori* ist offensichtlich in der Lage zu sein dem Tod durch Phagozytose zu entgehen, jedoch befinden sich die genauen Mechanismen noch in der Diskussion. Ein Teil der einverleibten Bakterien scheint sein Überleben durch einen Resistenz-Mechanismus zu sichern. Es werden Phagosomen gebildet, die später zu schützenden, intrazellulären Megasomen fusionieren können (Allen *et al.*, 2000;Odenbreit *et al.*, 2000). Ebenso schafft es das Bakterium dem Phagozyten vermittelten Tod durch reaktiven Sauerstoff (über NADPH) zu entgehen. Es tritt zwar ein erhöhter Spiegel an ROS (reactive oxygen species) auf, doch schafft es *H. pylori* diesen zu neutralisieren, z.B. mit Hilfe seiner Katalase-Aktivität.

Es wurde beschrieben, dass auch Mastzellen in erhöhtem Umfang im Rahmen einer *H. pylori*-Infektion auftreten und nach Eradikationstherapie wieder abfallen (Bamba *et al.*, 2002). Die genaue Rolle der Mastzellen ist im Detail noch nicht klar, jedoch scheinen sie in Reparaturvorgänge im Gewebe und verstärkte Antworten des Immunsystems involviert zu sein (Yakabi *et al.*, 2002). Auch scheinen sie eine Rolle bei der Immunisierung mittels Urease und Cholera Toxin zu spielen (Velin *et al.*, 2005).

3.1.5.2 Erworbene Immunantwort

Obwohl *H. pylori* im menschlichen Organismus eine starke humorale und zelluläre Immunantwort provoziert, schafft er es trotzdem auf der Mukosa des Magens zu überleben und, sofern keine Therapie erfolgt, eine lebenslange Infektion zu etablieren. Ein möglicher Mechanismus könnte sein, dass *H. pylori* die menschliche Immunantwort manipuliert, um somit seine Elimination zu verhindern und ein Zusammenleben mit dem Wirt zu ermöglichen. Jedoch gibt es auch Hinweise, dass die erworbene Immunantwort selbst einen Beitrag zu diesem Prozess leistet (Zevering et al., 1999). So ließ sich im Maus-Modell zeigen, dass die zelluläre Immunantwort eine zentrale Rolle in der Regulation der *H. pylori* induzierten Entzündung des Magens spielt: Mäuse, bei denen das Zytokin IL-10 (wird durch T-Helferzellen sezerniert) fehlt, entwickeln eine besonders kräftige Immunreaktion gegen *H. pylori* und können die Infektion relativ schnell eliminieren (Chen et al., 2001). Im Gegensatz dazu können beim menschlichen Organismus starke Immunreaktionen *H. pylori* nicht abtöten, sondern im Gegenteil die klinische Ausprägung der Infektion noch verstärken.

Die T-Zellantwort gegen *H. pylori* wird in der menschlichen Magenschleimhaut durch die Aktivität der T_{H1}-Zellen geprägt (Bamford et al., 1998). Diese Zellen produzieren IFN- γ , was u.a. eine erhöhte entzündungsfördernde Zytokin-Ausschüttung zur Folge hat. Durch diese Zytokine werden z.B. Makrophagen stimuliert weitere, die Entzündung verstärkende, Faktoren zu sezernieren. So lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Zahl IFN- γ herstellender Zellen in der Mukosa und der Schwere der Gastritis herstellen (Lehmann et al., 2002). Auch im Mausmodell erscheint IFN- γ als ein entscheidender, die Krankheit bestimmender Faktor. Mäuse mit starker T_{H1}-Antwort entwickeln eine stärkere Gastritis, jedoch auch eine niedrigere Dichte der *H. pylori*-Kolonisation. Einige Experimente ergaben Hinweise, dass *H. pylori* die Fähigkeit haben könnte, die T-Zell-Antwort herab zu regulieren (Gerhard et al., 2005a). So ließ sich für einige Virulenzfaktoren (u.a. CagA, gGT) nachweisen, dass sie den lymphozytären Zell-Zyklus stoppen (Paziak-Domaska et al., 2000; Schmees et al., 2007a). VacA hemmt die T-Zell-Antwort u.a. durch Blockieren der MHC-II vermittelten Antigen-Präsentation (Molinari et al., 1998).

Die Rolle der B-Zellen bei der *H. pylori*-Infektion ist weniger intensiv erforscht als die T-Zell-Antwort. Dennoch gibt es einige Hinweise, dass auch sie zur Immunpathogenese der Infektion beiträgt. So wurde in Studien mit B-Zell-defizienten Mäusen eine erhöhte Letalität mit damit einhergehender verstärkter Entzündung und Infiltration von T-Zellen festgestellt (Akhiani et al., 2004).

So stimuliert *H. pylori* die Produktion von Immunglobulinen vom Typ IgG und IgA. Der

genaue Effekt der Antikörper gegen die bakterielle Kolonisation ist jedoch noch nicht klar. Einige Studien zeigten, dass IgA und IgG im Maus-Modell die bakterielle Besiedelung unterstützen und protektive Immunvorgänge hemmen (Akhiani 2004, Akhiani 2005). Die B-Zell-Antwort spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese durch die Teilnahme an einem *H. pylori*-induzierten Präzipitationsprozess: Antikörper gehen hierbei Kreuzreaktionen mit Wirtsantigenen der Epithelzellen des Magens (Appelmelk 1996) und der H⁺, K⁺-ATPase der Parietalzellen ein (Amedei 2003). Durch diesen Prozess können die lokale Entzündung sowie ein zellulärer Schaden gefördert werden.

3.2 *Helicobacter Pylori* - Diagnostik und Therapie

3.2.1 Nicht-invasive Methoden

3.2.1.1 Allgemein

Die nicht-invasiven Nachweisverfahren für *H. pylori* erfordern keine vorausgehende Endoskopie. Sie basieren entweder auf einer im Magen erfolgenden Ureasereaktion, bei der das entstehende Reaktionsprodukt in der Atemluft nachgewiesen werden kann, einem *H. pylori*-Antigennachweis aus dem Stuhl oder dem serologischen Nachweis von Antikörpern aus dem Blut.

3.2.1.2 Harnstoff - Atemtest

Der Atemtest zur Untersuchung des *H. pylori*-Status basiert auf der starken Produktion von Urease durch *H. pylori*. So entsteht nach der oralen Gabe von 50-100mg ¹³C-markiertem Harnstoff im von *H. pylori* besiedelten Magen neben Ammoniak auch ¹³CO₂ als zusätzliches Reaktionsprodukt, welches in der Atemluft gemessen werden kann. Die Testgenauigkeit kann durch verschiedene Verfahren verbessert werden, so z.B. durch Verabreichung des Harnstoffs in Zitronensäure. Durch die Gabe in Form von Tabletten kann eine enzymatische Reaktion bereits im Oraltrakt vermieden werden. Bei Erwachsenen weist der Harnstoff-Atemtest eine Spezifität und Sensitivität von ca. 95% auf (Vaira and Vakil, 2001). Bei Kindern wurden Sensitivitäten um die 90% und Spezifitäten von 96-100% gemessen (Cardinali et al., 2003; Machado et al., 2004). Voraussetzung für das Funktionieren des Atemtests ist das Vorhandensein von stoffwechselaktiven Bakterien in ausreichender Anzahl und eine optimale Urease-Aktivität. Dies spielt klinisch insofern eine Rolle, da nach erfolgloser Therapie die Erregerdichte und Stoffwechselaktivität vorübergehend herabgesetzt ist und somit ein Atemtest noch mehrere Wochen nach erfolgloser Eradikation falsch negativ

ausfallen kann. Auch bei gastrointestinalen Blutungen kann das Ergebnis falsch negativ sein. Zusätzlich scheint die Gabe von PPI eine hemmende Wirkung auf die Urease-Aktivität zu haben. Dieses bei Patienten mit Magenbeschwerden häufig gegebene Medikament kann die Sensitivität auf 60-30% herabsetzen (Udd et al., 2003). So wird ein Atemtest erst nach einem 1-2 wöchigen Aussetzen der PPI und frühestens 4-6 Wochen nach einer Eradikationstherapie empfohlen.

3.2.1.3 Stuhltest

In diesem Test-Verfahren wird *H. pylori*-Antigen aus Stuhlproben an mono- oder polyklonale anti-*H. pylori*-Antikörper, welche an Plastikoberflächen (meist in Form von Mikrotiterplatten) adsorbiert sind, gebunden. Der darauf folgende Nachweis geschieht i.d.R. mittels ELISA. Für ein valides Testergebnis sollte der Stuhl beim Test möglichst frisch oder in der Zeit zwischen Entnahme und Untersuchung bei -20°C gelagert werden. Die ersten Stuhltest-Kits basierten auf polyklonalen Antikörpern, mittlerweile existieren jedoch auch Kits auf der Grundlage monoklonaler Antikörper. In einer größeren Studie wurden eine Sensitivität von 91% sowie eine Spezifität von 93% ermittelt (Gisbert and Pajares, 2004). Ähnlich wie beim Atemtest können die Ergebnisse durch PPI-Einnahme, nach erfolgloser Eradikation sowie gastrointestinalen Blutungen falsch negativ sein. Bei Kindern zeigt der Stuhltest sehr gute Ergebnisse (Koletzko et al., 2003).

3.2.1.4 Serologie

Als serologische Testverfahren werden in der *H. pylori*-Diagnostik vorwiegend Immunoblot- und ELISA-Systeme verwendet. Beide Systeme beruhen auf der Reaktion von menschlichen Antikörpern mit auf einer Festphase fixierten bakteriellen Antigenen. Im ELISA werden die Antigene auf die Oberfläche von zylindrischen Vertiefungen innerhalb einer Plastikplatte aufgetragen. Im Immunoblot-System geschieht die Auftragung in Form von Banden auf einen Kunststoffstreifen. Der prinzipielle Ablauf des Tests ist bei beiden Systemen ähnlich: Zuerst wird mit humanem Serum in einer bestimmten Verdünnung inkubiert, damit die Antikörper (falls vorhanden) an die entsprechenden Antigene binden können. Nach einem Waschvorgang wird mit einem zweiten Antikörper, der je nach Wunsch an humane IgG- oder IgA-Antikörper binden kann, inkubiert. Schließlich, nach erneutem Waschen, kann der zweite Antikörper mittels eines Detektions-Agens sichtbar gemacht werden.

In der Auswertung wird der Unterschied der beiden Systeme deutlich: Beim ELISA-System bekommt man für jedes well einen photometrisch ermittelten Wert, der Aufschluss gibt über die Konzentration der zweiten Antikörper, die an ein Immunglobulin gebunden haben. Falls

der ELISA mit mehr als einem Antigen beschichtet wurde, lässt sich nicht zwischen den Bindungen an einzelne Antigene differenzieren.

Dies ist der entscheidende Unterschied zum Immunoblot: Da die Antigene in Banden aufgetragen wurden, kann man nun an Hand jeder Bande ablesen, ob eine Antikörper-Antigen-Bindung stattgefunden hat oder nicht.

Man geht davon aus, dass praktisch jeder mit *H. pylori* infizierte Mensch Antikörper gegen Antigene von *H. pylori* entwickelt. Antikörper der Klasse IgG kommen nahezu regelmäßig vor, IgA nur bei einem geringeren Teil, IgM sehr selten. Die Antikörper werden gegen verschiedene Oberflächen- und zytosolische Proteine gebildet (Kimmel et al., 2000). Der Nachweis von IgG im Immunoblot und ELISA kann Sensitivitäts- und Spezifitäts-Werte bis 90% erreichen und ist somit diesbezüglich mit Histologie, Harnstoff-Atemtest und Urease-Schnelltest vergleichbar (Cutler et al., 1995). Die Nachweisrate mittels anti-*H. pylori*-IgA-Antikörpern ist deutlich geringer (Jaskowski et al., 1997). Da sich mit Hilfe des Immunoblots Antikörper gegen einzelne Antigene nachweisen lassen, ist prinzipiell die Möglichkeit gegeben, verschiedene bakterielle Proteine mit bestimmten klinischen Bildern zu assoziieren. Auch lassen sich epidemiologische Unterschiede im Vorkommen von Virulenzfaktoren identifizieren. Aktuell verfügbare Immunoblots basieren meist auf Bakterien-Lysaten. Das heißt, es werden lysierte Bakterienlösungen auf Festphase aufgetragen und anschließend auf die Zahl der gebundenen Banden untersucht. Ein kommerzieller Blot auf Basis rekombinant hergestellter Proteine existiert derzeit nicht.

Gewisse Unsicherheiten in der serologischen Diagnostik sind durch den Zustand nach Eradikation sowie bei AIDS-Patienten gegeben. So muss bei einem positiven Ergebnis eine Eradikationstherapie innerhalb des letzten Jahres ausgeschlossen werden. Bei AIDS-Patienten wurde eine verminderte serologische Antwort beobachtet (Fabris et al., 1997). Entscheidende Vorteile gegenüber den anderen Tests hat die Serologie bei Patienten mit fortgeschrittener Atrophie der Magenschleimhaut sowie bei einer PPI-Therapie. Bei diesen Konstellationen hat die Serologie im Vergleich zum Stuhl- und Atemtest keine erhöhte Zahl an falsch negativen Ergebnissen (Manes et al., 2001). Zusätzlich verfügt man bei der Serologie, neben der Histologie, über die längsten Erfahrungen.

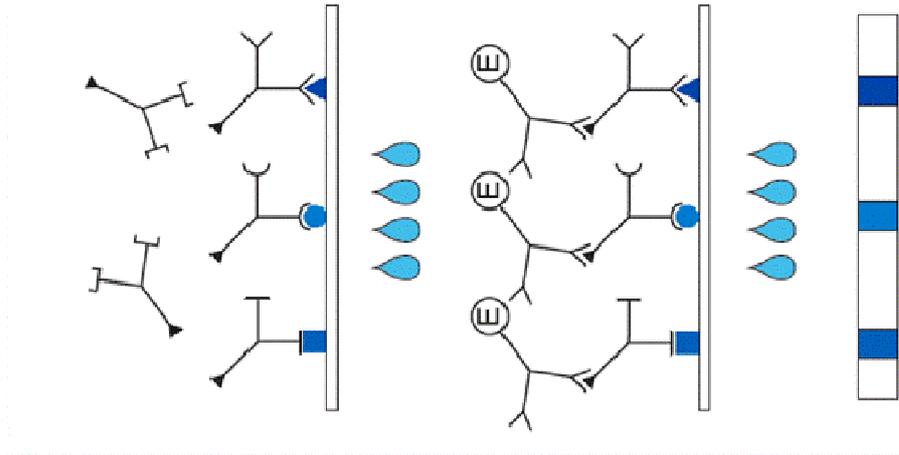


Abbildung 2: Prinzip des Antigennachweises bei Blot-Systemen. Bild 1: Antikörper (aus humanem Serum oder Kontrolle) binden spezifisch an ihr jeweiliges Antigen; Bild 2: Ein zweiter Antikörper mit gebundenem Enzym bindet an den Ersten (sofern vorhanden); Bild 3: Durch Hinzugeben eines Substrates, das vom Enzym in einen Farbstoff umgewandelt wird, werden an den Stellen, wo eine Antigen-Antikörper-Bindung stattgefunden hat, Banden sichtbar. Quelle: Mikrogen

3.2.2 Invasive Methoden

3.2.2.1 Allgemein

Als invasive Diagnostik gelten alle Methoden, bei denen zur Untersuchung des *H. pylori*-Status eine Endoskopie des oberen Gastrointestinaltraktes notwendig ist. Während der Untersuchung, die meist im Rahmen der Abklärung abdomineller Schmerzen oder unklarer Blutungen stattfindet, werden Gewebeproben entnommen. Diese werden dann im Anschluss entweder enzymatisch über den Urease-Schnelltest, kulturell durch Anzucht des Keimes, mikroskopisch mittels einer Bakterioskopie oder mit molekulargenetischen Methoden wie PCR oder Realtime-PCR untersucht. Den eindeutigen Beweis für lebende Erreger können nur der Urease-Schnelltest und eine bakterielle Kultur liefern.

3.2.2.2 Urease-Schnelltest

Durch den Urease-Schnelltest (HUT) kann die Urease-Aktivität in Biopsien der Magenschleimhaut nachgewiesen werden. Das Prinzip des Tests entspricht dem des Harnstoff-Atemtests und beruht auf der enzymatischen Umsetzung von Harnstoff in CO_2 und Ammoniak. Für den Test wird ein harnstoffhaltiges Medium samt pH-Indikator verwendet. Ist *H. pylori* in der Biopsie vorhanden, steigt der pH-Wert durch die Bildung von Ammoniak und ein Farbumschlag ist innerhalb von 1-3 Stunden zu sehen. Das Verfahren ist sehr spezifisch (93-100%), die Sensitivität liegt zwischen 89 und 98% (Cutler et al., 1995; Monteiro et al., 2001). Schwächen des Tests sind ähnlich wie beim Harnstoff-Atemtest die falsch negativen Ausfälle unter PPI-Therapie sowie in den ersten Wochen nach abgelaufener

Eradikationstherapie.

3.2.2.3 Kulturelle Anzucht

Um möglichst gute Anzuchtbedingungen zu erreichen, sollten die Magenbiopsien möglichst frisch, d.h. in geeignetem Transportmedium innerhalb von 24 h, in einem sterilen Gefäß in ein mikrobiologisches Labor gelangen. Dort wird die Biopsie steril homogenisiert und auf Spezialnährböden mit und ohne Antibiotika ausgestrichen. Ebenso wird ein kleines Ausstrichpräparat nach Gram gefärbt. Den Rest der Biopsie überschichtet man mit Harnstoff-Bouillon und lässt ihn bei Raumtemperatur für 48 Stunden inkubieren. Anschließend wird die Kultur bei 36°C in mikroaerophiler, feuchter Umgebung erstmals abgelesen und verdächtige Kolonien subkultiviert. Nährböden, die noch kein Wachstum gezeigt haben, werden nach 5-10 Tagen nochmals kontrolliert. Meist jedoch sind nach 48 Stunden Kolonien erkennbar. Anschließend kann man Empfindlichkeitsreaktionen gegen Metronidazol, Clarithromycin, Amoxicillin, Tetracyclin, Ciprofloxacin und Rifampicin durchführen. Die Sensitivität der kulturellen Anzucht ist stark abhängig von den Umständen der Probenentnahme wie Transportzeit, Erregerdichte, Qualität der Nährböden, und kann daher stark schwanken (50-90%).

Die Spezifität der kulturellen Anzucht beträgt 100%. Zusätzlich lässt sich bisher nur über die Kultur die Wirksamkeit aller verfügbaren Antibiotika testen. Auch für dieses Verfahren gilt das Problem der Einnahme von PPI und Antibiotika. So sollten Patienten, wenn möglich, 4 Wochen vor einer geplanten Gastroskopie Protonenpumpenhemmer und Antibiotika absetzen.

3.2.2.4 Histologie

Primäre Aufgabe der histologischen Diagnostik ist die Feststellung pathologischer Veränderungen in der Magenschleimhaut. Bereits in der Standard-Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung (HE) sind *H. pylori*-Bakterien sichtbar. Darüber hinaus kann die Histologie Aussagen treffen über die Wahrscheinlichkeit einer Erregerbesiedlung. So entspricht eine aktive antrumdominante Gastritis in der Regel einer Typ-B, das heißt bakteriellen, Gastritis. Die seltener vorkommende multifokal aktive Gastritis kann sowohl vom Typ-A (autoimmun), als auch vom Typ-B sein. Um Stichprobenfehler zu vermeiden, sollten immer jeweils 2 Proben im Antrum und Korpus genommen werden.

So lässt sich im Regelfall bei normaler Schleimhaut in Antrum und Corpus, ausgeprägter Typ-C (reaktiver) Gastritis oder bei chronischer inaktiver Gastritis kein Bakteriennachweis

führen und eine weitere Suche wäre in diesen Fällen unnötig. Wenn jedoch eine Antrumgastritis vorliegt, ist primär von einer *H. pylori* Infektion auszugehen; dies lässt sich meistens auch beim Screening der Proben mit 40facher Okularvergrößerung nachweisen. Ist dies nicht der Fall, kann nicht zwangsläufig von einem negativen *H. pylori*-Status ausgegangen werden. Mögliche Fehlerquellen können auch am Transport und der Bearbeitung der Biopsie im Labor liegen. Gegebenenfalls kann man über den Einsatz alternativer Färbemethoden wie Giemsa und Whartin-Starry nachdenken.

3.2.2.5 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wie z.B. die PCR haben in den letzten Jahren in der *H. pylori*-Diagnostik an Bedeutung gewonnen. Wurden sie früher fast ausschließlich für Genotypisierungen genutzt, kann man sie heute zum Nachweis von *H. pylori* aus Biopsien sowie für genotypische Empfindlichkeitsprüfungen gegenüber bestimmten Antibiotika verwenden. Dies ist insbesondere dann hilfreich, wenn die konventionelle Sensibilitätstestung der Gewebeprobe durch Kultur (z.B. wegen zu langer Transportdauer oder Verunreinigung) nicht mehr durchgeführt werden kann. Als Methode verwendet man in solchen Fällen meist eine Real-Time-PCR, welche eine hohe Sensitivität und Spezifität (> 95%) hat und die zuverlässig und schnell ist. Als Material kann man z.B. Reste einer Gewebeprobe eines Urease-Tests mittels eines DNA-Extraktionskits aufreinigen und anschließend auf *H. pylori*-spezifische Gene, wie z.B. *UreC* überprüfen (He et al., 2002).

Eine besondere Möglichkeit bietet die Real-Time-PCR mit der Durchführung von Mutationsanalysen durch FRET- (Fluorescence resonance energy transfer-) Sonden. Bei dieser Methode werden dem gewöhnlichen PCR-Ansatz noch zwei mit fluoreszierenden Farbstoffen markierte Sonden beigefügt. Die Stärke, mit der diese Sonden an den komplementären DNA-Strang binden, lässt sich visualisieren. Durch diese Technik können Punktmutationen erkannt werden. Dies ist im besonderen Maße für die *H. pylori* Diagnostik interessant, da bestimmte Antibiotika-Resistenzen auf Punktmutationen beruhen. So lassen sich z.B. Resistenzen gegen Clarithromycin und Ciprofloxacin mittels dieser Methode nachweisen (Matsumura et al., 2001; Oleastro et al., 2003; Glocker et al., 2006). Die Sensitivität dieser Methode übertrifft Kultur und Histopathologie und die Resistenzbestimmung stimmt mit der konventionellen Methode durch einen E-Test in der Kultur zu 98% überein (Tankovic et al., 2003).

3.2.3 Derzeitige Therapie-Praxis

Bei nachgewiesener *H. pylori*-Infektion wird heute in aller Regel mit einer Triple-Therapie

behandelt. Diese wurde erstmals 1993 beschrieben und erzielt seitdem bei guter Compliance Eradikationsraten von 85-95%. Sie besteht aus dem Protonenpumpeninhibitor Omeprazol in Kombination mit den Antibiotika Amoxicillin und Metronidazol oder alternativ Amoxicillin und Clarithromycin (OAM-, OAC-Therapie). Diese Therapie wird sieben Tage lang durchgeführt.

Detaillierte, fallbezogene Therapieempfehlungen unter Angabe von Evidenz-Basis und Empfehlungs-Grad wurden in der Maastricht-Leitlinie erarbeitet (Malfertheiner et al., 2007).

3.2.3.1 Zielsetzung der Arbeit

Aktuell kommerziell genutzte Immunoblot-Kits zur *H. pylori* Diagnostik basieren auf Bakterien-Lysaten, die auf eine Festphase geblottet werden. Sie können somit keine Aussage über einzelne Antigene des Bakteriums und deren Vorkommen in der jeweiligen Serumprobe treffen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen *H. pylori*-spezifische Proteine rekombinant hergestellt und auf Antigenität mit humanen Seren überprüft werden.

Anschließend soll in Zusammenarbeit mit der Firma Mikrogen GmbH der Prototyp eines neuen Immuno-Line-Blot hergestellt werden, der auf den rekombinanten Proteinen basiert. Dieser soll dann an Seren getestet und mit dem aktuellen kommerziellen Kits „Immunoblot Helicobacter IgG“ sowie „recomWell Helicobacter IgG“ (ELISA) von Mikrogen verglichen werden.

Außerdem soll im Rahmen einer Studie eine Serenbank von Gastroskopie-Patienten aufgebaut werden, bei der neben den Seren zusätzlich eine Histologie sowie eine bakterielle Kultur angelegt werden soll.

Abschließend soll in einer statistischen Auswertung die Validität des neuen Line-Blots sowie die jeweilige Häufigkeit der getesteten Antigene untersucht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material und Geräte

4.1.1 Plasmide

4.1.1.1 Klonierungsvektor

pGEM-T:

Das pGEM-T Vektor System ist ein effektives System zur Klonierung und Amplifikation von PCR-Produkten. Der Vektor ist vorbereitet durch die Restriktionsendonuklease EcoRV und hat 3'-terminale Thymidine an beiden Enden. Diese Überhänge können die Effizienz bei der Ligation von PCR-Produkten verbessern, indem sie eine Rezirkularisierung des Vektors verhindern. Außerdem verfügt der Vektor über eine LacZ-Site, welche ein späteres Screening ermöglicht. Die Multiple Cloning Site ist flankiert von Recognition Sites für das Restriktionsenzym BstZI, was eine Auslösung von Inserts durch ein einziges Enzym erlaubt. Es wurde ein Vektor der Firma Promega verwendet. Die rekombinanten Kolonien wurden durch Hilfe eines weiß/blau-Screenings auf X-Gal-Indikatorplatten identifiziert.

