

II. Medizinische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

**Bakterielle Virulenzfaktoren und
genetische Faktoren des Menschen bei der
Entstehung von schweren histologischen
Veränderungen der Magenmukosa während
der *Helicobacter pylori* Infektion**

Roland Rad

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. G. A. Häcker
3. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 22.01.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.06.04 angenommen.

Teile dieser Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, Schepp W, Classen M, Prinz C. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood group antigen binding adhesin (BabA).

Proc. Natl. Acad. Sci USA 96: 12778-12783, 1999.

Prinz C, Schöniger M, Rad R, Becker I, Keiditsch E, Wagenpfeil S, Classen M, Rosch T, Schepp W, Gerhard M. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation.

Cancer Res. 2001 Mar 1;61(5):1903-9.

Rad R, Gerhard M, Lang R, Schöniger M, Rosch 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 Mar 15;168(6):3033-41.

Gerhard M, Rad R, Prinz C, Naumann M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection.

Helicobacter. 2002 Sep;7 Suppl 1:17-23.

Rad R, Prinz C, Neu B, Neuhofer M, Zeitner M, Voland P, Becker I, Schepp W, Gerhard M. Synergistic effect of *Helicobacter pylori* virulence factors and interleukin-1 polymorphisms for the development of severe histological changes in the gastric mucosa.

J Infect Dis. 2003 Jul 15; 188(2): 272-81.

Rad R, Dossumbekowa A, Neu B, Lang R, Bauer S, Saur D, Gerhard M, Prinz C. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine secretion, the gastric inflammatory response and a host-specific colonisation.

Gut 2004 Aug; 53(8): 1082-9

Hafsi N, Voland P, Schwendy S, Rad R, Reindl W, Gerhard M, Prinz C. Human dendritic cells respond to *Helicobacter pylori*, promoting NK cell and Th1-effector cell responses *in vitro*

J Immunol. 2004 Jul 15; 173(2): 1249-57.

Lehours P, Dupouy S, Bergey B, Ruskone-Foumestroux A, Delchier JC, Rad R, Richy F, Tankovic J, Zerbib F, Megraud F, Menard F. Identification of a genetic marker of *Helicobacter pylori* strains involved in gastric extranodal marginal zone B cell lymphoma of the MALT-type.

Gut 2004 Jul; 53(7): 931-7

Neu B, Rad R, Neuhofer M, Reindl W, Gerhard M, Prinz C. Downregulation of TRAIL and its proapoptotic receptors during chronic *H. pylori* infection.

J Infect Dis. 2004 (in press)

Olfat F, Zheng Q, Oleastro M, Voland P, Boren T, Karttunen R, Engstrand L, Rad R, Prinz C, Gerhard M. Correlation of the *H. pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries.

FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2004 (in press)

*Gewidmet meinen Eltern
und meinem Bruder*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
1. Einleitung	7
1.1. Die Entdeckung von <i>Helicobacter pylori</i> aus geschichtlicher Sicht	7
1.2 Spezies Klassifikation und Charakteristiken	11
1.3 Epidemiologie und Übertragung	11
1.4 Das Spektrum der durch <i>H. pylori</i> hervorgerufenen Erkrankungen	12
1.4.1 Gastritis und Ulcus pepticum	12
1.4.2 Distales Magenkarzinom und Magenlymphome	13
1.5 Die Rolle von bakteriellen Virulenzfaktoren bei der Entstehung von <i>H. pylori</i> induzierten Erkrankungen	14
1.5.1 Das Vakuolisierende Zytotoxin VacA.....	14
1.5.2 Das Cytotoxin Assoziierte Gen A (<i>cagA</i>) und die <i>cag</i> Pathogenitätsinsel (<i>cagPAI</i>).....	15
1.5.3 Das Blutgruppenantigen-bindende Adhäsion (BabA).....	16
1.6 Genetische Faktoren des Menschen bei der <i>H. pylori</i> assoziierten Inflammation..	17
1.6.1 Rolle der Säuresekretion bei der Entstehung der <i>H. pylori</i> assoziierten Erkrankungen	18
1.6.2 Rolle von IL-1 β bei der Regulation der Säuresekretion	18
1.6.3 <i>IL-1</i> Polymorphismen sind mit Hypochlorhydrie und Magenkarzinomen assoziiert	19
1.7 Die durch <i>H. pylori</i> ausgelöste Immunantwort und Immunpathogenese	20
1.7.1 Angeborene Immunantwort (innate immunity)	20
1.7.2 Spezifische Immunität (adaptive immunity)	21
1.8 Zielsetzung der Arbeit	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Anlegen einer Biopsiebank von 742 Patienten	24
2.1.1 Patientenpopulation.....	24
2.1.2 Sammlung und Bearbeitung von Biopsiematerial	24
2.1.3 Histopathologische Untersuchung der Biopsien.....	24
2.2 Isolation von Nukleinsäuren	26

