

II. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München

Klinikum rechts der Isar

(Komm. Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. (Univ. Istanbul/Türkei, UMF Iassy,

Univ. Athen) M. Classen, i. R.)

**Die Schlüsselrolle des *Helicobacter pylori* Adhärenz-Faktors
„Blutgruppen-Antigen bindendes Adhäsın“ (Bab A) bei der
Entstehung schwerwiegender histologischer Veränderungen
der menschlichen Magenschleimhaut**

Martin Schöniger

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. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Chr. Prinz

2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 25.10.2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin

am 15.01.2003 angenommen.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits wie folgt veröffentlicht:

Prinz C., Schöniger M., Rad R., Becker I., Keiditsch E., Wagenpfeil S., Classen M., Rösch T., Schepp W. and Gerhard M.:

Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation.

Cancer Res 2001; 61: 1903-9.

Rad R., Gerhard M., Lang R., Schöniger M., Rösch T., Schepp W., Becker I., Wagner H. and Prinz C.:

The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response.

J Immunol 2002; 168: 3033-41.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1	Allgemeine Einleitung: <i>Helicobacter pylori</i> – Forschung und Klinik_____1
1.2	Spezielle Einleitung_____6
1.2.1.	Überleben und Bewegung von <i>H. pylori</i> im sauren Milieu des Magens_____6
1.2.2.	Diagnostik und Nachweismethoden der <i>H. pylori</i> Infektion_____9
1.2.3.	<i>H. pylori</i> assoziierte Pathologie: histologische Veränderungen der Magenschleimhaut und induzierte Immunantwort_____12
1.2.4.	Genetik von <i>H. pylori</i> _____16
1.2.5.	Pathogenitätsfaktoren_____17
1.2.5.1.	Das Zytotoxin assoziierte Antigen (CagA), die Cag Pathogenitätsinsel (<i>cagPAI</i>) und die Typ IV Sekretion_____17
1.2.5.2.	Das Vakuolisierende Zytotoxin (VacA)_____19
1.2.5.3.	Adhärenzmechanismen: Blutgruppen-Antigen bindendes Adhäsion (BabA)_____21
1.2.6.	Definition der „Typ 1 Stämme“ und der „Triple positiven Stämme“_____25
2. Material und Methoden	26
2.1.	Die Polymerasekettenreaktion (PCR)_____26
2.2.	Patientenauswahl und Biopsiegewinnung_____28
2.3.	Verarbeitung und Lagerung der Magenbiopsien_____29
2.4.	Histologische Beurteilung der Biopsien_____30
2.5.	Molekularbiologische Arbeitsmethoden_____32
2.5.1.	Materialien und Bezugsquellen_____32
2.5.2.	Verwendete Puffer, Lösungen und Medien_____34
2.5.3.	Sterilisation von Arbeitsmaterialien/Maßnahmen zur Dekontamination_____35

2.5.4.	Präparation der DNA und RNA	36
2.5.5.	Durchführung der Polymerasekettenreaktion	38
2.5.5.1.	Auswahl und Herstellung der Oligonukleotidprimer	39
2.5.5.2.	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	39
2.6.	Auswertung der PCR-Ergebnisse	42
2.7.	Klassifizierung der Patientenbiopsien anhand Pathologie und <i>H. pylori</i> Genotypen	42
2.8.	Statistische Methoden	42
3.	Ergebnisse	43
3.1.	Histologische Beurteilung der Antrum- und Korpusbiopsien	43
3.2.	DNA-/RNA-Extraktion	47
3.3.	Nachweis der Infektion durch <i>H. pylori</i> mittels <i>ureaseb</i> PCR	47
3.4.	<i>H. pylori</i> Genotypen und die histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut	48
3.4.1.	Korrelation des <i>babA2</i> , <i>vacAs1</i> und <i>cagA</i> Genotyps mit dem Ausmaß der granulozytären und lymphozytären Infiltration im Antrum und Korpus	48
3.4.1.1.	Blutgruppen-Antigen bindendes Adhäsins (<i>babA</i>)	50
3.4.1.2.	Vakuolisierendes Zytotoxin (<i>vacA</i>)	53
3.4.1.3.	Zytotoxin assoziiertes Antigen (<i>cagA</i>)	56
3.4.2.	Korrelation <i>babA2</i> positiver/negativer „Typ 1 Stämme“ mit der Aktivität und Chronizität der Gastritis	59
3.4.3.	Unterscheidung von <i>H. pylori</i> Subtypen bei schwerwiegenden histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut (Gastritis 3°, Drüsenatrophie, intestinale Metaplasie)	62

4. Diskussion _____ 65

5. Zusammenfassung _____ 71

6. Literaturverzeichnis _____ 73

7. Anhang _____ 88

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A-Gastritis	Autoimmun-Gastritis
ALP	Adhärenz-assoziiertes Lipoprotein
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
AT	Atrophie der Magenschleimhaut
ATP	Adenosintriphosphat
BabA	Blutgruppen-Antigen bindendes Adhäsın
B-Gastritis	Gastritis durch <i>H. pylori</i>
bp	Basenpaare
C	Kohlenstoff
Ca	Karzinom
Cag	Zytotoxin-assoziiertes Antigen
C-Gastritis	Gastritis durch chemische Einwirkungen
CLO	Campylobacter like Organism
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL-Zellen	Enterochromaffin-like Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Fla	Flagellin
G	aktive Gastritis
GTP	Guanidintriphosphat

G-Zellen	Gastrin-Zellen
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Humanes Leukozytenantigen
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HSP	Heat shock protein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IM	Intestinale Metaplasie der Magenschleimhaut
INOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IS	Insertionsequenz
kDa	kiloDalton
L	chronische Gastritis
Le	Lewis
LPS	Lipopolysaccharide
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mV	milliVolt
NH ₃	Ammoniak
NO	Stickstoffmonoxid
ÖGD	Ösophago-Gastro-Duedenoskopie
OMP	Outer membran protein
ORF	Open reading frame
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction

RM	Repeat motif
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Ure	Urease
Vac	Vakuolisierendes Zytotoxin

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einleitung: *Helicobacter pylori* – Forschung und Klinik

H. pylori ist ein gram-negatives Bakterium, welches die Schleimhaut des menschlichen Magens kolonisiert. Die Infektion mit diesem Keim führt bei der Mehrzahl der Fälle zu der Entstehung einer chronischen Gastritis. Ein Teil der befallenen Patienten entwickelt Magen- und Duodenalgeschwüre, ein geringer Prozentsatz sogar Adenokarzinome des Magens (13; 15). In den westlichen Industrienationen sind etwa 30 bis 50% der Bevölkerung infiziert, wobei die primäre Infektion sehr häufig in der frühen Kindheit erfolgt (104; 117). In den Entwicklungsländern sind bei schlechten hygienischen Zuständen ca. 80 bis 90% der Menschen bis zum 20. Lebensjahr infiziert (23; 25); insgesamt handelt es sich somit um die weltweit häufigste bakterielle Infektion des Menschen (23; 70; 136; 144). Dies unterstreicht die besondere medizinische und gleichzeitig auch volkswirtschaftliche Bedeutung dieses Pathogens (17; 136).

Die Übertragung von *H. pylori* erfolgt bei engem Kontakt normalerweise auf oral-oralem Wege, bei schlechten hygienischen Zuständen auch fäkal-oral (49; 82; 102; 187). Der Keim läßt sich in der befallenen Magenschleimhaut nachweisen, aber auch in Fäzes und im Speichel von Kindern (26; 99; 193). Die dauerhafte Besiedlung der Magenschleimhaut des Menschen ist keinem anderen Keim möglich. *H. pylori* überlebt also in einer speziellen ökologischen Nische, die er sich im Laufe einer langen Evolution erobert hat (38).

Intensive experimentelle wie auch klinische Studien haben in den letzten Jahren die besondere Bedeutung dieses Bakteriums für die Entstehung von aktiver und chronischer Gastritis, Ulkus duodeni und ventriculi, sowie schweren histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut wie intestinale Metaplasie, Atrophie, aber auch gastralem MALT-Lymphom und Entstehung von Adenokarzinomen des Magens gezeigt (13-15; 176). Unklar ist allerdings bislang, wie die unterschiedlichen Entwicklungen gesteuert werden und welche Rolle hierbei bakterielle sowie Wirtsfaktoren spielen. Die erstmalige Kultivierung des damals noch als CLO

(„Campylobacter like Organism“) bezeichneten *H. pylori* gelang 1982 durch die Australier Warren und Marshall (109). Durch Selbstinokulation konnten die beiden Forscher nachweisen, daß die Ingestion dieses Keimes zu einer Gastritis führt und damit ein Koch'sches Postulat erfüllt (66). Klinische Studien zeigten 1993 darüber hinaus, daß die Eradikation von *H. pylori* durch eine Kombinationstherapie von Antibiotika und säuresekreteionshemmenden Medikamenten ein Ulkusrezidiv verhindern kann, womit die kausale Verbindung zwischen der Infektion mit dem Keim und der Entstehung von Ulzera des Magens bewiesen werden konnte (78; 79). Auch wurde in diesem Zeitraum über eine starke Assoziation der *H. pylori* Infektion mit der Entstehung des Magenkarzinoms berichtet, welche sich aus epidemiologischen Studien ergab (67; 127; 128; 134; 135; 137). Gleichfalls wurde ein epidemiologischer und auch experimenteller Zusammenhang mit der Entwicklung des MALT-Lymphoms des Magens festgestellt (201-204). Diese beschriebene Beziehung zwischen Infektion und schweren histologischen Veränderungen des Magens wurde verstärkt durch Erfahrungen des Tiermodels, wo die Besiedlung mit *H. pylori* ebenfalls zu schwerer Gastritis und intestinaler Metaplasie führte (68; 87). Neuere Untersuchungen am Tiermodel haben eine kausale Verbindung zwischen dem Auftreten von *H. pylori* und der Entstehung des distalen Adenokarzinoms des Magens hergestellt; dort führt die Infektion nicht nur zur Ausbildung einer intestinalen Metaplasie, sondern auch bei lang anhaltender Besiedlung zur Ausbildung des distalen Magenkarzinoms (83; 195). Diese Tatsachen hatten 1994 die Einstufung des Bakteriums *H. pylori* als Klasse I Karzinogen zur Folge (2). Patienten mit schwerer Gastritis und gleichzeitiger *H. pylori* Infektion sind bei insgesamt ca. vierfach erhöhtem Risiko ein Magenkarzinom zu entwickeln deshalb auch von großem klinischen Interesse; schließlich könnte ja bei einem gewissen Anteil die Eradikation des Keimes der Karzinomentstehung vorbeugen (62).

Trotzdem ist die Anzahl derer, die mit *H. pylori* infiziert sind viel zu groß, um generell jeden Patienten einer Eradikationstherapie zu unterziehen; darüber hinaus verläuft die Erkrankung bei dem größten Anteil der Patienten ohne Symptome und oft auch selbstlimitierend (26; 136). In

den letzten Jahren wurden zunehmend klinisch-pathologische Richtlinien etabliert, nach denen die Eradikation des Keimes unter bestimmten Voraussetzungen angestrebt werden sollte, meist in Form einer Kombination aus Protonenpumpenhemmern und Antibiotika im Sinne einer sogenannten „Triple-Therapie“ (62). Keimspezifische Überlegungen sind dabei bisher nicht herangezogen worden, da trotz der bereits vorhandenen detaillierten Erkenntnisse der Zusammenhang bakterieller Mechanismen mit der Entwicklung von Gastritis, schweren histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut bis zur Karzinomentstehung noch nicht vollständig geklärt ist.

Die Kolonisierung der Magenmukosa durch *H. pylori* führt im Allgemeinen zu einer aktiven Gastritis des Antrums, welche charakterisiert wird durch eine Infiltration der epithelialen Drüsen und der darunter liegenden Lamina propria mit polymorphkernigen mononukleären Zellen und Granulozyten (41; 42). Eine anhaltende Besiedlung kann auch zum Befall des Korpus fortschreiten mit nachfolgender Schädigung des Oberflächenepithels der Mukosa und einer Infiltration durch Granulozyten, Lymphozyten, Eosinophilen und Plasmazellen (95). Bei langanhaltender Persistenz von *H. pylori* kann die Infektion zu einer multifokalen Atrophie und intestinalen Metaplasie der Magenschleimhaut führen und somit zu der Entstehung des Magenkarzinomes prädisponieren (35; 65).

Die Atrophie der Drüsen der Magenmukosa, die Ausbildung einer intestinalen Metaplasie, einer schweren Korpusgastritis und/oder eine erhöhte Ratio zwischen Korpus- und Antrumgastritis (in Bezug auf die granulozytäre Infiltration) wurden bereits als mögliche Risikofaktoren für die Entstehung eines Adenokarzinomes des Magens beschrieben (36; 65; 112; 113; 164; 171). Trotz dieser fundierten Untersuchungen ist der Grund der Progression von chronischer Gastritis zum Magenkarzinom noch relativ unklar.

Das klinische Erscheinungsbild der durch *H. pylori* verursachten histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut hängt dabei wohl von der unterschiedlichen Virulenz der *H. pylori* Stämme ab. Dabei wurden mit dem Zytotoxin-assoziierten Antigen CagA und dem

Vakuolisierenden Zytotoxin VacA einige wichtige bakterielle Virulenzfaktoren bereits identifiziert. Dies führte danach zur Definition der stärker virulenten „Typ 1 Stämme“, wenn beide Faktoren gleichzeitig vorhanden sind bzw. sezerniert werden (206).

VacA wird definiert als ein oligomeres Zytotoxin, welches bei niedrigen pH-Werten im Magen aktiviert wird und nach aktiver Sekretion durch das Bakterium zu epithelialen Erosionen der Magenschleimhaut führt (6; 39). Das *vacA* Gen, welches das Vakuolisierende Zytotoxin kodiert, ist in allen *H. pylori* Stämmen vorhanden. Die Signalregion des *vacA* Gens am 5' Ende tritt als das s1 oder s2 Allel in Erscheinung. *VacAs1* positive Stämme produzieren mittlere bis große Mengen an Toxin, *vacAs2* positive dagegen nur kleine Mengen. Die Detektion von *vacAs1* in Magenbiopsien mittels Polymerasekettenreaktion kann dadurch als Marker für die Sekretion von vakuolisierendem Toxin herangezogen werden.

CagA ist ein immunologisch wirksames Antigen mit einem Molekulargewicht von 128 kDa, dessen serologischer oder genetischer Nachweis die Anwesenheit der Cag Pathogenitätsinsel (Cag Pathogenicityisland; *cagPAI*) anzeigt. Diese beherbergt eine ganze Gruppe von Genen, welche *H. pylori* durch horizontalen Transfer von anderen Bakterienspezies erworben hat und die dann auch im weiteren Verlauf einer mannigfaltigen genetischen Variabilität unterworfen wurden, unter anderem durch Insertionen und Punktmutationen; diese genetische Insel kodiert für verschiedene Gene zur Pathogenitätsregulation, so auch für eine bakterielle Typ IV Sekretionsmaschine (27; 37; 38). Im Verlauf der letzten Jahre konnten verschiedene Autoren zeigen, daß nach Adhäsion von *H. pylori* an AGS Zellen (einer Zelllinie aus menschlichem Magenepithel) CagA mit Hilfe des Typ IV Sekretionsapparates in diese Zellen sezerniert und dort phosphoryliert wird. Damit steht CagA in direktem Zusammenhang mit der durch den Keim induzierten Signaltransduktion (38; 131; 159; 160; 169). Somit ist die Anwesenheit von VacA und CagA von essentieller Bedeutung bei der Entstehung von epithelialen Schäden und chronischer Entzündung des Magens.

Die Virulenz könnte jedoch zusätzlich abhängig sein von einer engen Zell-Zell Interaktion zwischen den „Typ I Stämmen“ und den Wirtszellen, wie sie nur durch spezifische Adhärenzmechanismen vermittelt werden kann.

Bakterielle Adhärenzfaktoren, welche einen derart engen Kontakt zu den epithelialen Zellen herstellen, könnten somit zu einer gesteigerten Pathogenität des Keimes beitragen (16; 61). Es gibt jedoch noch wenig Erkenntnisse darüber, in wie fern die Adhärenzfaktoren des *Helicobacters* bei der Entstehung von schwerer Gastritis, Drüsenatrophie und intestinalen Metaplasie beteiligt sind. Der erst kürzlich entdeckte Adhärenzfaktor BabA (Blutgruppen-Antigen bindendes Adhäsion), welcher an das Blutgruppen-Antigen der Lewis^b-Unterfraktion bindet, könnte an der ausgeprägten Pathogenitätsentstehung mitwirken (21; 22; 60; 88). Er vermittelt einen direkten bakteriellen Kontakt zur epithelialen Zelle des Magens und führt nachfolgend zu einem Einstrom von Pathogenitätsfaktoren wie VacA oder CagA. Wie kürzlich gezeigt, besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Anwesenheit des *babA2* Gens (welches für BabA kodiert) in klinischen Isolaten und dem Auftreten von Ulzera und Adenokarzinomen des Magens (69).

Der Nachweis dieses Gens in Magenbiopsien ist demnach über den von *vacAs1* und *cagA* hinaus von großem klinischen Interesse, um diejenigen mit *H. pylori* infizierten Patienten zu erkennen, welche ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von malignen Neubildungen des Magens mit sich tragen und das bereits Jahre vor der irreversiblen Ausbildung dieser malignen Transformation.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Studie die Anwesenheit des *babA2* Gens in Magenbiopsien mit dem Ausmaß der Aktivität und Chronizität der Gastritis korreliert. Bereits in vorangehenden Studien zeigten die „Typ 1 Stämme“ eine positive Korrelation mit dem Grad der Aktivität der Antrumgastritis (189; 197); hier wurde ein Vergleich mit unseren Daten angestrebt. Allerdings sind „Typ I Stämme“ mit einer Prävalenz von 60 bis 90% in der westlichen Bevölkerung sehr häufig, daher kann die prophylaktische *H. pylori* Eradikation zur Vermeidung der Entstehung von Magenkarzinomen nicht alleine auf dem

Nachweis von *cagA* und *vacAsI* beruhen; es müssen viel mehr weitere Kriterien etabliert werden, welche zur Definition einer kleinen Subgruppe von hochpathogenen Stämmen führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, eine Korrelation herzustellen zwischen dem Gennachweis der Pathogenitätsfaktoren *babA2*, *vaAsI* und *cagA* mittels Polymerasekettenreaktion und den histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut infolge der Infektion mit *H. pylori*. Es wurden dazu endoskopisch gewonnene Biopsien aus dem Magen von Patienten untersucht, die sich einer routinemäßigen Ösophago-Gastro-Duodenoskopie (ÖGD) aufgrund von Oberbauchbeschwerden unterzogen haben. Dabei wurden insbesondere das Ausmaß der Gastritis (Aktivität und Chronizität), der intestinalen Metaplasie und Atrophie im Antrum und Korpus beurteilt und mit dem Auftreten spezieller Virulenz- und Adhärenzfaktoren verglichen. Es soll ein eingehendes Augenmerk auf jene schweren Veränderungen geworfen werden, welche einer malignen Entartung vorausgehen könnten.

Wie die Ergebnisse zeigen, spielt die Anwesenheit des bakteriellen Adhärenzfaktors BabA eine wichtige Rolle bei der Induktion dieser schweren histologischen Veränderungen. Gleichzeitig wird mit der Einteilung in „Triple positive Stämme“ bei gleichzeitigem Nachweis von *babA2*, *vacAsI* und *cagA*, eine Differenzierung vorgeschlagen, die besser als diejenige der „Typ 1 Stämme“ hochpathogene Keime abgrenzen könnte. Patienten mit Infektion durch einen „Triple positiven Stamm“ könnten ein erhöhtes Risiko haben, solche schwerwiegenden Veränderungen zu entwickeln und somit auch von einer prophylaktischen Eradikation zur Vermeidung eines Magenkarzinomes profitieren.

1.2. Spezielle Einleitung

1.2.1. Überleben und Bewegung von *H. pylori* im sauren Milieu des Magens

Die Infektion mit dem gram-negativen Bakterium *H. pylori* erfolgt auf oralem Weg, dabei passiert der Keim den Ösophagus mit neutralem pH und hydrolytischen Enzymen, ehe er in das

Magenlumen mit seinem extrem niedrigen pH gelangt. Der pH im Magenlumen erreicht dabei Werte zwischen 1 und 4; unterhalb von pH 1 erfolgt eine Denaturierung der meisten Proteine, die Hydrolyse wird durch die sezernierten Proteine beschleunigt. Im extrem sauren Umfeld des Magenlumens bedarf es stark spezialisierter Mechanismen, um ein ausgeglichenes Zellmilieu aufrecht zu erhalten. *H. pylori* überlebt unter diesen extremen Bedingungen im Magenlumen durch eine Abpufferung des pH mit Hilfe seiner intrazellulären Urease (196). Diese stellt einen hochpotenten Virulenzfaktor dar, der die langanhaltende Besiedlung des menschlichen Magens erst ermöglicht (118). Urease-negative Mutanten von *H. pylori* sind im Tierversuch mit Schweinen nicht zur Kolonisierung des Magens fähig (50). Gleichzeitig hat das Enzym auch eine stark immunogene Wirkung, welche an der Immunantwort des Wirtes beteiligt ist über eine Induktion der proinflammatorischen Zytokinproduktion durch Phagozyten (76).

Urease wird als Protein in hohen Mengen durch den Keim exprimiert und katalysiert dabei die Hydrolyse von Harnstoff zu Ammoniak (NH_3). Insgesamt resultiert aus diesen Reaktionen ein Anstieg des pH zwischen der inneren und äußeren Zellmembran und somit eine Abpufferung gegenüber der sauren Umgebung (158; 196). Der pH im sogenannten periplasmatischen Raum zwischen innerer und äußerer Zellmembran wird durch die Aktivierung der zytoplasmatischen Urease auf etwa 6,2 eingestellt. Durch diese Abpufferung entsteht ebenfalls ein transmembranöses Potential von -105 mV, das über eine weite Variationsspannweite des pH im Magen aufrecht erhalten werden kann (114; 157; 158); allerdings erfolgt eine Abnahme der Enzymaktivität bei langandauernden sehr niedrigen pH-Werten (10).

Das Enzym wird aus zwei strukturellen Untereinheiten aufgebaut, UreaseA (26,5 kDa) und UreaseB (60,3 bis 61 kDa), welche die katalytische Einheit des Enzyms in Gegenwart von Nickel bilden, hier erfolgt also die Spaltung von Harnstoff. Kodiert wird das Enzym von den sieben aufeinander folgenden Genen *ureABIEFGH*, die alle in der gleichen Richtung von einer 6,13 kb großen Sequenz transkribiert werden, und mit Ausnahme der *ureaseI* für die Ausbildung des katalytisch wirksamen Enzymes notwendig sind (84; 85). Ein kleiner Teil der Urease findet sich

bei *Helicobacter* auch gebunden an die Zelloberfläche (142), wo sie als bakterielles Antigen wirkt. Wohl resultierend aus der Lyse einer bakteriellen Subpopulation lassen sich auch geringe Mengen im Medium nachweisen.

Ein Nachweis der genetisch kodierenden Regionen für das Enzym mittels Polymerasekettenreaktion stellt eine hochempfindliche und –spezifische Methode zum Nachweis auch kleinster Keimmengen im Biopsat aus der Magenschleimhaut dar, eine Diagnostik ist z. B. auch später aus Paraffinblöcken möglich. In dieser Studie dient die Amplifikation von Regionen des *ureB* Gens dem Nachweis der Infektion des untersuchten Patienten mit *H. pylori* (81; 111; 198); diesem Schritt folgte bei positivem Signal in der PCR der weitere Nachweis anderer Virulenzfaktoren. Darüber hinaus macht die hohe Menge an produzierter Urease auch den Nachweis von *H. pylori* aus Biopsien mittels CLO-Test, aus der Zellkultur und dem C13-/C14-Atemtest möglich (8).

H. pylori bindet an die oberflächliche Epithelschicht über mehrere Adhärenzfaktoren. Gleichzeitig erfolgt eine Induktion zur Reorganisation der Plasmamembran. Der Keim dringt durch aktive Bewegung in die schützende Mukosaschicht ein, welche das Magenepithel vor dem sauren Lumen schützt. Hierbei erfolgt der Antrieb durch die Flagellen des Bakteriums, bakterielle hydrolytische Enzyme und die Spiralform des Keimes fördern die Progression zur Epithelschicht. *H. pylori* besitzt dabei drei bis sechs unipolare polytrichose Flagellen, die in der äußeren Zellmembran verankert sind. Jede Flagelle besteht aus zwei Flagellin-Untereinheiten, FlaA und FlaB (98); bis heute unklar ist jedoch, anhand welcher Substanzen sich der Keim innerhalb des Mukus orientiert, also auch welche bakteriellen Sensorproteine für die Chemotaxis verantwortlich sind. Eine Mitbeteiligung an diesen Vorgängen scheint die bakterielle Urease zu spielen, welche die Protonentriebkraft erhöht (125; 209). Die Versorgung mit Nährstoffen für das bakterielle Wachstum ist sehr limitiert, wahrscheinlich produziert der Keim mehrere Proteine, welche die entstehenden Sauerstoffradikale nach granulozytäre Infiltration abfangen können. Hierbei sind

insbesondere die Katalase und die Superoxid-Dismutase des Keims von besonderer Bedeutung für das Überleben im chronisch-entzündeten Magen (140; 148; 161).

H. pylori bewirkt bei nahezu allen Infizierten die Ausbildung einer chronischen Gastritis, welche in Unterscheidung zur A-Gastritis mit autoimmuner Genese und der C-Gastritis durch chemische Irritationen als B-Gastritis bezeichnet wird (173); die chronische Entzündung folgt einem aktiven Stadium mit starker akuter Entzündungsreaktion. Die Gastritis wird nach unterschiedlichen Ausprägungsgrade gemäß der „updated“ Sydney Klassifikation in gering-, mittel-, und hochgradig eingeteilt. Diese Gastritisformen sind der gemeinsame Ausgangspunkt für die weiteren gastroduodenalen Komplikationen der Infektion mit duodenalen oder gastralen Ulzera, Atrophie der Magenmukosa, intestinaler Metaplasie, Magenkarzinom und dem MALT-Lymphom des Magens. Offensichtlich ist die Immunreaktion des Wirtes mitentscheidend dafür, welche Krankheit auf die chronische Entzündung folgt.

1.2.2. Diagnostik und Nachweismethoden der *H. pylori* Infektion

Zur Diagnostik der Infektion des menschlichen Magens mit dem Pathogen *H. pylori* haben sich mehrere invasive und nichtinvasive Methoden etabliert, die naturgemäß unterschiedliche Spezifität und Sensitivität besitzen. Meist erfolgt die endoskopische Untersuchung des oberen gastrointestinalen Traktes aufgrund dyspeptischer Beschwerden des Patienten; wenn die Magenspiegelung erfolgt, so sollte bei Verdacht auf eine Infektion mit *H. pylori* immer auch eine Biopsieentnahme zur histologischen Beurteilung, wenn möglich ein CLO-Test (zur Detektion von „Campylobacter Like Organisms“, auch „rapid urease test“ genannt) und das Anlegen einer mikrobiologischen Kultur erfolgen.