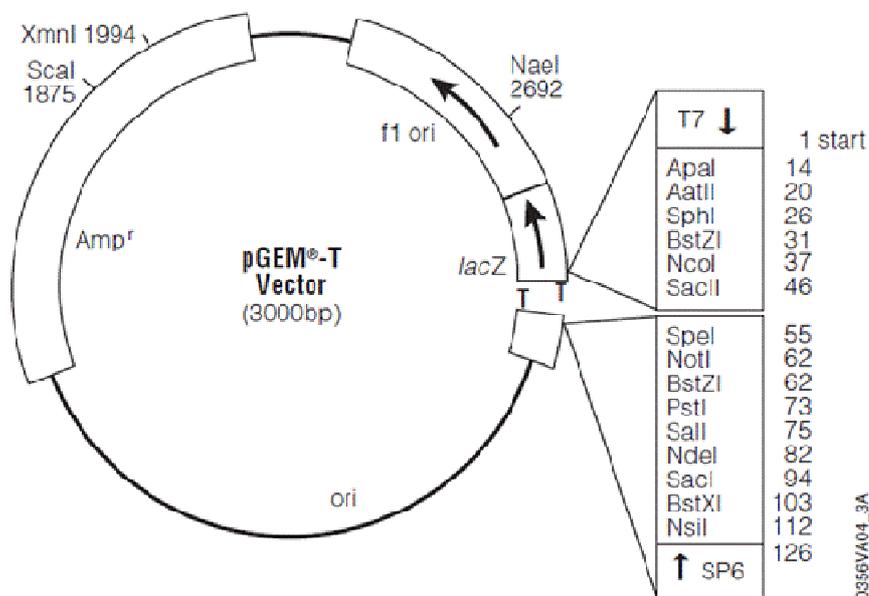


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Vektors pGEM-T; Quelle: Fa. Promega

4.1.1.2 Expressionsvektoren

pQETri_HisStrep2:

Dies ist ein Expressionsvektor zur rekombinanten Proteinexpression in *E. coli*, Insektenzellen und Säugerzellen. Es sind ein C-terminaler 6xHis-Tag und N-terminaler Strep-Tag enthalten. Es wurde der Vektor der Firma Qiagen verwendet, welcher eine Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin besitzt.

Promoter/Enhancer: T5 (Expression in *E. coli*); CAG (Expression in Säugerzellen); p10 (Expression in Insektenzellen)

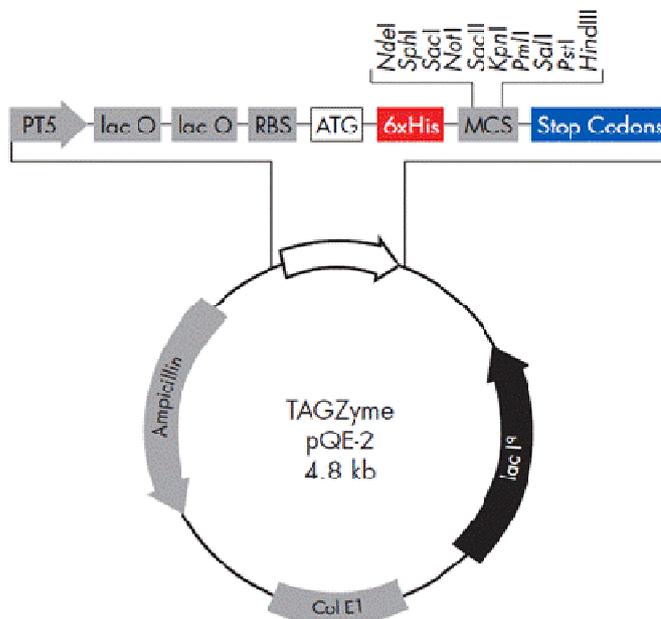


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Vektors pQETri_HisStrep2; Quelle: Fa. Qiagen

Cherry™ Codon-System:

Das Cherry™ Codon-System der Firma Eurogentec arbeitet mit einer T7-Expression über einen Bakteriophagen-Promotor. Die T7 RNA Polymerase erkennt nur den T7 Promotor und keine *E.coli*-Promotoren. Eine erhöhte Plasmid-Stabilität wird über den Gebrauch des Antidot/Zellgift-Systems *ccdA/ccdB* erreicht. Das Antidot *ccdA* (218bp) wird in die Plasmid DNA eingebaut und das bakterielle Toxin *ccdB* (305bp) in das Bakterien-Chromosom,

sodass ein Plasmid-Verlust einen Zelltod zur Folge hat. Daneben werden im pSCherry2-Vektor produzierte Proteine über ein rotes Polypeptid sichtbar und die Konzentration kann bei spezifisch 413 nm gemessen werden. Nach der Aufreinigung kann dieser Cherry-Tag mit einer Enterokinase wieder abgespalten werden. Der pSCodon1.2-Vektor fungiert als Kontrolle, das exprimierte Protein enthält kein Cherry-Tag.

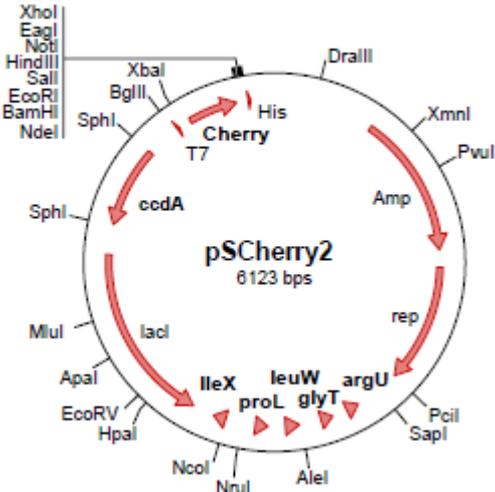


Abbildung 5: pSCherry2; Quelle: Delphi Genetics SA

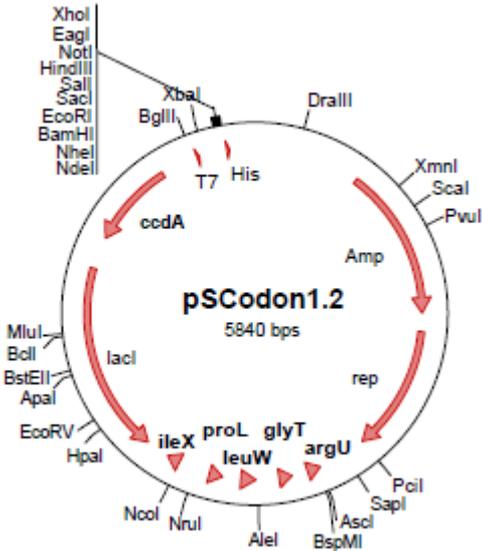


Abbildung 6: pSCodon1.2; Quelle: Delphi Genetics SA

4.1.2 Bakterien

4.1.2.1 H.pylori-Stämme

H. pylori G27: Patienten-Isolat aus dem Grosso Krankenhaus (Toskana, Italien) (Baltrus et al. 2009)

H. pylori 26695: Patienten-Isolat aus Großbritannien, 1997 sequenziert (Tomb et al. 1997)

4.1.2.2 E. coli Stämme

Klonierungsstamm:

DH5 α (Hanahan, 1983):

fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17

Expressionsstämme:

M15 DZ291 (D. Stüber, F. Hoffmann-La Roche Ltd.):

NaIS, StrS, RifS, Thi., Lac., Ara+, Gal+, Mtl., F., RecA+, Uvr+, Lon+.

BL21 Codon Plus (NOVAGEN, Bad Soden):

BF-, *ompT*, *hsdS*(rB-mB-), *dcm*+, Tetr, *gal*, λ (DE), *endA*, Hte, [*argU*, *proL*, Camr], [*argU*, *ileY*, *leuW*, Strep/Specr]

BL21 Arctic Express (NOVAGEN, Bad Soden):

B F- *ompT* *hsdS*(rB – mB –) *dcm*+ Tetr *gal* λ (DE3) *endA* Hte [*cpn10* *cpn60* Gentr]

4.1.3 Antikörper

ANTI-IgG Monoclonal Antibody human anti human IgG:HRP; Fa. Abd Serotec (Verwendung als zweiter Antikörper in Western Blot- und ELISA-Systemen zur Detektion von humanen IgG-Antikörpern)

4.1.4 Häufig verwendete Puffer und Medien

Alle Puffer und Medien wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

4.1.4.1 Puffer

1x PBS:

137 mM NaCl

1,5 mM KH_2PO_4

4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

2,6 mM KCl

pH 7,4

1x TBS:

20 mM Tris Base

150 mM NaCl

pH 7,4 (HCl)

1x TAE:

40 mM Tris Base

1 mM EDTA

0,7% (v/v) Essigsäure (100%)

pH 7,0 (NaOH)

4.1.4.2 Lösungen für den Western Blot

2x SDS-PAGE Auftrags-Puffer:

10% (w/v) Glycerin

5% (v/v) β -Mercaptoethanol

2% (v/v) SDS

0,01% (w/v) Bromphenolblau

1,25 M Tris HCl, pH 6,8

10x SDS-Lauf-Puffer:

3,03 g 0,025 M Tris/HCl

15,01 g 0,2 M Glycin

1 g 0,1% (w/v) SDS

1 Liter H₂O

10x Transfer-Puffer:

142,6 g Glycin

30,28 g Tris/HCl

1 g SDS

800 ml H₂O

1x Sammel-Gel:

1,06 ml H₂O

0,39 ml Protogel (30% Acrylamid/Bis Solution)

0,49 ml Sammel-Gel-Puffer

0,010 ml 10% APS

0,010 ml TEMED

1x Trenn-Gel:

2,43 ml H₂O

2,02 ml Protogel (30% Acrylamid/Bis Solution)

1,5 ml Trenn-Gel-Puffer

0,020 ml 10% APS

0,020 ml TEMED

SDS-PAGE Sammelgel-Puffer:

2 g 0,4% (w/v) SDS

30,29 g 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

500 ml H₂O

SDS-PAGE Trenngel-Puffer:

2 g 0,4% (w/v) SDS

90,86 g 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

500 ml H₂O

4.1.4.3 Lösungen für die Protein Aufreinigung

Lyse-Puffer:

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

pH 8,0

Wasch-Puffer:

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

20 mM Imidazol

pH 8,0

Elutions-Puffer:

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

250 mM Imidazol

pH 8,0

4.1.5 Bakteriennährmedien

LB-Agar:

0,5% (w/v) NaCl

0,5% (w/v) Hefeextrakt

1,0% (w/v) Trypton

1,5% (w/v) Agar

pH 7,4 (NaOH)

Das Gemisch wird autoklaviert und danach bei einer Temperatur von ca. 50°C Antibiotikum (z.B. Ampicillin, Kanamycin) hinzugegeben; danach Gießen in Kulturschalen und Lagerung bei 4°C.

LB-Medium:

1,0% (w/v) Trypton

0,5% (w/v) Hefeextrakt

1,0% (w/v) NaCl

pH 7,4 (NaOH)

Das Gemisch wird autoklaviert und danach bei einer Temperatur von ca. 50°C Antibiotikum (z.B. Ampicillin, Kanamycin) hinzugegeben. Lagerung bei 4°C.

4.1.6 Chemikalien

Bei dieser Doktorarbeit verwendete Chemikalien stammten von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) und Applichem (Darmstadt). Ausnahmen werden angegeben.

4.1.7 Geräte

8-Kanal-Pipette Fa. Abimed

Abzug Fa. Köttermann

ÄKTA Purifier Fa. GE Healthcare

Autoklav Fa. KSG

Autoklaven-Indikatorband Fa. 3M

Bakterienkulturschalen Fa. Schubert&Weiss

Bakterienschüttler (für *E. coli* Kultur) Fa. Gerhardt

Brutschrank Fa. Heraeus

Brutschrank mit HEPA-Filter für *H. pylori* Kultur Fa. Forma Scientific Inc.

Einmalküvetten halbmikro 1,5ml Fa. Brand GmbH

Einmalspritzen (1, 5, 10, 30ml) Fa. Codan Medical

Eisbad Fa. Neolab

Eismaschine Fa. Scotsman

Elektrophoresesystem (XCell™ Sure Lock)

ELISA-Reader Fa. Thermo Labsystems

Filmkassetten Fa. Kodak

Filmentwickler Hyperprocessor Fa. Amersham Biosciences

FPLC-Anlage; Äkta-Purifier Fa. GE Healthcare

Gefrierschrank -20 °C Fa. Liebherr

Gefrierschrank -80 °C Fa. GFL

Glasflaschen mit Schraubverschluss etc.) Fa. VWR

Glasgeräte (Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Messzylinder

Glas-Pasteurpipetten 150mm Volac

Heizbarer Magnetrührer Fa. IKA

Kolbenhubpipetten mit Zubehör Fa. Gilson

Konische Zentrifugationsröhrchen (15, 50ml) Fa. BD Labware

Kryoröhrchen (1,5ml) Fa. Nalgene

Kühlbare Zellkulturzentrifuge Fa. Hettich

Kühlschrank 4-8 °C Fa. Bosch

Laborfeinwaage Fa. Sartorius Analytic

Laborwaage Fa. Kern

Latex-Untersuchungshandschuhe Fa. Kimberly-Clark

Mikrowellengerät Fa. Siemens
mit Zubehör Fa. Invitrogen
Multipipette (Multipette plus) Fa. Eppendorf
Netzgerät für Gelelektrophorese und Western Blot Fa. BioRad
Nitril-Untersuchungshandschuhe Fa. Kimberly-Clark
Orbital-Schüttler (für *H. pylori* Kultur) Fa. Peqlab
PCR-Reaktionsgefäße 0,2ml Fa. Biozym
pH-Elektrode Fa. Neolab
pH-Meter Fa. WTW
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten Fa. Biozym Scientific
Pick-Tip (Fa. Süd-Laborbedarf)
Plastik-Drygalskyspatel (steril) Fa. VWR
Reaktionsgefäßständer Fa. Neolab
Rundbodenröhrchen 5ml mit Deckel für
Safe Lock Reaktionsgefäße (0,5; 1,0; 2,0ml) Fa. Eppendorf
Schüttel-Heizwasserbad Fa. GFL
Serologische Pipetten (1, 2, 5, 10, 25ml) Fa. BD Labware
Spitzen für Multipipette (0,5; 5ml) Fa. Eppendorf
Sterilbank mit S2 Zertifikat + Zubehör Fa. BDK
Sterilfilter 0,2 µl Fa. Nalgene
Stickstofftank Fa. MVE Cryogenics
Stieltupfer (steril) Fa. Lohmann&Rauscher
Thermomixer Fa. Eppendorf
Thermocycler Fa. Biometra
Tisch-Kühlzentrifuge Fa. Eppendorf
Tischzentrifuge Fa. Eppendorf
Tischzentrifuge Hettich Zentrifuge Mikro 22R
Ultraschall-Desintegrator mit Mikrospitze Fa. Branson

Ultrazentrifuge Fa. Beckman

UV/Vis Spektrophotometer Fa. Eppendorf

UV-Küvetten (steril, pyrogenfrei) 50-2000 µl Fa. Eppendorf

Verschlussfolie (Parafilm) Fa. Pechiney Plastic Packaging

Vortex Schüttler Fa. Bender&Hobein AG

Western-Blot System (XCell™ II Blot Module)

Zellstofftücher Fusselfrei Fa. Kimberly-Clark

4.2 Methoden

4.2.1 Mikrobiologische Methoden

4.2.1.1 Autoklavierung

Glaswaren und chemische Lösungen, die hitzestabil waren, wurden bei 121 °C und 2 bar für 20 min autoklaviert. Waren Lösungen hitzelabil, wurde sie in Stammlösungen angesetzt und durch Membranfilter oder Spritzenvorsatzfilter filtriert.

4.2.1.2 Kultivierung von *H. pylori*-Stämmen

Für die Gewinnung von *H. pylori*-DNA und -Proteinen wurden Glycerinstocks der Stämme G27 und 26695 aufgetaut und steril auf eine vorgewärmte Agarplatte ausgestrichen. Nach der Ernte mit einem sterilen Wattestäbchen wurden die Kolonien in 500 µl 37 °C warmes Flüssigmedium (1,5 ml große Eppendorfgefäße) überführt. Abschließend wurde die Bakteriensuspension auf fünf neue Agarplatten ausgestrichen.

4.2.1.3 Herstellung von Glycerinstocks

Stämme von *E.coli* wurden bei 37°C unter Schütteln bei 125 bzw. 230 rp m inkubiert. Falls in den Bakterien plasmidkodierte Antibiotikaresistenzen vorhanden waren, wurde das entsprechende Antibiotikum hinzugegeben. Nach Ausplattieren auf Agarplatten und Inkubation bei 37°C wurden Einzelkolonien angezogen. Für eine längerfristige Lagerung wurden Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurde ein Aliquot einer über Nacht-Kultur im Verhältnis 1:1 mit 87% Glycerin versetzt und anschließend nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

4.2.1.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden in einem Erlenmeyerkolben 250 ml TYM Medium mit einer 50 ml ü.N.-Kultur gemischt, auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 wurden die Bakterien 30 min auf Eis gestellt, in 50-75 µl Aliquots pipettiert und für 8 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets mit 10 ml TfB-I-Puffer resuspendiert und erneut für 8 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Abschütten des Überstandes wurde das Pellet in 10 ml TfB-II-Puffer resuspendiert und entweder nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff in 100 µl-Portionen in Eppendorfgefäßen bei -80°C gelagert oder direkt für eine Transformation genutzt.

4.2.1.5 Zucht und Konservierung von E.coli-Stämmen

Um die in der Arbeit verwendeten *E.coli*-Stämme langfristig zur Verfügung zu haben, wurden Glycerinstocks angefertigt. Hierfür wurden die gewünschten Stämme bei 37 °C im flüssigen Medium samt Antibiotikum (sofern eine Antibiotikaresistenz vorhanden war) kultiviert und auf Agarplatten ausgestrichen. Anschließend wurde ein Aliquot einer ü.N.-Kultur im Verhältnis 1:1 mit 87% Glycerin versetzt und nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff im Tiefkühlschrank bei -80 °C gelagert.

4.2.1.6 Transformation chemisch kompetenter E. coli Zellen

Ein Aliquot (75 µl) chemisch kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und anschließend 2-10 µl Ligationsansatz bzw. 50-100 ng Plasmid-DNA hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis wurden die Zellen für 45 s bei 42°C einem Hitzeschock im Wasserbad ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen wieder direkt auf Eis gelegt. Nach 5 min wurde 900 µl vorgewärmtes LB-Medium ohne Antibiotikum hinzugegeben und der Ansatz zur Inkubation ca. 30-60 Minuten bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Danach wurde das inkubierte Medium 5 min bei 3800 rpm zentrifugiert, der Überstand abgekippt, das Pellet in 100 µl resuspendiert, auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Alternativ wurde die Transformation durchgeführt, indem 10 µl 5-fach konzentriertes KCM mit 1 µl Plasmid und 50 µl kompetente Bakterien vermischt wurden. Nach 20 min auf Eis wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert, der weitere Verlauf nach Zugabe von 900 µl LB-Medium erfolgte wie bei der oben beschriebenen Hitze-Schock-Variante.

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1 Mini- Präparation: Isolierung von Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden 5 ml einer *E.coli* ü.N.-Kultur bei RT und 4000 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurde der Isolierungsvorgang durch das Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System von Promega laut Anleitung des Herstellers erzielt. Die gewonnene DNA (1-2 µg) wurde in 30 µl Wasser eluiert, die Konzentration mittels Spectrophotometer gemessen (4.2.2.3) und anschließend bei -20°C eingefroren.

4.2.2.2 Midi-Präparation: Isolierung von Plasmid-DNA zu präparativen Zwecken

Falls größere Mengen von Plasmiden notwendig waren, wurde eine Midi-Präparation durch das Pure Yield Plasmid Kit von Promega nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die gewonnene DNA, meist 10-20 µg wurde anschließend in 600 µl Wasser eluiert, die Konzentration mittels Spectrophotometer gemessen und anschließend bei -20°C eingefroren.

4.2.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentrationen

Nach einer Plasmidaufreinigung wurde die DNA mittels des Spectrophotometer NanoDrop ND-1000 (Fa. Thermo Scientific) bei 260 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt. Als Standard wurde gegen Wasser (1,5 µl) gemessen.

Formel des Lambert Beerschen Gesetzes: $\Delta E = \epsilon_{\text{mol}} \times c \times d$

ΔE : Im Photometer gemessene Extinktion

ϵ_{mol} : Molarer Extinktionskoeffizient in $\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

c: Konzentration der chemischen Verbindung in mol/L

d: Schichtdicke der Küvette in cm

4.2.2.4 Ermittlung der Primer

Nachdem die für den Lineblot gewünschten Antigene ausgewählt waren, wurden die

jeweiligen Sequenzen aus den *H. pylori*-Stämmen G27 und 26695 von der Datenbank NCBI bezogen. Es wurden ca. 20-30 bp lange DNA-Bereiche am Beginn und Ende der Zielgene ausgewählt und ihre biochemischen Eigenschaften mit den Programmen NEBCutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) und Oligocalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) untersucht. Es wurde darauf geachtet, dass der Anteil an Guanin und Cytosin, welcher neben der Primer-Länge wesentlich für die Schmelztemperatur ist, über 40% liegt. Die Schmelztemperatur lag meist zwischen 50 und 65°C. Self-Annealing und Hairpin-Konstellationen wurden ausgeschlossen und das komplette Konstrukt mittels pDRAW auf einen möglichen Frameshift untersucht. Die Primer wurden bei MWG Eurofins im gefriergetrockneten Zustand bestellt und nach Resuspension in einer 10 pmol/µl-Verdünnung eingesetzt.

4.2.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur *in vitro* Amplifikation definierter DNA-Stücke mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase. Sie erlaubt den schnellen und empfindlichen Direktnachweis kleinster Mengen von DNA oder RNA. Die PCR beruht auf der zyklischen Wiederholung von drei Schritten. Sie beginnt mit der Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge. Anschließend lagern sich synthetische Oligonukleotide (Primer) an die flankierenden Enden des zu amplifizierenden Genbereiches (Annealing). Im dritten Schritt, ausgehend von den Primern und mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase sowie der vier Desoxynukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), geschieht die eigentliche Polymerisierung (Neubildung) der doppelsträngigen DNA. Mit jedem Zyklus wird die DNA zwischen den beiden Primern verdoppelt.

Die Reaktionen wurden in 50 µl Volumen mit 100 ng DNA, jeweils 50 pmol der Primer und Fidelity Tag Master Mix durchgeführt. Die Temperaturen während der einzelnen Phasen gestalteten sich meist folgendermaßen:

1. Denaturierung 95 °C 2 min
2. Denaturierung 95 °C 30 s
3. Annealing TA °C 30 s
4. Extension 72 °C 2 min

5. Extension 72°C 10min

6. Abkühlung 4°C ∞

Der zweite bis vierte Schritt wurde 30-35 mal wiederholt. Anschließend wurde das Ergebnis der PCR auf einem 1%-Agarosegel überprüft.

4.2.2.6 Kolonie-PCR

Bei der Kolonie-PCR wird überprüft, ob sich der gewünschte Vektor in der untersuchten Bakterien-Kolonie befindet. Der Unterschied zu regulären PCR besteht in der Verwendung von Einzelkolonien, die dann im ersten Schritt bei 95°C lysiert werden. Die Kolonien wurden hierfür sorgfältig mit Pipettenspitzen von den Kulturplatten abgepickt und mit 50 µl destilliertem Wasser resuspendiert. Von dieser Suspension wurden anschließend 2,5 µl dem PCR Ansatz hinzugefügt. Falls die PCR positiv ausfiel, konnte mit der verbliebenen Suspension für die weitere Verwendung 5 ml LB-Medium angeimpft werden.

4.2.2.7 Agarosegelelektrophorese

Bei dieser Methode werden unterschiedlich lange DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Hiermit kann zum einen eine abgelaufene Spaltung einer DNA nachgewiesen, und zum anderen ein aufgetrenntes Fragment zum weiteren Gebrauch eluiert werden. Für die Herstellung eines Agarosegels wurde Agarose in 0,5x TAE-Puffer in 1% (w/v) Konzentration durch Aufkochen vollständig gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde bei ca. 40-50°C 0,2 µl einer Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) pro 10 ml Agaroselösung hinzugegeben und die Lösung in eine Gelkammer mit Kamm (je nach Größe des Ansatzes 8 – 20 Kammern) gegossen. Nach ca. 30 min wurde das nun ausgehärtete Gel in ein der Größe entsprechendes Elektrophoresesystem transferiert. In dem nun netzartig aufgebauten Gel konnte die negativ geladene DNA bei Anlegung einer Spannung entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Den zu untersuchenden DNA-Proben wurde 1/10 Vol DNA-Proben-Puffer hinzugefügt und die Ansätze vorsichtig in die Geltaschen pipettiert; zur späteren Identifikation der Größe der Banden wurde noch ein Standard (Blue Ladder) hinzugefügt. Anschließend wurde die Elektrophorese i.d.R. bei 85 V für etwa 30 min durchgeführt. Danach wurden die Banden unter UV-Licht (Wellenlänge 302 nm) detektiert, mit Hilfe des Molecular Imager Gel Doc XR System (Fa. BioRad) dokumentiert und bei Bedarf mit ausgeschnitten und eluiert (4.2.2.8).

4.2.2.8 Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung und Aufreinigung der DNA wurden die Banden unter UV-Licht detektiert, mit einer Pipette und einem Pick-Tip aus dem Agarosegel ausgestochen und anschließend mit einem entsprechendem Kit nach Herstellerangaben gereinigt („Wizard SV Gel and PCR Cleanup System Kit— (Promega) oder „GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit— (GE Healthcare)).

4.2.2.9 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die aufgereinigte DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen gespalten. Falls zwei verschiedene Restriktionsenzyme zur Spaltung notwendig waren, wurde nach Herstellerangaben ein Puffer ausgesucht, bei dem beide Enzyme gut funktionieren. Anschließend fand eine Überprüfung des Ergebnisses mittels Agarosegelelektrophorese statt.

4.2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten zu einem zusammenhängenden Genkonstrukt wurde das zuvor aus dem Agarosegel extrahierte Insertfragment in einem zwei- bis sechsfachen molaren Überschuss zum Vektorfragment hinzugefügt. Die Ligation wurde in T4-Ligase-Puffer mit 2 U T4-Ligase für mind. 10 Stunden bei 16°C in einem Volumen von 10 µl durchgeführt. Anschließend konnte der Ansatz zur Transformation in Klonierungs- oder Expressionsvektoren benutzt werden.

4.2.2.11 DNA Sequenzierung

Um festzustellen, ob eine Ligation und/oder anschließende Transformation funktioniert hatte, wurden die klonierten Genkonstrukte durch die Firma Eurofins MWG Operon sequenziert. Die abgegebenen Proben mit einem Gesamtvolumen von 15 µl enthielten je nach Probe 750-1000 ng DNA und jeweils 10 pmol eines Sequenzierungs-Primers, wodurch die DNA linear amplifiziert wurde. Die von der Firma MWG erhaltenen Sequenzen wurden mit Online-Programmen analysiert und mit den Sequenzen der entsprechenden Gene verglichen.