Die **histologische Färbung** von Magenbiopsien zur Diagnostik von *H. pylori* stellt nach wie vor den Goldstandard dar (145). Neben dem Keimnachweis erfolgt auch immer gleichzeitig eine Evaluation und Bewertung der histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut. Neben der von Warren und Marshall empfohlenen Warthin-Starry Silberfärbung (109) werden außerdem

etwas billigere und einfachere Methoden eingesetzt; dazu gehört als Färbung der Wahl die Methode nach Giemsa (103). Während bei der Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung früher viele Organismen übersehen wurden, ist ihre Spezifität gegenüber anderen Nachweismethoden durch vermehrte Erfahrung der Pathologen in der *H. pylori* Diagnostik heute nur etwas erniedrigt. Die pathologische Befundung kann dabei sowohl aus frischem Biopsiematerial als auch aus gefrorenen Biopsien erfolgen. Ebenfalls kann zum sensiblen Nachweis von *H. pylori* eine Immunhistochemie erfolgen. Einen indirekten Hinweis einer Infektion erhält man auch histologisch durch Nachweis einer chronischen Gastritis im Antrum; Patienten ohne chronische antrale Gastritis sind sehr selten mit *H. pylori* infiziert.

Der **CLO-Test** (oder auch „rapid urease“ Test) macht sich die hohen Mengen von Ammoniak zu Nutze, die durch *H. pylori* mit Hilfe der Urease produziert werden. Große Mengen an Ammoniak führen zu einem Anstieg des pH-Wertes, der durch einen Indikator wie Phenolrot sichtbar gemacht werden kann (110; 111). Im Laufe der letzten Jahre erfolgten einige Modifizierungen, das Grundprinzip ist jedoch das Gleiche geblieben: Bei infizierter Magenschleimhaut erfolgt nach der Biopsiezugabe (je eine Biopsie aus Antrum und Korpus) zu dem Test ein Farbumschlag, der bereits innerhalb von ein bis zwei Stunden beobachtbar sein sollte. Störfaktoren können wie bei den meisten Nachweismethoden neben einer zu geringen Keimbesiedlung auch die vorherige Therapie mit Antibiotika oder Protonenpumpenhemmern sein.

Der **kulturelle Nachweis** einer Infektion mit *H. pylori* zeigt zwar eine niedrigere Sensitivität als die anderen Testverfahren, aber eine hohe Spezifität und ermöglicht gleichzeitig eine *in vitro* Resistenztestung des jeweiligen Stammes. Bei verschiedenen anwendbaren Medien (Blutagar, Pferdeserum-Agar) unter mikroaeroben Bedingungen dauert es bei dem langsam wachsenden Keim zwei bis fünf Tage bevor die Kultur positiv wird (132). Die Keimidentifizierung erfolgt dann mittels Gramfärbung und Nachweis von Urease, Katalase und Oxidase. *H. pylori* läßt sich in der Kultur oft schwierig anzüchten und die Methode kann aufgrund vorheriger Antibiotikatherapie des Patienten und unsachgemäßer Biopsiebehandlung störanfällig

sein. Die Kultur ermöglicht eine spätere DNA-Diagnostik des angewachsenen Stammes. In älteren Kulturen geht der Keim allerdings von der spiralförmigen in die kokkoide Form über, die nicht mehr angezüchtet werden kann; dies kann auch eine vorübergehende Adaptationsmöglichkeit des Bakteriums an eine feindliche Umgebung (Mangel an Nahrung, Antibiotika) bedeuten.

Eine einfache nichtinvasive Nachweismethode stellt der **Urease-Atemtest** dar. Dabei wird Harnstoff mit C13 oder C14 markiert, welche ein spezielles Infrarot-Spektrum besitzen (8; 71; 72; 175). Nach oraler Aufnahme des markierten Harnstoffs durch den Patienten erfolgt bei Besiedlung mit *H. pylori* durch die Ureaseaktivität des Keimes die Freisetzung von Kohlendioxid, welches in der ausgeatmeten Luft nachgewiesen werden kann. Sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität diese Tests liegen zwischen 95 und 100%. Gleichzeitig vermeidet der Atemtest Fehler wie sie bei der Biopsieentnahme entstehen können durch eine fehlende Besiedlung an der Biopsiestelle. Selten können bei Besiedlung des Patienten mit anderen urease-produzierenden Keimen falsch positive Ergebnisse resultieren. Eine wichtige Rolle als nichtinvasive Diagnostikmethode stellt der Urease-Atemtest bei der Kontrolle nach erfolgter Eradikationstherapie dar, als Alternative zur Endoskopie bei symptomfreien Patienten sollte er dabei etwa vier Wochen nach Behandlung durchgeführt werden um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden (108).

Als nichtinvasive Alternative zum Urease-Atemtest scheint sich vor allem bei Kindern in den letzten Jahren der Nachweis von ***H. pylori*-Antigen im Stuhl** durch ELISA zu erweisen (108; 193).

Durch die Besiedlung mit dem pathogenen Keim erfolgt eine lokale und systemische Immunantwort. Ein indirekter Nachweis der Infektion kann deshalb über eine **serologische Testung** erfolgen; die etablierten Nachweismethoden, meist mittels ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) zeigen hierbei neben einer nur zufriedenstellenden Sensitivität (bis zu 80%), auch oft eine niedrige Spezifität (70 bis 80%). Es erfolgt der Nachweis von menschlichen

Antikörpern gegen bakterielle Proteine wie UreB, CagA, VacA oder heat shock Proteine (HSP) (186). Serologische Titer variieren je nach Alter und Population. Die serologische Testung stellt eine gute Methode der Primärdiagnostik dar, kann aber zur Kontrolle des Eradikationserfolges nicht herangezogen werden, nach dem die Antikörper-Titer nur sehr langsam abfallen (33).

Die **molekularen Nachweismethoden** wurden mit der Zielsetzung eingeführt eine rasche Diagnostik zu etablieren, die gleichzeitig eine genetische Typisierung der klinischen Isolate ermöglicht („genetic fingerprinting“) (198; 199); auch epidemiologische Untersuchungen können durchgeführt werden. Die **Polymerasekettenreaktion** erlaubt dabei im Vergleich zu den anderen Diagnoseoptionen eine hoch spezifische und sensitive Sicherung der Infektion, auch aus älterem Biopsiematerial. Der Keim muß hierbei nicht mehr vital sein und es kann gleichzeitig ein Nachweis von sehr geringem genetischen Material erfolgen. Prinzipiell existieren mehrere Protokolle zur Identifizierung verschiedener *H. pylori* Gene, sinnvoll erscheint zur Basisdiagnostik aber vor allem der Nachweis von Genen, welche in allen Stämmen vorhanden sind, zum Beispiel der Gene, welche für die Urease kodieren (5; 31; 32). Anhand quantitativer PCR-Methoden kann die Keimzahl abgeschätzt werden. Der Nachweis von Keimmaterial kann dabei aus biotisch gewonnenem Material, Magensaft, Speichel (99; 107; 193; 198; 199) und relativ unsicher aus Faeces erfolgen.

Allgemein ist die angewendete Diagnostik also meist von einer durchgeführten endoskopischen Untersuchung des Patienten abhängig. Dabei können parallel angewendete Methoden einen sehr sicheren *H. pylori* Nachweis erbringen.

1.2.3. *H. pylori* assoziierte Pathologie: histologische Veränderungen der Magenschleimhaut und induzierte Immunantwort

Neben der durch *H. pylori* induzierten Gastritis (B-Gastritis) erfolgt außerdem die klinische und pathologische Einteilung in Autoimmungastritis (A-Gastritis) durch Antikörper gegen Parietalzellen und die chemisch induzierte Gastritis (C-Gastritis) (173). Die A-Gastritis

wird auch als Gastritis im Rahmen der perniziösen Anämie beschrieben, hier existieren Antikörper gegen Parietalzellen und es erfolgt allgemein kein Nachweis von *H. pylori* (52). Gleichzeitig besteht ein deutlich erhöhtes Risiko für die Krebsentstehung (80; 92), die betroffenen Patienten müssen regelmäßig endoskopiert und gleichzeitig biopsiert werden (20).

Die *H. pylori* induzierte B-Gastritis kann topographisch in drei Phenotypen unterteilt werden (172; 173):

1. Die nichtatrophische, häufig pangastrische Gastritis mit geringgradiger Entzündungsreaktion, welche sich bei den meisten Patienten findet und in einem Großteil der Fälle asymptomatisch persistiert oder spontan abheilen kann.
2. Die antrumbetonte, nichtatrophische Gastritis mit wenigen histologischen Veränderungen im Korpus, welche durch die konsekutive Hypergastrinämie zu einer Hyperazidität führen kann und mit duodenalen Ulzerationen assoziiert ist (122). Das von den Bakterien ausgeschüttete Ammoniak spielt hierbei eine entscheidende Rolle für die Stimulation der G-Zellen im Antrum (24).
3. Die multifokale atrophische Pangastritis mit reduzierter Säuresekretion und Gefahr der Entstehung von intestinaler Metaplasie, Ulzera ventriculi und bei zunehmender Hypoazidität auch von Magenkarzinomen. Dies ist nur bei einer kleinen Minderheit der Patienten der Fall, welche aber ein erhöhtes relatives Risiko für die Entstehung präkanzeröser Veränderungen tragen. Offensichtlich ist hierbei eine Infektion in der frühen Kindheit ausschlaggebend (36).

Bei erstmaliger Besiedlung der Magenschleimhaut mit *H. pylori* kommt es bei den meisten Patienten wie bereits erläutert zur aktiven Gastritis, die unterschiedlich lokalisiert sein kann; häufig wird aber primär das Antrum besiedelt, die Ausbreitung in den Korpus kann bei länger anhaltender Infektion geschehen. Dabei führt die inflammatorische Antwort der Magenschleimhaut über Zytokinmediatoren zur Infiltration des Epithels mit neutrophilen Granulozyten. Primär wird durch Zellen der Magenmukosa als Antwort auf den Kontakt zu pathogenen Keimen IL-8 als chemotaktischer Faktor sezerniert (43; 57; 123; 126), der wiederum

eine weitere inflammatorische Kaskade mit Ausschüttung von $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und $\text{TNF-}\alpha$ durch aktivierte Granulozyten auslöst (9; 19; 57; 163). Dabei lösen Bakterienstämme, welche CagA, VacAs1 oder BabA exprimieren eine verstärkte Immunantwort aus (43; 57; 146; 163).

Aktivierte neutrophile Granulozyten produzieren darüber hinaus große Mengen an zelltoxischen Sauerstoffradikalen, welche einen weiteren *H. pylori* assoziierten Zellschaden verursachen können; die Karzinomentstehung könnte durch die damit verbundenen Schäden auf DNA-Ebene getriggert werden (121; 129; 143; 167)

Die chronische Gastritis wird charakterisiert durch das Auftreten von Zellen der unspezifischen Immunabwehr wie Granulozyten und Makrophagen. Gleichzeitig finden sich aber auch Zellen des adaptiven-spezifischen Immunsystems wie B-Lymphozyten, sowie *H. pylori*-spezifische T-Lymphozyten (45); $\text{IFN-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$ werden dabei durch Th1-Zellen freigesetzt und unterhalten dabei die Entzündungsreaktion (168). Die Dichte der Besiedlung mit *H. pylori* korreliert dabei mit dem Ausmaß der Gastritis und der Pathologe erkennt meist typische Lymphfollikel in der Schleimhaut. Beim Kind sind diese besonders ausgeprägt, was die vorwiegend lymphozytäre Komponente der Entzündungsreaktion auf diese Infektion in diesem Alter unterstreicht. In gesunder Magenschleimhaut lassen sich keine Lymphfollikel nachweisen, sie sind also pathognomonisch für eine *H. pylori* Infektion. Nach Jahrzehnten der Infektion kann es in einem kleinen Teil der Infizierten zur Atrophie der Drüsenkörper und nachfolgendem Ersatz durch metaplastische Zellen kommen (86; 171; 188).

Die mit der chronischen Infektion durch *H. pylori* einhergehenden schweren histologischen Veränderungen des Magens wie hochgradige Gastritis, intestinale Metaplasie und Atrophie der Magendrüsen können den Weg zur Entstehung des Adenokarzinoms des Magens bahnen (205). Dennoch ist der genaue Weg des Modells der Karzinomentstehung über die chronische Gastritis, atrophische und metaplastische Läsionen bis hin zu präkanzerösen Läsionen wie Dysplasien und intraepitheliale Neoplasien noch sehr unklar (34).

Für das klinische Verlaufsbild der *H. pylori* Infektion sind neben den bakteriellen Pathogenitätsfaktoren vor allem individuelle Wirtsfaktoren des betroffenen Patienten ausschlaggebend. Für die Entstehung von Magen- und Duodenalulzeration scheint die Blutgruppe 0 ein erhöhtes Risiko darzustellen, weiterhin aber auch Geschlecht des Patienten, Ernährung und Rauchen. Auch das Vorhandensein von intestinaler Metaplasie erscheint gehäuft bei Zusammentreffen dieser Faktoren und gleichzeitiger Infektion mit *H. pylori* (153). Ebenfalls findet sich eine erhöhte Rate an Infektionen mit *H. pylori* bei niedrigerem sozio-ökonomischen Status und niedriger Schulbildung (1; 23; 105; 106; 194). Unabhängig ist die Prävalenz der Infektion von dem ABO-Blutgruppenstatus (185). El-Omar et al. (53) konnten im Jahr 2000 darüber hinaus nachweisen, daß das Vorhandensein von Mutationen im IL-1 β /IL-1 RA Gen zu einer erhöhten Sekretion dieser proinflammatorischen Zytokine führt und dadurch eine Atrophie der Schleimhaut begünstigt. Diese Patienten haben daher ein deutlich erhöhtes Risiko für die Karzinomentstehung im Magen. Generell kann gesagt werden, daß diese Polymorphismen zur Hypochlorhydrie disponieren, welche die Karzinogenese begünstigt (54). Darüber hinaus gibt es aber wahrscheinlich auch andere Polymorphismen, die eine Hyperazidität begünstigen und dadurch die Entstehung von Magenerkrankungen induzieren könnten.

Kürzliche prospektive Untersuchungen haben nachgewiesen, daß nur in *Helicobacter*-positiven Patienten mit hochgradiger korpus-dominanter Gastritis und teilweise auch mit Atrophie und intestinaler Metaplasie ein deutlich erhöhtes Risiko für die Karzinomentstehung vorliegt; dies gilt besonders für jüngere Patienten (77; 184); Ulzera ventriculi besitzen demnach in Übereinstimmung mit früheren Studien ebenfalls eine erhöhte Wahrscheinlichkeit zur Entartung (75); kein erhöhtes Risiko besteht hingegen für Patienten mit duodenalen Ulzerationen. Insgesamt unterstreichen diese Untersuchungen die besondere Bedeutung von *H. pylori* für die Karzinogenese im menschlichen Magen.

1.2.4. Genetik von *H. pylori*

H. pylori besitzt ein zirkuläres Genom bestehend aus etwa 1,6 Mio. Basenpaaren (bp). Die gesamte Sequenz zweier Stämme wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt kloniert (4; 178). Diese Stämme besitzen zwischen 1495 (Stamm J99) und 1590 (Stamm 26695) open reading frames (ORF); deren durchschnittliche Größe beträgt 945 bp. Die meisten dieser ORF kodieren strukturelle Proteine oder Proteine, die an Zellwachstum und -teilung beteiligt sind (48). Insgesamt sind von etwa 1600 Genen 1200 in allen bisher bekannten Stämmen identisch, etwa 400 Gene werden differentiell exprimiert (74). Zahlreiche Proteininteraktionen wurden durch yeast-two Hybrid Systeme beschrieben (147). 91% des Genomes entspricht kodierenden Regionen, der durchschnittliche G+C Gehalt liegt bei 39%. Insgesamt existieren fünf Regionen, welche einen auffallend abweichenden G+C Anteil aufweisen: Zwei dieser Regionen beinhalten mehrere Kopien der Insertionssequenz IS605 und werden von einer 5S ribosomalen RNA-Sequenz flankiert; sie sind an der Umstrukturierung von DNA beteiligt. Eine andere auffällige Region des Genomes ist die Cag Pathogenitätsinsel (Cag Pathogenicity Island; *cagPAI*), dessen Bedeutung für die Virulenzentstehung nachfolgend erläutert wird (12). Weiterhin wurden 36 Arten von tRNA beschrieben, welche in sieben Clustern und 12 Einzelgenen organisiert sind. Insgesamt spricht die genomische Zusammensetzung von *H. pylori* dafür, daß die generellen Mechanismen der Replikation, Zellteilung und Sekretion ähnlich sind mit denen von *E. coli* und *H. influenzae*. Die Fähigkeit des Keimes zur fortlaufenden Mikroevolution läßt sich ebenfalls an genetischen Differenzen von Keimisolaten innerhalb einer einzigen *H. pylori* Kolonie ablesen (89). Unterschiedliche Genotypen finden sich dementsprechend auch in verschiedenen menschlichen Populationen (91).

1.2.5. Pathogenitätsfaktoren

1.2.5.1. Das Zytotoxin-assoziierte Antigen (CagA), die Cag Pathogenitätsinsel (*cagPAI*) und die Typ IV Sekretion

Das Zytotoxin-assoziierte Antigen (CagA) ist einer der ersten charakterisierten Virulenzfaktoren von *H. pylori*; es löst eine starke Immunantwort des Wirtes aus, so daß ein direkter serologischer Antikörpernachweis erfolgen kann. Ursprünglich war eine strenge Koexpression mit dem Vakuolisierenden Zytotoxin VacA beschrieben worden (37; 181), was zur damaligen Namensgebung führte. Jedoch befinden sich die beiden Gene in einem Abstand von 300 kb und die VacA Expression ist unabhängig von der Anwesenheit des *cagA* Gens. *CagA* negative Mutanten sind in der Lage VacA Protein zu synthetisieren (44; 182; 206). Während lange Zeit die Funktion von *cagA* in Bezug auf die Virulenzentstehung sehr unklar war, so erscheint es heute als Markergen für einen ganzen Komplex an Virulenzfaktoren, gleichzeitig aber auch als eigenständiges zellschädigendes Protein. Der Nachweis von *cagA* dient als Marker für das Vorhandensein einer bakteriellen Pathogenitätsinsel mit einer Länge von 40 kb, dem ***cagPAI***. Pathogenitätsinseln sind generell größere DNA-Elemente mit einer Länge von 10 bis 200 kb, welche von ehemals nicht pathogenen Keimen über horizontalen DNA-Transfer durch Phagen/Plasmide von anderen Spezies erworben werden, so entstehen durch Integration in das Chromosom neue, virulente Stämme. Ähnliche Mechanismen sind für *E. coli*, *Salmonellen*, *Yersinien* und *Shigellen* beschrieben worden (73). Oft kodieren diese Pathogenitätsinseln für mehrere Virulenzdeterminanten, sind genetisch instabil, flankiert von mehreren direct repeats und haben einen unterschiedlichen G+C Gehalt im Vergleich zum restlichen Chromosom (dies als Zeichen ihrer fremden Herkunft). Diese „PAIs“ scheinen somit dem Bakterium einen Selektionsvorteil gegenüber seinen Vorfahren zu verschaffen, die Kolonisierung neuer ökologischer Nischen wird möglich (38).

Die Pathogenitätsinsel von *H. pylori* (charakterisiert durch den Nachweis von *cagA*) wurde erstmals 1996 beschrieben (27; 149), ihre Nukleotidsequenz besteht aus 40 kb. Wie zu erwarten ist der G+C Gehalt im Vergleich zum restlichen Chromosom verändert (35% vs. 39%). Abhängig von der Anwesenheit von *cagA* und dem *cagPAI* erfolgte die Unterteilung der *H. pylori* Stämme in zwei Gruppen: Typ I Stämme mit dem Nachweis von *cagPAI* und Typ II Stämme ohne dessen Nachweis (206). Die Pathogenitätsinsel wurde ursprünglich als komplette Einheit erworben und zeigt große genetische Divergenz zwischen den verschiedenen Stämmen, bei einigen besteht sie aus zwei Untereinheiten, der *cagI* und *cagII* Domäne, welche zum Teil über eine eingefügte Sequenz (IS605) verbunden sind und flankiert werden. Einige Stämme zeigen auch Deletionen der Untereinheiten (27). Diese Instabilität durch Inversion/Deletion kann eine wichtige Determinante der Virulenz darstellen.

Das *cagPAI* beinhaltet 31 verschiedene Gene, deren Proteine eng mit der inneren Bakterienmembran verknüpft sind und für den Aufbau einer Typ IV Sekretionsmaschine verantwortlich zu sein scheinen. Diese Sekretionsmaschinen sind stark spezialisierte Proteinstrukturen zur Sekretion bakterieller Virulenzfaktoren an die Oberfläche des Keimes oder sogar in die Wirtszelle (149; 169). Ähnliche Sekretionsmaschinen sind bei *Bordetella pertussis*, *E. coli* und *Legionella pneumophila* bekannt (94). Sie integrieren Kanäle in der Zellmembran, welche dann als Durchtrittsstellen für Moleküle durch die Membran dienen oder Pili, die den Kontakt zur Wirtszelle modifizieren können. Das bis jetzt einzige bekannte Substrat der Typ IV Sekretionsmaschine stellt wiederum CagA dar (130; 159; 169).

Das *cagA* Gen befindet sich am 3'-Ende des PAI, seine Molekulargröße variiert je nach Stamm zwischen 128 und 142 kDa. Im Tiermodell, aber auch in klinischen Studien zeigt sich, daß 70 bis 80% der Isolate CagA exprimieren, diese Stämme scheinen eine erhöhte Virulenz zu besitzen und gehen häufiger mit schweren histologischen Veränderungen einher.

So zeigt sich in verschiedenen klinischen Studien die stark signifikante Korrelation des *cagA* Status mit dem Auftreten von schwergradiger akuter und chronischer Gastritis, Ulzera duodeni

(28; 151), intestinaler Metaplasie, Atrophie der Magenschleimhaut (96), MALT-Lymphomen des Magens (51) und auch der Entwicklung von Adenokarzinomen des Magens (13).

Nach der Bindung von *H. pylori* an das Oberflächenepithel erfolgt die Sekretion von CagA durch den Typ IV Mechanismus in die Epithelzelle, dort werden Tyrosinreste des Proteines durch Kinasen der Wirtszelle phosphoryliert. Der Nachweis dieses Vorganges erfolgt experimentell an AGS Zellen (130; 160) und führt im weiteren Verlauf der Infektion zur Reorganisation des Zytoskelettes der Wirtszelle und Bildung von Epithelfüßchen am Rande des Epithels, Vorwölbungen der Zelloberfläche (169) und Actinpolymerisation. Diese Strukturen sind die Konsequenz eines Rearrangements von Actin und anderen Proteinen des Zytoskelettes, sie scheinen zur Bindung des Keimes an die Wirtszelle mit beizutragen. Die Tyrosin-Phosphorylierung des CagA Proteines dient also als Mechanismus der Signaltransduktion. Unabhängig von dem Protein CagA verläuft die Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B mit nachfolgender Sekretion des proinflammatorischen Zytokines Il-8 als chemotaktischer Faktor für neutrophile Granulozyten (159;162), hier spielt wohl ein anderes PAI-assoziiertes Protein, das CagE (auch PicB genannt) Molekül, eine wichtige Rolle (27; 100; 183).

1.2.5.2. Das Vakuolisierende Zytotoxin VacA

Die erste Beschreibung dieses Pathogenitätsfaktors erfolgte 1988 durch Leunk (97) mit der Feststellung, daß der Überstand von *H. pylori* Isolaten die Bildung von großen zytoplasmatischen Vakuolen in eukaryoten Zellen induziert. VacA wirkt dabei als Hauptdeterminante der *H. pylori* assoziierten Erkrankungen des Magens: In HeLa Zellen (einer menschlichen Zelllinie) bilden sich diese Vakuolen in unmittelbarer Nähe des Zellkerns, wachsen an, bis sie nahezu das gesamte Zytosol anfüllen und dann zum Zelltod durch Nekrose führen können (63). Daneben hat die Induktion von Vakuolenbildung durch das Vakuolisierende Zytotoxin mehrere Auswirkungen auf die Physiologie der Zelle: Neben der Abnahme der proteolytischen Aktivität (Abbau von körperfremden Antigenen innerhalb des endozytotischen Pathways) erfolgt auch eine Hemmung

des Proteintransportes in den Endosomen. Das VacA Toxin wird transkribiert als 140 kDa Protein und über die aminoternale Signalsequenz durch einen Proteintransportmechanismus an der inneren Zellmembran erkannt; diese Signalsequenz wird daraufhin durch periplasmatische Proteasen entfernt, woraufhin die carboxyterminale Sequenz (35 kDa, outer membran domaine) die Translokation des sezernierten Anteiles des Toxins (95 kDa) durch die äußere Zellmembran zur Zelloberfläche vermittelt. Es gibt eine stark stammabhängige Variabilität des VacA Proteines (6; 39): Die Signalsequenzen werden in vier verschiedene Allele unterteilt, s1a, s1b, s1c und s2 (191). Im Bereich des hinteren Anteiles des Genomes, welche als m-Region bezeichnet wird, existieren ebenfalls unterschiedliche Sequenzen, m1 und m2 (6). Stämme mit s1/m1 sezernieren generell große Mengen von VacA und sind hochtoxisch im Vakuolisierungsversuch mit HeLa-Zellen. Die meisten Stämme, welche s2 exprimieren, sezernieren kein Toxin. Stämme, welche s1/m2 Toxin exprimieren, produzieren eine signifikante Menge an Toxin, welches aber HeLa-Zellen nicht vakuolisiert. M1 und m2 Stämme unterscheiden sich nicht in ihrer Toxizität. Stämme mit einer s2 Signalsequenz sind relativ selten und ihre biologische Signifikanz ist unklar. Im Gegensatz dazu werden m2 Allele häufig gefunden und reflektieren den funktionellen Polymorphismus.

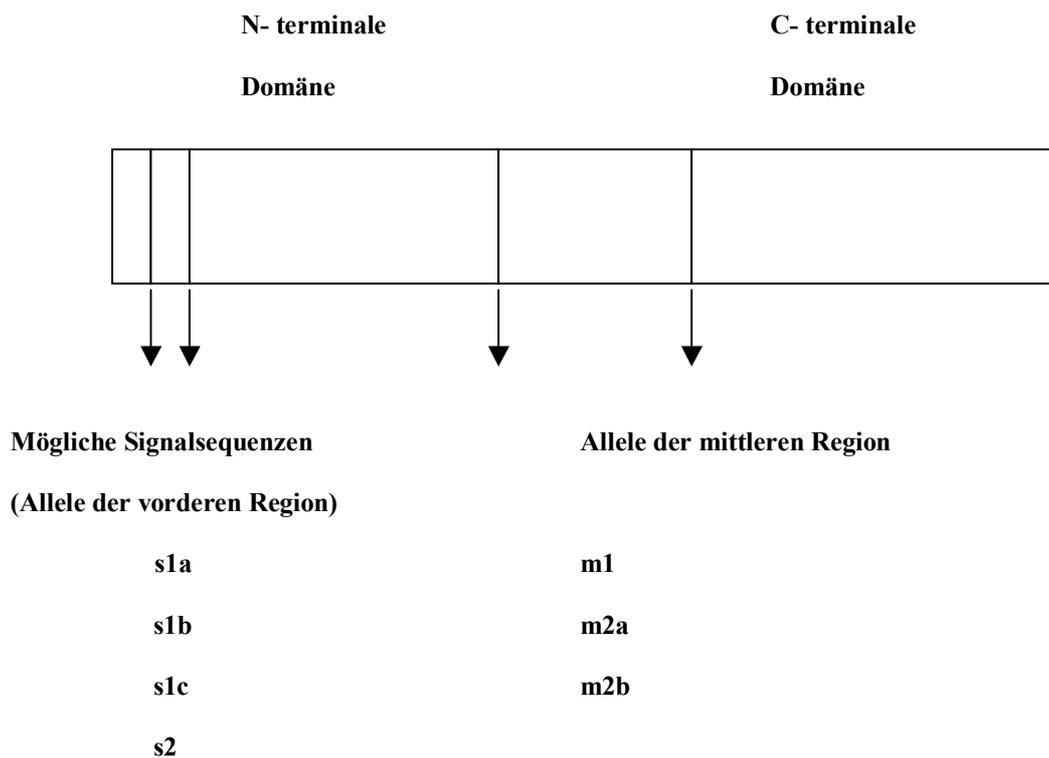
Eine weitere Subklassifizierung des Virulenzfaktors *vacA* ergab sich aus den Untersuchungen der geographischen Verteilung der *H. pylori* Stämme. So wurde unter asiatischen Isolaten ein neuer m2-Subtyp gefunden, der m2b genannt wird zur Unterscheidung von dem ursprünglichen m2 Subtyp (welcher jetzt m2a genannt wird) (191).