4.2.3 Analytische Methoden

4.2.3.1 Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Zu Beginn werden die Proteine mit Hilfe des Detergenzes Natriumdodecylsulfat

(SDS) denaturiert und negativ geladen. Ein (negativ geladenes) SDS-Molekül bindet ungefähr an jede zweite Aminosäure und überdeckt somit die Eigenladung der Proteine mit seiner negativen Ladung. Durch die Siebstruktur der Polyacrylamidmatrix findet anschließend eine Auftrennung nach Größe statt. Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt (Verhältnis 1:4, 4x SDS-Puffer) und bei 95°C für 3-5 min erhitzt. Nach einer kurzen Abkühlungsphase wurde die Elektrophoresekammer mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt und der Ansatz (je nach Taschengröße 10-20 µl) in die Taschen der vorbereiteten Gele (meist 12%) pipettiert. Nach nochmaligem Auffüllen der Elektrophoresekammer mit Laufpuffer wurde die Elektrophorese bei konstanter Spannung von 170V für eine Stunde durchgeführt.

4.2.3.2 Färbung von SDS-Gelelen

Die Proteine können nach der Auftrennung in der Elektrophorese mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G 250 detektiert werden, indem man sie ca. 15 min in der Farbstofflösung schwenkt und anschließend durch wiederholtes Auswaschen und Schwenken im Wasserbad entfärbt. Die Nachweisgrenze beträgt ca. 0,2-0,5 µg pro Bande.

4.2.3.3 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots lassen sich bestimmte Proteine aus größeren Gemischen (z.B. Zell- oder Gewebelysat) identifizieren und auch in gewissem Maße quantifizieren. Ebenso lassen sich Antikörper-Antigen-Reaktionen nachweisen. Der Western Blot wurde bei folgendem Aufbau durchgeführt: In die WB-Apparatur wurden als erstes an die Anode zwei in Transferpuffer angefeuchtete Schwämme gelegt. Hierauf kam ein auf Gelgröße geschnittenes Whatman-Filterpapier, auf welches direkt das SDS-Gel folgte. Auf das Gel wurde die zuvor in Transferpuffer eingelegte PVDF-Membran platziert und der Aufbau mit Whatman-Filterpapier und angefeuchteten Schwämmen so fertiggestellt, dass die WB-Kammer voll war. Abschließend wurde die WB-Apparatur fest verschlossen, in die WB-Kammer eingestellt und mit Transferpuffer aufgefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 230 mA für 90 min durchgeführt.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde die Membran für ca. 60 min in 3-5 %-Magermilchpulver/TBS-Lösung geblockt und anschließend 1 h mit der Lösung des ersten Antikörpers inkubiert. Diese bestand meist aus humanem oder immunisiertem murinen Serum, welches zuvor 1:100 mit Milchpulverpuffer verdünnt wurde. Nach dreimaligem Waschen mit TBS oder 1%-TBST für 5 min fand die Inkubation von 1h mit einem, zur Detektion mit einem Enzym (in diesem Fall Meerrettichperoxidase, Engl.: HRP =

horseradish-peroxidase) gekoppelten, zweiten Antikörper (Verdünnung 1:3000, gleiche Milchpulverlösung) statt. Nach erneutem dreimaligem, fünfminütigem Waschen (1%-TBST oder TBS) wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien in einer lichtschützenden Klapp-Box 5 min mit ca. 5 ml SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat Lösung (Fa. Thermo Scientific) inkubiert und in den Dunkelraum zum Filmentwickler transportiert. Die Belichtungszeit wurde je nach Bedarf und Stärke der Bande austariert und lag meist zwischen 5 und 120 s.

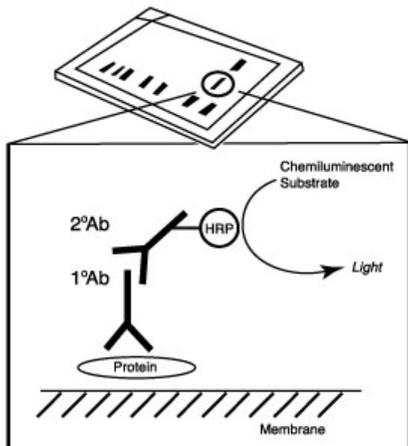


Abbildung 7: Prinzipieller Aufbau eines Western-Blots. Ein erster Antikörper bindet an ein, auf eine Membran fixiertes Protein. Im nächsten Schritt bindet ein zweiter Antikörper mit angebundener Horseradish-Peroxidase an den ersten Antikörper. Nach Hinzugabe eines chemolumineszenten Substrates kann der zweite Antikörper sichtbar gemacht werden. Hierdurch wird nun indirekt auch die Bindung des ersten Antikörpers an das membrangebundene Protein erkennbar. Quelle: www.kollewin.com

4.2.3.4 Mikrogen Immunoblot *Helicobacter* IgG/IgA

Die untersuchten Patienten-Seren wurden alle mit dem „Immunoblot *Helicobacter* IgG/IgA“ der Firma Mikrogen GmbH getestet. Dieser Test wurde stets nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt: Alle Reagenzien wurden auf RT gebracht und die Teststreifen in 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer eingelegt. Nach Hinzugabe von 20 (IgG) bzw. 40 (IgA) µl Probe oder Kontrolle, inkubierte der Ansatz 1 h auf dem Schüttler. Anschließend folgte dreimaliges, fünfminütiges Waschen mit Waschpuffer des Herstellers. Dann wurde wieder 45 min auf dem Schüttler mit 2 ml Konjugatlösung inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde 1,5 ml Substratlösung hinzugegeben und erneut 5-10 min auf dem Schüttler inkubiert, bis die Positiv-Kontrolle gut sichtbar war. Abschließend wurden die Streifen noch drei Mal mit deionisiertem Wasser gewaschen und mindestens 2 h bis zur Auswertung zwischen saugfähigem Papier gelagert. Die sich darstellenden Banden wurden abgelesen und der Score mittels einer Liste des Herstellers ermittelt. Das Maximum an erreichbaren Punkten ist 37. Ab einer Punktzahl von 13 gilt die Probe als positiv, unter 11 Punkten als negativ.

„Lysatblot“ bezeichnet in dieser Arbeit immer das kommerzielle Kit.

Nr. No.	Erkannte Banden Antigen bands											Beurteilung Interpretation				
	Antigen	120	67	62	58	54	47	33	29	28	25	19	Σ	negativ negative	fraglich borderline	positiv positive
	IgG	5	2	1	1	2	5	5	3	4	4	5		≤ 10	11 – 12	≥ 13
	IgA	5		1	2					3				≤ 2	3 - 4	≥ 5
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																

Abbildung 8: links: Tabelle zum Eintragen der Punktwerte der einzelnen Banden des Immunoblot *Helicobacter* von Mikrogen, unter „Beurteilung“ wird, an Hand der Höhe des Scores, eingetragen, ob eine Probe positiv oder negativ ist; rechts: Kontrollstreifen einer komplett positiven Serumprobe, Hilfe zum Ablesen der getesteten Streifen

4.2.3.5 Mikrogen Lineblot Prototyp

Bei den Testreihen mit dem Lineblot Prototyp wurden die Komponenten einzeln geliefert, da zum Durchführungszeitpunkt noch kein kommerzieller Test angeboten wurde. Der eigentliche Ablauf des Testes entsprach sehr genau dem Lysatblot (4.2.3.4), mit Ausnahme der unterschiedlichen Test-Streifen. Die Auswertung erfolgt über das Ablesen der sechs Banden, die jeweils verschiedene Proteine repräsentieren. Je nach Stärke der Bande werden 0,5, 1 oder 2 Punkte vergeben, sodass ein Maximum von 12 Punkten erreichbar ist. Details zur Auswertung und Durchführung des Tests sind im Ergebnisteil dargestellt. Dieser Test wird in dieser Arbeit als „Lineblot“ bezeichnet.

4.2.3.6 ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Beim ELISA handelt es sich um ein immunologisches Detektionssystem. Platten werden mit den nachzuweisenden Antigenen beschichtet, welche dann durch spezifische Antikörper im Serum erkannt werden. Die gebundenen Antikörper werden in einem zweiten Arbeitsschritt mittels eines Antikörper-Konjugats (meist HRP) detektiert und anschließend über Photometrie quantifiziert.

Zu Beginn wurde eine ELISA-Platte mit 96 Wells über Nacht mit 2 µg Protein / ml PBS bei

einem Volumen von 100 µl pro Well im Kühlschrank inkubiert (Coating). Für das Coating im gGT-Elisa dieser Arbeit wurde eine Konzentration der gGT von 1:300, 1:600 und 1:900 verwendet. Am nächsten Tag wurde die Platte mittels ELISA-Waschgerät drei Mal gewaschen und anschließend mit 200 µl PBS und 1 % BSA pro Well 2 h bei 37°C inkubiert (alternativ 5 % Milchpulverpuffer). Nach erneutem Waschen wurde das zu untersuchende Serum in aufsteigender Verdünnung (Anfangsverdünnung 1:33 oder 1:100) auf 150 µl Puffer in jeweils 2 Wells pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschvorgang wurden 100µl pro Well des 2. Antikörpers (Anti-human IgG; 1:5000 oder 1:10000) hinzugefügt und erneut 1h bei 37°C inkubiert. Nach einem letzten Waschen wurden die Ansätze 10-20 min (je nach Reaktionsgeschwindigkeit) mit TMB inkubiert und mit 1 M H₂SO₄ abgestoppt (50µl pro Well). Anschließend erfolgte die Auswertung mit einem ELISA-Reader.

4.2.3.7 Mikrogen ELISA recomwell Helicobacter

Die in der Arbeit durchgeführten ELISA mit dem Mikrogen-Kit „recomwell Helicobacter“ wurden nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die mit CagA und GroEL beschichteten ELISA-Platten wurden mit den zu testenden Seren bzw. Kontrollen befüllt. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei 37°C und viermaligem Waschen erfolgte die Inkubationszeit mit dem zweiten, im Kit enthaltenen, Anti-IgG-Antikörper von 30 min bei 37°C. Nach wiederholtem viermaligem Waschen wurde ein gebrauchsfertiges Substrat zugegeben. Nach 12 min wurde die Reaktion mit H₃PO₄ abgestoppt und die Extinktion bei 450 nm gemessen. Anschließend erfolgte Auswertung an Hand der Cut-off-Proben.

4.2.4 Proteinchemische Methoden

4.2.4.1 Proteinherstellung im analytischen Maßstab – Textexpression

Vor der Durchführung von Expressionen im größeren Maßstab (präparativ), wurden Testexpressionen vorgeschaltet um die Funktionalität der Vektoren und Expressionsbakterien zu sichern. Hierfür wurden 5 ml LB-Medium (einschließlich Antibiotikum) mit, in der Kolonie-PCR positiven Bakterien inokuliert und bei 37°C über Nacht in den Schüttler gestellt. Mit Hilfe dieser Kultur wurden weitere 10 ml LB-Medium angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C geschüttelt. Induziert wurde die Expression dann durch 0,5-1 mM IPTG (die zu exprimierenden Gene lagen meist in Vektoren der pQE2Tri-Serie (Qiagen) vor und wurden daher durch das mit IPTG induzierbare lac-Operon kontrolliert). Zur Kontrolle wurde vor der Induktion eine Null-Probe von 30 µl für ein SDS-Gel genommen. Nach 4 h Inkubationszeit wurden die Zellen zentrifugiert (4000 rpm; 10 min, 4°C), der Überstand abgekippt und in 1 ml Lyse-Puffer

resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend nach Zugabe von 1 mM Lysozym (40 µl aus 50 mM-Stock) und 30 minütiger Inkubation in einer Ultraschallbehandlung mit dem Sonifier aufgeschlossen (6 mal 10 s mit jeweils 5 s Pause). Während der kompletten Sonifizierung befand sich die Probe auf Eis. Anschließend wurden die Proben in der vorgekühlten Tischzentrifuge zentrifugiert (10000g; 25 min; 4°C) und der Überstand in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert. Die im Pellet zurückgebliebenen unlöslichen Zellbestandteile wurden in 1 ml Lyse-Puffer resuspendiert und ebenso wie 30 µl des löslichen Zellextrakts aus dem Überstand mit 4xSDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden anschließend einer SDS-PAGE unterzogen und die daraus entstehenden Banden analysiert.

4.2.4.2 Proteinherstellung im analytischen Maßstab - Testreinigung

Um aus dem löslichen Überstand der Testexpression die exprimierten Proteine in erhöhter Konzentration zu erhalten, wurde eine Testreinigung durchgeführt. Die Reinigung erfolgte nach einem Ni-NTA Spin Kit von Qiagen für Proteine mit 6fachem His-tag und funktionierte mit Hilfe von Ni-NTA-Säulen, welche die exprimierten Proteine spezifisch binden.

4.2.4.3 Proteinherstellung im präparativen Maßstab

Nachdem ein positives Ergebnis in der Testreinigung erzielt werden konnte, wurde bei den jeweiligen Klonen eine Reinigung im größeren Maßstab durchgeführt. Hierfür wurden 3L-Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 wurde die Expression des Proteins mit 1mM IPTG induziert. Für die spätere Darstellung der Protein-Bande im SDS-Gel wurde vorher noch eine Nullprobe der Kultur entnommen. Nach 4h wurde die Kultur aus dem Schüttler genommen und für 15min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in Tris-Puffer aufgenommen und nach Hinzufügen von 1mM Lysozym durch Sonifikation aufgeschlossen. Um die Proteine vom Rest des entstandenen Zell-Lysats zu trennen, wurde das Gemisch erneut für 30 min bei 4°C und 15000 rpm in die Zentrifuge gestellt. Der erhaltene Überstand wurde auf Eis gelagert.

4.2.4.4 Rückfaltung unlöslicher Proteine

Um unlösliche Proteine wieder löslich zu machen, wurden die Pellets der unlöslichen Proteine nach der Expression in 30 ml Tris-Puffer auf Eis resuspendiert. Für die Lösung der Proteine von der Membran wurden sie anschließend mit einem Sonifier (8 x 30 s, Amplitude 50%) aufgeschlossen. Danach wurde bei 12500 rcf und 4°C für 30 min zentrifugiert und der

Überstand abgekippt. Zu dem erhaltenen Pellet wurden 15 ml, 4 M Guanidin Lösung (2,5 mM DTT) hinzugefügt und die Resuspension wurde 2 h im Kühlraum gerührt. Nach nochmaligem Zentrifugieren für 15 min bei 15000 rcf und 4°C wurde der Überstand langsam in einen Liter HEPES-Puffer getropft. Die Rückfaltung erfolgte unter ständigem Rühren über Nacht im Kühlraum.

4.2.4.5 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist ein Verfahren, welches zur Aufreinigung eines bestimmten Proteins aus einem Proteingemisch dient. Das Proteingemisch läuft über eine Säulenmatrix, an der verschiedene chemische Gruppen exponiert sind. In dieser Arbeit wurde die Affinitätschromatographie an der ÄKTA Purifier über His-Trap FF crude Säulen durchgeführt. Die gesuchten Zielproteine hatten über ihren Expressionsvektor am C-terminalen Ende eine Histidinkette erhalten, welche nun selektiv an die Nickel-Ionen binden konnte. Nachdem die Proteine an die Säule gebunden hatten, wurden sie mit einem steigenden Imidazol-Gradienten eluiert. Das Imidazol besitzt ebenfalls eine hohe Bindungsaffinität zu Nickel-Ionen und verdrängt das Protein kompetitiv. Vor jedem Lauf oder nach zweimaliger Benutzung wurde die Säule wieder mit Nickel-Ionen nach diesem Schema beladen:

1. Auftragsschlauch A1 und Säule mit H₂O spülen
2. Säule mit 20 ml 0,5 M EDTA spülen, um alte Nickel-Ionen zu entfernen (Strippen)
3. Säule mit 100 ml 0,5 M NaCl spülen, um das EDTA abzuwaschen
4. Säule mit 2 Säulenvolumen (SV) 0,1 M NiSO₄ spülen
5. Säule mit 100 ml 0,5 M NaCl spülen, um ungebundene Nickel-Ionen abzuwaschen
6. Equilibrieren der Säule mit Laufpuffer 100 mM Tris, pH 7,5, 500 mM NaCl

Die Reinigung erfolgte bei 4°C nach folgender Methode:

Flussrate 2 ml/min

Äquilibrieren 2 SV 100 mM Tris, 10 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7,5

Beladen 30-60 ml Proteinlösung in 100 mM Tris, 10 mM Imidazol,

500 mM NaCl, pH 7,5 mittels Auftragspumpe

Waschen 10 SV 100 mM Tris, 10 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7,5

Eluieren 15 SV Gradient von 10-1000 mM Imidazol in 100 mM Tris, pH 7,5,

500 mM NaCl; es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt.

Äquilibrieren 2 SV 100 mM Tris, 10 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7,5

Abschließend konnte die Elution bei einer Absorption von 280 nm verfolgt werden. Um das Ergebnis zu bestätigen wurde anschließend noch eine SDS-PAGE durchgeführt.

4.2.5 Statistische Methoden

4.2.5.1 Spezifität und Sensitivität

Ein einfacher statistischer Test, um Aussagen über die Validität eines Testsystems zu machen, benötigt zwei Informationen: Die Ergebnisse des zu untersuchenden Testsystems und die eines Standards, der Anspruch auf ein sicheres Ergebnis hat. Letzterer wird auch als Goldstandard bezeichnet. Anschließend kann man die Ergebnisse des zu untersuchenden Tests und des Standards z.B. in einer Vierfeldertafel auftragen und bestimmte statistische Kennwerte errechnen.

So ist die Sensitivität der Anteil an wirklich Positiven, die auch vom zu untersuchenden Test als positiv erkannt wurden. Eine niedrige Sensitivität weist somit auf einen hohen Anteil an falsch negativen Ergebnissen hin.

Die Spezifität beschreibt den Anteil an wirklich Negativen, die auch vom zu untersuchenden Test als negativ erkannt wurden. Eine niedrige Spezifität weist somit auf einen hohen Anteil an falsch positiven Ergebnissen hin (Altman and Bland, 1994b).

4.2.5.2 Prädiktive Werte

Der Wert eines diagnostischen Tests liegt vor allem in seiner Aussage darüber, ob ein möglicher Befund vorliegt oder nicht. Daher ist es hilfreich, die Wahrscheinlichkeit zu kennen, mit der ein Testergebnis wirklich zutrifft oder nicht. Hier helfen die prädiktiven Werte (Tabelle 1). Der positive prädiktive Wert oder auch positive predictive value (PPV) gibt den Anteil an Patienten mit positivem Testergebnis wieder, die auch in Wirklichkeit positiv sind.

Der negative prädiktive Wert oder auch negative predictive value (NPV) gibt den Anteil an Patienten mit negativem Testergebnis wieder, die auch in Wirklichkeit negativ sind. Auch bei diesen Werten werden die Ergebnisse des zu untersuchenden Testes an einem Goldstandard gemessen (Altman and Bland, 1994a).

		Goldstandard		Gesamt
		negativ	positiv	
Zu untersuchender Test	neg	A	C	A+C
	pos	B	D	B+D
	Gesamt	A+B	C+D	A+B+C+D
Sensitivität	$D/C+D$		PPV	$D/B+D$
Spezifität	$A/A+B$		NPV	$A/A+C$

Tabelle 1: Schema einer Vierfeldertafel; Angabe der Berechnung der statistischen Werte

4.2.5.3 Receiver Operating Characteristic (ROC)

Die Receiver Operating Characteristic Kurve ist ein Weg, visuell die Effizienz mit der Fehlerrate eines Testes zu vergleichen. Man erhält eine ROC-Kurve durch Auftragen der Sensitivität gegen 1-Spezifität. Ein Test, der perfekt zwischen diesen Gruppen unterscheiden könnte, hätte eine Kurve, die auf der Y-Achse nach oben (Trefferquote von 100) und anschließend bei einer Sensitivität von 1 waagrecht verlaufen würde. Ein Test mit nur falschpositiven Ergebnissen würde demgegenüber erst auf der X-Achse und dann bei 1-Spezifität = 1 senkrecht nach oben verlaufen. ROC-Kurven nahe der Diagonalen deuten auf einen Zufallsprozess hin, hier entspricht die Häufigkeit von Treffern der Häufigkeit von falschpositiven Ergebnissen. Einen Eindruck über die Güte eines Tests gibt die Fläche unter der ROC-Kurve, auch AUC genannt (area under the curve). Diese Fläche entspricht der Wahrscheinlichkeit, dass eine beliebige Person mit Krankheit einen höheren Testwert hat, als eine beliebige Person ohne Krankheit. Für einen unbrauchbaren Test wäre diese Wahrscheinlichkeit 50%, entsprechend einem Münzwurf.

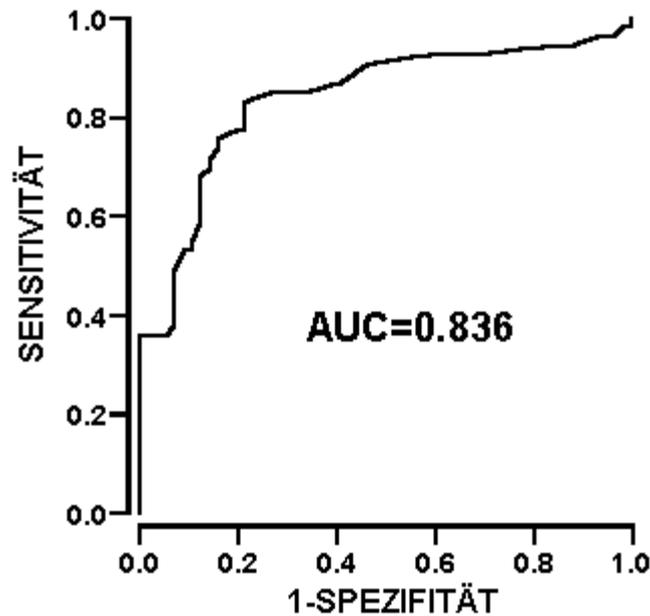


Abbildung 9: Beispiel für eine ROC-Kurve eines validen Tests mit Angabe der AUC (Area under the curve)

4.2.5.4 Konfidenzintervall

Das Konfidenzintervall beschreibt die Präzision der Lageschätzung eines Parameters. Das Intervall gibt mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit (Konfidenzniveau) den Bereich um den geschätzten Wert an, in dem der wahre Wert wirklich liegt. Ein breites Intervall lässt auf eine kleine Stichprobenanzahl oder einen sehr variablen Testparameter schließen. Wird, wie auch in dieser Arbeit, ein Konfidenzniveau von 95% gewählt, so bedeutet dies, dass das angegebene Intervall bei 95 von 100 zufällig gewählten Stichproben den richtigen Wert enthält.

4.2.5.5 p-wert

Der p-wert (auch Signifikanzwert) ist eine Kennzahl bei der Auswertung statistischer Tests. Er liegt immer zwischen 0 und 1 und gibt an, wie glaubhaft das erhaltene Stichprobenergebnis ist, wenn die Nullhypothese wahr ist. Er ist somit ein Maß für die Glaubhaftigkeit der Nullhypothese. Je kleiner der p-Wert, desto mehr spricht das Ergebnis gegen die Nullhypothese. Üblicherweise wird ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ oder $p < 0,01$ gewählt. Wird die Nullhypothese verworfen, so kann ein Testergebnis als statistisch signifikant betrachtet werden.

5 Ergebnisse

5.1 Klonierungs-Ergebnisse

5.1.1 Auswahl und Herkunft der Antigene

Bei der Auswahl der Antigene für den neuen Lineblot spielten verschiedene Faktoren eine Rolle. Hier war vor allem eine hohe Prävalenz der ausgewählten Proteine bei *H. pylori* ein wichtiges Kriterium, um mit dem Test möglichst alle Infektionen zu erfassen. Ebenso waren Hinweise auf einen Zusammenhang von Antigenen mit wichtigen *H. pylori*-assoziierten Krankheitsbildern wie die aktiv-chronische Gastritis, das distale Magenkarzinom oder das MALT-Lymphom interessant. Die gut erforschten Proteine CagA und VacA treten in virulenten Stämmen auf (Kuipers et al., 1995). UreA, NapA, GroEL spielen eine Rolle bei der Kolonisation des Magens durch *H.pylori* (Kavermann et al., 2003; Momynaliev et al., 2005). Weiterhin zeigte eine Studie, dass die Antikörper gegen CagA, VacA, HcpC und GroEL bei gleichzeitigem Auftreten mit einem 18-fach höheren Erkrankungsrisiko für die chronisch atrophische Gastritis assoziiert werden (Gao et al., 2009).

Die Proteine CagA, VacA (nur die m1 Region, s. 3.1.4.4), UreA und GroEL wurden in aufgereinigter Form von der Mikrogen GmbH bereitgestellt. Die vorliegenden Konstrukte pMal_HcpC (Prof. Dr. Mittel, Universität Zürich) und pQE2Tri_HpgGT (Christian Bolz, AG Gerhard, Klinikum Rechts der Isar) wurden exprimiert und aufgereinigt. Die Proteine NapA, Omp1, Omp11, Omp15 wurden im Rahmen dieser Arbeit kloniert, NapA konnte auch exprimiert und aufgereinigt werden. Dies geschah jedoch nicht rechtzeitig für die Herstellung des Prototyps, so dass NapA in einem nächsten Schritt dem Lineblot zugefügt wird.

Somit enthält der in dieser Arbeit getestete Prototyp die Antigene CagA, VacA, GroEL (p58), UreA, HcpC und gGT.

5.1.2 Klonieren der ausgewählten Gensequenzen

Die Gensequenzen der im Fokus stehenden Proteine wurden von der Online-Datenbank NCBI bezogen. Als DNA-Quelle wurden je nach Vorkommen der jeweiligen Proteine die *H. pylori*-Stämme 26695 oder G27 verwendet. Anhand der Genome der beiden Stämme (Tomb et al., 1997; Baltrus et al., 2009) wurden Primer für die Amplifikation der Zielproteine entworfen. Die Primer wurden so ausgewählt, dass die gesamte kodierende Proteinsequenz eines Proteins amplifiziert wurde.