Auffallend ist darüber hinaus die weitere geographische Verteilung der VacA Untergruppen: Im Westen sind 80% der Stämme s1/m1, 20% s1/m2, in China ist die Relation umgekehrt. Asiatische Patienten sind häufig mit s1c Stämmen infiziert (190).

Basierend auf der starken Divergenz der *H. pylori* Stämme wird vermutet, daß der Mosaikstruktur der *vacA* Gene ebenfalls ein horizontaler DNA-Transfer über andere Spezies zugrunde liegt. In Zusammenhang mit der Bindung von *H. pylori* an die Zelloberfläche erhöht

VacA die Permeabilität der polarisierten Epithelmembran und es kann zur Ernährung des Keimes über die Magenmukosa führen. Für VacA sind keine Rezeptoren an der Zelloberfläche der Mukosa bekannt, wie sie bei anderen bakteriellen Proteintoxinen existieren.

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Mosaikstruktur des Genomes von *vacA* mit konstanten und diversen Regionen: Vier verschiedene mögliche Signalsequenzen (s1a, s1b, s1c und s2), drei mögliche Sequenzen in der mittleren Region (m1, m2a und m2b). Für diese Allele bestehen die dargestellten unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten (40; 190). Das komplette Genom von *vacA* besteht aus ca. 3000 bp.



1.2.5.3. Adhärenzmechanismen

Der Magen des Menschen besitzt höchst wirksame Schutzmechanismen gegen eine bakterielle Besiedlung; er bildet eine schwer zu besiedelnde ökologische Nische mit seinem extrem niedrigen pH, einer ausgeprägten Peristaltik, schützendem Epithel und einer stark

spezialisierten Mukosa. Das Überleben von *H. pylori* wird auch durch verschiedene Adhärenzeigenschaften gesichert und es bedarf bei der Besiedlung einer optimalen Balance zwischen der Fortbewegung durch Flagellen und dem Anhaften durch Adhärenz. Die Gewebeanheftung erfolgt dabei durch Erkennung von Rezeptoren an der Zelloberfläche des Wirtes (Oberflächenproteine, Glykolipide/-proteine), eine Interaktion, die auch als Wirt- oder Gewebetropismus bezeichnet wird und hilft eine hohe Besiedlungsdichte des Keimes sicherzustellen (16; 61). Eine optimale Anheftung kann dabei für *H. pylori* normalerweise im Antrum des Magens mit seinem relativ niedrigen pH erfolgen. Einmal mit Hilfe der Flagellen durch die Schutzbarriere der Magenmukosa gelangt, interagiert der Keim mit Kohlenhydratepitopen der Magenschleimhaut, welche sich im sialynisierten, fucosylierten oder sulfatierten Zustand befinden; eine erstmalige Beschreibung dieser Bindung erfolgte bereits 1988 (58); dabei besitzt der Keim mindestens zehn verschiedene Bindungsmöglichkeiten für Kohlenhydrate. Neben der Bindung an Oberflächenstrukturen des Magenepithels erfolgt auch eine Interaktion von *H. pylori* mit Glukokonjugaten auf anderen Wirtszellen, so auch auf den polymorphnukleären Zellen, welche durch diesen Kontakt eine Veränderung in ihren Oberflächenmolekülen erfahren und aktiviert werden (150).

Die fucosylierten Blutgruppen-Antigene der Erythrozytenmembran finden sich ebenfalls auf dem Oberflächenepithel des Gastrointestinaltrakts, wo sie dann als Histo-Blutgruppen-Antigene bezeichnet werden. Das H-Antigen ist eine fucosylierte Kohlenhydratstruktur, welche den Blutgruppen 0 Phenotyp definiert. Das Le^b Antigen wird durch Hinzufügen eines erneuten Fukoserestes an das H-Antigen gebildet, es wird also difucosyliert (α -1, 3/4-difucosyliert) (21; 22). Das Le^a Antigen ist ähnlich aufgebaut, allerdings nur einfach fucosyliert. Das Le^b Antigen ist das dominierende blutgruppenverwandte Antigen der Mukosa des Magens (155). Es vermittelt wie unten erläutert über spezifische Rezeptoren an der äußeren Membran von *H. pylori* die spezifische Bindung an Oberflächenmukosa (21). Der Bindung über das Lewis^b Antigen folgt die effektive Sekretion von Virulenzfaktoren.

Blutgruppen-Antigen bindendes Adhäsın (BabA)

Die bakterielle Adhärenz von *H. pylori* an die Schleimhaut des Magens wird durch fucosylierte Le^b Histo-Blutgruppen-Antigene vermittelt. Die Bindung erfolgt mittels dem bekannten „Schlüssel-Schloß-Prinzip“ wie auch bei der Bindung von humoralen Antikörpern an bakterielle Antigene. Es erfolgt keine Bindung an andere menschliche Histo-Blutgruppen-Antigene, wie Lewis^a, H-2, Lewis^x oder Lewis^y; der Rezeptor von *H. pylori* ist somit spezifisch für die Lewis^b und H-1 Blutgruppen-Antigene (21; 60; 88).

Die Entdeckung von BabA erfolgte aufgrund seiner hohen Spezifität und Affinität für das Lewis^b Antigen mit der sogenannten „Re-Tagging“ Methode. Dabei wird das Protein oder der Rezeptor radioaktiv markiert und nach erfolgreicher Bindung an einen Komplex nachgewiesen (21). Das BabA Adhäsın befindet sich auf der gesamten äußeren Zellmembran mit Ausnahme der Flagellen, es gehört deshalb der großen Familie der „outer membran proteins“ (OMP) an (3). Insgesamt existieren zwei *babA* Gene (*babA1* und *babA2*) und ein *babB* Gen, wobei nur *babA2* für das funktionelle Protein mit 78 kDa kodiert. Eine Inaktivierung des *babA1* Gens führt somit nicht zu einem Bindungsverlust an Lewis^b Antigene. Die kodierende Region beider *babA* Gene ist nahezu identisch mit Ausnahme der Einfügung einer 10 bp langen Sequenz am 5‘ Ende des Gens bei *babA2* mit einem sogenannten „repeat motif“, welches den Initiationskodon der Basenfolge ATG zur Translation beinhaltet. Der Verlust dieses „repeat motifs“ führt zu der Ausbildung des „stummen“ *babA1* Gens (nahezu kompletter ORF). *BabB* kodiert für ein 75,5 kDa Protein mit identischer N-terminaler Sequenz.

1.2.6. Definition der „Typ 1 Stämme“ und der „Triple positiven Stämme“

Wie bereits erläutert, entsteht das klinische Erscheinungsbild der Infektion mit *H. pylori* unter starkem Einfluß der bakteriellen Virulenzfaktoren. Nachdem primär das Vakuolisierende Zytotoxin VacA und das Zytotoxin assoziierte Antigen CagA verantwortlich für die Virulenzverstärkung erschienen, wurde an klinischen Kollektiven und Isolaten von *H. pylori* untersucht, welche Veränderungen der Magenschleimhaut bei gleichzeitigem Nachweis beider Faktoren entstehen. Dabei ergab sich eine starke Korrelation dieser sogenannten „Typ 1 Stämme“ mit dem Grad der Aktivität der Gastritis, dem Auftreten von Ulkuserkrankungen, intestinaler Metaplasie und Atrophie der Magenschleimhaut, sowie dem Adenokarzinom des Magens (18; 69; 96; 189; 192; 197). Allerdings ist die Prävalenz der „Typ 1 Stämme“ mit 60 bis 90% in der westlichen Bevölkerung sehr hoch, was sich anhand der vorliegenden Arbeit ebenfalls nachvollziehen läßt. Auch schließt diese Klassifikation den Adhärenzfaktor BabA nicht mit ein.

Dagegen wird die Bezeichnung „Triple positive Stämme“ verwendet bei gleichzeitigem genetischen Nachweis von *babA2*, *vacAs1* und *cagA*. Schon in früheren Studien konnte an klinischen Isolaten eine Korrelation dieser hochpathogenen Stämme mit dem Auftreten von Ulkuserkrankung und Adenokarzinomen des Magens gezeigt werden. Die über das Lewis^b Antigen vermittelte enge Bindung des Keimes an das Magenepithel könnte dann ein wichtiger Faktor zur Pathogenitätsinduktion werden, wenn die zusätzlichen Faktoren *vacAs1* und *cagA* auch gleichzeitig anwesend sind (69); nachdem *babA2* bei schweren histologischen Veränderungen des Magens häufiger nachgewiesen wird als bei geringgradigen, könnte die Klassifikation der „Triple positiven Stämme“ besser als die der „Typ 1 Stämme“ frühzeitig Patienten anzeigen, welche ein erhöhtes Risiko haben präkanzeröse Läsionen zu entwickeln.

2. Material und Methoden

2.1. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR) erlaubt *in vitro* die enzymatische Amplifikation spezifischer DNA- und RNA-Sequenzen mit hoher Effizienz. Mit dieser Methode können selbst kleinste Mengen von genetischem Erbgut nachgewiesen und auch vervielfältigt und somit einer wissenschaftlichen Analyse zugänglich gemacht werden.

Seit ihrer Einführung 1985 (124) wurde die Methodik zunehmend verbessert, die Grundprinzipien sind jedoch dieselben geblieben: Als Grundvoraussetzung bedarf es der Kenntnis von genetischen Sequenzen, welche die zu amplifizierende Region flankieren. Dabei lagern sich zwei synthetische Oligonukleotide (Primer) an einen zuvor durch große Hitze (95°C) denaturierten DNA-Doppelstrang an. Sich wiederholende Zyklen mit Denaturierung, Bindung des Primers und Extension führen dann zu der selektiven Anreicherung von spezifischen DNA-Sequenzen; nach 20- bis 60-facher Wiederholung dieses Drei-Stufen-Zyklus wird eine Amplifikation der Sequenz bis um den Faktor 10^{12} erreicht.

Eine zusätzliche Vereinfachung und Automatisierung der Methode konnte durch die Einführung einer thermostabilen DNA-Polymerase erreicht werden; diese Taq-Polymerase wird aus der thermophilen Bakterienspezies *Thermus aquaticus* gewonnen (154; 177). Das ursprünglich verwendete Enzym von *E. coli* (das Klenow Fragment) mußte aufgrund seiner Thermolabilität noch nach jedem Denaturierungsschritt erneut zugesetzt werden.

Jedes Paar von Oligonukleotidprimern bedarf dabei seiner eigenen optimalen Bedingungen, welche neben der Auswahl der spezifischen Annealing- oder Bindungstemperatur auch die der Zykluszeitabstände und -anzahl, des Enzymes, der Reaktionspuffer und der geeigneten Magnesiumkonzentration (1,5-2,5 mM) beinhalten.

Höhere Annealing- und Extensionstemperaturen verhindern dabei die Bildung unerwünschter Sekundärstrukturen und unspezifischer DNA-Strukturen.

Die Primer sollten dabei gewöhnlich 20 bis 30 Basen lang sein und es sollten Sequenzen vermieden werden, die zur Bildung von Sekundärstrukturen führen könnten (11). Bei der Primerwahl sollte des weiteren der Exon-/Intron-Aufbau der DNA berücksichtigt werden, ein Intron sollte dabei mindestens überspannt werden. Theoretisch kann eine derartige Amplifikation exponentiell verlaufen, durch sinkende Konzentration der zugeführten Stoffe und Bildung von Inhibitoren wird jedoch eine Plateauphase erreicht. Zur Synthese der spezifischen Oligonukleotidprimer sind Sequenzinformationen über den zu amplifizierenden Genabschnitt notwendig; mit der Kenntnis von mRNA-Sequenzen kann nach reverser Transkription auch cDNA amplifiziert werden und somit Funktionsanalysen auf Ebene der Expression durchgeführt werden. Die hohen Amplifikationsraten bedingen dabei, daß kontaminierende Sequenzen ein signifikantes Problem darstellen können, Maßnahmen zur Dekontamination sollen gesondert dargestellt werden. Der Nachweis der amplifizierten PCR-Produkt erfolgt in der Regel mittels Gelelektrophorese durch Nachweis einer Ethidium-Bromid-gefärbten Bande, auch eine spezifische Identifikation der Banden mittels SouthernBlot ist möglich.

Generell findet die Polymerasekettenreaktion ihre klinische Anwendung in der Immunologie zur Definition von HLA-Polymorphismen, Pathogen-Detektion (virale, bakterielle und fungale Pathogene, vor allem solche mit langsamem und schwierigen Kulturwachstum), Detektion von Lymphomen und Leukämien, T-Zellrezeptor- und Immunglobulindiversität; sie findet auch Einsatz in der Diagnostik solider Tumoren (Detektion von Mikrometastasen, genetische Veränderungen innerhalb von Karzinomen), der Diagnostik genetisch-vererbter Krankheiten und der forensischen Forschung (DNA-Fingerprinting). Auch bei der Entschlüsselung des menschlichen Genomes im Rahmen des Human Genome Projects spielt die Polymerasekettenreaktion eine gewichtige Rolle.

Speziell bei der Diagnostik von *H. pylori* aus Magenbiopsien scheint die PCR den herkömmlichen Methoden (CLO Test, Kultur, histologische Untersuchung) an Spezifität und Sensitivität überlegen zu sein (59).

Eine Vielzahl weiterer Autoren hat sich mit der Perfektionierung der PCR-Technik befaßt (55; 56; 101).

2.2. Patientenauswahl und Biopsiegewinnung

Alle Patienten, die an dieser Studie beteiligt waren, unterzogen sich einer routinemäßigen Spiegelung des oberen Magendarmtraktes aufgrund gastrointestinaler Beschwerden, es wurden also keine Patienten aus reinen Studienzwecken untersucht oder biopsiert.

Die Endoskopien wurden von erfahrenen Untersuchern in den II. Medizinischen Abteilungen des Klinikums rechts der Isar der TU München, sowie des angeschlossenen Lehrkrankenhauses, dem Städtischen Klinikum Bogenhausen, durchgeführt.

Die ausdrückliche Einwilligung zur Studienteilnahme mit speziellen histologischen und molekularbiologischen Untersuchungen der zusätzlich entnommenen Biopsien wurde vor der Untersuchung eingeholt, ein ausführliches Aufklärungsgespräch mit den Patienten wurde durchgeführt (entsprechend den ethischen Richtlinien der TU München).

Patienten, welche nichtsteroidale Antiphlogistika, Kortikoide, Sekretionshemmer oder Antibiotika einnahmen, wie auch Patienten mit Ulzera des Magens oder des Duodenums, Magenkarzinomen und MALT-Lymphomen des Magens wurden nicht in die Studie aufgenommen.

Insgesamt wurden von jedem der insgesamt 451 untersuchten Patienten fünf Biopsien aus dem Antrum und fünf aus dem Korpus des Magens untersucht. Es fand vorher eine makroskopische Beurteilung der Magenschleimhaut durch den jeweiligen Untersucher statt, bei Verdacht auf eine Besiedlung mit *Helicobacter pylori* wurde teilweise bereits während der Untersuchung ein „rapid urease“ Test angelegt (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

Unter den 451 untersuchten Patienten befanden sich 209 Frauen und 242 Männer, der Altersdurchschnitt lag bei 62,2 Jahren mit einer Varianz von 23 bis 99 Jahren; 88% der untersuchten Patienten waren deutscher Nationalität, 12% stammten aus anderen europäischen Staaten.

Die Biopsien wurden gemäß den Richtlinien der „updated“ Sydney Klassifikation entnommen (47;165;173). Die Entnahme von je fünf Biopsien aus Magenantrum und –korpus (wobei mindestens je eine Biopsie von der kleinen und von der großen Kurvatur stammen sollte) führt zu einer hohen Wahrscheinlichkeit den korrekten Status einer *H. pylori* Infektion und gleichzeitig den Ausbildungsgrad der Gastritis und der assoziierten Erkrankungen der Magenschleimhaut darzustellen.

Maximale Ausprägungen von intestinaler Metaplasie und Atrophie der Mukosa finden sich dabei sehr häufig im Bereich der Incisura angularis, also in der Übergangszone von Korpus- zu Antrumschleimhaut (170), dort finden sich auch gehäuft prä maligne Dysplasien (36; 152).

Neben der makroskopischen Beurteilung der Veränderungen der Magenschleimhaut durch den endoskopischen Untersucher, sollte auch eine kurze Kommunikation mit dem beurteilenden Pathologen stattfinden, etwa anhand von Endoskopiebildern.

2.3. Verarbeitung und Lagerung der Magenbiopsien

Je drei von den Patienten entnommene Antrum- und Korpusbiopsien wurden sofort nach der endoskopischen Entnahme mit autoklavierten Biopsiezangen in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert und somit schockgefroren, was eine optimale Konservierung der Biopsien und der DNA/RNA auch über einen längeren Zeitraum möglich macht.

Nach jeder endoskopischen Untersuchung wurden die Endoskope und Biopsiezangen in einer Olympus Reinigungsmaschine bei 60 °C über 45 Minuten gesäubert.

Die gefrorenen Biopsien wurden in 2 ml Tubes (Eppendorf, D) mit einem autoklavierten Mörser in einer stickstoffgefüllten Porzellanwanne (um ein Auftauen zu verhindern) zerkleinert und homogenisiert und dann bis zur Präparation von DNA oder RNA in flüssigem Stickstoff in einem separaten Raum gelagert.

2.4.1. Histologische Beurteilung der Biopsien

Je zwei der erhalten Biopsien aus Antrum und Korpus wurden der histologischen Beurteilung zugeführt. Um Differenzen in der Beurteilung zu minimieren, die durch unterschiedliche Untersucher naturgemäß gegeben sind, wurden alle histologischen Präparate abschließend durch eine Pathologin bewertet (Frau PD Dr. Becker, Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie, Klinikum rechts der Isar der TU München). Der Pathologin wurden die Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion auf *ureaseb* nicht mitgeteilt.

Zur besseren reproduzierbaren und klinisch anwendbaren Diagnostik der mit der Besiedlung durch *H. pylori* verbundenen Krankheiten erfolgte die pathologische Evaluation der Biopsien gemäß der „updated“ Sydney Klassifikation von 1996 (47; 173). Sie beinhaltet eine Kombination von topographischen, morphologischen und ätiologischen Informationen und klassifiziert diese Veränderungen anhand endoskopischer und histologischer Kriterien.

Der *H. pylori* Status eines Patienten sollte dabei an mindestens je zwei Biopsien aus dem Antrum und Korpus ermittelt werden; häufig läßt sich der Keim nach einer Eradikationstherapie noch im Korpus nachweisen, während im Antrum keine Besiedlung mehr sichtbar ist. Zusätzliche Biopsien sollten dabei aus jeder sichtbaren Läsion erfolgen (z. B. Erosion oder Ulkus).

Bei der Beurteilung durch den Pathologen erscheinen gemäß dieser Klassifikation darüber hinaus folgende Kriterien grundlegend:

Für die klinische Fragestellung in Verbindung mit den histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut ist der „direkte“ **Nachweis von *H. pylori*** oft die wichtigste Information, er beeinflusst das weitere klinische Vorgehen, gegebenenfalls schließt sich unmittelbar an die Beurteilung die Eradikationstherapie an. Veränderungen der Dichte der Besiedlung korrelieren mit der Ausprägung der Gastritis und können Einfluß haben auf die Folgeerkrankungen (46).

Die durch die Infektion ausgelöste chronische Gastritis hat meist auch eine aktive Komponente, die **chronisch-aktive Gastritis** beschreibt also die Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten bei Hintergrund einer chronischen Entzündung; Neutrophile finden sich dabei

nahezu ubiquitär in der gesamten Magenschleimhaut in der Lamina propria, im Epithel und auch im Drüsenlumen, wo sie Grübchenabszesse bilden. Die Aktivität der Gastritis (also das Ausmaß der Infiltration mit Neutrophilen) korreliert mit dem Ausmaß des Gewebeschadens und der Stärke der *H. pylori* Infektion (64). Die Veränderungen des aktiven Anteiles der Entzündungen stellen einen sehr sensiblen Indikator für die Anwesenheit des Bakteriums dar. So sind bereits wenige Tage nach Beginn der Eradikation oft keine aktiven Entzündungszellen mehr nachweisbar (173)

Die gesunde gastrische Mukosa enthält nur sehr wenige mononukleäre Zellen, jeder Anstieg spricht deshalb für das Vorliegen einer **chronischen Gastritis**: Man findet dann zelluläre Infiltrate mit CD4/CD8 positiven Lymphozyten, B-Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten, Mastzellen und Eosinophilen. Diese mononukleären Infiltrationen verschwinden im Vergleich zu der aktiven Komponente der Entzündung nach Eradikation nur sehr langsam (200).

Die **Atrophie** der spezialisierten Magenschleimhaut wird definiert als Untergang von Drüsengewebe und Ausdünnung der gastralen Mukosa. Dem Verlust der Drüsen folgen Ulzerationen, Erosionen und lang anhaltende entzündliche Prozesse mit Ausbildung einer Fibrose. Die quantitative Diagnostik erfolgt anhand der Beurteilung von Drüsenabschnitten pro mikroskopischem Gesichtsfeld, welche die untere Antrumukosa überspannen. Der Ersatz von Epithel durch die intestinale Metaplasie trägt oft zum Eindruck einer atrophischen Schleimhaut bei, wobei es sich allerdings um zwei komplett unabhängige Vorgänge handelt. Die Atrophie ist durch den Untergang an funktionellen Zellen eng verbunden mit dem Verlust der Magensäuresekretion, welcher ebenfalls ein erhöhtes Risiko darstellt für die Entwicklung eines Magenkarzinomes (34; 166).

Generell findet sich die **intestinale Metaplasie** gehäuft bei langanhaltendem Vorliegen einer chronischen Gastritis; sie wird beschrieben als der Nachweis von Becherzellen, wie man sie normalerweise nur in der Schleimhaut des Dünndarmes findet; es handelt sich dabei um Zellen mit Absorptionsfunktion, die einen hohen Mucingehalt haben. Dabei erfolgt eine Einteilung der Metaplasie in drei verschiedene Typen:

- Typ I (= komplett)
- Typ II (= inkomplett)
- Typ III (= kolischer/enterokolischer Typ)

Das Vorhandensein einer intestinalen Metaplasie prädisponiert für die Entstehung von malignen Läsionen der Magenschleimhaut, das höchste Karzinomrisiko geht hierbei von dem Typ III (dem sogenannten Sulfomucin-sezernierenden Typ) aus (141; 180).

Neben den Routinefärbungen (z. B. HE) existieren Spezialfärbungen zum Nachweis von *H. pylori* (Giemsa, Warthin-Starry, Immunfärbungen), der Nachweis von intestinaler Metaplasie der Magenschleimhaut erfolgt häufig mittels der PAS-Färbung.

2.5.1. Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.5.1. Materialien und Bezugsquellen

Enzyme und Proteine

Deoxynucleotid-Mix	Biometra, Göttingen
QIAamp Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Random Primer	Boehringer, Mannheim
Reverse Transkriptase Superskript™ II	Gibco BRL, USA
rTth DNA Polymerase	Perkin Elmer, Vaterstetten
Taq PCR Master Mix	Qiagen, Hilden
Trizol Reagenz	Gibco BRL, USA

Sonstige Reagentien

Agarose	Biozym, Hameln
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen

Chloroform	Merck, Darmstadt
DEPC	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Merck, Darmstadt
EDTA-Na ₂	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid-Na-Salz	Merck, Darmstadt
Ficoll	Sigma, Deisenhofen
Isopropylalkohol	Merck, Darmstadt
Längenstandard Bioladder™	Hybaid, Heidelberg
PBS	GibcoBRL, Eggenstein
Phenol	GibcoBRL, Eggenstein
Tris (Trizma)	Sigma, Deisenhofen
Sonstige Standardlaborchemikalien	Merck, Darmstadt und Sigma, Deisenhofen

Verwendete Gerätschaften

Autoklave	KSG, Olching
Computer	Hewlett-Packard, USA
DU 640 Spectrometer	Beckmann, München
Elektrophoreseapparatur	Bio-Rad, München
Heizbank	Liebisch, Bielefeld
Heizschrank	Heraeus, München
Primus PCR Cycler	MWG Biotech, Ebersberg
Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Thermo-Mixer	Eppendorf, Hamburg
Tubes	Eppendorf, Hamburg
Vakuumpumpe	Schultheiss, München
Videodokumentationssystem	MWG Biotech, Ebersberg

Vortexer	Heidolph, Bielefeld
Zentrifuge 5403, 5415	Eppendorf, Hamburg

Allgemeine Verbrauchsmaterialien

3MM Filterpapier	Whatman, England
Eppendorf Tubes	Eppendorf, Hamburg
Nap-5 columns	Pharmacia/LKB, Freiburg
Nap-10 columns	Pharmacia/LKB, Freiburg
Pipettenspitzen steril	Biozym, Oldendorf

2.5.2. Verwendete Puffer, Lösungen und Medien

TE-Puffer	10 mM Tris-HCL 10 mM EDTA pH 8,0
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA pH 8,0
TBE-Puffer	90 mM Tris-Borat 1 mM EDTA pH 8,0
PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ 10 mM NaH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl
Ladepuffer (10x) für DNA-/RNA-Elektrophorese	0,04% Bromphenolblau 0,04% Xylencyanol 2,5% Ficoll in TAE-Puffer
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml in ddH ₂ O

2.5.3. Sterilisation von Arbeitsmaterialien/Maßnahmen zur Dekontamination

Allgemein wurde strikt auf die Einhaltung steriler Arbeitstechniken geachtet, bei dem Umgang mit bakteriellem Genom eine Grundvoraussetzung um Kontaminationen und falsch positive oder negative Ergebnisse zu vermeiden. Noch dazu handelt es sich bei der Polymerasekettenreaktion um eine höchst sensible Methode, gleichzeitig sind aber auch bei der vorherigen Präparation von DNA und RNA saubere Arbeitstechniken unabdingbar.

Glasgeräte wurden dabei über 12 Stunden bei trockener Hitze von 180 °C sterilisiert; Flüssigkeiten (Wasser und Pufferlösungen), sowie Labormaterial aus Polypropylen (Zentrifugenbecher, Eppendorfgläser, Reaktionstubes und Pipettenspitzen) und Biopsiemörser/-schalen wurden bei 121 °C und 2 bar über zwei Stunden autoklaviert. Zur Pipettierung der PCR-Ansätze und –Produkte wurden ausschließlich Einmalpipettenspitzen mit Filter (aerosoldicht) verwendet.