Protein	Primer forward	Primer reverse
Omp 1	5' ATGGATCCTTTACTCTCTCTCTCTCGC 3'	5' TATCTCGAGGTAAGCAAACACATAATTCAAATACA 3'
Omp11	5' ATGGATCCAATTGCTTGTATTTTAA GCTTGAGC 3'	5' TATCTCGAGGAAA GTAAAGACATAATCCACATAC 3'
Omp15	5' ATGGATCCTGTAGCTTTAGGGCTTCTATC 3'	5' TATCTCGAGAAAAGTGTA GTTATACCCCAAATAAA 3'
NapA	5' ATCCCGGAAATTTTAAAAACATTTGCAAGCGGA 3'	5' ATCTCGAGAGCCAAATGGGCTTCTAGCAT 3'

Abbildung 10: Verwendete forward und reverse Primer der klonierten Proteine

Nach der Amplifikation mittels PCR konnten die erhaltenen Sequenzen in einem Agarosegel erkannt und zugeordnet werden (Abbildung 11).

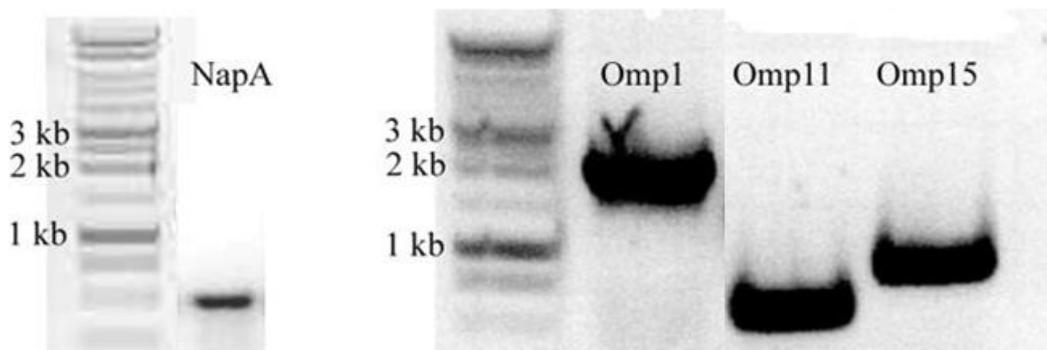


Abbildung 11: Agarosegele der amplifizierten DNA-Fragmente; NapA (~435 bp), Omp1 (~1,98kb), Omp11 (540bp), Omp 15 (780 bp)

Die erhaltenen Fragmente wurden anschließend in einen liniarisierten pGEM-T Vektor ligiert, in *E.coli DH5α* Bakterien transformiert und Minipreps angefertigt.

In der nun erhöhten Konzentration wurden die erhaltenen Inserts in den bereits mit BamHI/XhoI verdauten Expressionsvektor pQE2Tri ligiert. Für die spätere Aufreinigung via Affinitätschromatographie besitzt dieser Vektor einen N-terminalen Strep-Tag und einen C-terminalen His-Tag. Die Konstrukte pQE2Tri_NapA und pQE2Tri_Omp11 konnten in einem Testverdau nachgewiesen werden.

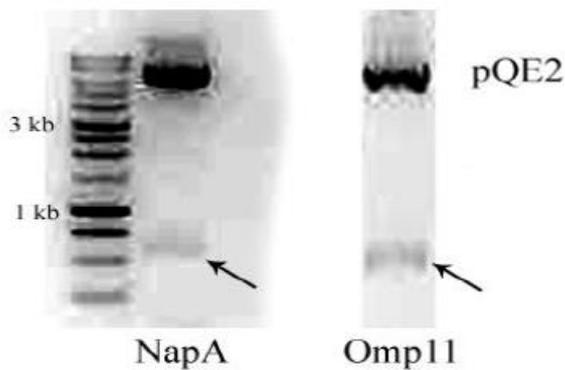


Abbildung 12: Agarosegel der mit BamHI/XhoI für 2h bei 37°C verdauten Konstrukte pQE2_NapA und pQE2_Omp11

Trotz vieler Versuche und Variation der Klonierungsstrategie konnte im Rahmen dieser Arbeit von Omp1 und Omp15 kein nachweisbares Konstrukt in einem Expressionsvektor kloniert werden. So konnte beispielsweise neben pQE2 auch bei den Expressionsvektoren pSCodon und pSCherry2 kein Konstrukt nachgewiesen werden.

5.1.3 Expression der rekombinant hergestellten Konstrukte

Nach positiver Sequenzanalyse wurde das Konstrukt pQE2Tri_NapA in den Expressionsstamm *E. coli* M15 DZ291 transformiert und durch Kolonie-PCR bestätigt. Bei dem Konstrukt pQE2Tri_Omp11 war die Sequenzierung nicht vollständig, die Anfangs- und Endsequenzen fehlten. Dies ließ bereits annehmen, dass die für die Aufreinigung benötigten Tags nicht mitexprimiert werden würden. Das Konstrukt wurde dennoch probeweise exprimiert. Ebenso durchgeführt wurden Expressionen der bereitgestellten Konstrukte pQE2Tri_HpgGT und pMal_HcpC.

Vor der Expression im größeren Maßstab wurde eine Testexpression der Proteine durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Proteine löslich im Zytoplasma oder unlöslich in der Zellmembran des Expressionsbakteriums waren. Dies ist wichtig, da unlösliche Proteine vor der Aufreinigung noch aus Inclusion Bodies gereinigt und rückgefaltet werden müssen. Lösliche Proteine hingegen bedürfen keiner zusätzlichen Schritte. Die Detektion erfolgte mittels SDS-Gel und Western Blot.

Die Konstrukte wurden über Nacht kultiviert und zur Proteinproduktion induziert. Das Ergebnis der Expression wurde mit einer SDS-PAGE des Überstands überprüft. In diesem Schritt war bei den Proteinen HcpC und HpgGT eine Bande erkennbar, was auf deren Löslichkeit rückschließen ließ. Die Proteine NapA und Omp11 wurden in der SDS-Page im Pellet gefunden und erschienen somit als unlöslich. Dies ließ sich auch durch Variation der

Expressionsbedingungen (Temperatur und Expressionsdauer, Konzentration an IPTG) nicht ändern. Daher wurden diese Proteine aus Inclusion bodies isoliert und nach Denaturierung über Nacht mit dem *rapid dilution* Verfahren rückgefaltet (4.2.4.4). Anschließend wurde eine Reinigung der Proteine durchgeführt.

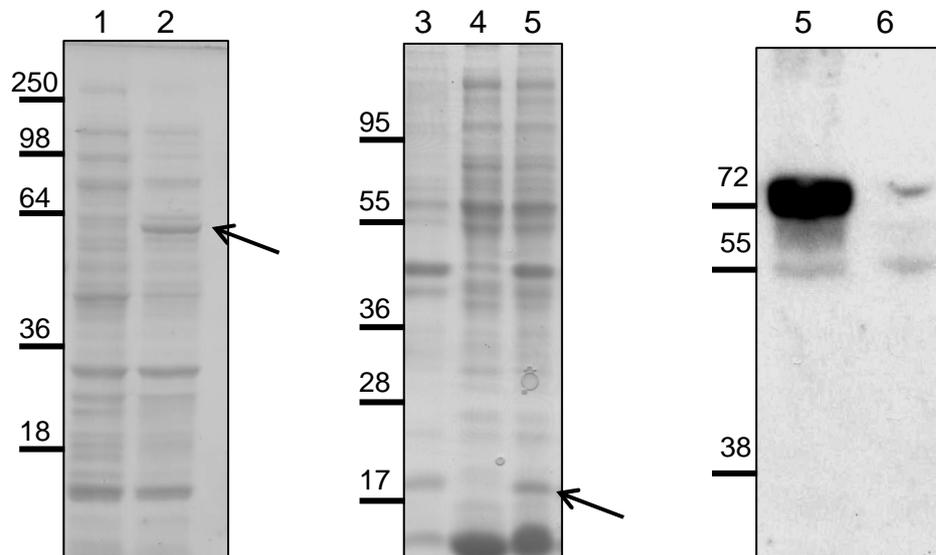


Abbildung 13: Testexpression. Links: gGt (60 kDa): Lane 1: vor Induktion; Lane 2: nach Induktion.
 Mitte: NapA (19 kDa): Lane 3: nach Sonifikation; Lane 4: Überstand; Lane 5: Pellet.
 Rechts: HcpC (76 kDa): Lane 5: nach Induktion; Lane 6: vor Induktion.
 Jeweils auf der linken Seite: Marker in kDa

5.1.4 Aufreinigung der Proteine

Für die Separation der Ziel-Antigene gGT, HcpC, NapA und Omp11 vom Rest der bakteriellen Proteine wurde eine Ni-NTA Säule benutzt.

Bei den löslichen Proteinen gGT und HcpC konnte nach dem Zellaufschluss der Überstand aus der Zentrifugation benutzt werden. Die Ni-NTA Säule wurde mit dem Überstand bei einer Flussgeschwindigkeit von 2ml/min beladen. Nach Waschen der Säule wurden die Proteine mit einem Imidazol-Gradienten eluiert. Die erfolgreiche Reinigung konnte durch die kontinuierliche Messung der Absorption bei 280 nm erkannt werden; überprüft wurden die Ergebnisse anschließend mit einer SDS-PAGE (Abbildung 14; Abbildung 15).

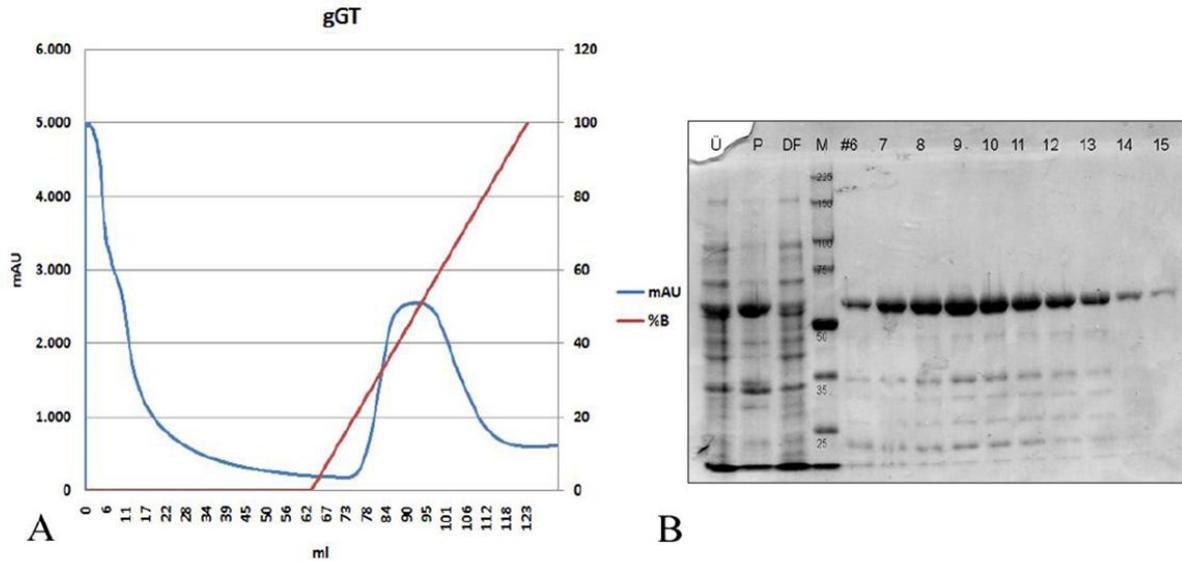


Abbildung 14: Ni-NTA-Aufreinigung des Proteins gGT; A: Absorption bei 280 nm (blau); Elution mit Imidazol-Gradient von 10-500mM (rot); B: SDS-PAGE: Ü: Überstand, P: Pellet, DF: Durchfluss, M:Marker, Protein-Fractionen 6-15

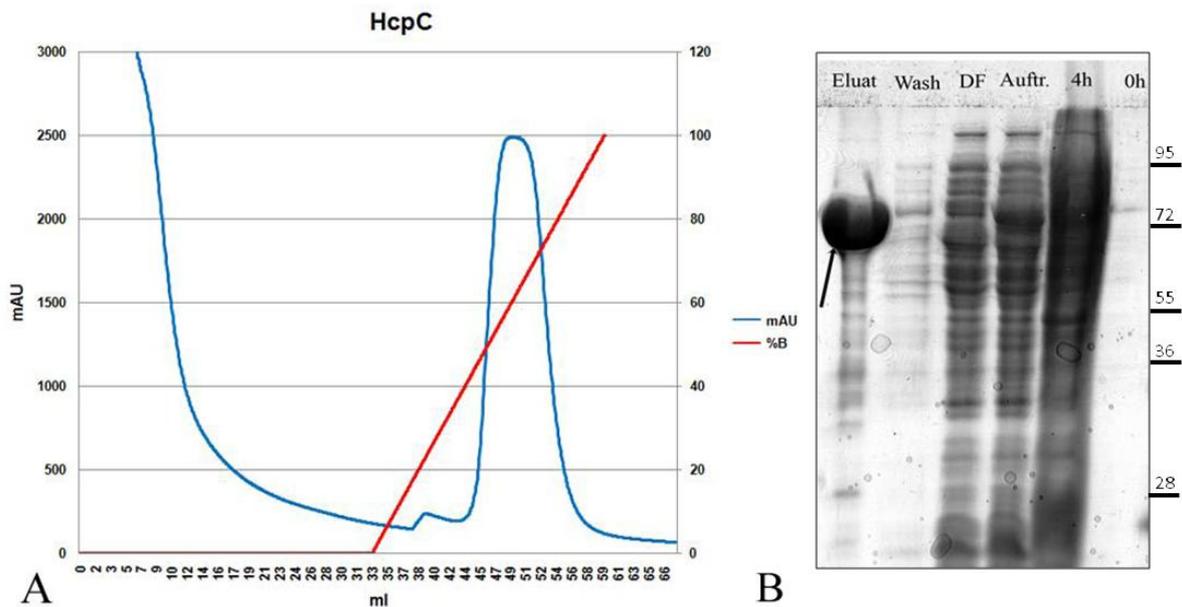


Abbildung 15: Ni-NTA-Aufreinigung des Proteins HcpC; A: Absorption bei 280 nm (blau); Elution mit Imidazol-Gradient von 10-500mM (rot); B: SDS-PAGE: Eluat, Waschschritt, DF: Durchfluss, Auftr.: Auftrag, 4h: induziert, 0h: nicht induziert, Marker: 17-95 KDa

Die für die Reinigung rückgefalteten Proteine NapA und Omp11 wurden im HEPES-Puffer mit einer Flussgeschwindigkeit von 5ml/min auf die Ni-NTA Säule aufgetragen. Danach wurde wie bei den löslichen Proteinen mit einem Imidazol-Gradienten eluiert. Bei dem Protein NapA konnte der gewünschte Elutionspeak erreicht werden (Abbildung 16). Die Reinigung von Omp11 führte zu keinem Ergebnis. Dies wurde wie schon angesprochen

(5.1.3) auf die fehlenden Randsequenzen in der Sequenzierung zurückgeführt, welche normalerweise den His-Tag beinhalten.

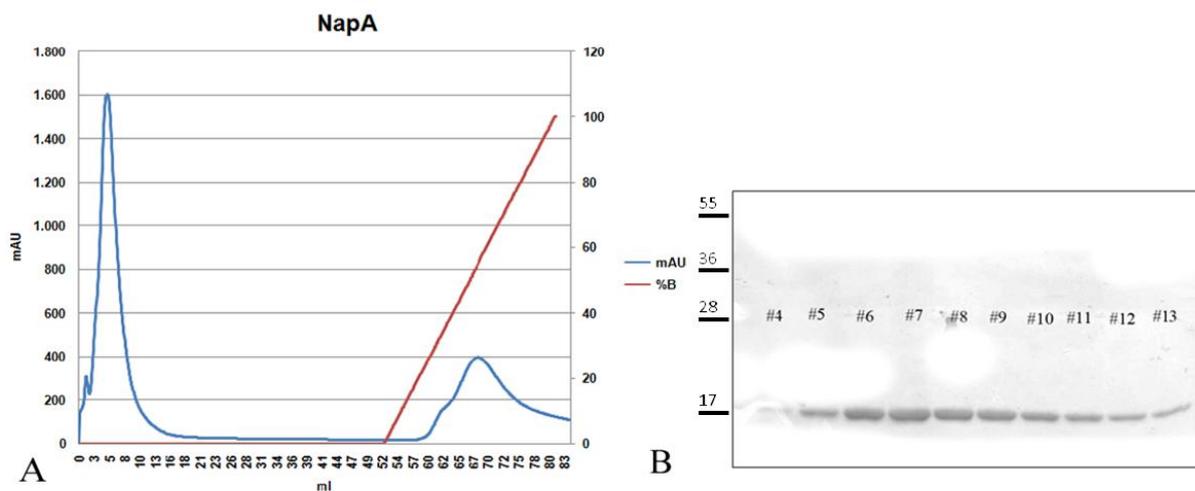


Abbildung 16: Ni-NTA-Aufreinigung des Proteins NapA; A: Absorption bei 280 nm (blau); Elution mit Imidazol-Gradient von 10-500mM (rot); B: SDS-PAGE: Marker: 17 – 72 KDa; Fraktionen 4-13

Nach der Aufreinigung standen somit 3 rekombinant hergestellte Proteine zur Verfügung, die zur Austestung der geeigneten Verdünnung für den Lineblot herangezogen werden konnten.

Proteine	Konzentration [mg/ml]	Volumen [ml]	Menge [mg]	Expressionsvolumen [ml]	Ausbeute [mg pro l Kultur]
NapA	0,66	2	1,3	2000	0,66
HcpC	0,5	2	1	3000	0,33
gGT	1,4	2	2,8	3000	0,93

Abbildung 17: Übersicht über die erfolgreich gereinigten Proteine

5.1.5 Test der aufgereinigten Proteine im Line Assay

Um sicher zu gehen, dass humane Antikörper auch wirklich an die hergestellten Proteine in aufliniierter Form binden, wurden nach der Aufreinigung Line Assays durchgeführt. Die Proteine HcpC und gGT (die Aufreinigung von NapA war zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen) wurden in verschiedenen Verdünnungen aufgetragen, um die optimale Konzentration für das später entwickelte kommerzielle Kit zu ermitteln. Zum Testen wurden Seren mit bekanntem Immunoblot-Ergebnis verwendet. Nach erfolgreichem Test wurden die neuen Proteine zusammen mit den bereits getesteten (CagA, VagA, UreA p58) der Mikrogen GmbH in die Herstellung des neuen Lineblots einbezogen.

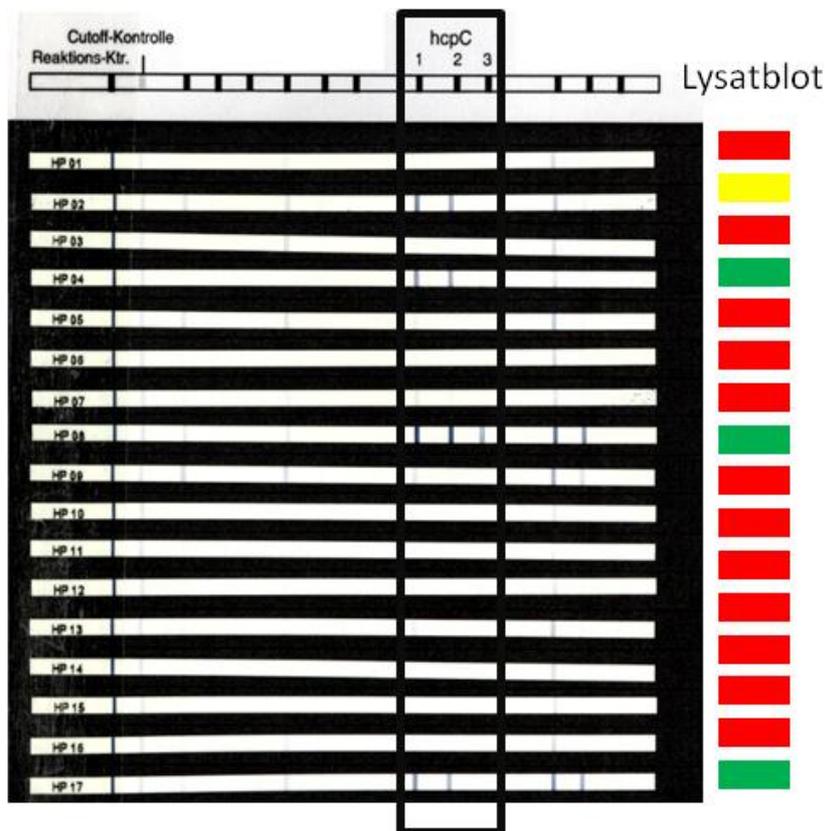


Abbildung 18: Line Assay von HcpC bei verschiedenen Verdünnungen: 1=166 µg/ml; 2=50 µg/ml; 3=5 µg/ml Rechts: Ergebnis des Lysatblots zum Vergleich: rot=negativ; gelb=fraglich; grün=positiv

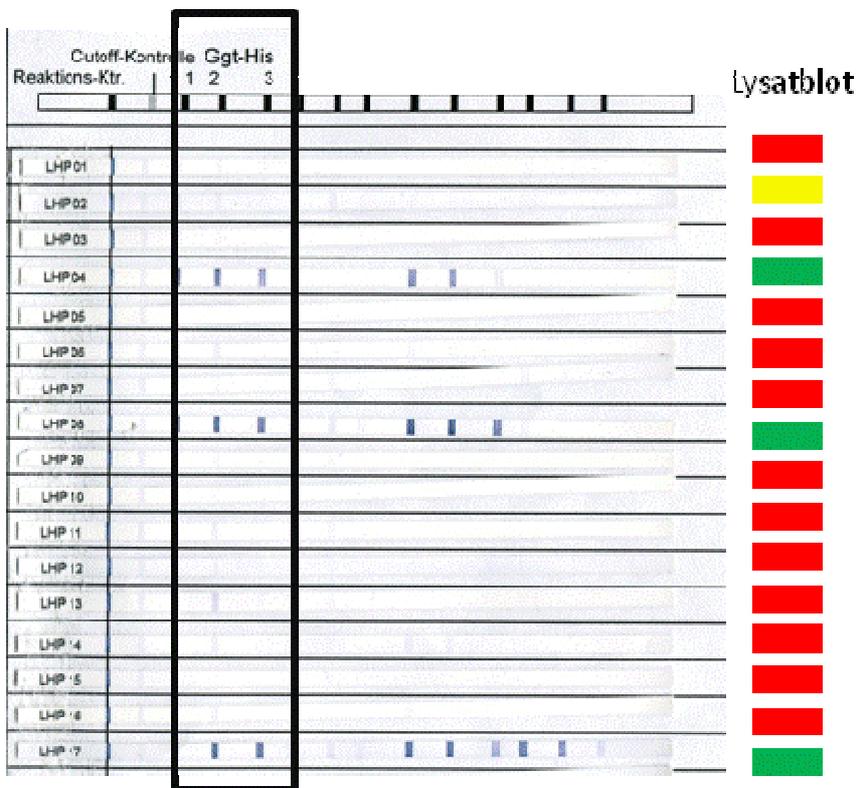


Abbildung 19: Line Assay von gGt bei verschiedenen Verdünnungen: 1=400 µg/ml; 2=240 µg/ml; 3=40 µg/ml. Rechts: Ergebnis des Lysatblots zum Vergleich: rot=negativ; gelb=fraglich; grün=positiv

5.2 Test des neu hergestellten Lineblots und Vergleich mit anderen diagnostischen Methoden

5.2.1 Verwendete Seren

Es wurden 122 Seren von Patienten aus der medizinischen Notaufnahme des Krankenhauses Rechts der Isar rekrutiert. Diese Seren wurden am gleichen Tag anonymisiert in einer Tabelle festgehalten, für 5 min bei 4000 U/min zentrifugiert und anschließend bei minus 20°C eingefroren. Mit diesen Seren wurden ausschließlich serologische Tests durchgeführt.

23 Seren wurden von Patienten aus dem Krankenhaus Rechts der Isar sowie dem Lehrkrankenhaus in Bogenhausen rekrutiert, von denen zusätzlich zum Serum während einer Gastroskopie eine Gewebeprobe zur histologischen Untersuchung entnommen wurde. Diese Patienten wurden vorher über die zusätzliche Entnahme von Magenbiopsien und einem Serum aufgeklärt. Bei diesen Patienten lagen jedoch Kontraindikationen vor, welche die Entnahme von nicht unbedingt medizinisch notwendigen Proben verboten. Somit lag lediglich das Ergebnis der Pathologie vor; eine kulturelle Anzucht konnte nicht durchgeführt werden.

Weiterhin wurden 44 Seren von Patienten aus dem Krankenhaus Rechts der Isar sowie dem Lehrkrankenhaus in Bogenhausen rekrutiert, von denen zusätzlich zum Serum (nach Aufklärung) während einer Gastroskopie Gewebeproben zur histologischen Untersuchung sowie zur kulturellen Anzucht entnommen wurden.

Insgesamt sechs Seren wurden nicht mit in die statistische Auswertung eingeschlossen. Dies waren allesamt Seren, bei denen die serologische Antwort dem histologischen Ergebnis widersprach und dies nicht überprüft werden konnte. In zwei Fällen mit positiver Histologie konnte entweder keine zweite Kontrolluntersuchung stattfinden, oder es konnte kein betreuender Arzt zum Ausschluss einer immunsuppressiven Erkrankung oder Therapie erreicht werden. In weiteren vier Fällen mit negativer Histologie konnte kein zuständiger Hausarzt gefunden werden und somit eine Eradikation, welche ein falsch positives Ergebnis erklären würde, nicht sicher ausgeschlossen werden.

In zwei Fällen wurde das primäre histologische Ergebnis in einer zweiten Färbung mit Whartin-Starry widerlegt. Die Histologie war in diesen Fällen primär je einmal falsch-positiv und falsch-negativ.

Zwei histologisch negative Fälle mit positiver Serologie wurden von der Pathologie bestätigt und sind in den Daten enthalten. Ebenso enthalten sind zwei Fälle mit positiver Histologie und negativer Serologie, bei deren Hausarzt keine Hinweise auf eine Immunsuppression vorlagen.

5.2.2 Pre-Screening der Proben mittels ELISA

5.2.2.1 ELISA als Screeningmethode

Für die ersten Tests wurde ein erhöhter Anteil an *H. pylori*-positiven Seren eingesetzt, um robustere Ergebnisse bei der statistischen Auswertung zu erzielen. Der ELISA wurde hierfür als Screeningmethode zur schnelleren Ermittlung von *H. pylori*-positiven Seren verwendet. Durch die gleichzeitige Testung von 92 Seren ist der ELISA dem Lysatblot bezüglich Umfang der gleichzeitig getesteten Seren überlegen, bei dem pro Testlauf nur 18 Seren getestet werden können. Zunächst wurde versucht ein Screening System zu etablieren, welches auf Basis des von der AG Gerhard rekombinant hergestellten Proteins gGT funktioniert.