Oberflächen, Arbeitsplätze wie die PCR-Bank und Geräte wurden nach Benutzung mit 10 % Natriumhydrochloridlösung gesäubert, um Nukleinsäuren, Fremd-DNA und PCR-Produkte zu zerstören.

Es wurde eine strikte räumliche Trennung von Biopsienaufbereitung, RNA-/DNA-Isolation, PCR-Durchführung und PCR-Auswertung mit Gelelektrophorese eingehalten, um eine Kontamination mit Produkten vorheriger Polymerasekettenreaktionen (sogenannter „product carryover“; (56)), exogener DNA und anderem zellulärem Material zu vermeiden.

Alle in der Methodik verwendeten Substanzen wurden vor Durchführung der PCR getestet, aliquotiert um „Crosskontamination“ zu vermeiden und in separaten Tiefkühlschränken aufbewahrt (Separation von *H. pylori* DNA/RNA und PCR-Reagentien). Alle Arbeitsgänge wurden mit Einmalhandschuhen ausgeführt.

Der Ansatz der Polymerasekettenreaktion wurde unter sterilen Zellkulturbänken mit vertikalem Luftstrom pipettiert, danach wurden die Arbeitsbänke mit UV-Licht bestrahlt um ungewünschte

PCR-Produkte zu eliminieren. Die Pipettenspitzen wurden nach jedem Pipettierschritt gewechselt, Nukleinsäuren nur mit aerosoldichten Spitzen pipettiert.

Es wurden bei jeder PCR Negativkontrollen ohne DNA mit angefertigt um Kontaminationen frühzeitig zu erkennen.

2.5.4. Präparation der DNA und RNA

Für die Analysen auf DNA- und RNA-Ebene wurden von jedem Patienten je drei Antrum- und Korpusbiopsien entnommen, welche unmittelbar nach der endoskopischen Entnahme zur Konservierung der DNA/RNA in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden.

Die Biopsien wurden in 2 ml Tubes (Eppendorf) mit einem Mörser zerkleinert und homogenisiert und bis zur Präparation der DNA in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur weiteren Isolation von RNA wurden die zermörserten Biopsien in Trizol-Reagenz homogenisiert und nachfolgend bei -70°C aufbewahrt.

Für die **Isolation der DNA** aus den Magenschleimhautbiopsien wurde das Gewebe mit Proteinase K verdaut und somit lysiert. Die weitere DNA Isolation erfolgte mit dem „QIAamp Tissue Kit“ (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers:

Nach Zugabe von Proteinase K erfolgte der Verdau der homogenisierten und gevortexten Proben über drei Stunden bei 55°C. Anschließend wurde das Lysat nach Zugabe von ATL Puffer und 96 bis 100% Ethanol mehrfach über eine Membran gewaschen und zentrifugiert; die herausgefilterte DNA wurde in sterilen Tubes in 200 µl destilliertem Wasser bei -20°C aufbewahrt und war somit der mehrfachen PCR-Analyse zugänglich. Somit wurde eine standardisierte und relativ zügig durchführbare DNA-Präparation erreicht, welche lichtphotometrisch gemessen Konzentrationen von durchschnittlich 100 µg/µl ergab. Zur internen Qualitätskontrolle wurde neben der lichtphotometrischen Vermessung der DNA auch eine PCR für *β-Actin* durchgeführt (Primer: *β-Actin* sense: 5'-CTG TGC TAT CCC TGT ACG CCT CTG-3'; antisense: 5'-GCT TCT CCT

TAA TGT CAC GCA CGA-3') die bei den angeführten Mengen an extrahiertem genetischen Material ein eindeutiges Signal für jede Probe erbrachte.

Die Durchführung der **RNA-Isolation** erfolgte mittels der beschriebenen Methode (29; 30) von Chomczynski:

Um eine größere Menge von Proben gleichzeitig zu verarbeiten und einen Abbau durch RNAsen zu verhindern, wurden die gemörserten Proben wie bereits erwähnt in Trizol-Reagenz (GIBCO, USA) aufgenommen, welches eine monophasische Lösung darstellt aus Phenol und Guanidin-Isozyanat. Die gelöste Biopsie wurde fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nach der Zugabe von Chloroform zentrifugiert; es erfolgte eine Auftrennung der Mixtur in eine untere, rote Phenol-Chloroform-Phase (organische Phase mit DNA und Proteinen) und eine obere, farblose und wässrige Phase, welche die RNA beinhaltet. Die wässrige Phase wurde abgenommen, die RNA mit Isopropylalkohol präzipitiert und mit 75% Ethanol gewaschen; das verbleibende RNA-Pellet wurde in 100 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Auch hier wurde zur Qualitätskontrolle der Arbeitsmethode die RNA elektrophoretisch aufgetrennt mit Aufteilung in die 5s-, 18s- und 28s-Untereinheiten (Bilder nicht gezeigt); die RNA-Proben wurden dabei in 1% Gel (bestehend aus 10xMOPS, DEPC Wasser, Agarosegel und Formaldehyd) zwei bis drei Stunden aufgetrennt. Gleichzeitig wurde aber auch eine PCR mit *β2-Mikroglobulin* durchgeführt, welches als sogenanntes „Housekeeping“ Gen in allen MHC-I exprimierenden Zellen gefunden wird (als Primerpaare gemäß (174): *β2-Mikroglobulin* sense: 5'-CCT GAA TTG CTA TGT GTC TGG GTT TCA TCC A-3'; antisense: 5'-GGA GCA ACC TGC TCA GAT ACA TCA AAC ATG G-3'). Es ergab sich bei einer Annealingtemperatur von 65°C und 35 Zyklen das zu erwartende Fragment bei 441 bp.

2.5.5. Durchführung der Polymerasekettenreaktion

Die PCR Amplifikation der für die Pathogenität bedeutenden Genregionen von *H. pylori* erfolgte für den *ureaseb* (als Positivkontrolle), *cagA*, *babA2* Genotyp und die *vacA* Allele *vacAs1/s2*.

Die Polymerasekettenreaktion wurde unter den vorbeschriebenen sterilen Bedingungen an einer sterilen Zellkulturbank angesetzt, dabei wurde der Ansatz in 0,5 ml Eppendorf-Gefäße pipettiert. Die Amplifikation der DNA wurde durchgeführt in einem Gesamtvolumen von 25 μ l, welches sich zusammensetzt aus 22 μ l Taq PCR Master Mix (Qiagen), 1 μ l der präparierten DNA (entsprechend ca. 100 μ g) und 1 μ l pro Primer. Die $MgCl_2$ Konzentration wurde an jedes Primerpaar je nach Qualität der Gelelektrophorese angepaßt. Der Taq PCR Master Mix beinhaltet neben den notwendigen Nukleinsäuren (dNTPs: A, C, G und T) auch Puffer und die thermostabile DNA Polymerase. Das PCR Cycling wurde wie folgt in einem Primus PCR Cycler (MWG Biotech, Ebersberg) bei einer Zyklenzahl von 25 bis 30 durchgeführt: Initiale Phase der Denaturierung über 5 Minuten bei 94°C; anschließend 94°C über 30 Sekunden; Annealing bei Temperaturen zwischen 55 und 62°C über 30 Sekunden (je nach Primerpaar); 72°C für 30 Sekunden; anschließend erfolgte eine finale Extension bei 72°C über 10 Minuten.

Denaturierung: 94°C, 30 Sekunden

Annealing: 55 bis 62°C, 30 Sekunden

Synthese: 72°C, 30 Sekunden

Die PCR-Bedingungen (insbesondere die Zyklenzahl und Annealingtemperaturen) wurden dabei individuell den verschiedenen Primerpaaren angepaßt, bei mangelhafter Qualität der gelelektrophoretischen Darstellung erfolgte ebenfalls eine Veränderung.

Um den Nachweis der Virulenzfaktoren auch auf RNA-Ebene zu erbringen, wurde die isolierte RNA mittels reverser Transkription in cDNA überführt (gemäß der standardisierten Bedingungen); als Enzym wurde die rTth DNA Polymerase (Perkin Elmer Cetus, Vaterstetten) eingesetzt. Die Amplifikation der cDNA erfolgte analog den obigen Bedingungen mit den

gleichen Primerpaaren. Die Ergebnisse der PCR aus DNA und cDNA (nicht gezeigt) waren dabei identisch.

2.5.5.1. Auswahl und Herstellung der Oligonukleotidprimer

Die *babA2* Primer wurden aufgrund der publizierten Signalsequenz und wie vorbeschrieben synthetisiert (69) (*babA2* sense: 5'-AAT CCA AAA AGG AGA AAA AGT ATG AAA-3'; antisense: 5'-TGT TAG TGA TTT CGG TGT AGG ACA-3'); die anderen wie folgt: *urease b* sense: 5'-TTC ACC CCA ACA AAT CCC TAC AG-3'; antisense: 5'-ACG GCC CAT CGC TTG AGA GT-3'; *cagA* sense (69): 5'-GTA TGG GGG CAA TGG TGG TC-3', antisense: 5'-GAT TCT TGG AGG CGT TGG TGT AT-3'; *vacA* Primer wurden synthetisiert wie zuvor publiziert (6; 191).

Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech in Ebersberg synthetisiert, in lyophilisierter Form geliefert und nach Erhalt auf eine Konzentration von 20 µM verdünnt und anschließend getrennt von der isolierten DNA und RNA bei -20°C aufbewahrt.

2.5.5.2. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die gewonnenen PCR Produkte wurden auf 1 bis 2% Agarosegelen, gefärbt mit Ethidiumbromid, analysiert. Dazu wurde 100 ml 1xTBE Puffer mit einem bis zwei Gramm Agarosegel vermischt und erhitzt, nach Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid wurde das Gel dann in eine Plastikform zur Trocknung gegossen.

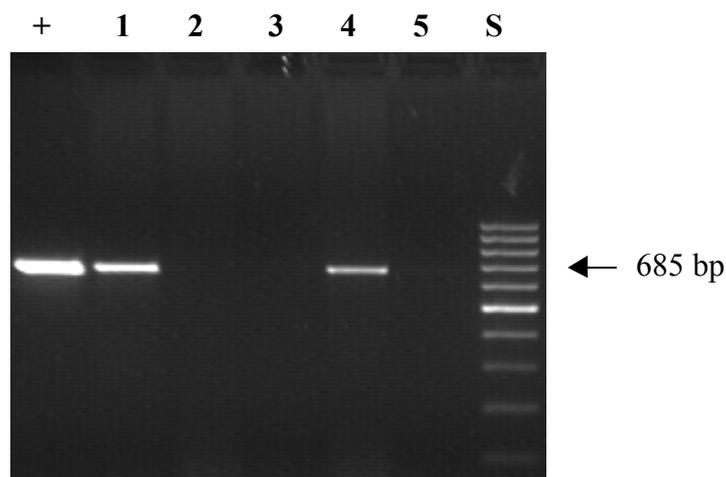
Nach Verfestigung durch Abkühlung wurden die Gele in die Elektrophoresekammer gelegt, welche mit TAE-Puffer aufgefüllt wurde. Die PCR-Proben wurden in Ladepuffer aufgenommen und in die Probenaschen des Gels pipettiert. Neben den Patientenproben erfolgte bei jeder Gelelektrophorese auch die Auftrennung einer Positivkontrolle (Stamm S3), einer Negativkontrolle (Wasser ohne Zusatz von DNA oder RNA) und des jeweiligen Standards.

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte über ein bis zwei Stunden bei einer Feldstärke von 6-7 V/cm.

Auf einem UV-Transilluminator läßt dann das beigeseetzte Ethidiumbromid die Nukleinsäuren im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm weißlich aufleuchten, jeder dargestellte DNA-Bande kann somit einer bestimmten Basenanzahl zugeordnet werden.

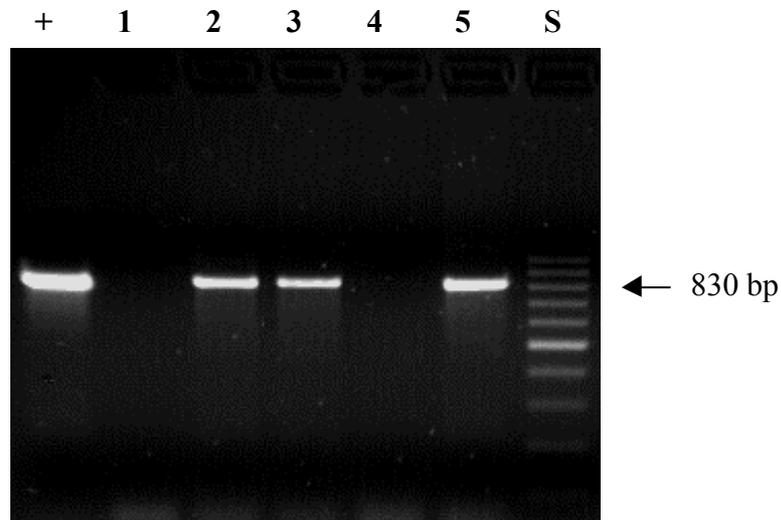
Abbildungen 3 bis 5 zeigen beispielhaft die Darstellung der PCR-Ergebnisse auf dem UV-Transilluminator nach der Gelelektrophorese. Jede Gelbande läßt sich dabei einer Patientenbiopsie zuordnen.

Abbildung 3: Darstellung der Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion (PCR) für den *H. pylori* Virulenzfaktor *ureB*



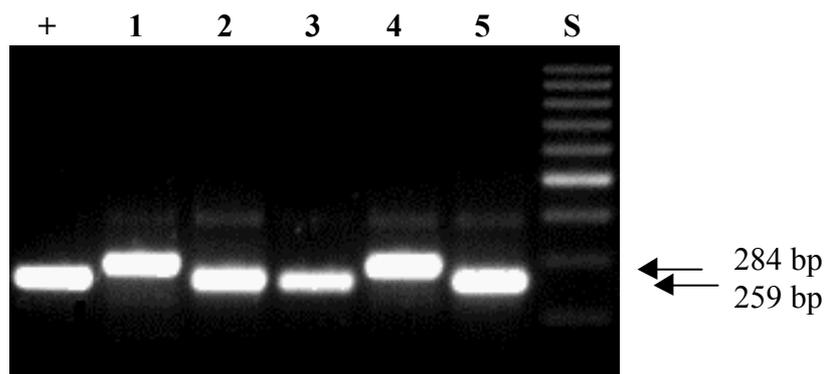
Darstellung der PCR-Ergebnisse auf einem Ethidiumbromid-Gel für *ureB*; positive Signale für die Positivkontrolle S3 (+) und die Proben 1 und 4 bei 685 bp. Der Nachweis von *ureB* diente als Marker für die *H. pylori* Infektion, für die positiven Proben schlossen sich die weiteren Analysen der anderen Virulenzfaktoren an. Standard (S) mit Markierungen im Abstand von 100 bp.

Abbildung 4: Darstellung der Polymerasekettenreaktion (PCR) für den *H. pylori* Virulenzfaktor *babA2*



Darstellung der PCR-Ergebnisse für *babA2*; die hellen Banden markieren das positive Signal bei 830 bp. Positivkontrolle Stamm S3 (+), ebenfalls positive Signale zeigen die Biopsien 2, 3 und 5. Standard (S) im Abstand von 100 bp, fette Markierung bei 500 bp.

Abbildung 5: Darstellung der Polymerasekettenreaktion (PCR) für die *H. pylori* Virulenzfaktor *vacAs1/vacAs2*



Darstellung der PCR-Ergebnisse zur Differenzierung zwischen dem *vacAs1/vacAs2* Status der Biopsien; die Positivkontrolle (+) markiert das zu erwartende Allel für *vacAs1* bei 259 bp (ebenso die Proben 2, 3 und 5). Die Proben 1 und 4 sind *vacAs2* positiv (Fragment bei 284 bp). Standard (S).

2.6. Auswertung der PCR-Ergebnisse

Die Einstufung der Patientenbiopsien als *H. pylori* positiv erfolgte bei deutlich positivem Signal in der *ureaseb* PCR. Es erfolgte anschließend die weitere molekulargenetische Analyse für die erwähnten Virulenzfaktoren des Keimes. Somit konnte jedem Patienten ein *H. pylori* Stamm mit den entsprechenden genetischen Merkmalen zugeordnet werden. Es wurden jeweils gleichzeitig ca. 10 bis 20 Biopsien analysiert. Bei unklaren Ergebnissen in der elektrophoretischen Auftrennung (beispielsweise bei Doppelbanden, unklarem Positivsignal) wurde die Polymerasekettenreaktion wiederholt, gegebenenfalls erfolgte eine Anpassung der Bedingungen (Annealingtemperatur, Zyklenzahl, MgCl₂-Konzentration). Biopsien mit anhaltend unklaren Signalen wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

2.7. Klassifizierung der Patientenbiopsien anhand Pathologie und *H. pylori* Genotypen

Die gewonnenen Biopsien wurden zu Gruppen zusammengefaßt, die sich aus den pathologisch festgestellten histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut ergeben. Neben der Auftrennung in Antrum und Korpus erfolgte eine Gruppierung anlehnend an die „updated“ Sydney Klassifikation.

Gleichzeitig wurde für jede Biopsie anhand der PCR-Ergebnisse der Status des Virulenzfaktors festgelegt als „positiv“ oder „negativ“.

2.8. Statistische Methoden

Um die Unterschiede der verschiedenen Isolate zu vergleichen wurden der Chi-Quadrat-Test und logistische Regressionsanalysen herangezogen. P-Werte und die angewandten Tests sind im Text und den Graphiklegenden angegeben. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant bewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Histologische Beurteilung der Antrum- und Korpusbiopsien

Es wurden von 451 Patienten, welche sich einer routinemäßigen endoskopischen Spiegelung des oberen Magen-Darm-Traktes unterzogen, nach den oben bereits erläuterten Kriterien Biopsien aus dem Antrum und Korpus des Magens gewonnen. Insgesamt wiesen 151 der 451 Patienten eine mittels PCR diagnostizierte *H. pylori* Infektion auf (bei positivem Nachweis des *ureaseb* Gens). Die Biopsien aus dem Antrum und Korpus wurden getrennt ausgewertet, der *H. pylori* Status war dabei für beide Biopsieorte immer identisch, d.h. bei positivem Nachweis von *ureaseb* im Antrum war auch stets im Korpus ein positives Signal zu finden. Bei 145 Patienten wurde histologisch eine Gastritis im Antrum und im Korpus diagnostiziert; es lag mit Ausnahme von neun Patienten auch immer eine aktive Komponente vor, das Vorliegen einer chronischen Gastritis in all diesen Fällen spricht (natürlich neben dem direkten Nachweis von *H. pylori* DNA) auch für eine Infektion durch den Keim. Sechs Patienten zeigten trotz *H. pylori* Nachweis keine histologischen Anzeichen einer Gastritis.

Im Antrum ergab sich dabei folgende Verteilung der histologischen Diagnosen in bezug auf das Stadium der aktiven Gastritis, entsprechend dem Ausmaß der Infiltration des Magenepithels mit polymorphkernigen Zellen (in absoluten Zahlen; G0° = nichtaktive Gastritis; G1° = geringgradig aktive Gastritis; G2° = mittelgradig aktive Gastritis; G3° = hochgradig aktive Gastritis): neun Patienten zeigten eine G0°, 27 Patienten mit G1°, 82 Patienten mit G2° und 27 Patienten hatten eine G3°. Die Verteilung im Korpus war folgendermaßen: 30 Patienten hatten eine G0° ohne Aktivitätszeichen, 54 Patienten hatten eine G1° entwickelt, 50 Patienten eine G2° und elf Patienten litten unter einer G3°. Bei insgesamt neun Patienten war der Grad der Gastritis im Korpus höher als im Antrum, sie zeigten immer eine mittel-/hochgradige Aktivität mit gleichzeitigem Vorliegen einer intestinalen Metaplasie oder Atrophie. Diese Patienten könnten

ebenfalls gemäß der Erfahrung aus früheren Studien ein erhöhtes Risiko für schwerwiegende Veränderungen der Magenschleimhaut mit sich tragen.

Alle Patienten mit einer intestinalen Metaplasie oder Atrophie hatten gleichzeitig eine chronische Gastritis im Antrum oder Korpus, diese schweren histologischen Alterationen können also nur bei langanhaltendem Infektionsgeschehen auftreten. Die Chronizität der Gastritis wurde klassifiziert anhand des Ausmaßes der lymphozytären Infiltration der Magenschleimhaut und wurde in die Stadien L1° bis L3° eingeteilt (L1° = geringgradig chronische Gastritis; L2° = mittelgradig chronische Gastritis; L3° = hochgradig chronische Gastritis). Es ergab sich folgende Verteilung im Antrum: 35 Patienten hatten eine L1°, 84 Patienten eine L2° und 26 Patienten eine L3°. 42 Patienten hatten eine intestinale Metaplasie und/oder eine Drüsenatrophie im Antrum. Die meisten Patienten hatten dabei im Vergleich zum Antrum eine geringere lymphozytäre Infiltration im Korpus, eine hochgradig chronische Gastritis im Korpus war relativ selten (L1°: 101 Patienten; L2°: 35 Patienten; L3°: neun Patienten); dies könnte den normalen Infektionsverlauf mit *H. pylori* widerspiegeln. Es erfolgt primär eine Besiedlung des Antrums, während der Magenkorpus nur bei langanhaltender Infektion befallen ist. Bei vier Patienten war dennoch der Grad der chronischen Gastritis im Korpus höher einzustufen als im Antrum.

Im Korpus fand sich histologisch nur bei acht Patienten eine intestinale Metaplasie und/oder Atrophie.

Von den 306 Patienten, welche in der *ureaseb* PCR ein negatives Ergebnis zeigten (also als *H. pylori* negativ gewertet wurden), hatten 94 (31%) eine histologisch vollkommen unauffällige Magenschleimhaut; der restliche Anteil zeigte meist eine gering-/mittelgradig chronische Gastritis, in einem Großteil der Fälle ohne jegliche Aktivitätszeichen.

Die Abbildungen 6A und 6B zeigen graphisch die Verteilung der histologischen Diagnosen bei positivem Nachweis von *H. pylori* in den Biopsien mittels PCR (*ureaseb* Nachweis).

Abbildung 6A: Darstellung der Verteilung der histologischen Diagnosen der untersuchten Patienten: Ausmaß der granulozytären Infiltration (entsprechend der **Aktivität der Gastritis**) der Magenschleimhaut im Vergleich von **Antrum** (hell schraffiert) und **Korpus** (dunkel). G0° entspricht nichtaktive Gastritis, G1° geringgradig, G2° mittelgradig und G3° hochgradig aktiver Gastritis (gemäß der „updated“ Sydney Klassifikation).

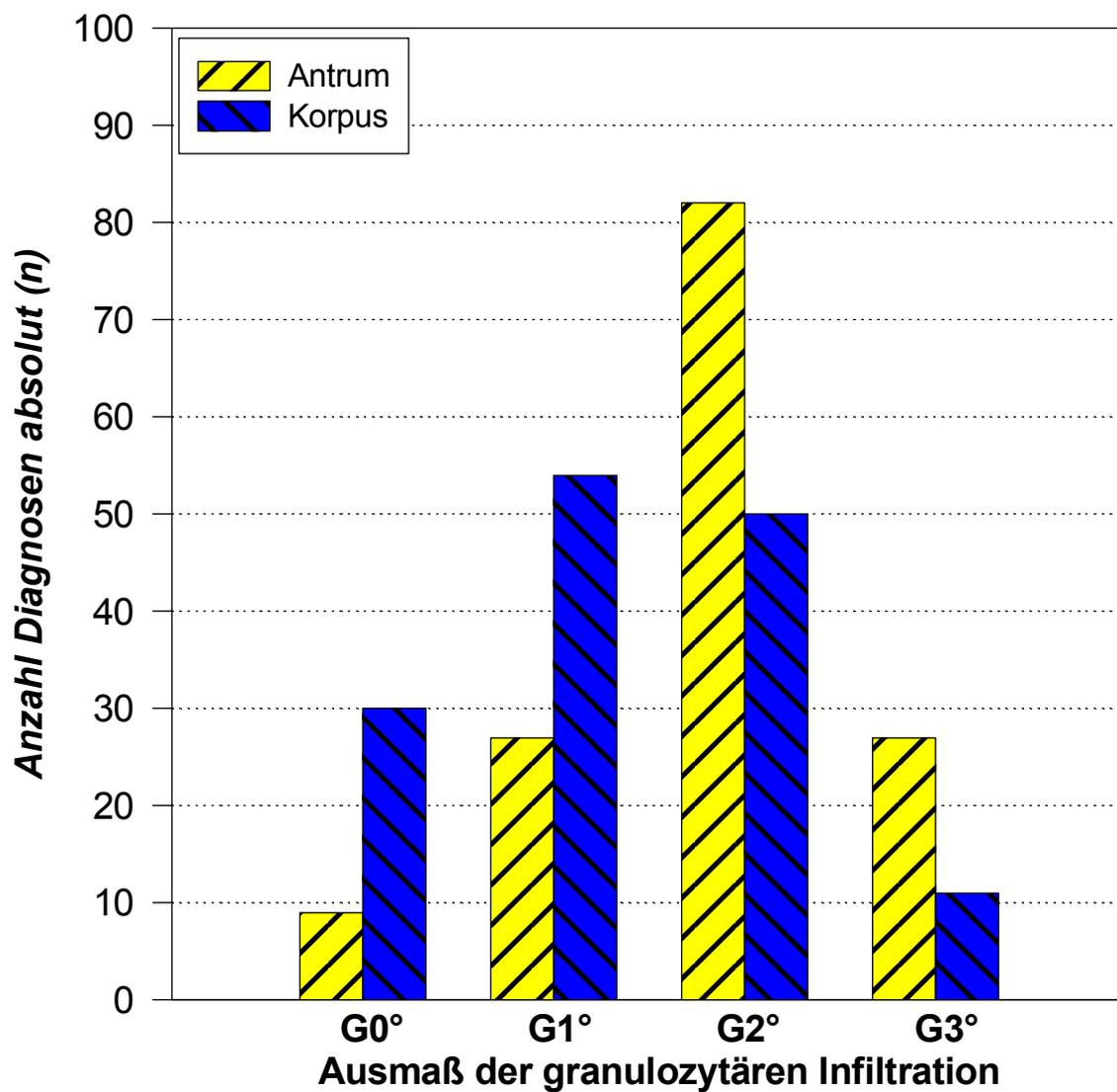
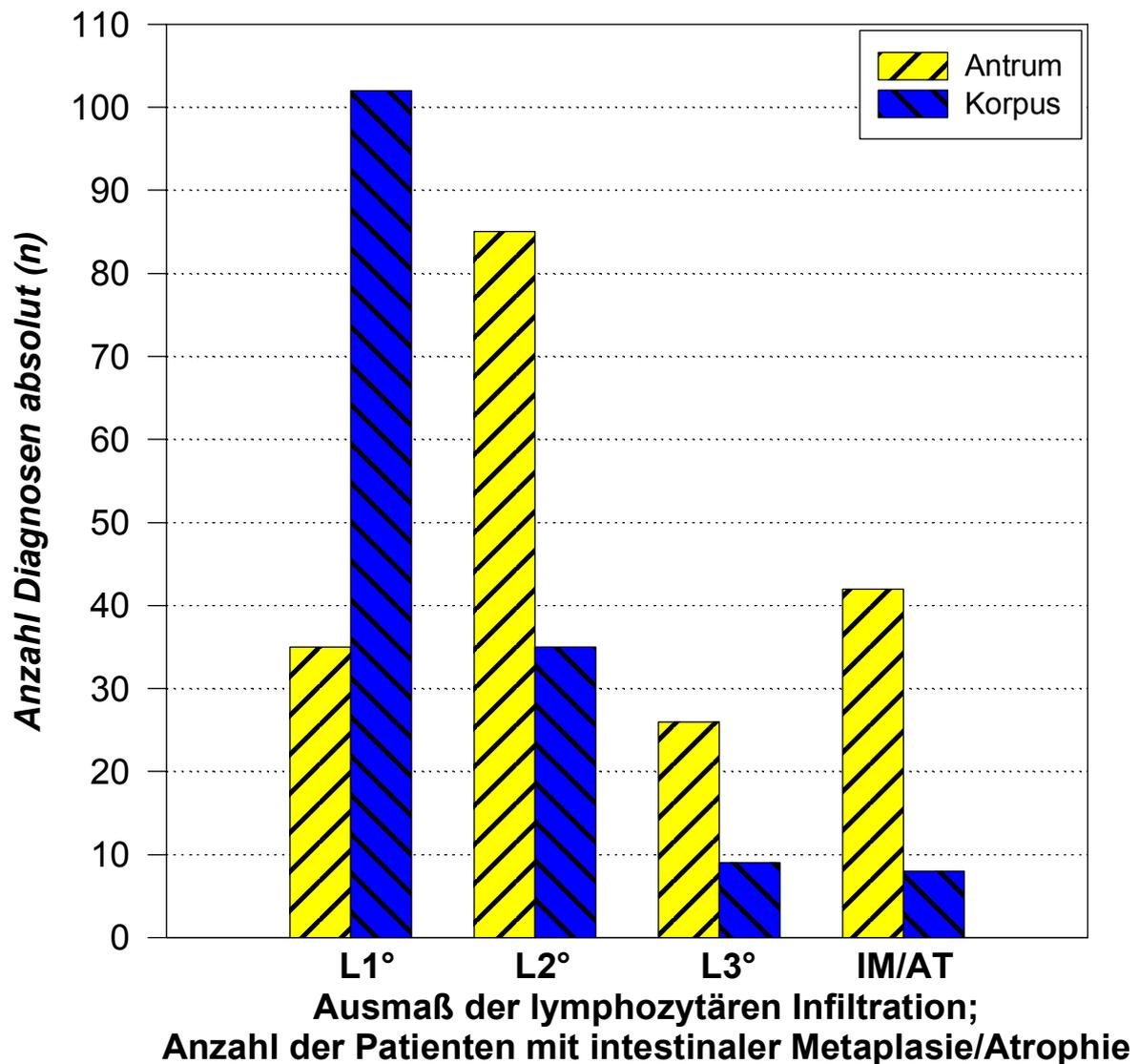


Abbildung 6B: Darstellung der Verteilung der histologischen Diagnosen der untersuchten Patienten: Ausmaß der lymphozytären Infiltration (entsprechend der **Chronizität der Gastritis**) der Magenschleimhaut im Vergleich von **Antrum** (hell schraffiert) und **Korpus** (dunkel). L1° entspricht geringgradig chronischer Gastritis, L3° hochgradig chronischer Gastritis. Auch dargestellt sind die Anzahl der ebenfalls chronischen Veränderungen der Magenschleimhaut: Intestinale Metaplasie (IM) und Atrophie (AT) (gemäß der „updated“ Sydney Klassifikation).