5.2.2.2 Versuch Etablierung gGT-ELISA

Der prinzipielle Ablauf des ELISA erfolgte wie im Methodenteil beschrieben (4.2.3.6). Die Konzentration der Seren betrug 1:100. Als Proben zur Bewertung der Validität des ELISA wurden Seren verwendet, die im Immunoblot sehr starke oder kaum Reaktionen zeigten. Als sekundäre Antikörper fungierten Immunglobuline von Abd und Mikrogen (4.1.3). Um das Risiko für Pipettierfehler zu minimieren, wurde in Dupletts pipettiert.

Es stellte sich heraus, dass beim ELISA ein starker, z.T. auch sehr variabler Hintergrund bestand, der eine valide Differenzierung zwischen positiven und negativen Seren zunächst unmöglich machte (Tabelle 2).

Serum	Lysatblot-Score	Extinktion	Serum	Lysatblot-Score	Extinktion
108	0	0,661	104	31	0,8645
109	1	0,698	134	20	0,5735
110	2	1,377	137	37	1,0605
114	2	1,206	142	37	2,461
115	1	0,9545	159	27	0,79
Leerwert	0	0,059	161	32	1,958

Tabelle 2: 5 im Immunoblot negative sowie 6 positive Seren mit Angabe der Extinktion im ELISA und Lysatblot-Score; Antikörper: Abd-Ab; Verdünnung 1:3000

Um diesen Hintergrund zu reduzieren, wurden verschiedene Maßnahmen ergriffen. Zum Einen wurde die Konzentration des zweiten Antikörpers von anfangs 1:3000 auf bis 1:10000 hochverdünnt, zum Anderen wurde der Vorgang des Blockens variiert, von 1% bis 3% PBS-BSA, auch Milchpulver kam zum Einsatz. Zusätzlich wurden parallel immer Messungen im ELISA mit gGT und ohne gGT durchgeführt. Anschließend wurde die gemessene Absorption im Well ohne gGT von der mit gGT abgezogen, um alle unspezifischen Bindungen rechnerisch zu eliminieren (Tabelle 3). Dieses Vorgehen erleichterte die Diskriminierung zwischen positiven und negativen Seren.

Serum	Immunoblot-Score	Extinktion	Serum	Immunoblot-Score	Extinktion
108	0	-0,116	104	31	0,493
109	1	0,121	134	20	-0,046
110	2	0,2995	137	37	0,4725
114	2	-0,029	142	37	1,5025
115	1	0,0195	159	27	-0,065
Leerwert	0	0,0175	161	32	1,3925

Tabelle 3: 5 im Immunoblot negative sowie 6 positive Seren mit Angabe der Extinktion im ELISA (nach Abzug von Leerprobe) und Lysatblot-Score; Antikörper: Abd-Ab; Verdünnung 1:5000

Wenn man bei einer Extinktion von 0,2 den Cut-Off zwischen negativen und positiven Bereich setzt, erhält man bei fünf im Immunoblot negativen Proben einen falsch-positiven; von sechs im Immunoblot positiven Proben sind im ELISA zwei falsch-negativ.

Die erzielten Ergebnisse ließen sich im Western Blot bestätigen. Bei murinem Anti-gGT-Serum zeigten sich die zu erwartenden Banden. Bei den humanen Seren, die sich im Immunoblot als deutlich *H. pylori*-positiv darstellten, zeigten sich jedoch sehr differente Ergebnisse. Bei den im Immunoblot positiv getesteten Seren 134 und 137 zeigte sich keine Bande, beim ebenfalls positiven Serum 142 war hingegen eine deutliche Antigen-Antikörper-Reaktion erkennbar (Abbildung 20). Die kleinere Untereinheit der gGT wurde nur vom murinen Serum erkannt.

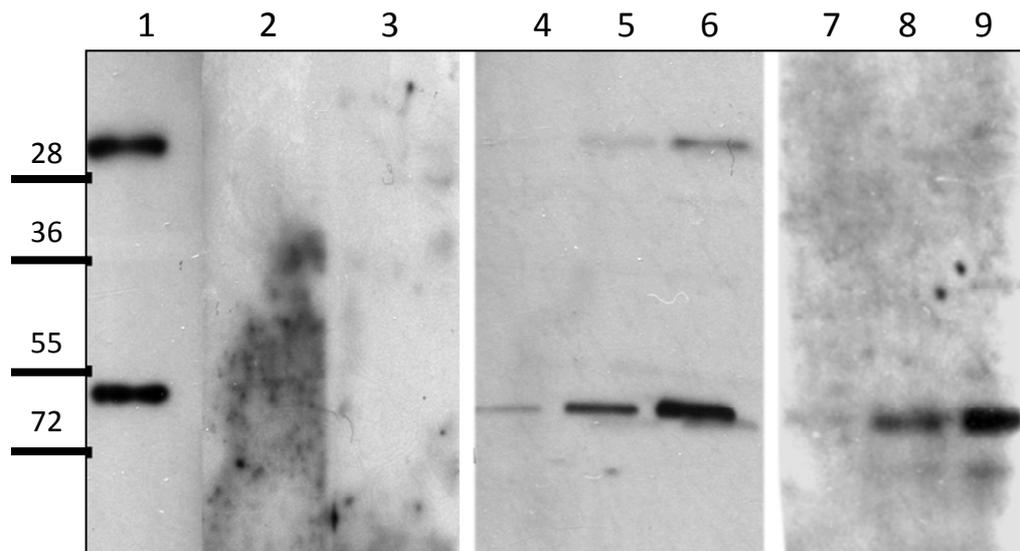


Abbildung 20: Lanes 1-3: Western Blot mit Mausserum (Lane 1) sowie den negativen Seren 134 (2) und 137 (3); Beladung des SDS-Gels: gGT, 4 μ g pro Lane. Lanes 4-6: Western Blot mit Maus-Serum. Lanes 7-9: Western Blot mit positivem Serum 142. Beladung des SDS-Gels mit ansteigender Konzentration von gGT (von links nach rechts jeweils: 0,4 μ g; 2 μ g; 4 μ g). Belichtungszeit: jeweils 10 sek.

Die mit dem gGT-ELISA erzielten Ergebnisse wurden, vor allem auf Grund der mehrfach festgestellten hohen falsch negativen Rate, als nicht ausreichend für die Nutzung als Screeningmethode im Rahmen dieser Arbeit erachtet.

5.2.2.3 Mikrogen ELISA

Um ein valides ELISA-Ergebnis zu erhalten wurde beschlossen, das Screening der Proben mit dem ELISA-Kit „recomWell Helicobacter IgG“ der Firma Mikrogen GmbH durchzuführen (im Folgenden ist mit "ELISA" immer dieses Kit gemeint). Dieses Kit basiert auf einem Coating mit CagA und GroEL. Eine ELISA-Platte kann mit 92 zu testenden Seren, je einer negativ- und positiv-Kontrolle sowie zwei Cut-off Proben bestückt werden. Bei der Auswertung wird der Absorptionsbereich, oberhalb dessen die Proben als positiv gewertet werden, über die Cut-off-Proben ermittelt.

Bei Seren, bei denen eine Histologie oder Kultur vorlag, wurden diese als Goldstandard festgelegt und es konnten statistische Kennwerte errechnet werden (4.2.5.1; 4.2.5.2).

Der ELISA stellte sich als ein sehr sensibler Test mit eher geringer Spezifität dar, der sich für ein Screening nach positiven Seren eignet, da nur ein von der Histologie als positiv gewerteter Patient serologisch fälschlicher Weise als negativ erkannt wurde (Tabelle 4).

		Histo		
		neg	pos	Gesamt
ELISA	neg	34	1	35
	pos	10	20	30
Gesamt		44	21	65
Sensitivität	95,2%		PPV	66,7%
Spezifität	77,3%		NPV	97,1%

Tabelle 4: Vierfeldertafel und statistische Werte des ELISA von Mikrogen; Goldstandard: positive Histologie oder Kultur; Seren: Alle, bei denen eine Histologie oder Kultur vorlag; Ausgenommen: ELISA-Werte im fraglichen Cut-Off-Bereich des ELISA (2 Seren)

Bei 115 Seren, bei denen kein Goldstandard vorlag, wurde die Korrelation zwischen dem ELISA und Lysatblot von Mikrogen untersucht (Tabelle 5). Auch hier detektiert der ELISA eine deutlich höhere Zahl positiv als der Lysatblot, was ein Hinweis auf eine höhere Spezifität des Lysatblots sein kann.

		ELISA		
		neg	pos	Gesamt
Lysatblot	neg	32	17	49
	pos	2	64	66
Gesamt		34	81	115

Tabelle 5: Vierfeldertafel Mikrogen ELISA im Vergleich mit Mikrogen Immunoblot; Seren: Alle, bei denen keine Kultur oder Histologie vorlag; Ausgenommen: Seren im fraglichen Cut-Off-Bereich des ELISA oder Immunoblot (7 Seren)

5.2.3 Ergebnisse der Magenbiopsien

5.2.3.1 Kultur

Im Rahmen der Kooperation mit dem Krankenhaus Bogenhausen sowie bei einigen Proben aus dem Krankenhaus Rechts der Isar wurde zusätzlich zur serologischen und histologischen Diagnostik eine kulturelle Anzucht auf Basis der Magenbiopsie durchgeführt. Bei diesen 44 Seren zeigte sich eine Spezifität von 100% bei einer Sensitivität von 50% bei Verwendung der Histologie als Goldstandard (Tabelle 6). Eine mögliche Ursache für die niedrige Sensitivität können unterschiedlich lange Liegezeiten vor Anzucht sowie der Transport von Proben aus dem Bogenhausener Klinikum ins Labor des Krankenhaus Rechts der Isar darstellen.

		Histo		
		Neg	pos	Gesamt
Kultur	neg	32	6	38
	pos	0	6	6
	Gesamt	32	12	44
Sensitivität	50,00%		PPV	100%
Spezifität	100%		NPV	84,20%

Tabelle 6: Vierfeldertafel und statistische Werte der H.p.-Kultur, Goldstandard: positive Histologie; Seren: Alle, bei denen Histologie sowie Kultur vorlagen

5.2.3.2 Histologie

Aus den Proben, bei denen eine Histologie vorlag, wurde die *H. pylori* Prävalenz sowie das Durchschnittsalter berechnet (Tabelle 7). Bei den insgesamt 67 Patienten mit Histologie bestand eine Prävalenz von 32,84% sowie ein Durchschnittsalter von 62,7 Jahren. Bei 33 getesteten Frauen und 34 getesteten Männern waren je 11 Seren *H. pylori* positiv. Die geschlechtsunabhängige Prävalenz liegt leicht unter einer an 6748 Personen in Deutschland durchgeführten Studie zur Prävalenz von IgG-Antikörpern gegen *H. pylori* (Seher et al., 2000). In der erwähnten Studie wurde eine Gesamt-Prävalenz von 40%, bei den 60-69 jährigen eine Prävalenz von 57,2 % ermittelt. Gründe für die niedrigere Prävalenz können vor allem in der Größe der Stichprobe, aber auch an der örtlichen Selektion (nur München) liegen, welches mit einem durchschnittlich höheren sozialen Status und somit niedrigerer Prävalenz verbunden ist.

Seren mit vorliegender Histologie				Altersverteilung	
		Histo-Ergebnis		20-29	1
		positiv	negativ	30-39	4
männlich	34	11	23	40-49	9
weiblich	33	11	22	50-59	15
Gesamt	67	22	45	60-69	12
				70-79	17
Durchschnittsalter		62,7		80-89	8
<i>H.pylori</i> -Prävalenz		32,84%		90-99	1

**Tabelle 7: Links: Angabe des Geschlechts, des Durchschnittsalters und der H.p.-Prävalenz von allen Patientenseren, bei denen eine Histologie vorlag
Rechts: Altersverteilung der getesteten Patienten**

Im Folgenden wird die Histologie, sofern vorhanden, als Goldstandard für die Errechnung der statistischen Werte angesehen.

5.2.4 Immuno-Lineblot

5.2.4.1 Aufbau des Systems

Für die Herstellung des neuen Blots wurden von der Firma Mikrogen GmbH folgende sechs Proteine auf einen Kunststoffstreifen geblottet: CagA, VacA, p58, UreA, HcpC, gGT. Der Vorgang der Inkubation (Serum und zweiter Antikörper) und des Waschens erfolgte nach Protokoll wie im Methodenteil beschrieben (4.2.3.5). Die Auswertung geschah durch Ablesen der Banden, denen je nach Intensität 0,5, 1 oder 2 Punkte zugeordnet wurden (Abbildung 21; Abbildung 22).

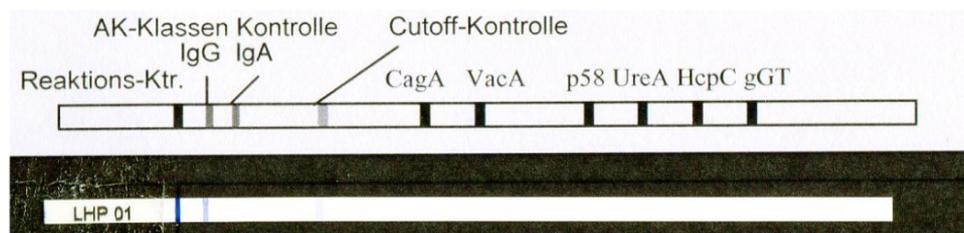


Abbildung 21: Neuer Immuno-Lineblot; oben: Schema bei vollständig positivem Serum; unten: Blot eines komplett negativ ausgefallenen Serums

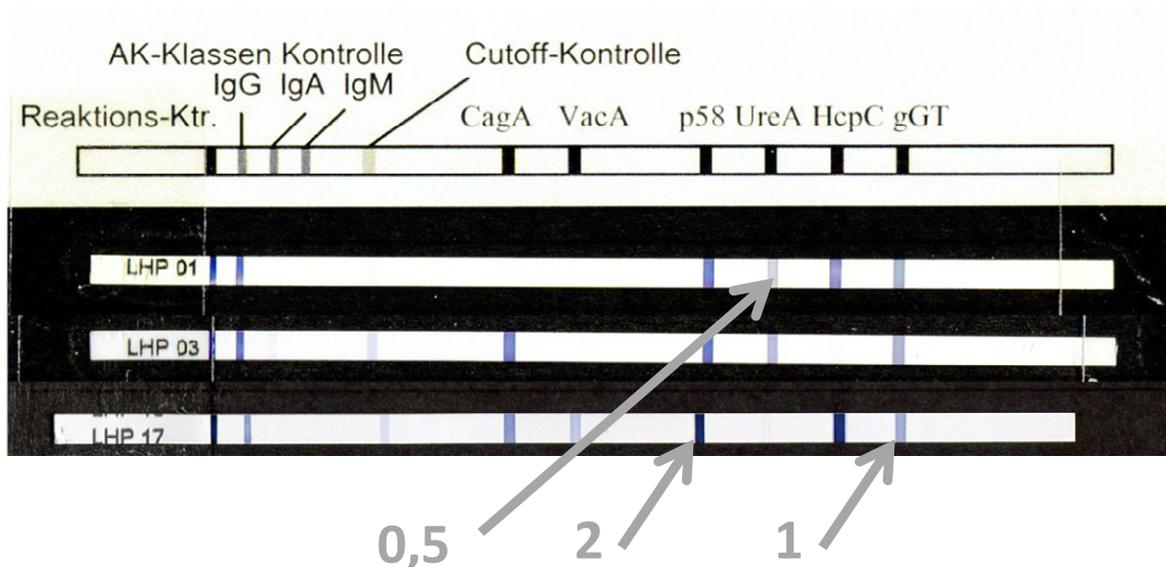


Abbildung 22: oben: Schema bei vollständig positivem Serum; unten: drei Beispiele für verschiedene H.p.-positive Seren; die roten Zahlen und Pfeile stellen jeweils ein Beispiel für die verschiedenen Punkte-Klassen dar

5.2.4.2 Ermittlung des Cut-Offs für den neuen Score

Zur Ermittlung des Cut-Offs für den neuen Lineblot-Score wurde eine Tabelle erstellt, in der für jeden möglichen Score-Wert die jeweiligen Sensitivität- und Spezifität-Werte errechnet wurden. Für die Berechnung der statistischen Werte wurde die Histologie als Goldstandard

verwendet. Die besten Werte wurden bei einem Score von 3 erreicht, sodass bei der Auswertung alle Seren mit einem Score von unter 3 als negativ, und alle Seren mit einem Score von mehr als 2,5 als positiv betrachtet wurden. Legt man den Cut-Off bei 3 fest, erhält man eine Sensitivität von 90,9% sowie eine Spezifität von 95,6% (Abbildung 23).

Positiv, wenn größer oder gleich	Sensitivität	Spezifität
-1,00	100,0%	0,0%
0,25	95,5%	35,6%
0,75	95,5%	46,7%
1,25	95,5%	62,2%
1,75	95,5%	75,6%
2,25	90,9%	84,4%
3,00	90,9%	95,6%
3,75	77,3%	95,6%
4,25	68,2%	97,8%
4,75	54,5%	97,8%
5,25	36,4%	100,0%
5,75	31,8%	100,0%
6,50	27,3%	100,0%
7,50	18,2%	100,0%
8,25	13,6%	100,0%
8,75	4,5%	100,0%
10,00	0,0%	100,0%

Abbildung 23: Sensitivität und Spezifität des Lineblots in Abhängigkeit eines möglichen Cut-Off-Wertes

5.2.5 Der neue Lineblot im Vergleich mit dem Lysatblot

Um einen Eindruck der Validität des neuen Lineblots zu erhalten, wurde er an Hand der Seren, bei denen eine Histologie vorlag, statistisch mit dem Lysatblot der Mikrogen GmbH verglichen (Tabelle 8; Tabelle 9). Insgesamt zeigten sich ähnliche Werte, wobei sich der Lineblot als etwas sensitiver darstellte.

		Histologie		Gesamt
		neg	pos	
Lysatblot	neg	43	3	46
	pos	2	19	21
	Gesamt	45	22	67
Sensitivität	86,40%	PPV		90,50%
95%-KI	65,1-97,1%	95%-KI		69,6-98,8%
Spezifität	95,60%	NPV		93,50%
95%-KI	84,9-99,5%	95%-KI		82,1-98,6%

Tabelle 8: Statistische Werte des Lysatblots von Mikrogen; Goldstandard: Histologie; Seren: Alle mit Histologie

		Histologie		Gesamt
		neg	pos	
Lineblot	neg	43	2	45
	pos	2	20	22
	Gesamt	45	22	67
Sensitivität	90,90%	PPV		90,90%
95%-KI	70,8-98,9%	95%-KI		70,8-98,9%
Spezifität	95,60%	NPV		95,60%
95%-KI	84,9-99,5%	95%-KI		84,9-99,5%

Tabelle 9: Statistische Werte des Lineblots; Goldstandard: Histologie; Seren: Alle mit Histologie

Um die Korrelation der beiden Blot-Systeme näher zu untersuchen, wurden die Scores gegeneinander aufgetragen (Abbildung 24). Es lässt sich erkennen, dass mit einem Ansteigen der detektierten Lysatblot-Banden ein höherer Score des Lineblots verbunden ist.

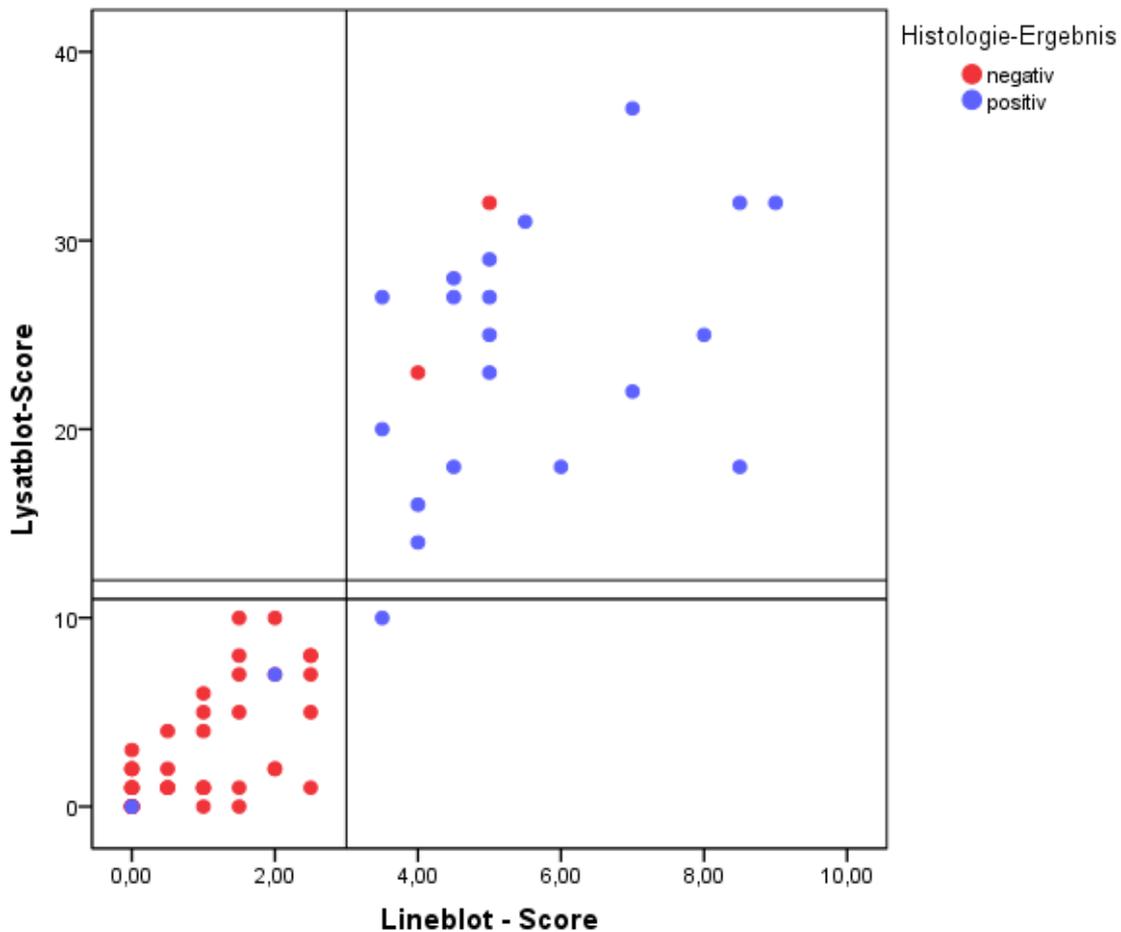


Abbildung 24: Korrelation von Lineblot- und Lysatblot-Score; farbliche Darstellung des Histologie-Ergebnisses; die schwarzen Linien markieren die Trennung zwischen positiven und negativen Werten (Lysatblot: 11-12; Lineblot: 3); Seren bei denen eine Histologie vorlag

Zur genaueren statistischen Auswertung wurde eine ROC-Kurve der beiden Tests mit Angabe der „Area under the Curve“ (AUC) sowie einem Konfidenzintervall von 95% berechnet. Es zeigten sich sehr ähnliche Ergebnisse, die zeigen, dass sowohl Line- als auch Lysatblot valide Testsysteme darstellen. Die p-Werte sind jeweils unter 0,001. Die AUC des Lineblots liegt mit 94% leicht über der des Lysatblots von 92,3% (Abbildung 25). Diese Fläche entspricht der Wahrscheinlichkeit, dass eine beliebige Person mit Erkrankung einen höheren Testwert hat, als eine beliebige Person ohne Erkrankung. Für einen unbrauchbaren Test wäre diese Wahrscheinlichkeit 50%, entsprechend einem Münzwurf.

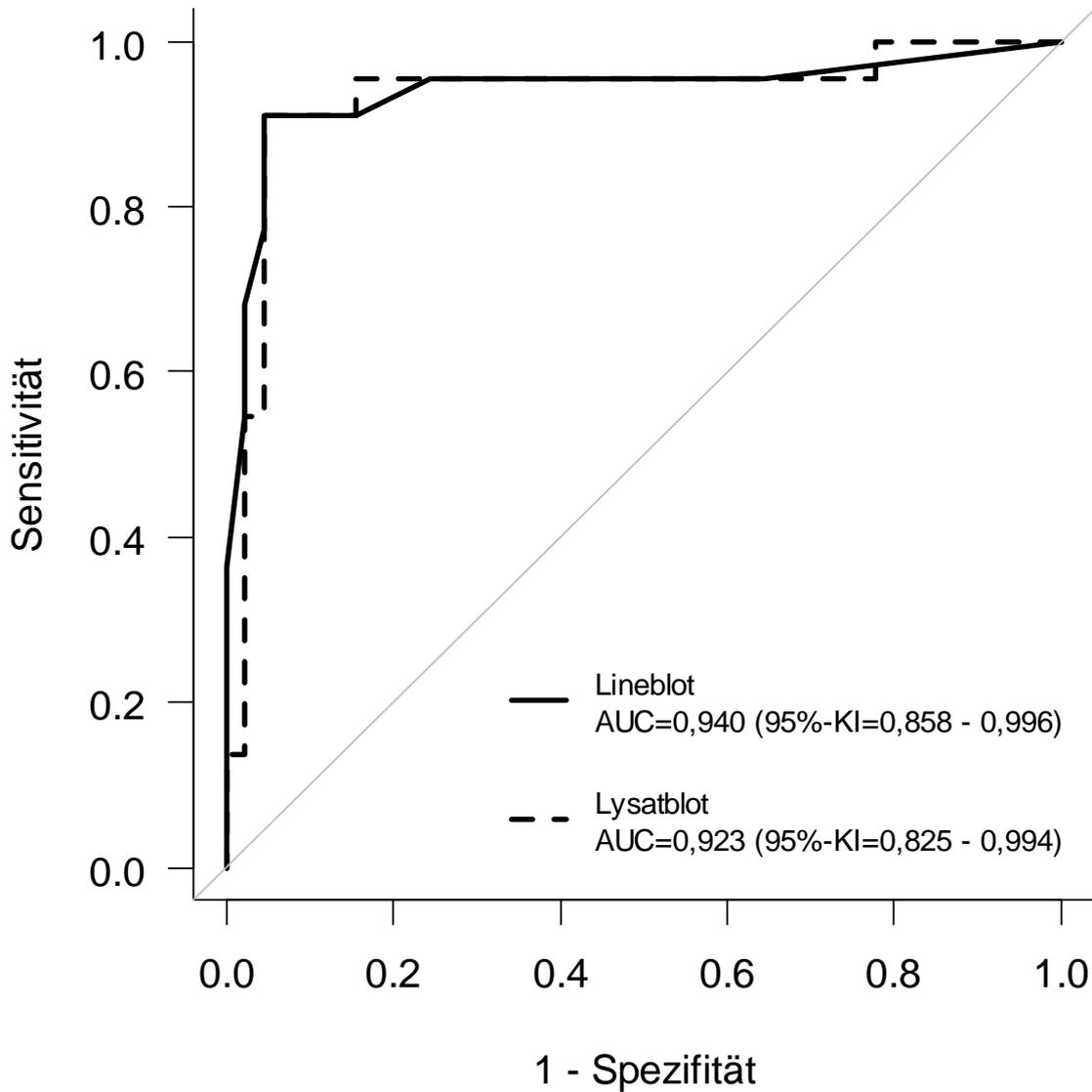


Abbildung 25: ROC-Kurven von Lysat- und Lineblot mit Angabe der Area Under the Curve (AUC). Die durchgezogene Linie beschreibt den Lineblot, die gestrichelte den Lysatblot. In Klammern ist das Konfidenzintervall bei einem Konfidenzniveau von 95% angegeben. Zum Vergleich ist die Diagonale mit abgebildet, welche einem Test nach dem Zufallsprinzip entspricht (gleiche Treffer- und Falschpositivenquote). Die errechneten p-Werte liegen für beide Blots unter 0,001.