3.1.1. DNA-/RNA-Extraktion

Die Präparation von DNA und auch RNA erfolgte gemäß den zuvor beschriebenen Methoden unter Einhaltung der sterilen Arbeitsbedingungen; dabei wurden je zehn bis 20 Biopsien nach der endoskopischen Gewinnung schnellst möglich verarbeitet um lange Lagerungen zu vermeiden und eine rationelle Präparation zu ermöglichen.

Die DNA-Präparationen wurden lichtphotometrisch in einem UV-Spektrometer vermessen, wobei neben der Konzentration auch die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt werden kann. Dabei wurden die DNA-Proben in einer Quarz-Halbmikroküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm bei Wellenlängen von 260 und 280 nm analysiert. Die durchschnittliche Konzentration an gewonnener DNA betrug ca. 100 µg/µl, so daß in die sich anschließende PCR ähnliche Mengen an Analyseproben eingesetzt werden konnten.

Nicht angeführt sind die Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion für *β-Actin* und *β-Mikroglobulin*, die als interne Qualitätskontrolle dienen.

3.1.2. Nachweis der Infektion durch *H. pylori* mittels *ureaseb* PCR

Zur Diagnose der Infektion eines Patienten mit *H. pylori* diene der hochspezifische Nachweis des *ureaseb* Gens mittels PCR. Wie schon in vorangegangenen Studien gezeigt wurde, lassen sich anhand dieser Methode auch sehr kleine Mengen von genetischem Material des Keimes nachweisen (199). Für die Gelelektrophorese ergibt sich ein positives Signal bei 685 bp (siehe Abbildung 3). 151 der 451 untersuchten Patienten zeigten hier eine positive Bande, die gewonnene DNA wurde also auf weitere *H. pylori* Virulenzfaktoren untersucht.

3.1.3. *H. pylori* Genotypen und die histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut

3.4.1. Korrelation des *babA2*, *vacAs1* und *cagA* Genotypes mit dem Ausmaß der granulozytären und lymphozytären Infiltration im Antrum und Korpus

Primär wird für jeden Genotyp der Virulenzfaktoren die Korrelation hergestellt zu der Aktivität und Chronizität der Gastritis (Tabelle 1 und Abbildungen 7 bis 9).

Ebenfalls werden die verschiedenen histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut verglichen hinsichtlich der Typisierung der einzelnen Biopsien als *cagA*⁺/*vacAs1*⁺ (oder auch „Typ 1 Stämme“), *cagA*⁺/*vacAs1*⁺/*babA2*⁻ (also „Typ 1 Stämme“, welche kein BabA exprimieren) und *cagA*⁺/*vacAs1*⁺/*babA2*⁺ (oder auch „Triple positive Stämme“).

Tabelle 1: Korrelation der verschiedenen bakteriellen Genotypen mit der Aktivität und der Chronizität der Gastritis im Antrum und Korpus des Magens

Korrelation der drei verschiedenen bakteriellen Genotypen mit der Aktivität (Ausmaß der granulozytären Infiltration der Magenschleimhaut) und Chronizität (Ausmaß der lymphozytären Infiltration) der Gastritis im Antrum und Korpus. Ermittelt durch den χ^2 Test; $p < 0,05$ wird als signifikant betrachtet. P-Werte $> 1,0$ entsprechen nicht signifikanten (n.s.).

Faktor	G0°	G1°	G2°	G3°	p-Werte G0°-G3°	L1°	L2°	L3°	p-Werte L1°-L3°
ANTRUM	n=9	n=27	n=82	n=27		n=35	n=85	n=26	
BabA2	11%	30%	35%	63%	0,01	17%	39%	62%	0,0018
VacAs1	56%	63%	70%	93%	0,038	46%	73%	100%	0,001
CagA	22%	56%	59%	89%	0,001	40%	61%	96%	0,001
CagA+/VacAs1+	22%	52%	57%	89%	0,0037	31%	61%	96%	0,001
CagA+/VacAs1+ BabA2-	11%	30%	26%	26%	n.s.	23%	25%	35%	n.s.
CagA+/VacAs1+ BabA2+	11%	22%	32%	63%	0,002	9%	36%	62%	0,01
CORPUS	n=30	n=54	n=50	n=11		n=35	n=85	n=26	
BabA2	23%	35%	44%	64%	0,05	17%	39%	44%	0,84
VacAs1	53%	72%	76%	100%	0,019	69%	73%	100%	0,12
CagA	47%	56%	70%	100%	0,01	40%	61%	96%	0,04
CagA+/VacAs1+	43%	54%	70%	100%	0,0027	31%	61%	96%	0,02
CagA+/VacAs1+ BabA2-	27%	22%	28%	36%	n.s.	23%	25%	35%	n.s.
CagA+/VacAs1+ BabA2+	17%	31%	42%	64%	0,019	9%	36%	62%	0,54

3.1.3.1. Blutgruppen-Antigen bindendes Adhäsion (*babA*)

Der *babA2* Genotyp wurde nur bei insgesamt 38% der mit *H. pylori* infizierten Patienten im Antrum und Korpus entdeckt. Wie aus den Abbildungen 7 ersichtlich, stellt sich im Antrum und Korpus eine statistisch signifikante Korrelation dar zwischen der Aktivität der Gastritis und dem *babA2* Genotyp (Abbildungen 7A und 7B; $p = 0,01$ bzw. $p = 0,05$). In Bezug auf die Chronizität der Gastritis ergab sich ein linearer Anstieg des Anteils der *babA2* positiven Biopsien nur im Antrum (Abbildung 7A), während sich im Korpus jedoch für die verschiedenen Gastritisstadien ein nahezu identischer Anteil ergab. Deswegen kam es hier nur zu einer signifikanten Korrelation zwischen den *babA2* positiven Stämmen und der lymphozytären Infiltration im Antrum (Abb. 7A; $p = 0,0018$), nicht jedoch im Korpus (Abb. 7B; $p = 0,84$). Hohe Anteile von *babA2* positiven Biopsien (62 bis 64%) ergaben sich für die hochgradig aktive und chronische Antrumgastritis, aber auch für die hochgradig aktive Gastritis im Korpus.

Abbildung 7A zeigt die starke Korrelation zwischen Aktivität und Chronizität der Gastritis mit dem Adhärenzfaktor *babA2* für das **Antrum**; lineare Zunahme des Anteils positiver Biopsien mit dem Schweregrad der Gastritis. Hoher Anteil der *babA2* positiven Biopsien für hochgradig aktive (G3°) und hochgradig chronische (L3°) Gastritis.

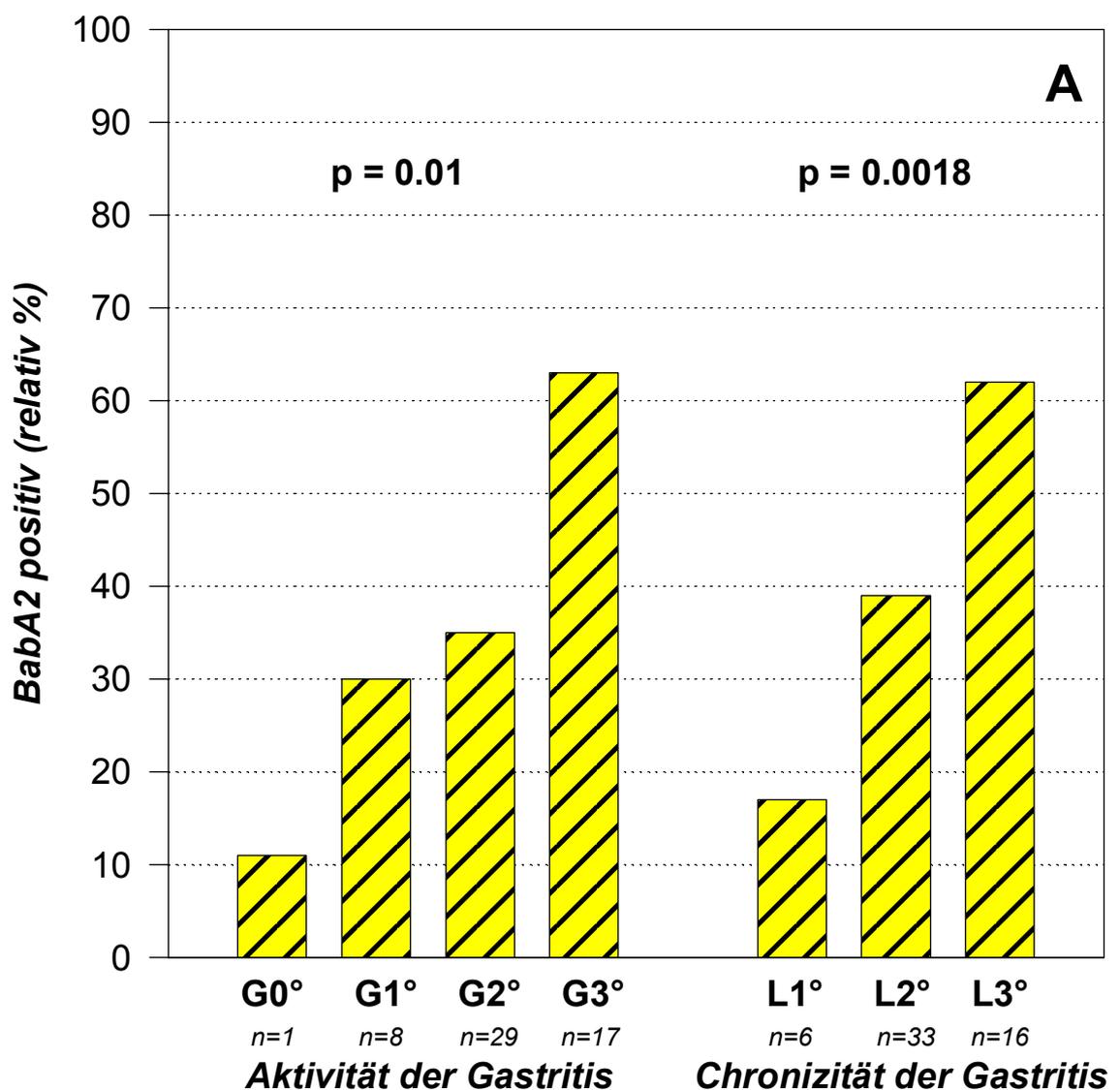
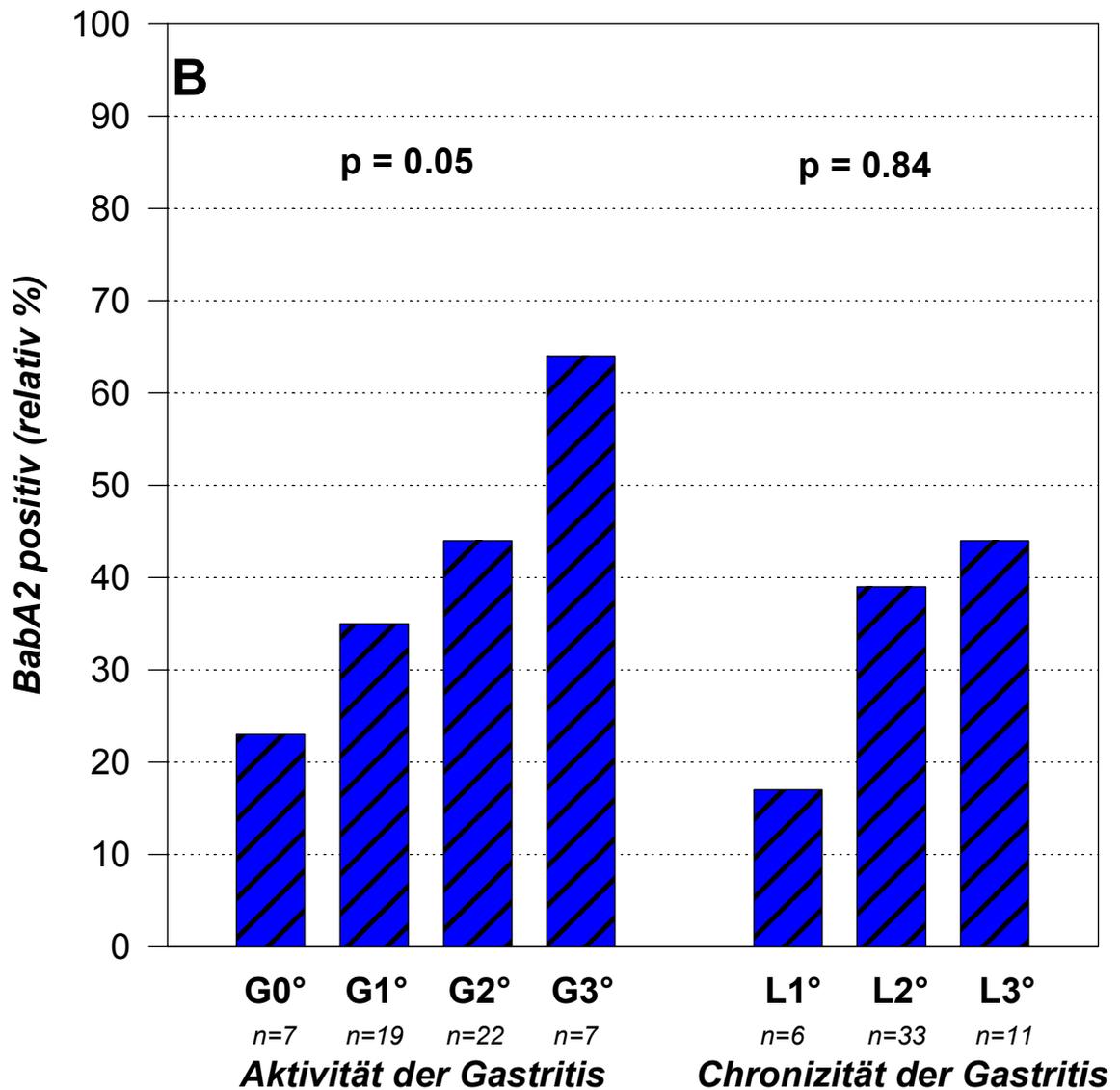


Abbildung 7B: Im **Korpus** des Magens ergibt sich nur ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der Gastritis und *babA2*; bezüglich der Chronizität ist p nicht signifikant.



3.4.1.2. Vakuolisierendes Zytotoxin (*vacA*)

72% der *H. pylori* positiven Patienten waren *vacAs1* positiv, 28% zeigten den *vacAs2* Genotyp. Wie aus den Abbildungen 8A (Antrum) und 8B (Korpus) ersichtlich, erreichte die Assoziation von *vacAs1* mit der Aktivität der Gastritis signifikante Werte im Antrum ($p = 0,038$), aber auch im Korpus ($p = 0,019$). Der Anteil der *vacAs1* positiven Patienten zeigte eine lineare Zunahme mit dem Anstieg der Schwere der chronischen Gastritis im Antrum (L1° bis L3°, $p = 0,001$), jedoch nicht im Korpus ($p = 0,12$); dort war bereits ein hoher Anteil der Biopsien mit geringgradig chronischer Gastritis *vacAs1* positiv.

Bei zwei Patienten lag eine Mischinfektion vor mit gleichzeitigem Nachweis von *vacAs1* und *vacAs2* in der gleichen Biopsie. Diese Biopsien waren auch positiv für *babA2* und *cagA*, histologisch zeigte sich eine milde granulozytäre (G1° bis G2°) und geringgradige lymphozytäre Infiltration (L1° bis L2°), aber keine G3° oder AT/IM.

Darüber hinaus wurde auch hier eine weitere Subklassifizierung der *vacAs1* Stämme wie in früheren klinischen Studien vorgenommen. *VacAs1a* Stämme dominieren in Nordamerika (> 90%), während *vacAs1b* am häufigsten sind in Südamerika und mit einer hohen Rate an Magenkarzinomen einhergehen; *vacAs1c* Stämme wurden in der asiatischen Population entdeckt, sind aber selten in den westlichen Ländern (113; 164; 206). Mit den von Atherton et al. vorgeschlagenen Primern (6) waren 78,8% der *vacAs1* Stämme positiv für das *vacAs1a* Allel. Identisch zu der Verteilung bei *vacAs1* waren mehr als 70% der Patienten in den benannten Hochrisikogruppen (G3°, AT oder IM) *vacAs1a* positiv. Die zuvor in Asien beobachtete klinische Korrelation von *vacAs1b* Stämmen mit Magenkarzinomen könnte demzufolge mit der geographischen Verteilung der *vacA*-Allele einhergehen und dürfte für die deutsche Bevölkerung nach unseren Ergebnissen nicht relevant sein.

Abbildung 8A zeigt den Anteil der genotypisch *vacAs1* positiven Biopsien an den unterschiedlichen Gastritisstadien für das **Antrum**. Für den *vacA2* Genotyp ergibt sich das inverse Verhältnis. Bei den jeweils hochgradigen Gastritisformen findet sich ein Anteil *vacAs1* positiver Biopsien von > 90%.

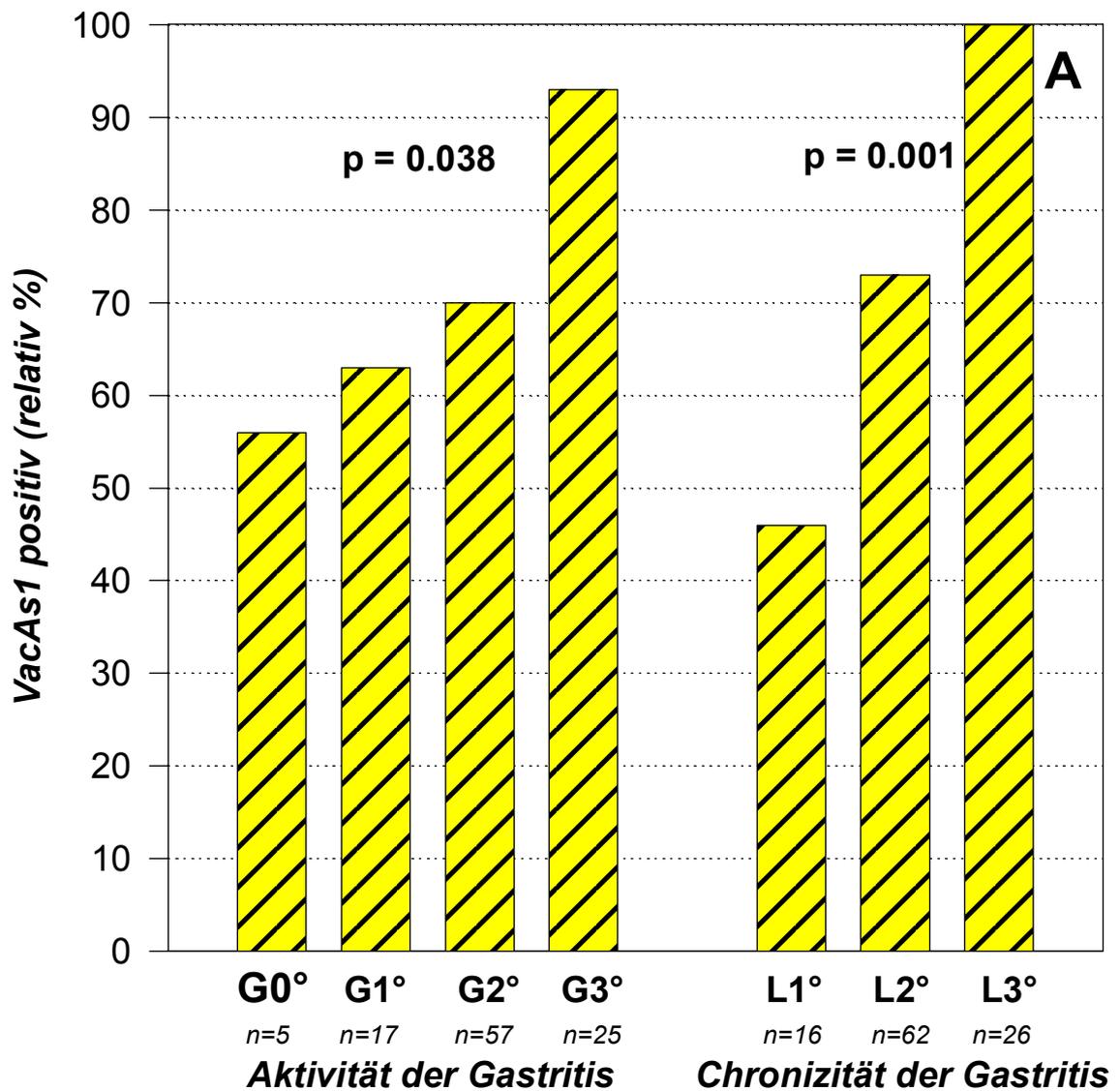
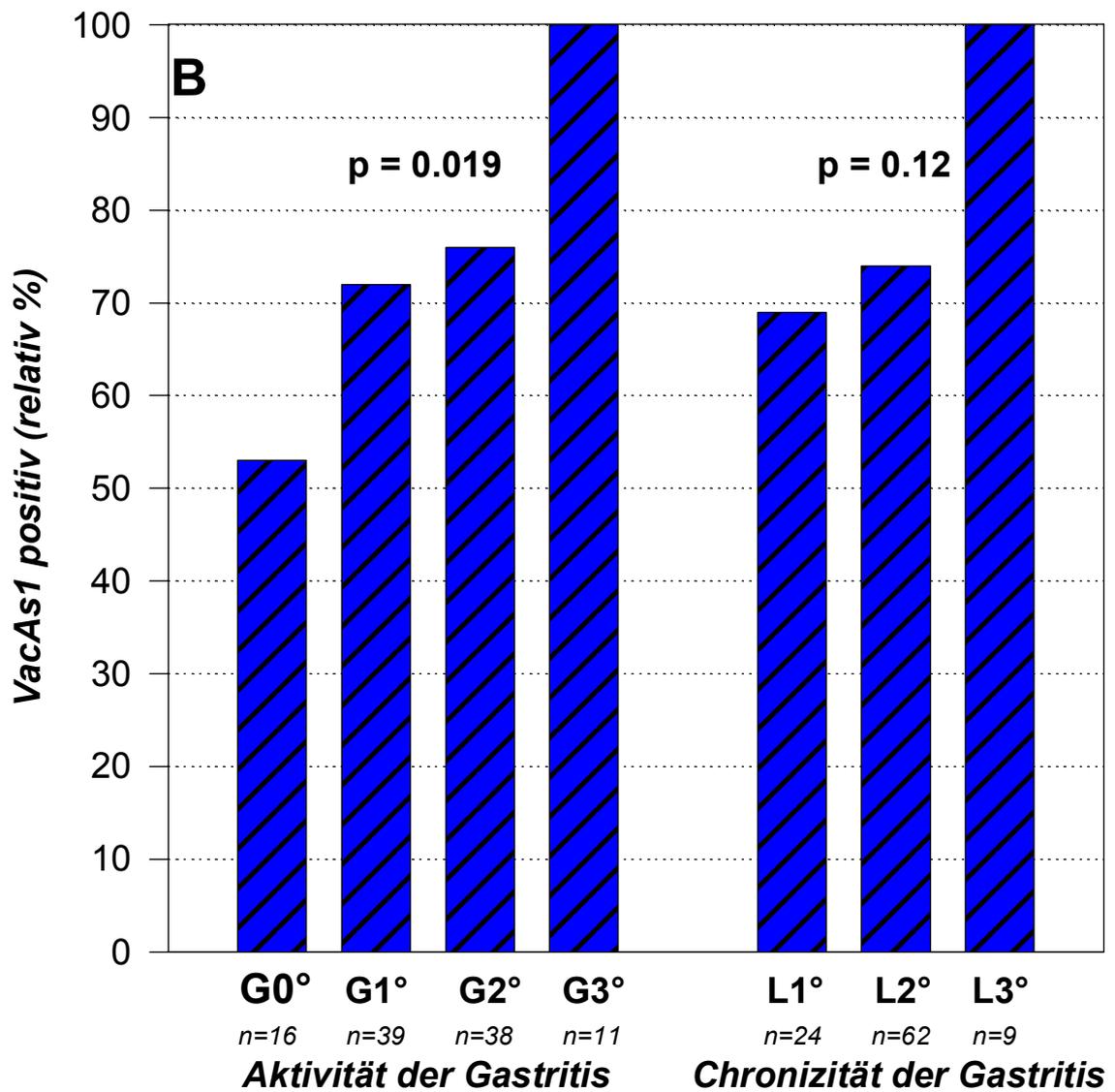