Die Korrelation der beiden Tests wird auch bei den Ergebnissen der Seren deutlich, bei denen keine Histologie vorlag (Abbildung 26; Tabelle 10).

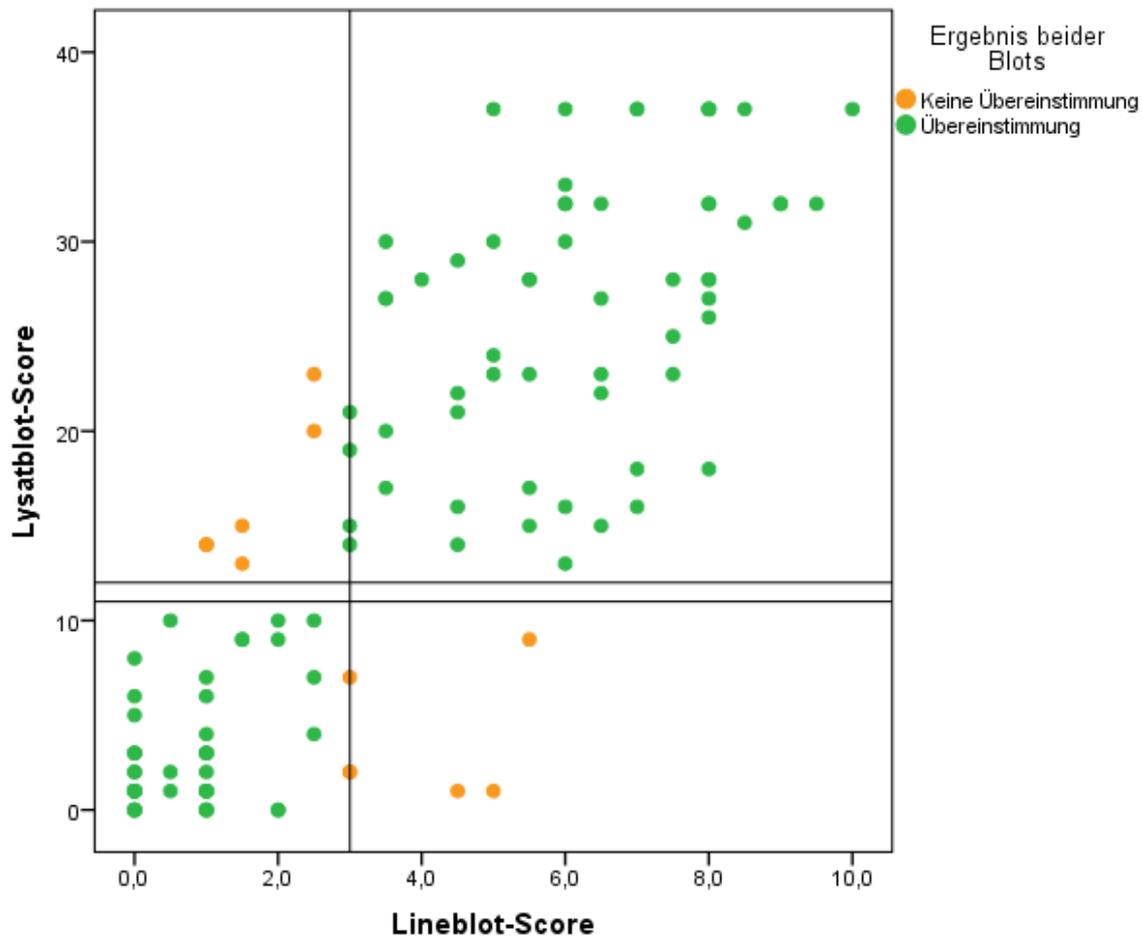


Abbildung 26: Korrelation von Lineblot- und Lysatblot-Score; die schwarzen Linien markieren die Trennung zwischen positiven und negativen Werten (Lysatblot: 11-12; Lineblot: 3); farbliche Darstellung der Übereinstimmung der beiden Tests; Seren: Alle, bei denen keine Histologie vorlag; Ausgenommen: Seren innerhalb des Cut-Off-Bereichs

		Lineblot		Total
		neg	pos	
Lysatblot	neg	46	6	52
	pos	6	60	66
Total		52	66	118

Tabelle 10: Vierfeldertafel von Lysatblot und Lineblot; Seren: Alle, bei denen keine Histologie vorlag; Ausgenommen: Seren innerhalb des Cut-Off-Bereichs

Anschließend wurden die 12 Seren, welche im Lysat- und Lineblot unterschiedliche Ergebnisse ergaben, näher untersucht und mit dem ELISA-Score verglichen (Tabelle 11). Es fiel auf, dass die nur im Lineblot positiven Seren alle deutlich bei p58, die Hälfte zusätzlich noch bei HcpC reagierten. Von den nur im Immunoblot positiven Seren zeigten sich fünf von sechs positiv für CagA, sonst jedoch kaum Reaktionen. Der ELISA war bei 10 der 12 Seren positiv.

Da bei diesen Fällen ein Goldstandard in Form der Histologie nicht vorlag, bleibt der *H. pylori*-Status hier offen. Möglichkeiten für das alleinige Vorhandensein von CagA werden in der Diskussion behandelt. CagA ist ein Protein, welches im Immunoblot identifiziert wurde und dort relativ stark mit 5 Punkten gewichtet wird. Die starke Antwort von p58 und HcpC bei den Immunoblot-negativen Seren kann ein Hinweis darauf sein, dass diese Antigene nicht im für die Immunoblot-Herstellung verwendeten Bakterien-Lysat vorhanden sind. Das Ergebnis des ELISA kann dadurch erklärt werden, dass er mit p58 und CagA gecoatet ist.

Lineblot positiv / Immunoblot negativ									
Probe	CagA	VacA	p58	UreA	HcpC	gGT	Score	I-Blot	ELISA
101	2		1				3	2	positiv
112	1		2				3	7	positiv
168	0,5		1	0,5	2	0,5	4,5	1	fraglich
195			2	0,5	0,5		3	2	positiv
286			2	0,5	2	1	5,5	9	positiv
301			2	0,5	2	0,5	5	1	positiv
Lineblot negativ / Immunoblot positiv									
Probe	CagA	VacA	p58	UreA	HcpC	gGT	Score	I-Blot	ELISA
122					0,5	0,5	1	14	negativ
143	1						1	14	positiv
155	1		1		0,5		2,5	23	positiv
203	1					0,5	1,5	13	positiv
272	2		0,5				2,5	20	positiv
280	1			0,5			1,5	15	positiv

Tabelle 11: Oben: Positiv reagierenden Banden im Lineblot bei den Seren, die im Lineblot positiv und im Immunoblot negativ reagierten. I-Blot steht für den Score des Immunoblot (unter 11=negativ). Ganz rechts ist das Ergebnis des ELISA angegeben

Unten: Positiv reagierenden Banden im Lineblot bei den Seren, die im Immunoblot positiv und im Lineblot negativ reagierten. I-Blot steht für den Score des Immunoblot (über 12=positiv). Ganz rechts ist das Ergebnis des ELISA angegeben

5.2.6 Statistische Werte der getesteten Proteine

5.2.6.1 Übersicht

Insgesamt ließen sich bei den Proteinen Sensitivitäten zwischen 31,8% (VacA) und 63,6% (HcpC) feststellen. Die Reichweite der Spezifitätswerte ging von 60,0% (UreA) bis 93,3% (VacA). Es gab kein Protein, welches Werte erzielte, die dem Gesamtergebnis des Lineblots nahe kamen (Tabelle 13 - Tabelle 18). Insgesamt zeigte sich bei CagA am häufigsten eine positive Bande (in 49,3 % der Seren), am seltensten wurden Antikörper gegen VacA nachgewiesen (in 14,9 % der Seren).

Übersichtstabelle			
	positiv	negativ	Positiv in Prozent
CagA	33	34	49,3%
p58	32	35	47,8%
UreA	29	38	43,3%
HcpC	24	43	35,8%
gGT	19	48	28,4%
VacA	10	57	14,9%

Tabelle 12: Häufigkeit des Nachweises der einzelnen Proteine innerhalb der 67 Seren mit vorliegender Histologie.

5.2.6.2 Werte der einzelnen Proteine

		Histologie		
		neg	pos	Gesamt
CagA	neg	26	8	34
	pos	19	14	33
Gesamt		45	22	67
Sensitivität	63,6%		PPV	42,4%
Spezifität	57,8%		NPV	76,5%

Tabelle 13: Vierfeldertafel und statistische Werte des H.p.-Proteins CagA

		Histologie		
		neg	pos	Gesamt
VacA	neg	42	15	57
	pos	3	7	10
Gesamt		45	22	67
Sensitivität	31,8%		PPV	70,0%
Spezifität	93,3%		NPV	73,7%

Tabelle 14: Vierfeldertafel und statistische Werte des H.p.-Proteins VacA

		Histologie		
		neg	pos	Gesamt
p58	neg	29	6	35
	pos	16	16	32
Gesamt		45	22	67
Sensitivität	72,7%		PPV	50,0%
Spezifität	64,4%		NPV	82,9%

Tabelle 15: Vierfeldertafel und statistische Werte des H.p.-Proteins p58

		Histologie		
		neg	pos	Gesamt
UreA	neg	27	11	38
	pos	18	11	29
Gesamt		45	22	67
Sensitivität	50,0%		PPV	37,9%
Spezifität	60,0%		NPV	71,1%

Tabelle 16: Vierfeldertafel und statistische Werte des H.p.-Proteins UreA

		Histologie		
		neg	pos	Gesamt
HcpC	neg	33	10	43
	pos	12	12	24
Gesamt		45	22	67
Sensitivität	54,5%		PPV	50,0%
Spezifität	73,3%		NPV	76,7%

Tabelle 17: Vierfeldertafel und statistische Werte des H.p.-Proteins HcpC

		Histologie		
		neg	pos	Gesamt
gGT	neg	37	11	48
	pos	8	11	19
Gesamt		45	22	67
Sensitivität	50,0%		PPV	57,9%
Spezifität	82,2%		NPV	77,1%

Tabelle 18: Vierfeldertafel und statistische Werte des H.p.-Proteins gGT

5.2.7 Untersuchung der falsch positiven Seren im ELISA

Nach der Durchführung der serologischen Tests mit dem neuen Lineblot wurden die Ergebnisse des Mikrogen CagA/GroEL (p58)-ELISA nochmals untersucht. Interessant waren die Daten der fünf Seren, die sich im ELISA positiv und in der Histologie sowie den beiden Blot-Systemen negativ darstellten (Tabelle 19).

Serum	Histo / Kultur	Lysat-blot-Score	Lysat-blot	ELISA-Score	ELISA	Lineblot IgG - Score	Lineblot-IgG
B6	neg	5	neg	0,451	pos	2,5	neg
B17	neg	6	neg	0,483	pos	1	neg
B34	neg	10	neg	0,672	pos	1,5	neg
1104	neg	10	neg	0,57	pos	2	neg
152	neg	7	neg	1,322	pos	2	neg

Tabelle 19: ELISA-positive Seren mit negativen Ergebnis bzw. Score von Lysatblot, Lineblot und Histologie

Um zu untersuchen, welches Bild das falsch positive Ergebnis des ELISA im Lineblot erzeugte, wurden die Seren auf die einzelnen, positiv erscheinenden Protein-Banden untersucht. Es fällt die zu erwartende positive Bande bei CagA auf. Bei einer Analyse ohne 0,5-Banden sind, bis auf ein Serum, welches gar keine Punkte erreicht, alle Seren ausschließlich bei CagA positiv (Tabelle 20, unten). Dies erklärt die niedrigere Spezifität des CagA-ELISA, nicht jedoch die Gründe für das Vorkommen von CagA-Antikörpern bei *H. pylori*-negativen Patienten (6.4). Keiner der kontaktierten Hausärzte dieser fünf Patienten hatte eine Eradikationstherapie durchgeführt. Eine frühere *H. pylori*-Infektion, die durch Antibiotika-Therapie gegen eine andere Indikation eradiziert wurde, ist jedoch nicht sicher auszuschließen. Ebenso ist ein Hausarztwechsel möglich, welcher die fehlende Kenntnis über eine Eradikation erklären würde.

Serum	CagA	VacA	p58	UreA	HcpC	gGT
B6	1	0	0	1	0	0
B17	1	0	1	0	0	0
B34	1	0	1	0	0	0
1104	1	0	0	0	0	0
152	1	0	0	0	0	0
Serum	CagA	VacA	p58	UreA	HcpC	gGT
B6	1	0	0	0	0	0
B17	0	0	0	0	0	0
B34	1	0	0	0	0	0
1104	1	0	0	0	0	0
152	1	0	0	0	0	0

Tabelle 20: Anzahl der im Lineblot erkannten Banden pro Serum: 1=Bande vorhanden; 0=keine Bande. vorhanden; oben: mit 0,5-Banden; unten: ohne 0,5-Banden

6 Diskussion

6.1 Hintergrund

Seit der Entdeckung des Bakteriums *Helicobacter pylori* (Marshall and Warren, 1984; Marshall *et al.*, 1985) ist seine Rolle bei der Pathogenese von Erkrankungen des Magens und Duodenums Gegenstand intensiver Forschung. So wurde der Keim im Laufe der Jahre für das Vorkommen von gastroduodenalen Ulzera sowie von distalen Adenokarzinomen des Magens verantwortlich gemacht und von der WHO als Karzinogen eingestuft. Die weltweit geschätzte Prävalenz der *H. pylori*-Infektion von 50 % macht die herausragende klinische und ökonomische Bedeutung der Infektion verständlich. Die Ermittlung des *H. pylori*-Status wird heutzutage meist über den C₁₃-Atemtest oder invasive Gastroskopien mit anschließender mikrobiologischer Diagnostik und histologischen Untersuchungen durchgeführt. Klinisch wichtig ist, dass sowohl Atemtest als auch der Urease-Schnelltest an der Biopsie nach erfolgter, jedoch nicht erfolgreicher Therapie vermehrt falsch negativ ausfallen können. Ebenso können gastrointestinale Blutungen und die Gabe von Protonenpumpeninhibitoren die Sensitivität der Tests verringern (Udd *et al.*, 2003). Neben den Kosten einer gastrokopischen Diagnostik und den damit verbundenen Risiken und Belastungen für den Patienten kann das Ergebnis der histologischen Untersuchung zusätzlich durch schlechte Transportbedingungen und falsche Bearbeitung im Labor verfälscht werden.

Eine weitere Möglichkeit der Diagnostik ist die Detektion von *H. pylori*-spezifischen Antikörpern mit Hilfe serologischer Tests. Hier gibt es einerseits den ELISA, bei dem zylindrische Vertiefungen in Kunststoffplatten mit Antigenen beschichtet werden. Bei dieser Methode lassen sich sehr schnell viele Seren screenen, es lässt sich jedoch nicht erkennen, gegen welche Antigene speziell Antikörper gebildet wurden. Zum anderen gibt es noch die Möglichkeit, die Antigene auf Teststreifen zu blotten. Bislang wurden für die Antigene Bakterienlysate benutzt, die nach der Inkubation mit Patientenserum mittels eines Score-Systems ausgewertet wurden. Durch die hohe Anzahl an geblotteten Proteinen ergeben sich jedoch Probleme, zum Beispiel ein hoher Background an unspezifischen Signalen. Ebenso ist es schwierig, eindeutige Banden abzugrenzen, was die Auswertung des Tests für Unerfahrene erschwert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun erstmals ein serologisches Diagnostik-System für *H. pylori* entwickelt, welches auf sechs rekombinant hergestellten Proteinen beruht, und mittlerweile von der Firma Mikrogen GmbH unter dem Namen „recomLine Helicobacter IgG“ vertrieben wird. Bei diesem System können die *H. pylori*-

spezifische Proteine über jeweils eine eigene, klar abgegrenzte Bande erkannt werden. Über einen Score kann anschließend der *H. pylori*-Status des Patienten ermittelt werden. Darüber hinaus ist es möglich, aus der Kombination der detektierten Banden Informationen über die Art des Keims und somit auch Hinweise auf die Wahrscheinlichkeit möglicher Krankheitsbilder zu erhalten.

6.2 Technische Probleme und Einordnung der statistischen Ergebnisse

6.2.1 Technische Probleme

Für den neuen Lineblot wurden die Proteine CagA, VacA, UreA und GroEL (p58) von der Firma Mikrogen GmbH in aufgereinigter Form bereitgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteine HcpC und HpgGT aus vorliegenden Konstrukten exprimiert und aufgereinigt. Die Proteine Omp1, Omp11, Omp15 wurden kloniert, NapA konnte kloniert, exprimiert und aufgereinigt werden. Dies geschah jedoch nicht rechtzeitig für die Herstellung des Prototyps, so dass NapA nach erfolgreicher Reaktivitätsprüfung dem Nachfolger des in dieser Arbeit evaluierten Lineblots hinzugefügt wurde. Somit enthält der in dieser Arbeit getestete Lineblot die *H. pylori*-Antigene CagA, VacA, GroEL, UreA, HcpC und gGT.

Trotz vieler Versuche und Anwendung von verschiedenen Klonierungsprotokollen und Vektoren konnte die Herstellung der rekombinanten Oberflächenproteinen Omp 1, 11 und 15 im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden. Es konnte keine Ursache für eine mögliche mangelnde Effizienz der Ligasen oder Fehler im Transformationsprozess gefunden werden. In Zukunft soll speziell an der Optimierung der Herstellung der Konstrukte gearbeitet werden, um noch mehr Proteine – insbesondere Oberflächenproteine - für den Lineblot zu gewinnen. Eine Möglichkeit wäre die Verwendung von alternativen Klonierungsmethoden, wie zum Beispiel die, in dieser Arbeit nicht angewendete, Gateway Technologie (Firma Invitrogen). Bei dieser Methode werden keine Restriktionsenzyme oder DNA-Ligasen benötigt. Das System nutzt das natürlich vorkommende Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ . Durch die Verwendung des ccdB-Systems wird hier direkt auf positive Klone selektiert (Karimi et al., 2002).

Neben der Klonierung stellte sich bei den OMP's die Expression als schwierig dar. Die OMP's besitzen transmembranäre, hydrophobe Anteile, die nach Expression zu Aggregation neigen und unlöslich werden, was den weiteren Aufreinigungsprozess erschwert. Um dieses Problem zu umgehen können die hydrophoben Anteile durch Herausschneiden aus der DNA eliminiert werden. Man erhält in diesem Fall ein Fusionsprotein aus Teilen des OMP's. Das

neue Protein besitzt dann zwar nicht mehr alle Aminosäuren der nativen Form, jedoch sind gerade die extrazellulären Anteile als potentielle Epitope für den Lineblot interessant. Außerdem kann versucht werden die Löslichkeit durch Bindung an große, hydrophile Proteine wie zum Beispiel das Maltose-binding-Protein zu verbessern.

6.2.2 Mögliches Potenzial im Blotting-Prozess

Einen Anhaltspunkt für die Einordnung der statistischen Ergebnisse der einzelnen Proteine können die Ergebnisse einer von Gao durchgeführten Multiplex-Studie geben (Gao et al., 2009). Das Multiplex-Verfahren, ein auf Glutathion-S-Transferase basierender Immunoassay, ist deutlich aufwendiger und in Bezug auf Praktikabilität und Kosten nicht mit dem Lineblot zu vergleichen (Waterboer et al., 2005). Die Ergebnisse der Multiplex-Studie zeigen jedoch, dass die in diesem Lineblot verwendeten Proteine potenziell gute Marker-Antigene für *H. pylori* sind und der Test durch Verbesserung des Blotting-Verfahrens noch Potenzial bietet, die Gesamt-Sensitivität zu verbessern.

Betrachtet man die statistischen Werte der einzelnen Proteine, so fällt auf, dass VacA als einziges Protein eine Spezifität von über 90% hat und kein Protein eine Sensitivität von über 90% erreicht. Vergleicht man die Daten mit den Sensitivitätswerten der Multiplex-Studie, so zeigen sich niedrigere Werte. Die Sensitivität von CagA ist um 10 % niedriger, die von VacA um 50 %, HcpC um 13 % und die von GroEL (p58) um 15 %. Nur die Sensitivität von UreA ist um 2 % höher als in der Multiplex-Studie.

Diese Differenzen könnten zum einen durch die niedrige Zahl der getesteten Seren bedingt sein. Auf der anderen Seite kann aber auch die Struktur des jeweiligen Proteins das Problem darstellen. Da unterschiedliche Sequenzen für die Klonierung benutzt wurden, kann diese Sequenz bzw. der jeweilige Stamm eine Ursache der unterschiedlichen Erkennungsraten der beiden Tests sein. Neben der zu Grunde liegenden DNA-Sequenz unterscheiden sich auch die Grundstrukturen mancher Proteine. Im Multiplex-Verfahren wurden Proteine aus einem rekombinanten Lysat von *E. coli*-Bakterien verwendet, sie lagen also ihrer nativen dreidimensionalen Struktur vor. Bei den in dieser Arbeit genutzten CagA, VacA und Urea handelt es sich um denaturiert gereinigte Proteine, diese Antigene liegen also linearisiert vor; dies könnte die Erkennung von Epitopen durch Antikörper beeinflussen.

6.2.3 Unklarer Goldstandard in der Literatur

Mit den sechs klonierten Proteinen ließ sich im Vergleich zum Lysatblot (Sensitivität: 86,4%; Spezifität: 95,6%) eine leicht bessere Sensitivität (90,9%) und gleiche Spezifität (95,6%)

ermitteln. Dies lag bei der Gesamtprobenzahl von 67 an einem Serum mehr, welches vom Lysatblot falsch negativ beurteilt wurde. Es lässt sich in den Korrelationsdarstellungen erkennen, dass vermehrte Antikörperbindungen auf dem Lysatblot mit vermehrten Bindungen auf dem Lineblot einhergehen. Dies lässt sich sowohl bei der Korrelation der Seren mit und ohne Histologie als Goldstandard erkennen. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Modell des serologischen Tests auf der Basis von rekombinant hergestellten Proteinen ein valides Diagnostik-System für *H. pylori* darstellt und die synthetisierten Proteine ebenso wie die im Lysat vorhandenen Antigene von humanen Antikörpern erkannt werden. Zum Vergleich wurden in einer vergleichenden Studie von IgG-ELISA und endoskopischem Ergebnis eine Sensitivität von 70% und 73,7% ermittelt. Der Goldstandard wurde hier über entweder positive histologische Untersuchung, positiven Urease-Test oder positive Kultur definiert (Garza-Gonzalez *et al.*, 2003). Eine Studie zum Antigennachweis im ergab eine Sensitivität von 93,1% sowie eine Spezifität von 94,6%. Hier wurde der Goldstandard so definiert, dass zwei der vier Merkmale Histologie, C₁₃-Atemtest, Urease-Schnelltest und Serologie (IgG-ELISA) positiv sein mussten (Choi *et al.*, 2011). Die angeführten Beispiele machen deutlich, dass es bei Studien über Nachweismethoden für eine *H. pylori*-Infektion noch keinen allgemein verwendeten Goldstandard gibt. So gilt es in jeder Studie den verwendeten Goldstandard zu beachten und dies in die Diskussion der Ergebnisse mit einzubeziehen (Kwiatkowski, 2009). In dieser Arbeit wurde eine positive Histologie als Goldstandard für das Vorliegen einer *H. pylori*-Infektion verwendet. Da diese Methode jedoch keine Sensitivität und Spezifität von 100% besitzt, können die Ergebnisse hierdurch verfälscht worden sein. Es gibt momentan keinen Weg, der eine Sensitivität und Spezifität von 100% bei der Bestimmung des *H. pylori*-Status ermöglicht. Ein weiteres Problem bei der Findung des Goldstandards stellt die Invasivität der endoskopischen Untersuchung dar.

6.2.4 Optimierungspotenzial des Testumfangs

Um das Immunoblot-Testsystem weiter auszubauen und weiter zu verbessern, sollte versucht werden noch weitere immunogen wirkende *H. pylori*-Proteine zu identifizieren und dem Test hinzuzufügen, wie zum Beispiel das in dieser Arbeit aufgereinigte Protein NapA. Zusätzliche interessante Antigene, die in weiterführenden Arbeiten ausgetestet werden, sind ein Flagellar-hook Protein, HpaA und Hp231. Für die Weiterentwicklung des Tests wird das serologische Verhalten von potentiellen Antigenen eine Rolle spielen. So ist es wichtig zu wissen, nach welcher Zeitspanne nach Eradikation die gegen das jeweilige Antigen gebildeten Antikörper wieder aus dem Detektionsbereich des Blots verschwinden und nicht mehr nachweisbar sind. Zusätzlich sollten die dem Lineblot dieser Arbeit folgenden Test-Systeme mit einer erhöhten Zahl an Seren mit vorliegender Histologie ausgewertet werden,

um die statistisch ermittelten Werte zu untermauern. Ebenso sollte nach Hinzufügen weiterer Proteine das Score-System statistisch reevaluiert werden; gegebenenfalls kann man auch eine den statistischen Werten der einzelnen Proteine angepasste Punktevergabe diskutieren, um die Aussagekraft des Lineblots noch zu erhöhen. So macht es zum Beispiel Sinn, Proteine mit gesicherter hoher Spezifität sowie Sensitivität stärker zu gewichten.