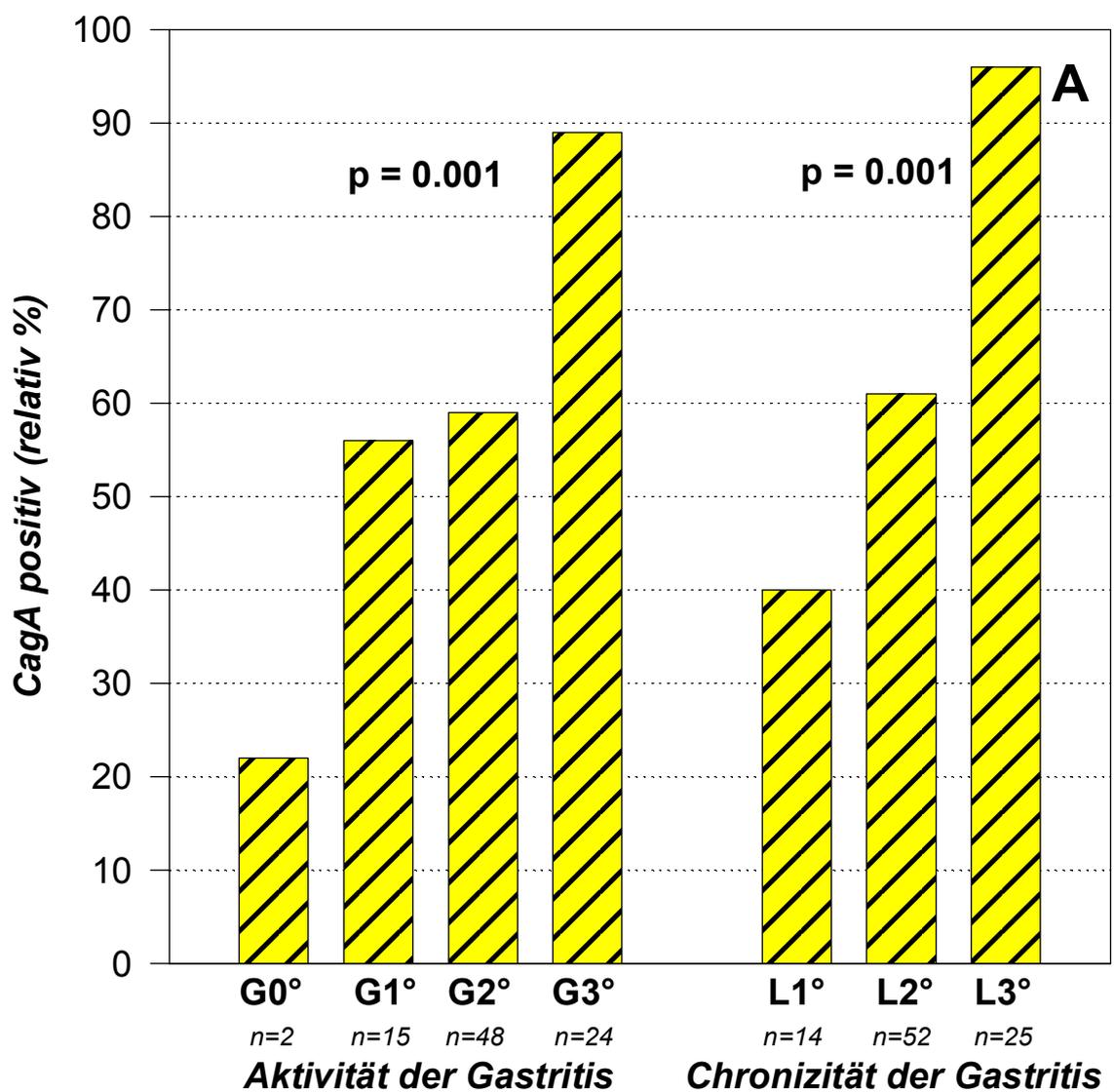
Abbildung 8B: Auch im **Korpus** ergibt sich ein signifikanter Anstieg der *vacAs1* positiven Biopsien für die Aktivität. Dagegen ist schon bei der geringgradig chronischen Gastritis der Anteil von *vacAs1* positiven Patienten mit 69% relativ hoch, somit ergibt sich kein signifikanter p-Wert.



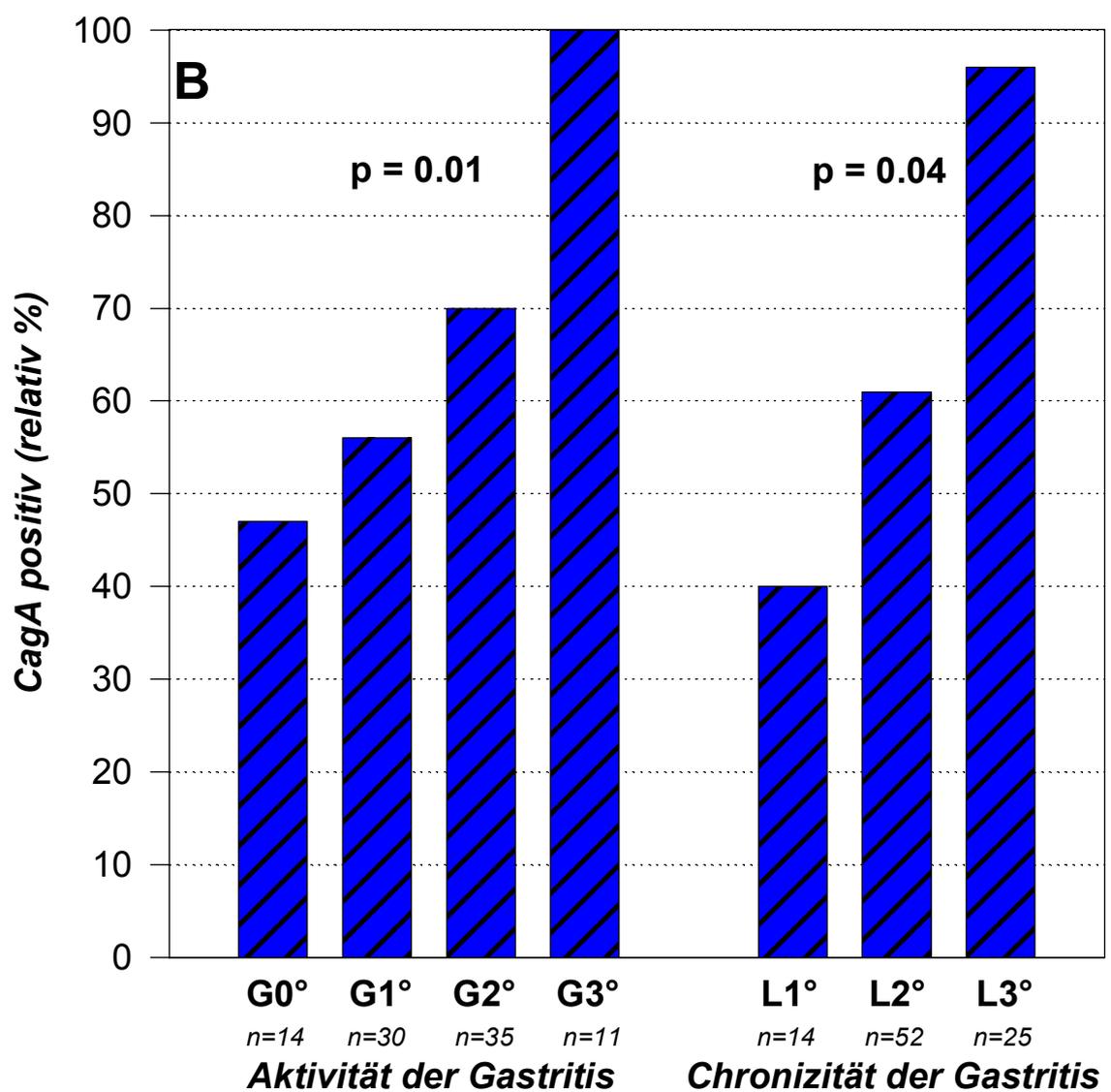
3.4.1.3. Zytotoxin-assoziiertes Antigen (*cagA*)

Das *cagA* Gen wurde insgesamt bei 61% der mit *H. pylori* infizierten Patienten entdeckt. Abbildungen 9A und 9B zeigen, daß *cagA* mit der Aktivität der Gastritis gleichzeitig im Antrum und im Korpus korreliert (Antrum: $p = 0,001$; Korpus: $p = 0,01$). Darüber hinaus ergab sich sogar eine Korrelation für beide Entnahmestellen mit dem Grad der lymphozytären Infiltration (Antrum: $p = 0,001$; Korpus: $p = 0,04$).

Abbildung 9A zeigt die Korrelation des *cagA* Status der Patientenbiopsien mit dem Ausmaß der verschiedenen Gastritisstadien im **Antrum**. Dabei lineare Zunahme der *cagA* positiven Biopsien mit dem Schweregrad der Aktivität und Chronizität der Gastritis.



Auch im **Korpus** des Magens ergeben sich signifikante p-Werte sowohl für die granulozytäre als auch für die lymphozytäre Infiltration der Magenschleimhaut mit dem *cagA* Status der Patienten (Abbildung 9B).



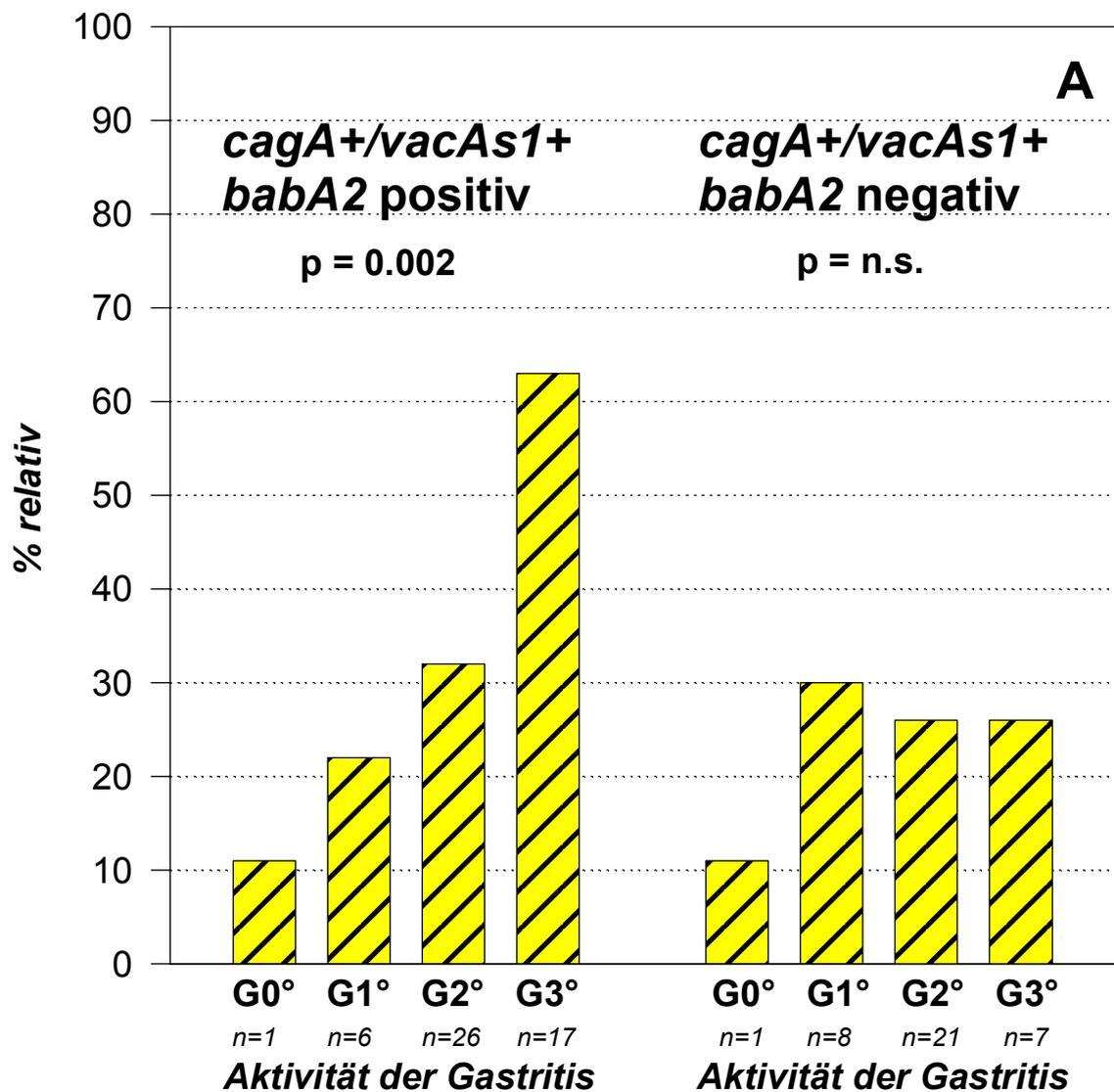
3.1.4. Korrelation *babA2* positiver/negativer „Typ 1 Stämme“ mit der Aktivität und Chronizität der Gastritis

„Typ 1 positive Stämme“ zeichnen sich aus durch den gleichzeitigen Nachweis von CagA und VacA bzw. der entsprechenden Gene, *cagA* und *vacAsI* (206). Insgesamt waren 60% der *H. pylori* infizierten Patienten auch „Typ 1“ positiv und zeigten eine statistisch signifikante Korrelation (Tabelle 1) mit der Aktivität ($p = 0,0037$ im Antrum, $p = 0,0027$ im Korpus) und der Chronizität der Gastritis ($p = 0,001$ im Antrum, $p = 0,02$ im Korpus).

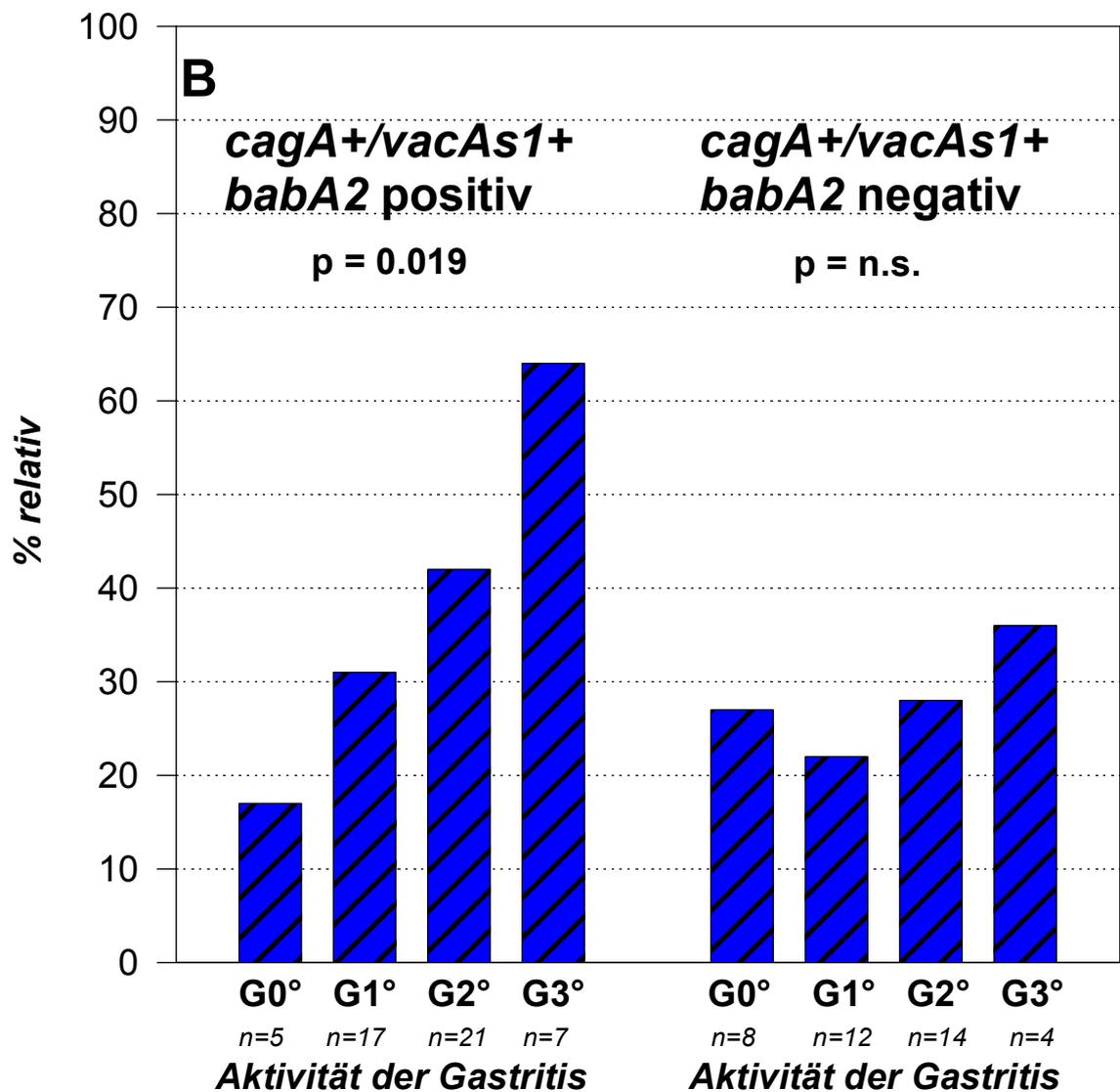
Darüber hinaus wurde die gleichzeitige Anwesenheit in der Patientengruppe von *cagA*, *vacAsI* und *babA2* Genen untersucht: Bei 87 Patienten ergab sich eine Infektion mit Stämmen, die gleichzeitig positiv waren für *cagA* und *vacAsI*; 50 dieser Stämme exprimierten dabei auch das *babA2* Gen, die restlichen 37 Stämme waren negativ für dieses Gen. Im Gegensatz dazu waren nur zwei von 52 Stämmen mit simultaner Expression von *vacAsI* und *babA2* negativ für das *cagA* Gen. Nur einer von 51 *cagA/babA2* positiven Stämmen war negativ für den *vacAsI* Genotyp. Somit ergab nur die Untergruppierung der *cagA+/vacAsI+* Stämme anhand des *babA2*-Genotyps ausreichend aussagekräftige Kriterien für eine statistische Auswertung. Diese Untergruppen wurden in Zusammenhang mit den verschiedenen histologischen Gradierungen analysiert

Die Abbildungen 10 zeigt die Verteilung der *cagA+/vacAsI+* Stämme, unterteilt in das gleichzeitige Vorhandensein/Fehlen des *babA2* Genes. „Typ 1 Stämme“, welche negativ sind für das *babA2* Gen, zeigen keine Korrelation mit der Aktivität der Gastritis im Antrum oder Korpus. Im Gegensatz dazu zeigen Stämme, welche gleichzeitig „Typ 1“ und *babA2* positiv sind („Triple positive Stämme“, bei 34% aller *H. pylori* infizierten Patienten nachgewiesen) eine signifikante Korrelation mit der Aktivität der Gastritis für das Antrum ($p = 0,002$) und Korpus ($p = 0,019$). *BabA2* ist somit der entscheidende Parameter, welcher die Assoziation der *cagA+/vacAsI+* Stämme mit dem Ausmaß der granulozytären Infiltration in der Magenmukosa bestimmt.

Abbildung 10A zeigt die Korrelationen der Gastritisstadien bezüglich der Aktivität mit dem gleichzeitigen Nachweis von *cagA*, *vacAs1* und *babA2* in den Biopsien aus dem **Antrum** des Magens. Dem gegenüber gestellt ist die Patientengruppe, welche positiv ist für *cagA* und *vacAs1*, aber ohne Nachweis von *babA2*.



Ähnliche Verhältnisse ergeben sich für die Analyse im **Korpus**: Auch hier ergeben sich hoch signifikante p-Werte für die „Triple positiven Stämme“ bezüglich der Aktivität der Gastritis bei nicht signifikantem p-Wert für *vacAs1/cagA* positive Patienten ohne *babA2* Nachweis (Abbildung 10B).



„Triple positive Stämme“ zeigen ebenfalls eine enge Korrelation mit der lymphozytären Infiltration der Schleimhaut im Antrum ($p = 0,01$), nicht jedoch im Korpus ($p = 0,54$). „Typ 1 Stämme“ ohne Nachweis des *babA2* Genes zeigten keine signifikante Assoziation mit der Chronizität der Entzündung im Antrum oder Korpus ($p =$ nicht signifikant).

3.4.3. Unterscheidung von *H. pylori* Subtypen bei schweren histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut (Gastritis 3°, Drüsenatrophie, intestinale Metaplasie)

Schwere histologische Veränderungen der Magenschleimhaut wie hochgradige Infiltration mit Granulozyten (entsprechend G3°), Atrophie der Drüsen (AT) oder intestinale Metaplasie (IM) können möglicherweise als prämaligene Läsionen betrachtet werden, die der Entstehung des Magenkarzinoms vorausgehen. Deshalb wurde ein besonderes Augenmerk gerichtet auf den Zusammenhang von verschiedenen bakteriellen Genotypen und dem Vorliegen einer G3°, AT und IM im Antrum oder Korpus (Tabelle 2).

Die „Triple positiven“ Stämme zeigen dabei eine positive Korrelation mit der hochgradigen Infiltration durch Granulozyten (G3°) im Antrum ($p = 0,001$), der p-Wert ist dabei kleiner als bei *vacAs1* oder *cagA* positiven Biopsien und den „Typ 1 Stämmen“. Auch zeigen „Typ 1 Stämme“ mit gleichzeitigem Nachweis von *babA2* eine Korrelation mit der hochgradigen Gastritis (G3°) im Korpus ($p = 0,004$). Wie auch bei obigen Beobachtungen zeigen hier die „Typ 1“ positiven, aber gleichzeitig *babA2* negativen Isolate keinerlei Verbindung mit dem G3° Status ($p = 0,63$ im Korpus; $p = 1,0$ im Antrum; berechnet durch logistische Regression).

BabA2 positive Patienten und „Triple positive Stämme“ sind die einzigen Untergruppen, welche eine Assoziation mit dem Vorhandensein der intestinalen Metaplasie und Drüsenatrophie im Antrum zeigen (Tabelle 2), auch mit den besten Signifikanzwerten ($p = 0,001$ bis $0,0045$). Die *vacAs1*, *cagA* positiven Stämme oder „Typ 1 Stämme“ sind nur unregelmäßig assoziiert mit der AT oder IM im Antrum und zeigen sogar gar keine Korrelation im Korpus. Am auffälligsten erscheint, daß *babA2* negative „Typ 1 Stämme“ keinen statistisch relevanten Zusammenhang mit

diesen histologischen Veränderungen haben und sowohl bei leichten als auch schwergradigen Veränderungen der Magenschleimhaut ähnlich verteilt sind.

Ein enger Zusammenhang ergab sich von „Triple positiven Stämmen“ mit dem Vorhandensein von AT/IM im Korpus, wo sie doppelt so häufig sind im Vergleich zu Biopsien ohne diese schweren histologischen Veränderungen. Eine statistisch signifikante Aussage kann aber aufgrund der kleinen Zahl von Biopsien mit AT/IM im Korpus (n = 8) nicht gemacht werden.

Tabelle 2: Korrelation von schweren histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut mit verschiedenen bakteriellen Genotypen

Korrelation der verschiedenen bakteriellen Genotypen mit dem Nachweis einer hochgradig aktiven Gastritis (G3°), Atrophie (IM) oder intestinalen Metaplasie (IM) im Antrum/Korpus des Magens. P-Werte ermittelt nach exakter logistischer Regression (LogXact 4.02; Cytel Software, Cambridge, USA).

Faktor	G3°	Non-G3°	p-Wert G3°	AT	Non-AT	p-Wert AT	IM	Non-IM	p-Wert IM
ANTRUM	n=27	n=118		n=42	n=103		n=42	n=103	
BabA2	63%	32%	0,004	52%	32%	0,02	55%	31%	0,008
VacAs1	85%	67%	0,005	81%	67%	0,05	81%	67%	0,12
CagA	89%	55%	0,004	71%	57%	0,23	79%	54%	0,02
CagA+/VacAs1+	89%	53%	0,002	71%	55%	0,16	76%	53%	0,02
CagA+/VacAs1+ BabA2 -	26%	26%	1,0	19%	28%	0,65	21%	27%	0,62
CagA+/VacAs1+ BabA2+	63%	27%	0,001	52%	27%	0,0045	55%	26%	0,001
KORPUS	n=11	n=134		n=8	n=137		n=8	n=137	
BabA2	44%	36%	0,008	63%	36%	0,15	63%	36%	0,15
VacAs1	100%	70%	0,005	100%	70%	0,20	100%	70%	0,20
CagA	100%	61%	0,005	100%	60%	0,16	100%	60%	0,16
CagA+/VacAs1+	89%	53%	0,005	71%	55%	0,16	76%	53%	0,16
CagA+/VacAs1+ BabA2-	36%	25%	0,63	38%	26%	0,7	37%	26%	0,7
CagA+/VacAs1+ BabA2+	64%	32%	0,004	63%	31%	0,1	63%	31%	0,1

4. Diskussion

Seit der Entdeckung des gram-negativen Bakteriums *H. pylori* 1983 wurde dieser Mikroorganismus mit der Entstehung von Karzinomen im Magen in Zusammenhang gebracht, sei es aufgrund epidemiologischer klinischer Studien oder anhand des Tiermodells (83; 133; 135; 195). Insgesamt führten diese Untersuchungen 1994 zur Einstufung des Keimes *H. pylori* als Klasse I Karzinogen.

Bei der großen Anzahl von mit *H. pylori* infizierten Personen besteht aber nach wie vor Unklarheit darüber, warum nur ein kleiner Anteil ein Adenokarzinom des Magens entwickelt. In den letzten Jahren konnten die Pathogenitätsmechanismen des Keimes zunehmend entschlüsselt werden durch die Entdeckung von bakteriellen Adhärenz- und Virulenzfaktoren, die sich von Stamm zu Stamm unterscheiden können. Diese speziellen charakteristischen Eigenschaften der verschiedenen *H. pylori* Stämme könnten bei einer kleinen Subgruppe von Patienten die Progression von Gastritis über prämaligne Läsionen hin bis zu dem Adenokarzinom des Magens erklären.

In der vorliegenden Studie wurden mittels der Polymerasekettenreaktion verschiedene Adhärenz- und Virulenzfaktoren von *H. pylori* in klinischen Biopsien aus der Mukosa des menschlichen Magens nachgewiesen; es wurden Patienten untersucht, die sich aufgrund dyspeptischer Beschwerden vorstellten; Patienten mit bereits vorliegendem Magenkarzinom, Ulzera duodeni oder ventrikuli, MALT-Lymphom und Einnahme von NSAR oder Antibiotika wurden von dieser Studie bewußt ausgeschlossen, um ein möglichst repräsentatives „Normalkollektiv“ zu erhalten, dies auch in Unterscheidung zu früheren Untersuchungen. Die Ergebnisse dieser Studie wurden daraufhin in Korrelation gebracht mit den unterschiedlichen Gastritisstadien und darüber hinaus mit den schweren histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut, welche dem Magenkarzinom vorausgehen können.

VacAs1 und gleichzeitig *CagA* positive Stämme (welche bezeichnet werden als „Typ 1 Stämme“) wurden bereits in früheren Studien mit der Entwicklung schwerer Gastritisstadien in Zusammenhang gebracht (138; 139; 197).

Der Kontakt von epithelialen Zellen mit dem vakuolisierenden Protein VacA führt zu einem Anschwellen der endosomalen Kompartimente (119), Veränderungen des zellulären Transports (156) und inhibiert das Processing von Antigenen in prälysosomalen Kompartimenten innerhalb der befallenen Zelle (120). Der Nachweis von *vacAs1* wurde in früheren Untersuchungen korreliert mit dem Ausmaß der Aktivität und Chronizität der Gastritis im Antrum (7), was durch die hier vorliegenden Resultate bestätigt wird. Es stellt sich ebenfalls eine starke Korrelation dar zwischen *vacAs1* und der hochgradigen granulozytären Infiltration im Antrum und Korpus, sowie zwischen *vacAs1* und der lymphozytären Infiltration im Antrum des Magens.

Die hier vorliegenden Daten bekräftigen ebenfalls eine enge Korrelation von *cagA* positiven Stämmen sowohl mit der hochgradigen granulozytären als auch der hochgradigen lymphozytären Infiltration der Magenmukosa im Antrum und Korpus, auch dies in Übereinstimmung mit bereits vorliegenden Studien (41; 197). Diese Assoziation läßt folgenden Schluß vermuten: *H. pylori* führt zu einer direkten Schädigung der Magenmukosa durch die Sekretion von CagA in die epithelialen Zellen, welches dort eine granulozytäre Antwort induziert (130; 159; 169). Darüber hinaus entsteht wohl ein indirekter Zellschaden über die Aktivierung der Immunantwort (27; 138; 139). Aus mehreren Studien geht hervor, daß *cagA* positive *H. pylori* Stämme verschiedene Variationen in den „3‘Repeat“ Regionen aufweisen, welche mit unterschiedlichen Risiken für die Entstehung von Magenkarzinomen einhergehen, d.h. durchaus nicht alle *cagA* positiven Stämme sind identisch (207). Um den Einfluß der genetischen Variation zu minimieren, kamen deshalb Primerpaare zur Anwendung, welche in der mittleren Region des *cagA* Gens liegen.

Obwohl sich für *cagA* die niedrigsten p-Werte bei der Untersuchung der Korrelation mit den Gastritisstadien ergaben, muß erwähnt werden, daß die Gesamtprävalenz von *cagA* oder „Typ 1

Stämmen“ mit 61 bis 100% sehr hoch war (je nach Gastritisstadium). Die Behandlung von Patienten mit diesen Stämmen erscheint problematisch hinsichtlich der entstehenden Kosten und der Effizienz der Therapie, da nur ein kleiner Prozentsatz der betroffenen Patienten überhaupt eine Erkrankung des Magens entwickeln wird. Damit ergibt sich die besondere Notwendigkeit, eine spezielle Subgruppe von „Typ 1 Stämmen“ zu definieren, welche eine ausgeprägte Assoziation zeigt mit schweren histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut. Um dies zu versuchen, wurde die Anwesenheit des Adhärenzfaktors BabA alleine oder mit dem gleichzeitigen Nachweis von VacA und CagA untersucht. Es scheint wahrscheinlich, daß diese beiden Virulenzfaktoren ein größeres pathogenes Potential erreichen, wenn sich das Bakterium eng an das Epithel binden kann.

Die Ergebnisse aus früheren Studien lassen bereits die Schlüsselrolle des 78 kDa schweren Adhäsins BabA und der korrespondierenden Lewis^b-Blutgruppen-Antigene vermuten, die ihnen bei der Adhärenz des Keimes in vitro und in vivo an Zellen der Oberflächenmukosa des Magens zukommt (21; 22; 60). Die zwei entsprechenden Gene, welche für das BabA Protein kodieren, wurden bereits geklont und erhielten die Bezeichnungen *babA1* und *babA2*, wobei allerdings nur das *babA2* Gen funktionell aktiv ist (88). Klinische Studien haben kürzlich gezeigt, daß der Nachweis von *babA2* vor allem in Kombination mit *vacAs1* und *cagA*, assoziiert ist mit dem gehäuften Vorkommen von Magenulzera und Adenokarzinomen (69), welches zu dem Vorschlag führte, diese Stämme „Triple positiv“ zu nennen.

Wie aus den jetzt vorliegenden Ergebnissen deutlich wird, ist der Nachweis von *babA2* bei unseren Biopsien signifikant assoziiert mit dem Grad der granulozytären Entzündung im Magenantrum und -korpus, sichtbar an einem fast linearen Anstieg des positiven Anteils vom G0° bis zum G3° Stadium. Diese Beobachtungen unterstreichen die Wichtigkeit der Adhäsion von *H. pylori* an Lewis^b Blutgruppen-Antigene für die Pathogenese der schweren Gastritis und der speziellen Erkrankungen des Magens. Der Nachweis von *babA2* korrelierte ebenfalls signifikant mit der lymphozytären Infiltration im Antrum, allerdings nicht mit der Chronizität der Gastritis im

Korpus (L1° bis L3°: 36 bis 43%). Dies läßt vermuten, daß das Adhäsion nicht *per se* verantwortlich ist für eine spezifische Immunantwort (also für eine lymphozytäre Reaktion) und somit diesen Immunzellen nicht als bakterielles Epitop oder Antigen dient. Die Assoziation mit der Chronizität der Gastritis im Antrum könnte deshalb auch nur den Verlauf der Erkrankung und der chronischen Infektion reflektieren.

Auch aus diesem Grund wurde versucht eine Korrelation herzustellen, die sich bei gleichzeitigem Nachweis von *babA2* zusammen mit *vacAs1* und *cagA* ergeben könnte. Wie aus Abbildung 10 ersichtlich, sind „Triple positive Stämme“ signifikant assoziiert mit der Aktivität der Gastritis. „Typ 1 positive“, aber gleichzeitig *babA2* negative Stämme zeigen dagegen keinen derartigen Zusammenhang. Somit ist *babA2* also ein wichtiger Parameter, welcher die Korrelation von besonders virulenten *H. pylori* Stämmen mit der Aktivität der Gastritis determiniert. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß die Adhärenz über BabA von kausaler Wichtigkeit ist für die Bindung des Keimes und für den Transport von bakteriellen Produkten in das Magenepithelium. Die Adhärenz von *H. pylori*, über BabA vermittelt, scheint also einen effektiveren Transport der anderen Virulenzfaktoren in das betroffene Magenepithel zu ermöglichen und dort auch schwerere Alterationen hervor zu rufen. Der Nachweis von *babA2* ist also von großer klinischer Bedeutung, vor allem dann, wenn das Gen zusammen mit VacA und CagA exprimiert wird.

In früheren Untersuchungen wurden primär drei histologische Veränderungen hinsichtlich der möglichen Entwicklung eines Adenokarzinoms des Magens untersucht: Die hochgradige granulozytäre Infiltration im Korpus, die Atrophie der Magendrüsen und das Vorhandensein von intestinaler Metaplasie. Die schwere Infiltration durch Granulozyten im Korpus (G3°) und vor allem ein erhöhtes Verhältnis von Schweregrad der Korpus- zur Antrumgastritis werden von mehreren Autoren als unabhängige Risikofaktoren für die spätere Entwicklung eines Magenkarzinoms angesehen (112; 113; 115; 116; 171). Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, zeigt die Differenzierung der „Typ 1 Stämme“ durch den zusätzlichen Nachweis von *babA2* („Triple positive Stämme“) eine signifikante Korrelation mit der hochgradigen Gastritis (G3°) im Antrum

und Korpus. Dagegen erreichen die *babA2* negativen „Typ 1 Stämme“ dort keine derartige Korrelation und die Verteilung unter den verschiedenen Gastritisstadien ist nahezu identisch.

Aus diesem Grunde erscheint die Einteilung nach „Triple positiven Stämmen“ als der beste Marker, um zu unterscheiden zwischen dem Vorliegen einer hochgradigen Gastritis (G3°) und weniger schweren Verläufen (G0° bis G2°), vor allem im Korpus.

Für die „Triple positiven Stämme“ ergaben sich ebenfalls die niedrigsten p-Werte bei dem Vergleich zwischen dem Vorhandensein einer Drüsenatrophie/intestinalen Metaplasie im Antrum und histologisch derart unauffälligen Biopsien. Im Korpus wird kein signifikantes Level erreicht, was wohl in der geringen Zahl von Patienten mit IM und AT (n = 8) begründet liegt.

Aus diesen Erkenntnissen läßt sich folgender Schluß ziehen: Eine enge Adhäsion der Bakterien an epitheliale Zellen via *babA2* kann von essentieller Bedeutung sein für den effektiven Transport von bakteriellen Produkten in die Zelle durch *cagA+/vacAsI+* Stämme; dadurch kann direkt oder indirekt eine verstärkte Schädigung der Mukosa erfolgen. Die Entwicklung einer schweren Gastritis, Drüsenatrophie und schließlich einer intestinalen Metaplasie könnte initiiert und erleichtert werden durch den engen Kontakt der *babA2* positive Stämme zum Epithelium der Magenmukosa. Nach der Bindung des Bakteriums via BabA wird durch VacA Zytotoxine und CagA Antigene der epitheliale Schaden, die Achlorhydrie, Drüsenatrophie und intestinale Metaplasie verstärkt.

Atrophie und intestinale Metaplasie (vor allem der Sulfomycin-sezernierende Typ III der intestinalen Metaplasie) werden als Risikofaktoren für die Entstehung eines Magenkarzinoms verantwortlich gemacht (65; 86; 90; 93; 164; 188), können zur Entstehung von N-Stickstoff Elementen und freien Sauerstoffradikalen führen und somit zur Karzinogenese beitragen. Sogar metaplastische Zellen können ein Ziel sein für die Adhäsion von Bakterien über die Interaktion von BabA und Lewis^b, da diese Zellen eine erhöhte Expression von Lewis Antigenen zeigen (179). Deswegen kann die Korrelation von *babA2* positiven Stämmen mit der Atrophie und intestinalen Metaplasie der Magenschleimhaut zustande kommen durch eine kontinuierliche

Adhärenz von *H. pylori* sogar während schwerwiegender histologischer Veränderungen der Magenschleimhaut.

Die Anwesenheit von *babA2* vor allem in Kombination mit *vacAs1* und *cagA* ist von essentieller Bedeutung bei der Pathogenese von spezifischen Erkrankungen des Magens. Die gleichzeitige Expression von BabA zusammen mit anderen Virulenzfaktoren des Keimes kann zu schweren histologischen Veränderungen führen und somit zur Entstehung des Magenkarzinoms prädisponieren.

Es wird eine routinemäßige Klassifikation von *H. pylori* durch molekulare Genotypisierung vorgeschlagen, um die verschiedenen Bakterienstämme zu identifizieren. Folgende prospektive Langzeitstudien müssen zeigen, ob Patienten mit „Triple positiven Stämmen“ und niedrigen Gastritisstadien von einer sozusagen prophylaktischen Eradikationstherapie profitieren.

5. Zusammenfassung

Der Keim *H. pylori* kolonisiert den menschlichen Magen mit Hilfe verschiedener bakterieller Virulenzfaktoren; aufgrund seiner Rolle bei der Entstehung von Adenokarzinomen des Magens wird er als Klasse I Karzinogen betrachtet. Die durch die bakterielle Besiedlung ausgelöste chronische Infektion kann im weiteren Verlauf zu hochgradiger Gastritis, Atrophie der Magenschleimhautdrüsen und intestinalen Metaplasie der Schleimhaut führen. *H. pylori* Stämme, welche das Vakuolisierende Zytotoxin VacA sezernieren und das Zytotoxin assoziierte Antigen CagA produzieren („Typ 1 Stämme“), sowie zusätzlich das Blutgruppen-Antigen bindende Adhäsion BabA werden mit der Entstehung von Magengeschwüren und des distalen Adenokarzinoms des Magens assoziiert. Somit könnten diese Stämme auch mit schwerwiegenden histologischen Läsionen einhergehen, welchen das Magenkarzinom folgt. Der Virulenzfaktor BabA bindet dabei an die Lewis^b Antigene der Magenschleimhaut und ermöglicht durch diese enge Adhärenz erst die Kolonisierung des Magens und die effektive Sekretion anderer Virulenzfaktoren des Keimes.

In der vorliegenden Arbeit wurden von 451 Patienten endoskopisch Biopsien aus dem Magenantrum und -korpus entnommen, bei 151 Patienten wurde durch den Nachweis des *ureaseb* Genes in der Polymerasekettenreaktion (PCR) eine Infektion mit *H. pylori* nachgewiesen. Die Magenbiopsien wurden histologisch nach der „updated“ Sydney Klassifikation ausgewertet auf das Vorhandensein einer granulozytären (Aktivität der Gastritis; G0°-G3°), sowie einer lymphozytären (Chronizität der Gastritis; L1°-L3°) Infiltration der Magenschleimhaut und der Präsenz einer Atrophie oder intestinalen Metaplasie. Gleichzeitig wurde mittels der Polymerasekettenreaktion das Vorhandensein der bakteriellen Gene untersucht, welche für die Virulenz- und Adhärenzfaktoren der verschiedenen *H. pylori* Stämme kodieren (*vacAs1*, *cagA* und *babA2*).

Die Ergebnisse ergeben eine Korrelation des Nachweises von *vacAs1* und *cagA* (alleine oder in Kombination als „Typ 1 Stämme“) sowohl mit der Aktivität als auch der Chronizität der

Gastritis ($p < 0,05$). Allerdings ist in den untersuchten Biopsien vergleichbar auch mit früheren Studien die gesamte Häufigkeit von *cagA* und *vacAsI* positiven Stämmen mit 60 bzw. 72% sehr hoch. Das *babA2* Gen, welches für den Adhärenzfaktor BabA kodiert, wird dagegen nur bei insgesamt 38% aller infizierten Patienten entdeckt und korreliert ebenfalls mit der Aktivität der Gastritis im Antrum und Korpus des Magens ($p < 0,05$; χ^2 -Test). Stämme welche gleichzeitig positiv für *cagA* und *vacAsI* sind („Typ 1 Stämme“), aber auch gleichzeitig *babA2* exprimieren, werden häufiger bei Patienten mit schweren histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut gefunden, also bei der hochgradigen Gastritis, intestinaler Metaplasie oder Atrophie ($p < 0,01$). „Typ 1 Stämme“ ohne den Nachweis von *babA2* zeigen dagegen keine signifikante Korrelation bei diesen Veränderungen, die dem Adenokarzinom des Magens vorangehen können.

Die über den Virulenzfaktor BabA vermittelte Adhärenz von *H. pylori* scheint von großer Bedeutung für den Keim zu sein bei dem effektiven Transport von VacA und CagA in die Zellen der befallenen menschlichen Magenschleimhaut und könnte somit gleichzeitig eine wichtige Rolle spielen bei der Pathogenese schwerer keimassoziierter histologischer Veränderungen im Magen.

6. Literaturverzeichnis

1. Epidemiology of and risk factors for *Helicobacter pylori* infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. The EUROGAST Study Group. *Gut* 1993; 34: 1672-1676.
2. Infection with *Helicobacter pylori*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1994; 61: 177-240.
3. Alm R.A., Bina J., Andrews B.M., Doig P., Hancock R.E., Trust T.J. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. *Infect Immun* 2000; 68: 4155-4168.
4. Alm R.A., Ling L.S., Moir D.T., King B.L., Brown E.D., Doig P.C., Smith D.R., Noonan B., Guild B.C., deJonge B.L., Carmel G., Tummino P.J., Caruso A., Uria-Nickelsen M., Mills D.M., Ives C., Gibson R., Merberg D., Mills S.D., Jiang Q., Taylor D.E., Vovis G.F., Trust T.J. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen. *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999; 397: 176-180.
5. Ashton-Key M., Diss T.C., Isaacson P.G. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy and resection specimens. *J Clin Pathol* 1996; 49: 107-111.
6. Atherton J.C., Cao P., Peek R.M. Jr., Tummuru M.K., Blaser M.J., Cover T.L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771-17777.
7. Atherton J.C., Peek R.M. Jr., Tham K.T., Cover T.L., Blaser M.J. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997; 112: 92-99.
8. Atherton J.C., Spiller R.C. The urea breath test for *Helicobacter pylori*. *Gut* 1994; 35: 723-725.
9. Baggolini M., Walz A., Kunkel S.L. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84: 1045-1049.
10. Bauerfeind P., Garner R., Dunn B.E., Mobley H.L. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut* 1997; 40: 25-30.
11. Bell J. The polymerase chain reaction. *Immunol Today* 1989; 10: 351-355.
12. Bjorkholm B., Lundin A., Sillen A., Guillemin K., Salama N., Rubio C., Gordon J.I., Falk P., Engstrand L. Comparison of genetic divergence and fitness between two subclones of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2001; 69: 7832-7838.
13. Blaser M.J. *Helicobacter pylori*: its role in disease. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 386-391.
14. Blaser M.J. Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology* 1992; 102: 720-727.

15. Blaser M.J. *Helicobacter pylori*: microbiology of a 'slow' bacterial infection. *Trends Microbiol* 1993; 1: 255-260.
16. Blaser M.J., Kirschner D. Dynamics of *Helicobacter pylori* colonization in relation to the host response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 8359-8364.
17. Blaser M.J., Parsonnet J. Parasitism by the "slow" bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. *J Clin Invest* 1994; 94: 4-8.
18. Blaser M.J., Perez-Perez G.I., Kleanthous H., Cover T.L., Peek R.M., Chyou P.H., Stemmermann G.N., Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55: 2111-2115.
19. Bodger K., Crabtree J.E. *Helicobacter pylori* and gastric inflammation. *Br Med Bull* 1998; 54: 139-150.
20. Borch K. Epidemiologic, clinicopathologic, and economic aspects of gastroscopic screening of patients with pernicious anemia. *Scand J Gastroenterol* 1986; 21: 21-30.
21. Boren T., Falk P., Roth K.A., Larson G., Normark S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 1993; 262: 1892-1895.
22. Boren T., Normark S., Falk P. *Helicobacter pylori*: molecular basis for host recognition and bacterial adherence. *Trends Microbiol* 1994; 2: 221-228.
23. Brown L.M. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev* 2000; 22: 283-297.
24. Calam J., Gibbons A., Healey Z.V., Bliss P., Arebi N. How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? Its effect on acid and gastrin physiology. *Gastroenterology* 1997; 113: S43-S49.
25. Campbell D.I., Warren B.F., Thomas J.E., Figura N., Telford J.L., Sullivan P.B. The african enigma: low prevalence of gastric atrophy, high prevalence of chronic inflammation in west african adults and children. *Helicobacter* 2001; 6: 263-267.
26. Cave D.R. How is *Helicobacter pylori* transmitted? *Gastroenterology* 1997; 113: S9-14.
27. Censini S., Lange C., Xiang Z., Crabtree J.E., Ghiara P., Borodovsky M., Rappuoli R., Covacci A. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 14648-14653.
28. Ching C.K., Wong B.C., Kwok E., Ong L., Covacci A., Lam S.K. Prevalence of CagA-bearing *Helicobacter pylori* strains detected by the anti-CagA assay in patients with peptic ulcer disease and in controls. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 949-953.
29. Chomczynski P. Solubilization in formamide protects RNA from degradation. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 3791-3792.
30. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.

31. Clayton C., Kleanthous K., Tabaqchali S. Detection and identification of *Helicobacter pylori* by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 1991; 44: 515-516.
32. Clayton C.L., Kleanthous H., Coates P.J., Morgan D.D., Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 192-200.
33. Cohen H., Rose S., Lewin D.N., Retama B., Naritoku W., Johnson C., Bautista L., Crowe H., Pronovost A. Accuracy of four commercially available serologic tests, including two office-based tests and a commercially available ¹³C urea breath test, for diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 1999; 4: 49-53.
34. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-6740.
35. Correa P., Chen V.W. Gastric cancer. *Cancer Surv* 1994; 19-20: 55-76.
36. Correa P., Shiao Y.H. Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 1941s-1943s.
37. Covacci A., Censini S., Bugnoli M., Petracca R., Burroni D., Macchia G., Massone A., Papini E., Xiang Z., Figura N. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 5791-5795.
38. Covacci A., Telford J.L., Del Giudice G., Parsonnet J., Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 1999; 284: 1328-1333.
39. Cover T.L. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 1996; 20: 241-246.
40. Cover T.L., Tummuru M.K., Cao P., Thompson S.A., Blaser M.J. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* 1994; 269: 10566-10573.
41. Crabtree J.E. Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10 Suppl 1: 29-37.
42. Crabtree J.E. Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996; 215: 3-10.
43. Crabtree J.E., Wyatt J.I., Trejdosiewicz L.K., Peichl P., Nichols P.H., Ramsay N., Primrose J.N., Lindley I.J. Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. *J Clin Pathol* 1994; 47: 61-66.
44. Crabtree J.E., Xiang Z., Lindley I.J., Tompkins D.S., Rappuoli R., Covacci A. Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a *cagA* negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* 1995; 48: 967-969.
45. D'Elia M.M., Manghetti M., De Carli M., Costa F., Baldari C.T., Burroni D., Telford J.L., Romagnani S., Del Prete G. T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J Immunol* 1997; 158: 962-967.

46. Davies G.R., Banatvala N., Collins C.E., Sheaff M.T., Abdi Y., Clements L., Rampton D.S. Relationship between infective load of *Helicobacter pylori* and reactive oxygen metabolite production in antral mucosa. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 419-424.
47. Dixon M.F., Genta R.M., Yardley J.H., Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1161-1181.
48. Doig P., de Jonge B.L., Alm R.A., Brown E.D., Uria-Nickelsen M., Noonan B., Mills S.D., Tummino P., Carmel G., Guild B.C., Moir D.T., Vovis G.F., Trust T.J. *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; 63: 675-707.
49. Dursun M., Goral V., Simsek H., Hascelik G. Vertical transmission of *Helicobacter pylori*: different transmission route. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 1011-1012.
50. Eaton K.A., Brooks C.L., Morgan D.R., Krakowka S. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 1991; 59: 2470-2475.
51. Eck M., Schmausser B., Haas R., Greiner A., Czub S., Müller-Hermelink H.K. MALT-type lymphoma of the stomach is associated with *Helicobacter pylori* strains expressing the CagA protein. *Gastroenterology* 1997; 112: 1482-1486.
52. Eidt S., Oberhuber G., Schneider A., Stolte M. The histopathological spectrum of type A gastritis. *Pathol Res Pract* 1996; 192: 101-106.
53. El Omar E.M., Carrington M., Chow W.H., McColl K.E., Bream J.H., Young H.A., Herrera J., Lissowska J., Yuan C.C., Rothman N., Lanyon G., Martin M., Fraumeni J.F. Jr., Rabkin C.S. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404: 398-402.
54. El Omar E.M., Oien K., Murray L.S., El Nujumi A., Wirz A., Gillen D., Williams C., Fullarton G., McColl K.E. Increased prevalence of precancerous changes in relatives of gastric cancer patients: critical role of *H. pylori*. *Gastroenterology* 2000; 118: 22-30.
55. Erlich H.A. Polymerase chain reaction. *J Clin Immunol* 1989; 9: 437-447.
56. Erlich H.A., Gelfand D., Sninsky J.J. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991; 252: 1643-1651.
57. Ernst P.B., Crowe S.E., Reyes V.E. How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? The inflammatory response. *Gastroenterology* 1997; 113: S35-S42.
58. Evans D.G., Evans D.J. Jr., Moulds J.J., Graham D.Y. N-acetylneuraminylactose-binding fibrillar hemagglutinin of *Campylobacter pylori*: a putative colonization factor antigen. *Infect Immun* 1988; 56: 2896-2906.
59. Fabre R., Sobhani I., Laurent-Puig P., Hedef N., Yazigi N., Vissuzaine C., Rodde I., Potet F., Mignon M., Etienne J.P. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens: comparison with culture, rapid urease test, and histopathological tests. *Gut* 1994; 35: 905-908.

60. Falk P., Roth K.A., Boren T., Westblom T.U., Gordon J.I., Normark S. An in vitro adherence assay reveals that *Helicobacter pylori* exhibits cell lineage-specific tropism in the human gastric epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 2035-2039.
61. Falk P.G., Syder A.J., Guruge J.L., Kirschner D., Blaser M.J., Gordon J.I. Theoretical and experimental approaches for studying factors defining the *Helicobacter pylori*-host relationship. *Trends Microbiol* 2000; 8: 321-329.
62. Feldman R.A. Review article: would eradication of *Helicobacter pylori* infection reduce the risk of gastric cancer? *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15 Suppl 1: 2-5.
63. Figura N., Guglielmetti P., Rossolini A., Barberi A., Cusi G., Musmanno R.A., Russi M., Quaranta S. Cytotoxin production by *Campylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 225-226.
64. Fiocca R., Villani L., Luinetti O., Gianatti A., Perego M., Alvisi C., Turpini F., Solcia E. *Helicobacter* colonization and histopathological profile of chronic gastritis in patients with or without dyspepsia, mucosal erosion and peptic ulcer: a morphological approach to the study of ulcerogenesis in man. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992; 420: 489-498.
65. Fontham E.T., Ruiz B., Perez A., Hunter F., Correa P. Determinants of *Helicobacter pylori* infection and chronic gastritis. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 1094-1101.
66. Forbes G.M., Warren J.R., Glaser M.E., Cullen D.J., Marshall B.J., Collins B.J. Long-term follow-up of gastric histology after *Helicobacter pylori* eradication. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11: 670-673.
67. Forman D., Webb P., Parsonnet J. *H pylori* and gastric cancer. *Lancet* 1994; 343: 243-244.
68. Fujioka T., Kodama R., Honda S., Guei-Hua G., Nishizono A., Nasu M. Long-term sequelae of experimental gastritis with *Helicobacter pylori*: a 5-year follow-up study. *J Clin Gastroenterol* 1997; 25 Suppl 1: S8-12.
69. Gerhard M., Lehn N., Neumayer N., Boren T., Rad R., Schepp W., Miehle S., Classen M., Prinz C. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 12778-12783.
70. Go M.F. Natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16 Suppl 1: 3-15.
71. Graham D.Y., Klein P.D., Evans D.J. Jr., Evans D.G., Alpert L.C., Opekun A.R., Boutton T.W. *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the ¹³C-urea breath test. *Lancet* 1987; 1: 1174-1177.
72. Graham D.Y., Malaty H.M., Cole R.A., Martin R.F., Klein P.D. Simplified ¹³C-urea breath test for detection of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1741-1745.
73. Hacker J., Kaper J.B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 641-679.