6.3 Geringe Sensitivität des gGT-ELISA

Um zu Beginn der Arbeit vermehrt *H. pylori* positive Seren zu erhalten wurde ein ELISA-Screening durchgeführt. Zuerst war angedacht hierfür ein Screening mittels des von Christian Bolz (AG Gerhard) produzierten Proteins *H.p.-gGT* durchzuführen. Nach mehrfacher Variation des ELISA-Protokolls wurde jedoch festgestellt, dass die Ergebnisse für ein Screening nicht ausreichend waren, da die Sensitivität zu niedrig war; diese Daten bestätigten sich am Ende auch an Hand der Ergebnisse der *H.p.-gGT* im Lineblot: Die Sensitivität von 50% zeigt, dass nur bei jedem zweiten *H. pylori*-positiven Serum auch Antikörper gegen die *H.p.-gGT* nachgewiesen werden konnten. Da mittels PCR bislang in allen untersuchten klinischen Isolaten von *H. pylori* die *H.p.-gGT* nachgewiesen werden konnte, stellt sich die Frage nach den Ursachen für das im Vergleich schlechtere Ergebnis der gGT im ELISA und Lineblot.

Ein mögliches Problem könnte hierbei gewesen sein, dass es auch auf der Festphase zu einer Autoprozessierung kommt und sich die gGT in ihre zwei Untereinheiten teilt. Diese Instabilität könnte eine Erkennung des Proteins durch die Antikörper verhindert haben. Auch könnte die niedrige Sensitivität durch eine undefinierte Immobilisierung des Proteins entstanden sein. Konformationsänderungen, welche durch die Prozessierungsstufen entstanden sind, könnten ebenfalls eine mögliche Ursache gewesen sein. Der Mechanismus, der hinter diesen möglichen Ursachen steht, ist der gleiche: Es ändert sich die äußere Struktur der gGT im Verlauf der Herstellung des Blots so stark, dass auch die Epitope der gGT-Antikörper betroffen sind. Eine Antikörper-Antigen-Bindung kann nur noch schwach oder gar nicht mehr stattfinden und der Test fällt negativ aus.

Ein möglicher Ansatz zur Verbesserung der gGT-Sensitivität in diesem Zusammenhang ist die Möglichkeit, durch gezielte Aminosäuren-Mutationen die Autoprozessierung zu verhindern. In weiterführenden Arbeiten konnte dies durch den Austausch von Thymin durch Alanin an Position 380 erzielt werden. Die ersten Ergebnisse ergeben bessere Signale bei der Antikörperantwort.

Neben einer möglichen Änderung der Antigen-Struktur kann auch die Hemmung der lymphozytären Antwort und die somit verminderte Immunglobulinbildung durch die *H.p*-gGT als Ursache für die niedrige Sensitivität der serologischen Diagnostik diskutiert werden. So ließ sich zeigen, dass die *H.p*-gGT einen Arrest der Lymphozyten im G1-Stadium induziert und somit in der Lage ist einen Teil der zellulären Immunantwort zu unterdrücken (Schmees *et al.*, 2007b).

6.4 Geringe Spezifität des Mikrogen ELISA

Nach der statistischen Auswertung wurden die Ergebnisse der einzelnen Proteine nochmal mit denen des Mikrogen ELISA, welcher über ein Coating mit CagA und GroEL funktioniert, verglichen. Hierbei ließ sich zeigen, dass bei den im ELISA falsch positiven Seren deutliche Antikörperbanden bei CagA, bei den anderen 5 geblotteten Proteinen jedoch keine Banden zu sehen waren. Hier stellt sich die Frage nach dem Grund des alleinigen Vorliegens der CagA-Antikörper bei den wahrscheinlich *H. pylori* negativen Seren.

Zum einen ist es möglich, dass eine sogenannte Kreuzreaktivität vorliegt. Diese tritt auf, wenn ein Antikörper an zwei unterschiedliche Antigene bindet, die eine identische oder zumindest sehr ähnliche Bindungsstelle (Epitop) besitzen. Bis jetzt ist weder eine Infektion noch eine körpereigene Struktur bekannt, welche die Bildung von Antikörpern, die positiv mit CagA reagieren, hervorruft. Die nähere Untersuchung der Ursache wäre jedoch in mehrerlei Hinsicht interessant, da es möglich ist, dass diese Patienten eine gewisse intrinsische Immunität gegen eine *H. pylori*-Infektion besitzen könnten. In der Literatur wurde bis jetzt noch keine bakterielle oder virale Homologie beschrieben, welche zu einer Ausbildung von kreuzreagierenden Antikörpern und somit zu einem eventuellen Schutz vor einer *H. pylori*-Infektion führen kann. Für das Protein GroEL wurde eine solche Kreuzreaktivität jedoch gefunden (Johansen *et al.*, 1995).

Eine andere Erklärung wäre, dass bei den betreffenden Patienten eine Immunreaktion gegen *H. pylori* stattgefunden hat. Grundsätzlich wurde bei der Sammlung der Seren ein möglicher Zustand nach Eradikation abgefragt, eine hundertprozentige Sicherheit ist dadurch jedoch nicht gegeben. Patienten können zum Beispiel eine klinisch inapparente *H. pylori* Infektion erlitten haben, die durch eine Antibiotikabehandlung aus anderer Indikation eradiziert wurde. Ebenso ist möglich, dass die Infektion spontan ausheilte. Somit muss man auch in Betracht ziehen, dass das alleinige Auftreten der CagA-Antikörper auf eine besonders lange Persistenz gerade dieser Immunglobuline im Vergleich zu den anderen zurückzuführen sein kann. Auch hier sollten die biochemischen Eigenschaften der einzelnen IgG's näher

untersucht werden, um den serologischen *H. pylori*-Test besser mit wissenschaftlichen Fakten zu hinterlegen.

6.5 Ausblick

6.5.1 Breitere Anwendung von serologischen *H. pylori*-Tests

Diese Arbeit deutet darauf hin, dass durch Kombination mehrerer geeigneter Antigene ein hoch sensitiver und spezifischer serologischer Nachweistest für die *H. pylori*-Infektion entwickelt werden kann.

Lassen sich die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit zusätzlichen Proteinen an Hand eines größeren Serenkollektivs bestätigen und noch verbessern, so könnte ein häufigerer Einsatz in der klinischen Praxis im Sinne eines *H. pylori*-Screenings diskutiert werden. Der große Vorteil des serologischen Tests gegenüber invasiven Verfahren und auch dem C₁₃-Atemtest besteht in seiner leichten Durchführung und dem Komfort für Patienten, nur eine Blutprobe abgeben zu müssen.

Neben einer größer aufgestellten Datenlage wäre für eine breitere Anwendung des serologischen *H.pylori*-Tests eine Optimierung der Kosten von Vorteil. Nach dem Einheitlichem Bewertungsmaßstab der Gesetzlichen Krankenkassen bekommt ein Krankenhaus für einen serologischen Lineblot derzeit 19€ (GKV-Laborreform 2008). Bei einem Einkaufspreis von 355€ pro Lineblot-Kit von Mikrogen hat das Krankenhaus Materialkosten von 17,75€ pro Patient. Durch die hinzukommenden Personalkosten ist es momentan nicht möglich bei gesetzlich Versicherten mit dem Lineblot profitabel zu arbeiten. Bei breiterem Einsatz und höheren Produktionsmengen ließen sich die Kits günstiger produzieren und wären somit für die Krankenhäuser in Zukunft attraktiver.

6.5.2 Einfachere Datengewinnung zur Charakterisierung von *H. pylori*-Stämmen

Abgesehen von der serologischen Diagnose bietet der neue Lineblot einige Möglichkeiten mehr, die ihn von bisherigen Methoden abgrenzen. So wurde bereits gezeigt, dass sich bestimmte Antigene verstärkt mit einem erhöhten Risiko für *H. pylori*-induzierte Krankheiten assoziieren lassen. In einer quantitativen Proteom-Analyse konnten CagA und GroEL statistisch mit einem Auftreten von Magen-Karzinom und duodenalem Ulkus assoziiert werden (Park et al., 2006). In einer Studie mit verschiedenen *H. pylori*-induzierten Krankheiten wurde das Auftreten von CagA-Antikörpern untersucht. Es ergab sich ein Vorkommen von 92,2% bei Patienten mit Magen-Karzinom, 96,7% bei duodenalem Ulkus

sowie 75 % bei nicht-ulzeröser Dyspepsie (Iaquinto et al., 2000). In der bereits angesprochenen Multiplex-Studie wurde bei Vorliegen von Antikörpern gegen CagA, VacA, GroEl und HcpC ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer chronisch aktiven Gastritis nachgewiesen (Gao et al., 2009). Die Kombination dieser Antigene ergab ein 18-fach erhöhtes Risiko für diese Erkrankung. In Zellkultur- und Tierexperimenten konnte eine Korrelation von CagA mit Magenkarzinomen festgestellt werden (Franco et al., 2005; Murata-Kamiya et al., 2007). Hier bietet eine breite Anwendung des neuen Lineblots die Möglichkeit, diese bisherigen Ergebnisse und Korrelationen von Antigenen und Pathologien an größeren Kollektiven zu überprüfen und statistisch zu untermauern.

Auch lässt sich mit dem Test die Korrelation von Pathogenitätsfaktoren untereinander beschreiben. Bei vielen durchgeführten Tests wurde das Vorliegen einer Krankheit mit einem Pathogenitätsfaktors korreliert. Ist das Vorkommen dieses Faktors verstärkt mit dem Auftreten eines anderen, nicht getesteten Antigens korreliert, kann eine falsche Schlussfolgerung gezogen werden. Durch die gleichzeitige Detektion mehrerer Antigene kann die Wahrscheinlichkeit eines solchen Fehlers verringert werden. Gehäuftes gemeinsames Auftreten von Antigenen kann mittels des Lineblots leichter festgestellt werden. So könnten neu festgestellte Korrelationen von Antigenen auch Hinweise auf bisher nicht bekannte Funktionen von Antigenen geben, welche die Basis für weitergehende Untersuchungen darstellen könnten.

6.5.3 Möglichkeit der Risikoprofilierung

Mit dem Lineblot wird es möglich, Untersuchungen an großen Kollektiven durchzuführen und für die bestehenden sechs und alle hinzukommenden Proteine Daten zu generieren. Mit diesen Daten können dann bei nachgewiesenem Pathogenitätspotential der einzelnen Antigene Risikoprofile für jeden Patienten erstellt und an Hand dieser eine Einschätzung der Virulenz des jeweiligen Stammes sowie der Gefahr eines Magenkarzinoms ermittelt werden. So könnten zum Beispiel die verschiedenen VacA-Subtypen s1/m1, s1/m2 und s2/m2, welche mit jeweils unterschiedlicher Aktivität des Pathogens einhergehen, aufgeblottet werden (Atherton et al., 1995). Mit Hilfe einer solchen Risikoeinschätzung könnte dann die Notwendigkeit einer gastrokopischen Abklärung oder einer direkten Eradikationstherapie ermittelt werden. Wichtig ist hierbei immer eine möglichst genaue Kenntnis der vom Patienten eingenommenen Antibiotika sowie frühere invasive und nicht-invasive diagnostische Maßnahmen, da sich die Serologie nach der Eradikation einer Infektion erst spät ändert. Mit einem Immunoblot, der auf der Basis von rekombinant hergestellten Antigenen basiert, wird es jedoch möglich sein, den Verlauf der Immunantwort bei einem

Zustand nach Eradikation zu erfassen. Man kann beurteilen, welche Antikörper als erstes keine Reaktion mehr zeigen und welche am längsten im Blut persistieren. So könnte es möglich sein, an Hand des serologischen Bildes auf den ungefähren Zeitpunkt einer Eradikation zu schließen.

6.5.4 Möglichkeit der Vakzinierung

Weiterhin ließen sich bei einer breitflächigen Nutzung des Testsystems Antigene identifizieren, welche für eine Impfung gegen *H. pylori* in Erwägung gezogen werden könnten. Für eine solche Impfung wäre eine Protein- oder Immunogenmischung ideal, welche den Großteil der *H. pylori*-Stämme abdeckt. Die mit dem neuen Lineblot ermittelbaren Häufigkeitsverteilungen können auf solche, für eine Vakzine interessanten Proteine, hinweisen. An Hand dieser Verteilungen könnte man dann Protein-Cluster erstellen, welche einen größtmöglichen Bereich erschließen und zur Erprobung von Vakzinen herangezogen werden können. Gesucht werden hoch immunogene Proteine, welche eine nachhaltige Immunität des Organismus durch Antikörperbildung gegen *H. pylori* induzieren.

Ebenso sollte der Lineblot alle Proteine enthalten, die derzeit im Rahmen von Impfstoffentwicklungen verwendet werden, um später immunisierte von infizierten Patienten zu unterscheiden. So könnte man dann im Verlauf bei Patienten an Hand des Antikörperprofils auf ihren Impfstatus schließen, ähnlich wie es heute in der Hepatitis-B-Serologie geschieht. Besitzt ein Patient allein Antikörper gegen den Impfstoff, liegt die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass es sich um einen geimpften Patienten handelt. Ist er jedoch für viele andere Antikörper positiv gegen *H. pylori*, sollte eine Abklärung mittels Atemtest oder Gastroskopie erfolgen. Nach einer Impfung lässt sich der Schutz durch den Lineblot gut überwachen. Sollte die Antwort zu schwach oder nicht mehr nachweisbar sein, kann eine Auffrischung der Impfung empfohlen werden.

6.5.5 Fazit

Mit dem Lineblot auf Basis rekombinant hergestellter *H. pylori*-Antigene wurde ein serologischer Test entwickelt, der hoch spezifisch und sensitiv eine Infektion nachweisen kann. Durch die genauere Analyse der vorliegenden Antigene bietet der Lineblot vielfältige Möglichkeiten, Infektionen in Zukunft besser zu charakterisieren und Erkrankungsrisiken zu ermitteln. Ebenso wird es durch den Test möglich, verschiedene Antigene an breiteren Populationen auszutesten. Die Erkenntnisse aus diesen Tests sollten die Entwicklung einer Vakzine gegen *H. pylori* unterstützen können.

7 Literaturverzeichnis

- Akhiani, A. A., K. Schon, and N. Lycke, 2004, "Vaccine-induced immunity against *Helicobacter pylori* infection is impaired in IL-18-deficient mice," *The Journal of Immunology* 173, 3348.
- Allen, L. A. H., L. S. Schlesinger, and B. Kang, 2000, "Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages," *The Journal of Experimental Medicine* 191, 115.
- Altman, D. G. and J. M. Bland, 1994a, "Diagnostic tests 2: Predictive values," *BMJ: British Medical Journal* 309, 102.
- Altman, D. G. and J. M. Bland, 1994b, "Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity," *BMJ: British Medical Journal* 308, 1552.
- Amieva, M. R., R. Vogelmann, A. Covacci, L. S. Tompkins, W. J. Nelson, and S. Falkow, 2003, "Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA," *Science* 300, 1430.
- Andersen, L. P. and T. Wadstrom, 2001, "Basic bacteriology and culture," *Helicobacter pylori: physiology and genetics* 27-38.
- Andrutis, K. A., J. G. Fox, D. B. Schauer, R. P. Marini, J. C. Murphy, L. Yan, and J. V. Solnick, 1995, "Inability of an isogenic urease-negative mutant strain of *Helicobacter mustelae* to colonize the ferret stomach," *Infection and immunity* 63, 3722.
- Appelmelk, B. J., I. Simoons-Smit, R. Negrini, A. P. Moran, G. O. Aspinall, J. G. Forte, T. De Vries, H. Quan, T. Verboom, and J. J. Maaskant, 1996, "Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity," *Infection and immunity* 64, 2031.
- Argent, R. H., M. Kidd, R. J. Owen, R. J. Thomas, M. C. Limb, and J. C. Atherton, 2004, "Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*," *Gastroenterology* 127, 514-523.
- Asahi, M., T. Azuma, S. Ito, Y. Ito, H. Suto, Y. Nagai, M. Tsubokawa, Y. Tohyama, S. Maeda, and M. Omata, 2000, "*Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells," *The Journal of Experimental Medicine* 191, 593.
- Atherton, J. C., 2006, "The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases,".
- Atherton, J. C., P. Cao, R. M. Peek, M. K. R. Tummuru, M. J. Blaser, and T. L. Cover, 1995, "Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*," *Journal of Biological Chemistry* 270, 17771.
- Azuma, T., A. Yamakawa, S. Yamazaki, K. Fukuta, M. Ohtani, Y. Ito, M. Dojo, Y. Yamazaki, and M. Kuriyama, 2002, "Correlation between Variation of the 3'Region of the "cagA" Gene in "*Helicobacter pylori*" and Disease Outcome in Japan," *The Journal of infectious diseases* 186, 1621-1630.
- Baltrus, D. A., M. R. Amieva, A. Covacci, T. M. Lowe, D. S. Merrell, K. M. Ottemann, M. Stein, N. R. Salama, and K. Guillemin, 2009, "The complete genome sequence of *Helicobacter pylori* strain G27," *Journal of bacteriology* 191, 447.
- Bamba, N., S. Nakajima, A. Andoh, M. Bamba, H. Sugihara, T. Bamba, and T. Hattori, 2002, "Stem cell factor expressed in human gastric mucosa in relation to mast cell increase in *Helicobacter pylori*-infected gastritis," *Digestive diseases and sciences* 47, 274-282.
- Bamford, K. B., X. Fan, S. E. Crowe, J. F. Leary, W. K. Gourley, G. K. Luthra, E. G. Brooks, D. Y. Graham, V. E. Reyes, and P. B. Ernst, 1998, "Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype," *Gastroenterology* 114, 482-492.
- Bizzozero, G., 1893, "Ueber die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen

ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut Dritte Mittheilung," *Archiv für mikroskopische Anatomie* 42, 82-152.

- Blaser, M. J., Y. Chen, and J. Reibman, 2008, "Does *Helicobacter pylori* protect against asthma and allergy?," *British Medical Journal* 57, 561.
- Blaser, M. J., G. I. Perez-Perez, H. Kleanthous, T. L. Cover, R. M. Peek, P. H. Chyou, G. N. Stemmermann, and A. Nomura, 1995, "Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach," *Cancer research* 55, 2111.
- Bumann, D., S. Aksu, M. Wendland, K. Janek, U. Zimny-Arndt, N. Sabarth, T. F. Meyer, and P. R. Jungblut, 2002, "Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*," *Infection and immunity* 70, 3396.
- Cardinali, L. C. C., G. A. Rocha, A. M. C. Rocha, S. B. De Moura, T. de Figueiredo Soares, A. M. B. Esteves, A. M. M. F. Nogueira, M. M. D. A. Cabral, A. S. T. de Carvalho, and P. Bitencourt, 2003, "Evaluation of [¹³C] urea breath test and *Helicobacter pylori* stool antigen test for diagnosis of *H. pylori* infection in children from a developing country," *Journal of clinical microbiology* 41, 3334.
- Carlsohn, E., J. Nystrom, H. Karlsson, A. M. Svennerholm, and C. L. Nilsson, 2006, "Characterization of the outer membrane protein profile from disease-related *Helicobacter pylori* isolates by subcellular fractionation and nano-LC FT-ICR MS analysis," *J. Proteome Res* 5, 3197-3204.
- Cave, D. R., M. Go, A. CULTER, J. Goldstein, B. Dunn, H. Mobley, J. BARKIN, B. FENNERTY, R. Hunt, and D. PEURA, 1996, "Transmission and epidemiology of *Helicobacter pylori*," *The American journal of medicine* 100, 5A.
- Censini, S., C. Lange, Z. Xiang, J. E. Crabtree, P. Ghiara, M. Borodovsky, R. Rappuoli, and A. Covacci, 1996, "*cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14648.
- Chan, W. Y., P. K. Hui, and K. M. Leung, 1994, "Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach," *American journal of clinical pathology* 102, 503-507.
- Chen, W., D. Shu, and V. S. Chadwick, 2001, "*Helicobacter pylori* infection: mechanism of colonization and functional dyspepsia Reduced colonization of gastric mucosa by *Helicobacter pylori* in mice deficient in interleukin-10," *Journal of gastroenterology and hepatology* 16, 377.
- Chen, Y. and M. J. Blaser, 2007, "Inverse associations of *Helicobacter pylori* with asthma and allergy," *Archives of internal medicine* 167, 821.
- Choi, J., C. H. Kim, D. Kim, S. J. Chung, J. H. Song, J. M. Kang, J. I. Yang, M. J. Park, Y. S. Kim, and J. Y. Yim, 2011, "Prospective evaluation of a new stool antigen test for the detection of *Helicobacter pylori*, in comparison with histology, rapid urease test, ¹³C urea breath test, and serology," *Journal of gastroenterology and hepatology* 26, 1053-1059.
- Cover, T. L. and M. J. Blaser, 1992, "Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*," *Journal of Biological Chemistry* 267, 10570.
- Cover, T. L., U. S. Krishna, D. A. Israel, and R. M. Peek, 2003, "Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin," *Cancer research* 63, 951.
- Cover, T. L., M. K. Tummuru, P. Cao, S. A. Thompson, and M. J. Blaser, 1994, "Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains," *Journal of Biological Chemistry* 269, 10566.
- Cutler, A. F., S. Havstad, C. K. Ma, M. J. Blaser, G. I. Perez-Perez, and T. T. Schubert, 1995, "Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection," *Gastroenterology* 109, 136-141.
- Ding, S. Z., A. M. Torok, M. F. Smith Jr, and J. B. Goldberg, 2005, "Toll like Receptor 2 Mediated Gene Expression in Epithelial Cells During *Helicobacter pylori* Infection," *Helicobacter* 10, 193-204.

- Doenges, J. L., 1938, p. 536.
- Drumm, B., G. I. Perez-Perez, M. J. Blaser, and P. M. Sherman, 1990, "Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection," *New England Journal of Medicine* 322, 359-363.
- Dundon, W. G., H. Nishioka, A. Polenghi, E. Papinutto, G. Zanotti, P. Montemurro, G. Del Giudice, R. Rappuoli, and C. Montecucco, 2001, "The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori*," *International Journal of Medical Microbiology* 291, 545-550.
- Dunn, B. E., G. P. Campbell, G. I. Perez-Perez, and M. J. Blaser, 1990, "Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*," *Journal of Biological Chemistry* 265, 9464.
- Eaton, K. A., C. L. Brooks, D. R. Morgan, and S. Krakowka, 1991, "Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets," *Infection and immunity* 59, 2470.
- Ernst, P. B. and B. D. Gold, 2000, "THE DISEASE SPECTRUM OF *HELICOBACTER PYLORI*: The Immunopathogenesis of Gastroduodenal Ulcer and Gastric Cancer," *Annual Reviews in Microbiology* 54, 615-640.
- Evans Jr, D. J., D. G. Evans, T. Takemura, H. Nakano, H. C. Lampert, D. Y. Graham, D. N. Granger, and P. R. Kviety, 1995, "Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein," *Infection and immunity* 63, 2213.
- Fabris, P., L. Bozzola, P. Benedetti, M. Scagnelli, R. Nicolini, V. Manfrin, C. Scarparo, and F. D. Lalla, 1997, "H. pylori Infection in HIV-Positive Patients (A Serohistological Study)," *Digestive diseases and sciences* 42, 289-292.
- Falush, D., C. Kraft, N. S. Taylor, P. Correa, J. G. Fox, M. Achtman, and S. Suerbaum, 2001, "Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 15056.
- Falush, D., T. Wirth, B. Linz, J. K. Pritchard, M. Stephens, M. Kidd, M. J. Blaser, D. Y. Graham, S. Vacher, and G. I. Perez-Perez, 2003, "Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations," *Science* 299, 1582.
- Fan, X., H. Gunasena, Z. Cheng, R. Espejo, S. E. Crowe, P. B. Ernst, and V. E. Reyes, 2000, "*Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis," *The Journal of Immunology* 165, 1918.
- Figura, N., P. Guglielmetti, A. Rossolini, A. Barberi, G. Cusi, R. A. Musmanno, M. Russi, and S. Quaranta, 1989, "Cytotoxin production by *Campylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only," *Journal of clinical microbiology* 27, 225.
- Franco, A. T., D. A. Israel, M. K. Washington, U. Krishna, J. G. Fox, A. B. Rogers, A. S. Neish, L. Collier-Hyams, G. I. Perez-Perez, and M. Hatakeyama, 2005, "Activation of β -catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10646.
- Freedburg, A. S., 1940, "The presence of Spirochaetes in human gastric mucosa," *Am. J. Dig. Dis* 7, 443-445.
- Fujimoto, S., O. Olaniyi Ojo, A. Arnqvist, J. Yih Wu, S. Odenbreit, R. Haas, D. Y. Graham, and Y. Yamaoka, 2007, "*Helicobacter pylori* BabA expression, gastric mucosal injury, and clinical outcome," *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 5, 49-58.
- Fujimura, K., 2005, "Helicobacter pylori and Idiopathic Thrombocytopenic Purpura," *International Journal of Hematology* 81, 113-118.
- Gao, L., M. N. Weck, A. Michel, and H. Brenner, 2009, "Association between chronic atrophic gastritis and serum antibodies to 15 *Helicobacter pylori* proteins measured by multiplex serology," *Cancer research* 69, 2973.