74. Hancock R.E., Alm R., Bina J., Trust T. *Helicobacter pylori*: a surprisingly conserved bacterium. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 216-217.
75. Hansson L.E., Nyren O., Hsing A.W., Bergstrom R., Josefsson S., Chow W.H., Fraumeni J.F. Jr., Adami H.O. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *N Engl J Med* 1996; 335: 242-249.
76. Harris P.R., Mobley H.L., Perez-Perez G.I., Blaser M.J., Smith P.D. *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology* 1996; 111: 419-425.
77. Haruma K., Komoto K., Kamada T., Ito M., Kitadai Y., Yoshihara M., Sumii K., Kajiyama G. *Helicobacter pylori* infection is a major risk factor for gastric carcinoma in young patients. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 255-259.
78. Hentschel E., Brandstatter G., Dragosics B., Hirschl A.M., Nemeč H., Schutze K., Taufer M., Wurzer H. Effect of ranitidine and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer. *N Engl J Med* 1993; 328: 308-312.
79. Hentschel E., Nemeč H., Schutze K., Hirschl A., Dragosics B., Brandstatter G., Taufer M. Duodenal ulcer recurrence and *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1991; 338: 569.
80. Hill M.J. Mechanisms of gastric carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev* 1993; 2 Suppl 2: 73-78.
81. Ho G.Y., Windsor H.M. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Polymerase chain reaction tests. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29: 903-915.
82. Honda K., Ohkusa T., Takashimizu I., Watanabe M., Amagasa M. High risk of *Helicobacter pylori* infection in young Japanese dentists. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 862-865.
83. Honda S., Fujioka T., Tokieda M., Satoh R., Nishizono A., Nasu M. Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. *Cancer Res* 1998; 58: 4255-4259.
84. Hu L.T., Foxall P.A., Russell R., Mobley H.L. Purification of recombinant *Helicobacter pylori* urease apoenzyme encoded by *ureA* and *ureB*. *Infect Immun* 1992; 60: 2657-2666.
85. Hu L.T., Mobley H.L. Expression of catalytically active recombinant *Helicobacter pylori* urease at wild-type levels in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1993; 61: 2563-2569.
86. Ihamaki T., Kekki M., Sipponen P., Siurala M. The sequelae and course of chronic gastritis during a 30- to 34-year bioptic follow-up study. *Scand J Gastroenterol* 1985; 20: 485-491.
87. Ikeno T., Ota H., Sugiyama A., Ishida K., Katsuyama T., Genta R.M., Kawasaki S. *Helicobacter pylori*-induced chronic active gastritis, intestinal metaplasia, and gastric ulcer in Mongolian gerbils. *Am J Pathol* 1999; 154: 951-960.
88. Ilver D., Arnqvist A., Ogren J., Frick I.M., Kersulyte D., Incecik E.T., Berg D.E., Covacci A., Engstrand L., Boren T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 1998; 279: 373-377.

89. Israel D.A., Salama N., Krishna U., Rieger U.M., Atherton J.C., Falkow S., Peek R.M. Jr. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 14625-14630.
90. Kekki M., Siurala M., Varis K., Sipponen P., Sistonen P., Nevanlinna H.R. Classification principles and genetics of chronic gastritis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1987; 141: 1-28.
91. Kersulyte D., Mukhopadhyay A.K., Velapatino B., Su W., Pan Z., Garcia C., Hernandez V., Valdez Y., Mistry R.S., Gilman R.H., Yuan Y., Gao H., Alarcon T., Lopez-Brea M., Balakrish N.G., Chowdhury A., Datta S., Shirai M., Nakazawa T., Ally R., Segal I., Wong B.C., Lam S.K., Olfat F.O., Boren T., Engstrand L., Torres O., Schneider R., Thomas J.E., Czinn S., Berg D.E. Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. *J Bacteriol* 2000; 182: 3210-3218.
92. Kokkola A., Sjoblom S.M., Haapiainen R., Sipponen P., Puolakkainen P., Jarvinen H. The risk of gastric carcinoma and carcinoid tumours in patients with pernicious anaemia. A prospective follow-up study. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 88-92.
93. Komoto K., Haruma K., Kamada T., Tanaka S., Yoshihara M., Sumii K., Kajiyama G., Talley N.J. *Helicobacter pylori* infection and gastric neoplasia: correlations with histological gastritis and tumor histology. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 1271-1276.
94. Krause S., Pansegrau W., Lurz R., de la C.F., Lanka E. Enzymology of type IV macromolecule secretion systems: the conjugative transfer regions of plasmids RP4 and R388 and the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases. *J Bacteriol* 2000; 182: 2761-2770.
95. Kuipers E.J. Review article: Relationship between *Helicobacter pylori*, atrophic gastritis and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12 Suppl 1: 25-36.
96. Kuipers E.J., Perez-Perez G.I., Meuwissen S.G., Blaser M.J. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1777-1780.
97. Leunk R.D., Johnson P.T., David B.C., Kraft W.G., Morgan D.R. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* 1988; 26: 93-99.
98. Leying H., Suerbaum S., Geis G., Haas R. Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol Microbiol* 1992; 6: 2863-2874.
99. Li C., Ha T., Ferguson D.A. Jr., Chi D.S., Zhao R., Patel N.R., Krishnaswamy G., Thomas E. A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 2142-2149.
100. Li S.D., Kersulyte D., Lindley I.J., Neelam B., Berg D.E., Crabtree J.E. Multiple genes in the left half of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for tyrosine kinase-dependent transcription of interleukin-8 in gastric epithelial cells. *Infect Immun* 1999; 67: 3893-3899.
101. Linz U., Delling U., Rubsamen-Waigmann H. Systematic studies on parameters influencing the performance of the polymerase chain reaction. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28: 5-13.

102. Lizza F., Mancuso M., Imeneo M., Contaldo A., Giancotti L., Pensabene L., Doldo P., Liberto M.C., Strisciuglio P., Foca A., Guandalini S., Pallone F. Evidence favouring the gastro-oral route in the transmission of *Helicobacter pylori* infection in children. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 623-627.
103. Madan E., Kemp J., Westblom T.U., Subik M., Sexton S., Cook J. Evaluation of staining methods for identifying *Campylobacter pylori*. *Am J Clin Pathol* 1988; 90: 450-453.
104. Malaty H.M., El Kasabany A., Graham D.Y., Miller C.C., Reddy S.G., Srinivasan S.R., Yamaoka Y., Berenson G.S. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet* 2002; 359: 931-935.
105. Malaty H.M., Graham D.Y. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1994; 35: 742-745.
106. Malaty H.M., Logan N.D., Graham D.Y., Ramchatesingh J.E. *Helicobacter pylori* infection in preschool and school-aged minority children: effect of socioeconomic indicators and breast-feeding practices. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1387-1392.
107. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C., Bell D., Bianchi P.G., Deltenre M., Forman D., Gasbarrini G., Jaup B., Misiewicz J.J., Pajares J., Quina M., Rauws E. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht Consensus Report. The European *Helicobacter Pylori* Study Group (EHPSG). *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9: 1-2.
108. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C., Hungin A.P., Jones R., Axon A., Graham D.Y., Tytgat G. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 167-180.
109. Marshall B.J., Warren J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-1315.
110. Marshall B.J., Warren J.R., Francis G.J., Langton S.R., Goodwin C.S., Blincow E.D. Rapid urease test in the management of *Campylobacter pyloridis*-associated gastritis. *Am J Gastroenterol* 1987; 82: 200-210.
111. McNulty C.A., Wise R. Rapid diagnosis of *Campylobacter*-associated gastritis. *Lancet* 1985; 1: 1443-1444.
112. Meining A., Bayerdorffer E., Muller P., Miehle S., Lehn N., Holzel D., Hatz R., Stolte M. Gastric carcinoma risk index in patients infected with *Helicobacter pylori*. *Virchows Arch* 1998; 432: 311-314.
113. Meining A., Stolte M., Hatz R., Lehn N., Miehle S., Morgner A., Bayerdorffer E. Differing degree and distribution of gastritis in *Helicobacter pylori*-associated diseases. *Virchows Arch* 1997; 431: 11-15.
114. Meyer-Rosberg K., Scott D.R., Rex D., Melchers K., Sachs G. The effect of environmental pH on the proton motive force of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1996; 111: 886-900.
115. Miehle S., Bayerdorffer E., Lehn N., Mannes G.A., Sommer A., Hochter W., Weingart J., Bastlein E., Hatz R., Stolte M. Severity of *Helicobacter pylori* gastritis predicts duodenal ulcer recurrence. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 856-862.

116. Miehlke S., Hackelsberger A., Meining A., Hatz R., Lehn N., Malfertheiner P., Stolte M., Bayerdorffer E. Severe expression of corpus gastritis is characteristic in gastric cancer patients infected with *Helicobacter pylori*. *Br J Cancer* 1998; 78: 263-266.
117. Miyaji H., Azuma T., Ito S., Abe Y., Gejyo F., Hashimoto N., Sugimoto H., Suto H., Ito Y., Yamazaki Y., Kohli Y., Kuriyama M. *Helicobacter pylori* infection occurs via close contact with infected individuals in early childhood. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 257-262.
118. Mobley H.L. The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10 Suppl 1: 57-64.
119. Molinari M., Galli C., Norais N., Telford J.L., Rappuoli R., Luzio J.P., Montecucco C. Vacuoles induced by *Helicobacter pylori* toxin contain both late endosomal and lysosomal markers. *J Biol Chem* 1997; 272: 25339-25344.
120. Molinari M., Salio M., Galli C., Norais N., Rappuoli R., Lanzavecchia A., Montecucco C. Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med* 1998; 187: 135-140.
121. Mori M., Suzuki H., Suzuki M., Kai A., Miura S., Ishii H. Catalase and superoxide dismutase secreted from *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 1997; 2: 100-105.
122. Moss S., Calam J. *Helicobacter pylori* and peptic ulcers: the present position. *Gut* 1992; 33: 289-292.
123. Moss S.F., Legon S., Davies J., Calam J. Cytokine gene expression in *Helicobacter pylori* associated antral gastritis. *Gut* 1994; 35: 1567-1570.
124. Mullis K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350.
125. Nakamura H., Yoshiyama H., Takeuchi H., Mizote T., Okita K., Nakazawa T. Urease plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *Infect Immun* 1998; 66: 4832-4837.
126. Noach L.A., Bosma N.B., Jansen J., Hoek F.J., van Deventer S.J., Tytgat G.N. Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 425-429.
127. Nomura A., Stemmermann G.N., Chyou P.H., Kato I., Perez-Perez G.I., Blaser M.J. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991; 325: 1132-1136.
128. Nomura A., Stemmermann G.N., Chyou P.H., Perez-Perez G.I., Blaser M.J. *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Ann Intern Med* 1994; 120: 977-981.
129. Obst B., Wagner S., Sewing K.F., Beil W. *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1111-1115.
130. Odenbreit S., Puls J., Sedlmaier B., Gerland E., Fischer W., Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000; 287: 1497-1500.

131. Odenbreit S., Till M., Hofreuter D., Faller G., Haas R. Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol Microbiol* 1999; 31: 1537-1548.
132. Owen R.J. *Helicobacter*--species classification and identification. *Br Med Bull* 1998; 54: 17-30.
133. Parsonnet J. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1993; 22: 89-94.
134. Parsonnet J. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1993; 22: 95-104.
135. Parsonnet J. Gastric adenocarcinoma and *Helicobacter pylori* infection. *West J Med* 1994; 161: 60.
136. Parsonnet J. The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9 Suppl 2: 45-51.
137. Parsonnet J., Friedman G.D., Vandersteen D.P., Chang Y., Vogelman J.H., Orentreich N., Sibley R.K. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1127-1131.
138. Peek R.M. Jr., Miller G.G., Tham K.T., Perez-Perez G.I., Zhao X., Atherton J.C., Blaser M.J. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest* 1995; 73: 760-770.
139. Peek R.M. Jr., Moss S.F., Tham K.T., Perez-Perez G.I., Wang S., Miller G.G., Atherton J.C., Holt P.R., Blaser M.J. *Helicobacter pylori* cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 863-868.
140. Pesci E.C., Pickett C.L. Genetic organization and enzymatic activity of a superoxide dismutase from the microaerophilic human pathogen, *Helicobacter pylori*. *Gene* 1994; 143: 111-116.
141. Petersson F., Borch K., Franzen L.E. Prevalence of subtypes of intestinal metaplasia in the general population and in patients with autoimmune chronic atrophic gastritis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 262-266.
142. Phadnis S.H., Parlow M.H., Levy M., Ilver D., Caulkins C.M., Connors J.B., Dunn B.E. Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infect Immun* 1996; 64: 905-912.
143. Pignatelli B., Bancel B., Esteve J., Malaveille C., Calmels S., Correa P., Patricot L.M., Laval M., Lyandrat N., Ohshima H. Inducible nitric oxide synthase, anti-oxidant enzymes and *Helicobacter pylori* infection in gastritis and gastric precancerous lesions in humans. *Eur J Cancer Prev* 1998; 7: 439-447.
144. Pounder R.E., Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9 Suppl 2: 33-39.

145. Price A.B. The histological recognition of *Helicobacter pylori*. Lee A. and Mégraud F. *Helicobacter pylori: techniques for clinical diagnosis and basical research*. Saunders, London 1995, 33-49.
146. Rad R., Gerhard M., Lang R., Schöniger M., Rösch T., Schepp W., Becker I., Wagner H., Prinz C. The *Helicobacter pylori* Blood Group Antigen-Binding Adhesin Facilitates Bacterial Colonization and Augments a Nonspecific Immune Response. *J Immunol* 2002; 168: 3033-3041.
147. Rain J.C., Selig L., De Reuse H., Battaglia V., Reverdy C., Simon S., Lenzen G., Petel F., Wojcik J., Schachter V., Chemama Y., Labigne A., Legrain P. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* 2001; 409: 211-215.
148. Ramarao N., Gray-Owen S.D., Meyer T.F. *Helicobacter pylori* induces but survives the extracellular release of oxygen radicals from professional phagocytes using its catalase activity. *Mol Microbiol* 2000; 38: 103-113.
149. Rappuoli R., Lange C., Censini S., Covacci A. Pathogenicity island mediates *Helicobacter pylori* interaction with the host. *Folia Microbiol (Praha)* 1998; 43: 275-278.
150. Rautelin H., Blomberg B., Fredlund H., Jarnerot G., Danielsson D. Incidence of *Helicobacter pylori* strains activating neutrophils in patients with peptic ulcer disease. *Gut* 1993; 34: 599-603.
151. Rautelin H., Sipponen P., Seppala K., Sarna S., Danielsson D., Kosunen T.U. Gastric inflammation and neutrophil-activating and cytotoxin-producing *Helicobacter pylori* strains. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 639-642.
152. Rugge M., Farinati F., Baffa R., Sonogo F., Di Mario F., Leandro G., Valiante F. Gastric epithelial dysplasia in the natural history of gastric cancer: a multicenter prospective follow-up study. Interdisciplinary Group on Gastric Epithelial Dysplasia. *Gastroenterology* 1994; 107: 1288-1296.
153. Russo A., Maconi G., Spinelli P., Felice G.D., Eboli M., Andreola S., Ravagnani F., Settesoldi D., Ferrari D., Lombardo C., Bertario L. Effect of lifestyle, smoking, and diet on development of intestinal metaplasia in *H. pylori*-positive subjects. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1402-1408.
154. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
155. Sakamoto S., Watanabe T., Tokumaru T., Takagi H., Nakazato H., Lloyd K.O. Expression of Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x, Lewis^y, sialyl-Lewis^a and sialyl-Lewis^x blood group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue. *Cancer Res* 1989; 49: 745-752.
156. Satin B., Norais N., Telford J., Rappuoli R., Murgia M., Montecucco C., Papini E. Effect of *helicobacter pylori* vacuolating toxin on maturation and extracellular release of procathepsin D and on epidermal growth factor degradation. *J Biol Chem* 1997; 272: 25022-25028.
157. Scott D., Weeks D., Melchers K., Sachs G. UreI-mediated urea transport in *Helicobacter pylori*: an open and shut case? *Trends Microbiol* 2000; 8: 348-349.

158. Scott D.R., Weeks D., Hong C., Postius S., Melchers K., Sachs G. The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998; 114: 58-70.
159. Segal E.D., Cha J., Lo J., Falkow S., Tompkins L.S. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 14559-14564.
160. Segal E.D., Lange C., Covacci A., Tompkins L.S., Falkow S. Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 7595-7599.
161. Seyler R.W. Jr., Olson J.W., Maier R.J. Superoxide dismutase-deficient mutants of *Helicobacter pylori* are hypersensitive to oxidative stress and defective in host colonization. *Infect Immun* 2001; 69: 4034-4040.
162. Sharma S.A., Tummuru M.K., Blaser M.J., Kerr L.D. Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. *J Immunol* 1998; 160: 2401-2407.
163. Shimoyama T., Crabtree J.E. Bacterial factors and immune pathogenesis in *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1998; 43 Suppl 1: S2-S5.
164. Sipponen P., Hyvarinen H., Seppala K., Blaser M.J. Review article: Pathogenesis of the transformation from gastritis to malignancy. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12 Suppl 1: 61-71.
165. Sipponen P., Kekki M., Siurala M. The Sydney System: epidemiology and natural history of chronic gastritis. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; 6: 244-251.
166. Sipponen P., Kosunen T.U., Valle J., Riihela M., Seppala K. *Helicobacter pylori* infection and chronic gastritis in gastric cancer. *J Clin Pathol* 1992; 45: 319-323.
167. Smoot D.T., Elliott T.B., Verspaget H.W., Jones D., Allen C.R., Vernon K.G., Bremner T., Kidd L.C., Kim K.S., Groupman J.D., Ashktorab H. Influence of *Helicobacter pylori* on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. *Carcinogenesis* 2000; 21: 2091-2095.
168. Sommer F., Faller G., Konturek P., Kirchner T., Hahn E.G., Zeus J., Rollinghoff M., Lohoff M. Antrum- and corpus mucosa-infiltrating CD4(+) lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis display a Th1 phenotype. *Infect Immun* 1998; 66: 5543-5546.
169. Stein M., Rappuoli R., Covacci A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1263-1268.
170. Stemmermann G.N. Intestinal metaplasia of the stomach. A status report. *Cancer* 1994; 74: 556-564.
171. Stolte M., Eidt S. *Helicobacter pylori* and the evolution of gastritis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996; 214: 13-16.
172. Stolte M., Meining A. *Helicobacter pylori* gastritis of the gastric carcinoma phenotype: is histology capable of identifying high-risk gastritis? *J Gastroenterol* 2000; 35 Suppl 12: 98-101.

173. Stolte M., Meining A. The updated Sydney system: classification and grading of gastritis as the basis of diagnosis and treatment. *Can J Gastroenterol* 2001; 15: 591-598.
174. Suggs S.V., Wallace R.B., Hirose T., Kawashima E.H., Itakura K. Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 6613-6617.
175. Taniguchi Y., Kimura K., Sohara H., Shirasaki A., Kawada H., Satoh K., Kihira K., Wang X.M., Takimoto T., Goto Y., Takatori K., Iida K., Kajiwara M. Simple ¹³C-urea breath test with infra-red spectrophotometer. *J Gastroenterol* 1996; 31 Suppl 9: 37-40.
176. Telford J.L., Covacci A., Rappuoli R., Chiara P. Immunobiology of *Helicobacter pylori* infection. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 498-503.
177. Tindall K.R., Kunkel T.A. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1988; 27: 6008-6013.
178. Tomb J.F., White O., Kerlavage A.R., Clayton R.A., Sutton G.G., Fleischmann R.D., Ketchum K.A., Klenk H.P., Gill S., Dougherty B.A., Nelson K., Quackenbush J., Zhou L., Kirkness E.F., Peterson S., Loftus B., Richardson D., Dodson R., Khalak H.G., Glodek A., McKenney K., Fitzgerald L.M., Lee N., Adams M.D., Venter J.C. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388: 539-547.
179. Torrado J., Ruiz B., Garay J., Cosme A., Arenas J.I., Bravo J.C., Fontham E., Correa P. Lewis, secretor, and ABO phenotypes, and sulfomucin expression in gastric intestinal metaplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 287-289.
180. Tosi P., Filipe M.I., Luzi P., Miracco C., Santopietro R., Lio R., Sforza V., Barbini P. Gastric intestinal metaplasia type III cases are classified as low-grade dysplasia on the basis of morphometry. *J Pathol* 1993; 169: 73-78.
181. Tummuru M.K., Cover T.L., Blaser M.J. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 1993; 61: 1799-1809.
182. Tummuru M.K., Cover T.L., Blaser M.J. Mutation of the cytotoxin-associated *cagA* gene does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1994; 62: 2609-2613.
183. Tummuru M.K., Sharma S.A., Blaser M.J. *Helicobacter pylori* *picB*, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* 1995; 18: 867-876.
184. Uemura N., Okamoto S., Yamamoto S., Matsumura N., Yamaguchi S., Yamakido M., Taniyama K., Sasaki N., Schlemper R.J. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 784-789.
185. Umlauf F., Keeffe E.B., Offner F., Weiss G., Feichtinger H., Lehmann E., Kilga-Nogler S., Schwab G., Propst A., Grussnewald K., Judmaier G. *Helicobacter pylori* infection and blood group antigens: lack of clinical association. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 2135-2138.

186. Vaira D., Holton J., Menegatti M., Landi F., Ricci C., Ali A., Gatta L., Farinelli S., Acciardi C., Massardi B., Miglioli M. Blood tests in the management of *Helicobacter pylori* infection. Italian *Helicobacter pylori* Study Group. *Gut* 1998; 43 Suppl 1: S39-S46.
187. Vaira D., Holton J., Ricci C., Menegatti M., Gatta L., Berardi S., Tampieri A., Miglioli M. Review article: the transmission of *Helicobacter pylori* from stomach to stomach. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15 Suppl 1: 33-42.
188. Valle J., Kekki M., Sipponen P., Ihamakki T., Siurala M. Long-term course and consequences of *Helicobacter pylori* gastritis. Results of a 32-year follow-up study. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 546-550.
189. van der Hulst R.W., van der Hulst E.A., Dekker F.W., Ten Kate F.J., Weel J.F., Keller J.J., Kruizinga S.P., Dankert J., Tytgat G.N. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastritis in relation to *cagA*: a prospective 1-year follow-up study. *Gastroenterology* 1997; 113: 25-30.
190. van Doorn L.J., Figueiredo C., Megraud F., Pena S., Midolo P., Queiroz D.M., Carneiro F., Vanderborcht B., Pegado M.D., Sanna R., de Boer W., Schneeberger P.M., Correa P., Ng E.K., Atherton J., Blaser M.J., Quint W.G. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1999; 116: 823-830.
191. van Doorn L.J., Figueiredo C., Sanna R., Pena S., Midolo P., Ng E.K., Atherton J.C., Blaser M.J., Quint W.G. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2597-2603.
192. van Doorn L.J., Figueiredo C., Sanna R., Plaisier A., Schneeberger P., de Boer W., Quint W. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998; 115: 58-66.
193. van Doorn O.J., Bosman D.K., van't Hoff B.W., Taminiau J.A., Ten Kate F.J., van der Hulst E.A. *Helicobacter pylori* Stool Antigen test: a reliable non-invasive test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 1061-1065.
194. Veldhuyzen van Zanten S.J. Do socio-economic status, marital status and occupation influence the prevalence of *Helicobacter pylori* infection? *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9 Suppl 2: 41-44.
195. Watanabe T., Tada M., Nagai H., Sasaki S., Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology* 1998; 115: 642-648.
196. Weeks D.L., Eskandari S., Scott D.R., Sachs G. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* 2000; 287: 482-485.
197. Weel J.F., van der Hulst R.W., Gerrits Y., Roorda P., Feller M., Dankert J., Tytgat G.N., van der Hulst E.A. The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J Infect Dis* 1996; 173: 1171-1175.
198. Westblom T.U. Molecular diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Immunol Invest* 1997; 26: 163-174.

199. Westblom T.U., Phadnis S., Yang P., Czinn S.J. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by means of a polymerase chain reaction assay for gastric juice aspirates. *Clin Infect Dis* 1993; 16: 367-371.
200. Witteman E.M., Mravunac M., Bex M.J., Hopman W.P., Verschoor J.S., Tytgat G.N., de Koning R.W. Improvement of gastric inflammation and resolution of epithelial damage one year after eradication of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* 1995; 48: 250-256.
201. Wotherspoon A.C., Diss T.C., Pan L., Singh N., Whelan J., Isaacson P.G. Low grade gastric B-cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue in immunocompromised patients. *Histopathology* 1996; 28: 129-134.
202. Wotherspoon A.C., Doglioni C., De Boni M., Spencer J., Isaacson P.G. Antibiotic treatment for low-grade gastric MALT lymphoma. *Lancet* 1994; 343: 1503.
203. Wotherspoon A.C., Doglioni C., Diss T.C., Pan L., Moschini A., De Boni M., Isaacson P.G. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1993; 342: 575-577.
204. Wotherspoon A.C., Ortiz-Hidalgo C., Falzon M.R., Isaacson P.G. *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 1991; 338: 1175-1176.
205. Xia H.H., Kalantar J.S., Talley N.J., Wyatt J.M., Adams S., Chueng K., Mitchell H.M. Antral-type mucosa in the gastric incisura, body, and fundus (antralization): a link between *Helicobacter pylori* infection and intestinal metaplasia? *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 114-121.
206. Xiang Z., Censini S., Bayeli P.F., Telford J.L., Figura N., Rappuoli R., Covacci A. 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. *Infect Immun* 1995; 63: 94-98.
207. Yamaoka Y., El Zimaity H.M., Gutierrez O., Figura N., Kim J.G., Kodama T., Kashima K., Graham D.Y., Kim J.K. Relationship between the cagA 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. *Gastroenterology* 1999; 117: 342-349.
208. Yamaoka Y., Kwon D.H., Graham D.Y. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 7533-7538.
209. Yoshiyama H., Nakamura H., Kimoto M., Okita K., Nakazawa T. Chemotaxis and motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *J Gastroenterol* 1999; 34 Suppl 11: 18-23.

7. Anhang

7.1. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Martin Schöniger

Anschrift: Westermühl Str. 16, 80469 München
Tel. 089-2010421
E-mail: martin-schoeniger@gmx.de

Geburtsdatum: 11. November 1970

Geburtsort: Holzminden

Familienstand: ledig

Schulbildung

09/1977 bis 03/1979 Grundschule Kirchheim

04/1979 bis 07/1981 Grundschule Übersee

09/1981 bis 06/1990 Gymnasium LSH Marquartstein
Abschluß mit Allgemeiner Hochschulreife

Zivildienst

07/1990 bis 09/1991 Alten- und Pflegeheim Reit im Winkl

Studium

10/1991 bis 02/1993 Jurastudium an der LMU München

05/1993 bis 09/1995 Humanmedizin Vorklinik und 1. klinisches Semester
an der Universität Würzburg

10/1995 bis 11/1999 Erster und zweiter klinischer Studienabschnitt an der
Technischen Universität München

03/1995 Ärztliche Vorprüfung

08/1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

09/1998 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

11/1999 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr: Pädiatrie KH München-Schwabing,
Innere Medizin und Chirurgie KH München-Bogenhausen

Berufliche Tätigkeit

01/2000 bis 06/2001

Arzt im Praktikum, Kinderklinik und Kinderpoliklinik der TU München, Krankenhaus Schwabing; Tätigkeit in der Kinderonkologie, Infektionsstation.

seit 07/2001

Assistenzarzt Pädiatrie Kinderklinik der TU München; Säuglingsstation, Kinderonkologie und Kinderambulanz.

Promotionsarbeit

1997 bis 2002

Prof. Dr. med. C. Prinz, II. Med. Klinikum rechts der Isar, TU München: Die Schlüsselrolle des *Helicobacter pylori* Adhärenzfaktors „Blutgruppen-Antigen bindendes Adhäsin“ (BabA) bei der Entstehung schwerwiegender histologischer Veränderungen der menschlichen Magenschleimhaut.

München, 15. Oktober 2002

7.2. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Christian Prinz danke ich für die Überlassung des Themas, sowie für seine fachliche und menschliche Betreuung, Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Seiner Arbeitsgruppe, stellvertretend seien hier Herr Dr. Markus Gerhard und meine Mitdoktoranden Robert Zanner sowie Roland Rad genannt, Dank für die engagierte Mithilfe bei der Aneignung der Methodik und dem allerzeit offen Ohr bei auftretenden Problemen.

Meinen Eltern und Brüdern herzlichen Dank für ihre unermüdliche Unterstützung und ihr Vertrauen; sie haben mir Studium und Promotion ermöglicht und waren allzeit bei mir.