- Garza-González, E., F. J. Bosques-Padilla, R. Tijerina-Menchaca, J. P. Flores-Gutierrez, H. J. Maldonado-Garza, and G. I. Pérez-Pérez, 2003, "Comparison of endoscopy-based and serum-based methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori*," *Canadian journal of gastroenterology= Journal canadien de gastroenterologie* 17, 101.
- Gasbarrini, A., E. Carloni, G. Gasbarrini, and S. A. Chisholm, 2004, "*Helicobacter pylori* and extragastric diseases—other *Helicobacters*," *Helicobacter* 9, 57-66.
- Gebert, B., W. Fischer, E. Weiss, R. Hoffmann, and R. Haas, 2003, "*Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation," *Science* 301, 1099.
- Geis, G., S. Suerbaum, B. Forsthoff, H. Leying, and W. Opferkuch, 1993, "Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*," *Journal of medical microbiology* 38, 371.
- Gerhard, M., N. Lehn, N. Neumayer, T. Boron, R. Rad, W. Schepp, S. Miehke, M. Classen, and C. Prinz, 1999, "Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 12778.
- Gerhard, M., C. Schmees, P. Volland, N. Endres, M. Sander, W. Reindl, R. Rad, M. Oelsner, T. Decker, and M. Mempel, 2005b, "A Secreted Low-Molecular-Weight Protein From *Helicobacter pylori* Induces Cell-Cycle Arrest of T Cells," *Gastroenterology* 128, 1327-1339.
- Gerhard, M., C. Schmees, P. Volland, N. Endres, M. Sander, W. Reindl, R. Rad, M. Oelsner, T. Decker, and M. Mempel, 2005a, "A Secreted Low-Molecular-Weight Protein From *Helicobacter pylori* Induces Cell-Cycle Arrest of T Cells," *Gastroenterology* 128, 1327-1339.
- Gewirtz, A. T., Y. Yu, U. S. Krishna, D. A. Israel, S. L. Lyons, and R. M. Peek Jr, 2004, "*Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity," *The Journal of infectious diseases* 189, 1914-1920.
- Gisbert, J. P. and J. M. Pajares, 2004, "Stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review," *Helicobacter* 9, 347-368.
- Glocker, E., H. P. Stueger, and M. Kist, 2006, "Quinolone resistance in *Helicobacter pylori* in Germany," *Antimicrobial agents and chemotherapy*.
- Goodwin, C. S. and J. A. Armstrong, 1989, "Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 39, 397.
- Goodwin, C. S. and B. W. Worsley, 1993, "Microbiology of *Helicobacter pylori*," *Gastroenterology Clinics of North America* 22, 5.
- Graham, D. Y., H. M. Malaty, D. G. Evans, D. J. Evans, P. D. Klein, and E. Adam, 1991, "Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States," *Gastroenterology* 100, 1495-1501.
- Haas, G., G. Karaali, K. Ebermayer, W. G. Metzger, S. Lamer, U. Zimny-Arndt, S. Diescher, U. B. Goebel, K. Vogt, and A. B. Roznowski, 2002, "Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease," *Proteomics* 2, 313-324.
- Hafsi, N., P. Volland, S. Schwendy, R. Rad, W. Reindl, M. Gerhard, and C. Prinz, 2004, "Human dendritic cells respond to *Helicobacter pylori*, promoting NK cell and Th1-effector responses in vitro," *The Journal of Immunology* 173, 1249.
- Hanahan, D., 1983, "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids," *Journal of molecular biology* 166, 557.
- Hawtin, P. R., A. R. Stacey, and D. G. Newell, 1990, "Investigation of the structure and localization of the urease of *Helicobacter pylori* using monoclonal antibodies," *Microbiology* 136, 1995.
- He, Q., J. P. Wang, M. Osato, and L. B. Lachman, 2002, "Real-time quantitative PCR for detection of *Helicobacter pylori*," *Journal of clinical microbiology* 40, 3720.

- Iaquinto, G., A. Todisco, N. Giardullo, V. D'Onofrio, L. Pasquale, A. De Luca, A. Andriulli, F. Perri, C. Rega, and G. De Chiara, 2000, "Antibody response to *Helicobacter pylori* CagA and heat-shock proteins in determining the risk of gastric cancer development," *Digestive and Liver Disease* 32, 378-383.
- Igarashi, M., Y. Kitada, H. Yoshiyama, A. Takagi, T. Miwa, and Y. Koga, 2001, "Ammonia as an accelerator of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* infection," *Infection and immunity* 69, 816.
- Ilver, D., A. Arnqvist, J. Ogren, I. M. Frick, D. Kersulyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand, and T. Boren, 1998, "*Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging," *Science* 279, 373.
- Isaacson, P. G., 1994, "Gastric Lymphoma and *Helicobacter pylori*," *New England Journal of Medicine* 330, 1310-1311.
- Ishihara, S., M. A. K. Rumi, Y. Kadowaki, C. F. Ortega-Cava, T. Yuki, N. Yoshino, Y. Miyaoka, H. Kazumori, N. Ishimura, and Y. Amano, 2004, "Essential role of MD-2 in TLR4-dependent signaling during *Helicobacter pylori*-associated gastritis," *The Journal of Immunology* 173, 1406.
- Isomoto, H., H. Mukae, H. Ishimoto, Y. Nishi, C. Y. Wen, A. Wada, K. Ohnita, T. Hirayama, M. Nakazato, and S. Kohno, 2005, "High concentrations of human beta-defensin 2 in gastric juice of patients with *Helicobacter pylori* infection," *WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY* 11, 4782.
- Jaskowski, T. D., T. B. Martins, H. R. Hill, and C. M. Litwin, 1997, "Immunoglobulin A antibodies to *Helicobacter pylori*," *Journal of clinical microbiology* 35, 2999.
- Johansen, H. K., A. Norgaard, L. P. Andersen, P. Jensen, H. Nielsen, and N. Hoiby, 1995, "Cross-reactive antigens shared by *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, and *Haemophilus influenzae* may cause false-positive titers of antibody to *H. pylori*," *Clinical and Vaccine Immunology* 2, 149.
- Jones, A. C., R. P. Logan, S. Foynes, A. Cockayne, B. W. Wren, and C. W. Penn, 1997, "A flagellar sheath protein of *Helicobacter pylori* is identical to HpaA, a putative N-acetylneuraminylactose-binding hemagglutinin, but is not an adhesin for AGS cells," *Journal of bacteriology* 179, 5643.
- JUNG, H. C., C. Y. KIM, J. M. KIM, and I. N. S. SONG, 1997, "*Helicobacter pylori* induces an array of proinflammatory cytokines in human gastric epithelial cells: Quantification of mRNA for interleukin, granulocyte macrophage colony stimulating factor, monocyte chemoattractant protein and tumour necrosis factor," *Journal of gastroenterology and hepatology* 12, 473-480.
- Karimi, M., D. Inz+®, and A. Depicker, 2002, "GATEWAY (TM) vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation," *Trends in Plant Science* 7, 193-195.
- Kavermann, H., B. P. Burns, K. Angermüller, S. Odenbreit, W. Fischer, K. Melchers, and R. Haas, 2003, "Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization," *The Journal of Experimental Medicine* 197, 813.
- Kimmel, B., A. Bosserhoff, R. Frank, R. Gross, W. Goebel, and D. Beier, 2000, "Identification of immunodominant antigens from *Helicobacter pylori* and evaluation of their reactivities with sera from patients with different gastroduodenal pathologies," *Infection and immunity* 68, 915.
- Koletzko, S., N. Konstantopoulos, D. Bosman, A. Feydt-Schmidt, A. Van der Ende, N. Kalach, J. Raymond, and H. Rössmann, 2003, "Evaluation of a novel monoclonal enzyme immunoassay for detection of *Helicobacter pylori* antigen in stool from children," *Gut* 52, 804.
- Kranzer, K., L. Sollner, M. Aigner, N. Lehn, L. Deml, M. Rehli, and W. Schneider-Brachert, 2005, "Impact of *Helicobacter pylori* virulence factors and compounds on activation and maturation of human dendritic cells," *Infection and immunity* 73, 4180.
- Krienitz, W., 1906, "Ueber das auftreten von spirochaeten verschiedener formen im mageninhalte bei carcinoma ventriculi. *Deutsches Med Wochenschr*, 1906, 32: 872," *Links*.
- Kuck, D., B. Kolmerer, C. Iking-Konert, P. H. Krammer, W. Stremmel, and J. Rudi, 2001, "Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS,"

Infection and immunity 69, 5080.

- Kuipers, E. J., G. I. P0rez-P0rez, S. G. M. Meuwissen, and M. J. Blaser, 1995, "Helicobacter pylori and atrophic gastritis: importance of the cagA status," *Journal of the National Cancer Institute* 87, 1777.
- Kwiatkowski, J. R., 2009, "In Patients with Peptic Ulcer Disease, What Is the Most Accurate Diagnostic Test to Determine the Presence of Helicobacter pylori Prior to Treatment?," *School of Physician Assistant Studies* 163.
- Labigne, A., V. Cussac, and P. Courcoux, 1991, "Shuttle cloning and nucleotide sequences of Helicobacter pylori genes responsible for urease activity," *Journal of bacteriology* 173, 1920.
- Lang, L., 2007, "Childhood acquisition of Helicobacter pylori linked to reduced asthma and allergy risk," *Gastroenterology* 133, 6.
- Lehmann, F. S., L. Terracciano, I. Carena, C. Baeriswyl, J. Drewe, L. Tornillo, G. De Libero, and C. Beglinger, 2002, "In situ correlation of cytokine secretion and apoptosis in Helicobacter pylori-associated gastritis," *American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology* 283, 481.
- Leunk, R. D., P. T. Johnson, B. C. David, W. G. Kraft, and D. R. Morgan, 1988, "Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of Campylobacter pylori," *Journal of medical microbiology* 26, 93.
- Machado, R. S., F. R. da Silva Patr0cio, and E. Kawakami, 2004, "13C-urea breath test to diagnose Helicobacter pylori infection in children aged up to 6 years," *Helicobacter* 9, 39-45.
- Mahdavi, J., B. Sonden, M. Hurtig, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, J. Angstrom, T. Larsson, S. Teneberg, and K. A. Karlsson, 2002, "Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation," *Science* 297, 573.
- Malaty, H. M., D. G. Evans, D. J. Evans Jr, and D. Y. Graham, 1992, "Helicobacter pylori in Hispanics: comparison with blacks and whites of similar age and socioeconomic class," *Gastroenterology* 103, 813.
- Malaty, H. M. and D. Y. Graham, 1994, "Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of Helicobacter pylori infection," *Gut* 35, 742.
- Malferteiner, P., F. Megraud, C. OÆMorain, F. Bazzoli, E. El-Omar, D. Graham, R. Hunt, T. Rokkas, N. Vakil, and E. J. Kuipers, 2007, "Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report," *Gut* 56, 772.
- Manes, G., A. Balzano, G. Iaquinto, C. Ricci, M. M. Piccirillo, N. Giardullo, A. Todisco, M. Lioniello, and D. Vaira, 2001, "Accuracy of the stool antigen test in the diagnosis of Helicobacter pylori infection before treatment and in patients on omeprazole therapy," *Alimentary pharmacology & therapeutics* 15, 73-79.
- Marshall, B. J., J. A. Armstrong, D. B. McGeachie, and R. J. Glancy, 1985, "Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric Campylobacter," *The Medical journal of Australia* 142, 436.
- Marshall, B. J., L. J. Barrett, C. Prakash, R. W. McCallum, and R. L. Guerrant, 1990, "Urea protects Helicobacter (Campylobacter) pylori from the bactericidal effect of acid," *Gastroenterology* 99, 697.
- Marshall, B. J. and J. R. Warren, 1984, "UNIDENTIFIED CURVED BACILLI IN THE STOMACH OF PATIENTS WITH GASTRITIS AND PEPTIC ULCERATION* 1," *The Lancet* 323, 1311-1315.
- Matsumura, M., Y. Hikiba, K. Ogura, G. Togo, I. Tsukuda, K. Ushikawa, Y. Shiratori, and M. Omata, 2001, "Rapid detection of mutations in the 23S rRNA gene of Helicobacter pylori that confers resistance to clarithromycin treatment to the bacterium," *Journal of clinical microbiology* 39, 691.
- Megraud, F., M. P. Brassens-Rabbe, F. Denis, A. Belbouri, and D. Q. Hoa, 1989, "Seroepidemiology of Campylobacter pylori infection in various populations," *Journal of clinical microbiology* 27, 1870.

- Mendz, G. L., S. L. Hazell, and B. P. Burns, 1993, "Glucose utilization and lactate production by *Helicobacter pylori*," *Microbiology* 139, 3023.
- Mimuro, H., T. Suzuki, J. Tanaka, M. Asahi, R. Haas, and C. Sasakawa, 2002, "Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities," *Molecular cell* 10, 745-755.
- Mittl, P. R. E., L. Luthy, C. Reinhardt, and H. Joller, 2003, "Detection of high titers of antibody against *Helicobacter* cysteine-rich proteins A, B, C, and E in *Helicobacter pylori*-infected individuals," *Clinical and Vaccine Immunology* 10, 542.
- Molinari, M., M. Salio, C. Galli, N. Norais, R. Rappuoli, A. Lanzavecchia, and C. Montecucco, 1998, "Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA," *The Journal of Experimental Medicine* 187, 135.
- Momynaliev, K. T., S. I. Rogov, O. V. Selezneva, V. V. Chelysheva, T. A. Akopian, and V. M. Govorun, 2005, "Comparative analysis of transcription profiles of *Helicobacter pylori* clinical isolates," *Biochemistry (Moscow)* 70, 383-390.
- Montecucco, C. and M. de Bernard, 2003, "Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*," *Microbes and infection* 5, 715-721.
- Monteiro, L., A. Mascarel, A. M. Sarrasqueta, B. Bergey, C. Barberis, P. Talby, D. Roux, L. Shouler, D. Goldfain, and H. Lamouliatte, 2001, "Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests," *The American journal of gastroenterology* 96, 353-358.
- Montemurro, P., H. Nishioka, W. G. Dundon, M. de Bernard, G. Del Giudice, R. Rappuoli, and C. Montecucco, 2002, "The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a potent stimulant of mast cells," *European journal of immunology* 32, 671-676.
- Morris, A. J., M. R. Ali, G. I. Nicholson, G. I. Perez-Perez, and M. J. Blaser, 1991, "Long-term follow-up of voluntary ingestion of *Helicobacter pylori*," *Annals of internal medicine* 114, 662.
- Murata-Kamiya, N., Y. Kurashima, Y. Teishikata, Y. Yamahashi, Y. Saito, H. Higashi, H. Aburatani, T. Akiyama, R. M. Peek, and T. Azuma, 2007, "*Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the β -catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells," *Oncogene* 26, 4617-4626.
- Namavar, F., M. Sparrius, E. C. I. Veerman, B. J. Appelmelk, and C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, 1998, "Neutrophil-activating protein mediates adhesion of *Helicobacter pylori* to sulfated carbohydrates on high-molecular-weight salivary mucin," *Infection and immunity* 66, 444.
- Nardone, G., A. Rocco, and P. Malfertheiner, 2004, "*Helicobacter pylori* and molecular events in precancerous gastric lesions," *Alimentary pharmacology & therapeutics* 20, 261-270.
- Nomura, A. M. Y., G. I. Perez-Perez, J. Lee, G. Stemmermann, and M. J. Blaser, 2002, "Relation between *Helicobacter pylori* cagA status and risk of peptic ulcer disease," *American journal of epidemiology* 155, 1054.
- Odenbreit, S., B. Edlmaier, E. Erland, W. Ischer, and R. Haas, 2000, "Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion," *Science* 287, 1497.
- Ogura, K., S. Maeda, M. Nakao, T. Watanabe, M. Tada, T. Kyutoku, H. Yoshida, Y. Shiratori, and M. Omata, 2000, "Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil," *The Journal of Experimental Medicine* 192, 1601.
- Oleastro, M., A. Mønard, A. Santos, H. Lamouliatte, L. Monteiro, P. Barthølymy, and F. Møgraud, 2003, "Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*," *Journal of clinical microbiology* 41, 397.
- Park, J. W., J. Y. Song, S. G. Lee, J. S. Jun, J. U. Park, M. J. Chung, J. S. Ju, D. Nizamutdinov, M. W. Chang, and H. S. Youn, 2006, "Quantitative analysis of representative proteome components and clustering of *Helicobacter pylori* clinical strains," *Helicobacter* 11, 533-543.

- Parsonnet, J., H. Shmueli, and T. Haggerty, 1999, "Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults," *Jama* 282, 2240.
- Paziak-Domaska, B., M. Chmiela, A. Jarosiska, and W. Rudnicka, 2000, "Potential role of CagA in the inhibition of T cell reactivity in *Helicobacter pylori* infections," *Cellular Immunology* 202, 136-139.
- Pellicano, R., S. Fagoonee, M. Rizzetto, and A. Ponzetto, 2003a, "*Helicobacter pylori* and coronary heart disease: which directions for future studies?," *Critical reviews in microbiology* 29, 351-359.
- Pellicano, R., M. G. Mazzarello, S. Morelloni, M. Ferrari, P. Angelino, M. Berrutti, A. M. Torriglia, M. Rizzetto, and A. Ponzetto, 2003b, "*Helicobacter pylori* seropositivity in patients with unstable angina," *The Journal of cardiovascular surgery* 44, 605.
- Perez-Perez, G. I., D. Rothenbacher, and H. Brenner, 2004, "Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection," *Helicobacter* 9, 1-6.
- Portal-Celhay, C. and G. Perez-Perez, 2006, "Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes," *Clinical Science* 110, 305-314.
- Rad, R., W. Ballhorn, P. Volland, J. Mages, L. Rad, R. Ferstl, R. Lang, H. Wagner, and R. M. Schmid, 2009, "Extracellular and intracellular pattern recognition receptors cooperate in the recognition of *Helicobacter pylori*," *Gastroenterology* 136, 2247-2257.
- Rossi, G., D. Fortuna, L. Pancotto, G. Renzoni, E. Taccini, P. Ghiara, R. Rappuoli, and G. Del Giudice, 2000, "Immunohistochemical study of lymphocyte populations infiltrating the gastric mucosa of beagle dogs experimentally infected with *Helicobacter pylori*," *Infection and immunity* 68, 4769.
- Sabarth, N., S. Lamer, U. Zimny-Arndt, P. R. Jungblut, T. F. Meyer, and D. Bumann, 2002, "Identification of surface proteins of *Helicobacter pylori* by selective biotinylation, affinity purification, and two-dimensional gel electrophoresis," *Journal of Biological Chemistry* 277, 27896.
- Salyers, A. A., D. D. Whitt, and D. D. Whitt, 1994, *Bacterial pathogenesis: a molecular approach* (ASM press Washington, DC, USA).
- Satin, B., G. Del Giudice, V. la Bianca, S. Dusi, C. Laudanna, F. Tonello, D. Kelleher, R. Rappuoli, C. Montecucco, and F. Rossi, 2000, "The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor," *The Journal of Experimental Medicine* 191, 1467.
- Schmees, C., C. Prinz, T. Treptau, R. Rad, L. Hengst, P. Volland, S. Bauer, L. Brenner, R. M. Schmid, and M. Gerhard, 2007b, "Inhibition of T-Cell Proliferation by *Helicobacter pylori* [gamma]-Glutamyl Transpeptidase," *Gastroenterology* 132, 1820-1833.
- Schmees, C., C. Prinz, T. Treptau, R. Rad, L. Hengst, P. Volland, S. Bauer, L. Brenner, R. M. Schmid, and M. Gerhard, 2007a, "Inhibition of T-Cell Proliferation by *Helicobacter pylori* [gamma]-Glutamyl Transpeptidase," *Gastroenterology* 132, 1820-1833.
- Scott, D. R., D. Weeks, C. Hong, S. Postius, K. Melchers, and G. Sachs, 1998, "The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*," *Gastroenterology* 114, 58-70.
- Seher, C., W. Thierfelder, and R. Dortschy, 2000, "*Helicobacter pylori*-Prävalenz in der deutschen Bevölkerung.[*Helicobacter pylori*-Prevalence in the German population]," *Gesundheitswesen* 62, 598-603.
- Selbach, M., S. Moese, R. Hurwitz, C. R. Hauck, T. F. Meyer, and S. Backert, 2003, "The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation," *The EMBO journal* 22, 515-528.
- Solnick, J. V. and D. B. Schauer, 2001, "Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases," *Clinical microbiology reviews* 14, 59.
- Stein, M., F. Bagnoli, R. Halenbeck, R. Rappuoli, W. J. Fantl, and A. Covacci, 2002, "c Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs," *Molecular microbiology* 43, 971-980.

- Stein, M., R. Rappuoli, and A. Covacci, 2000, "Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1263.
- Stingl, K., K. Altendorf, and E. P. Bakker, 2002, "Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis?," *Trends in microbiology* 10, 70-74.
- Suerbaum, S. and P. Michetti, 2002, "*Helicobacter pylori* infection," *New England Journal of Medicine* 347, 1175.
- Suerbaum, S., J. M. Smith, K. Bapumia, G. Morelli, N. H. Smith, E. Kunstmann, I. Dyrek, and M. Achtman, 1998, "Free recombination within *Helicobacter pylori*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 12619.
- Suzuki, M., S. Miura, M. Suematsu, D. Fukumura, I. Kurose, H. Suzuki, A. Kai, Y. Kudoh, M. Ohashi, and M. Tsuchiya, 1992, "*Helicobacter pylori*-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury," *American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology* 263, G719.
- Szabo, I., S. Brutsche, F. Tombola, M. Moschioni, B. Satin, J. L. Telford, R. Rappuoli, C. Montecucco, E. Papini, and M. Zoratti, 1999, "Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity," *The EMBO journal* 18, 5517-5527.
- Tankovic, J., C. Lascols, Q. Sculo, J. C. Petit, and C. J. Soussy, 2003, "Single and double mutations in *gyrA* but not in *gyrB* are associated with low-and high-level fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*," *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47, 3942.
- Tate, S. S. and A. Meister, 1981, "-Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects," *Molecular and Cellular Biochemistry* 39, 357-368.
- Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, and B. A. Dougherty, 1997, "The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*," *Nature* 388, 539-547.
- Torok, A. M., A. H. Bouton, and J. B. Goldberg, 2005, "*Helicobacter pylori* induces interleukin-8 secretion by Toll-like receptor 2-and Toll-like receptor 5-dependent and-independent pathways," *Infection and immunity* 73, 1523.
- Tsuda, M., M. Karita, M. G. Morshed, K. Okita, and T. Nakazawa, 1994, "A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach," *Infection and immunity* 62, 3586.
- Udd, M., P. Miettinen, A. Palmu, and R. Julkunen, 2003, "Effect of short-term treatment with regular or high doses of omeprazole on the detection of *Helicobacter pylori* in bleeding peptic ulcer patients," *Scandinavian journal of gastroenterology* 38, 588-593.
- Uemura, N., S. Okamoto, S. Yamamoto, N. Matsumura, S. Yamaguchi, M. Yamakido, K. Taniyama, N. Sasaki, and R. J. Schlemper, 2001, "*Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer," *New England Journal of Medicine* 345, 784.
- Vaira, D. and N. Vakil, 2001, "Blood, urine, stool, breath, money, and *Helicobacter pylori*," *Gut* 48, 287.
- Van Bohemen, C. G., M. L. Langenberg, E. A. J. Rauws, J. Oudbier, E. Weterings, and H. C. Zanen, 1989, "Rapidly decreased serum IgG to *Campylobacter pylori* following elimination of *Campylobacter* in histological chronic biopsy *Campylobacter*-positive gastritis," *Immunology letters* 20, 59-61.
- Velin, D., D. Bachmann, H. Bouzourene, and P. Michetti, 2005, "Mast cells are critical mediators of vaccine-induced *Helicobacter* clearance in the mouse model," *Gastroenterology* 129, 142-155.
- Voland, P., D. L. Weeks, E. A. Marcus, C. Prinz, G. Sachs, and D. Scott, 2003, "Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene cluster," *American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology* 284, 96.

- Warren, J. R. and B. J. Marshall, 1983, "Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis," *Lancet* 1, 1273-1275.
- Waterboer, T., P. Sehr, K. M. Michael, S. Franceschi, J. D. Nieland, T. O. Joos, M. F. Templin, and M. Pawlita, 2005, "Multiplex human papillomavirus serology based on in situ-purified glutathione S-transferase fusion proteins," *Clinical chemistry* 51, 1845.
- Webb, P. M., T. Knight, S. Greaves, A. Wilson, D. G. Newell, J. Elder, and D. Forman, 1994, "Relation between infection with *Helicobacter pylori* and living conditions in childhood: evidence for person to person transmission in early life," *Bmj* 308, 750.
- Weeks, D. L., S. Eskandari, D. R. Scott, and G. Sachs, 2000, "A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization," *Science* 287, 482.
- Xiang, Z., S. Censini, P. F. Bayeli, J. L. Telford, N. Figura, R. Rappuoli, and A. Covacci, 1995, "Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin," *Infection and immunity* 63, 94.
- Yakabi, K., T. Arimura, M. Koyanagi, Y. Uehigashi, S. Ro, Y. Minagawa, and T. Nakamura, 2002, "Effects of interleukin-8 and *Helicobacter pylori* on histamine release from isolated canine gastric mucosal mast cells," *Journal of gastroenterology* 37, 10-16.
- Yamaoka, Y., 2008, "Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis," *World Journal of Gastroenterology: WJG* 14, 4265.
- Yamaoka, Y., M. Kita, T. Kodama, N. Sawai, K. Kashima, and J. Imanishi, 1997, "Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive *Helicobacter pylori* strains," *Gut* 41, 442.
- Yamaoka, Y., T. Kodama, O. Gutierrez, J. G. Kim, K. Kashima, and D. Y. Graham, 1999, "Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries," *Journal of clinical microbiology* 37, 2274.
- Zevering, Y., L. Jacob, and T. F. Meyer, 1999, "Naturally acquired human immune responses against *Helicobacter pylori* and implications for vaccine development," *Gut* 45, 465.

8 Publikationen

Teile dieser Arbeit werden unter folgendem Titel veröffentlicht:

A novel immuno-line assay enables highly specific and sensitive serologic diagnosis of H. pylori infection in comparison to ELISA, Immunoblot and histology

9 Danksagung

Für die interessante Fragestellung, die durchgängig gute Betreuung und die Zuverlässigkeit während der Erstellung meiner Arbeit möchte ganz herzlich Prof. Dr. Markus Gerhard danken.

Besonderer Dank aus der AG Gerhard gilt Christian Bolz, der mir die molekularbiologischen und proteinchemischen Methoden näher gebracht und mich stets bei Fragen unterstützt hat.

Weiterer Dank für eine gute Zusammenarbeit und immer ein offenes Ohr gilt Behnam Kalali, Luca Formicelli sowie Anke Loregger, Katharina Hütz und Zohra Sahavi-Ouriaghi.

Für die Hilfe in statistischen Fragestellungen möchte ganz herzlich Bernhard Haller danken.

Herrn Prof. Dr. Schepp von der Gastroenterologie am Klinikum Bogenhausen danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Hilfe bei der Sammlung histologischer Proben.

Bei meinen Eltern und meiner Schwester Marlene bedanke ich mich für ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums und die Gewissheit mich immer auf sie verlassen zu können.