2.2.1	Isolation von DNA	26
2.2.2	Isolation von RNA	27
2.2.3	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	28
2.3	Reverse Transkription	29
2.3.1	Prinzip der Reversen Transkription	29
2.3.2	Reagenzien	29
2.3.3	Durchführung der Reversen Transkription	30
2.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	32
2.4.1	Prinzip der PCR	32
2.4.2	Primer für die PCR	32
2.4.3	Materialien und Durchführung der PCR	33
2.5	Agarose-Gelelektrophorese	34
2.5.1	Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese	34
2.5.2	Agarose Gele für die RNA-Elektrophorese	34
2.5.4	Agarose Gele für die DNA-Elektrophorese	35
2.5.6	Elektrophoreselauf und Dokumentation	36
2.5.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	36
2.6	Klonierung von PCR-Produkten	37
2.6.1	Prinzip der Klonierung	37
2.6.2	Reagentien, Medien und Selektivnährböden	38
2.6.3	Durchführung der Klonierung	39
2.6.4	Plasmidisolation	40
2.7	Restriktionsfragment Längenpolymorphismus (RFLP) Analyse	40
2.8	Real-time quantitative TaqMan RT-PCR	41
2.8.1	Prinzip der quantitativen RT-PCR	41
2.8.2	Reagenzien	42
2.8.3	Primer und Probes für die TaqMan-PCR	43
2.8.4	Durchführung der TaqMan-PCR	44
2.8.5	Quantifizierung	44
2.9	Allelic-discriminating (AD) TaqMan-PCR	45
2.9.1	Prinzip der AD-PCR	45
2.9.2	Durchführung der AD-PCR	46
2.10	Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay	47
2.10.1	Prinzip des ELISA	47
2.10.2	Reagenzien für ELISA	47
2.10.2	Durchführung des ELISA	48

2.11 Indirekte Immunhistochemie	49
2.11.1 Prinzip der indirekten Immunhistochemie	49
2.11.2 Reagenzien	49
2.11.3 Durchführung	50
2.12 Kultur von <i>H. pylori</i>	50
2.12.1 Kulturmedien und Selektivnährböden	50
2.12.2 Kultur von <i>H. pylori</i> in Überschichtungskultur	51
2.12.3 Kultur von <i>H. pylori</i> in Flüssigmedium	52
2.12.4 Langzeitlagerung von <i>H. pylori</i>	52
2.13 Kokkultur von <i>H. pylori</i> mit KATO III Zellen	52
2.13.1 Materialien	52
2.13.2 Durchführung der Kokkultur	53
3 Ergebnisse	54
3.1 Aufbau einer Magenbiopsiebank (742 Patienten)	54
3.2 Einfluß von <i>IL-1</i> Polymorphismen auf die <i>IL-1</i>β Expression und auf die Entstehung von schweren histologischen Veränderungen der Magenmukosa während der <i>H. pylori</i> Infektion	55
3.2.1 Allelhäufigkeiten von <i>IL-1B</i> und <i>IL-1RN</i> Polymorphismen	55
3.2.2 Assoziation von <i>H. pylori</i> Stammtypen mit <i>IL-1</i> Polymorphismen	56
3.2.3 Einfluß von <i>IL-1</i> Polymorphismen auf die <i>IL-1</i> β Expression bei der <i>H. pylori</i> Infektion	57
3.2.4 Einfluß von humanen <i>IL-1</i> Polymorphismen auf die Entstehung der gastralen Histopathologie	60
3.3 Rolle der bakteriellen Virulenzfaktoren CagA und VacA bei der Entstehung schwerer histologischer Veränderungen der Mukosa	63
3.4 Synergistischer Effekt von Wirtsfaktoren und bakteriellen Faktoren auf die Entstehung von schweren histologischen Mukosaveränderungen	64
3.5 Einfluß des bakteriellen Adhäsins BabA auf Inflammation und Kolonisation. Mechanismus der BabA-vermittelten Pathogenese	67
3.5.1 Assoziation von BabA mit weiteren bakteriellen Virulenzfaktoren	67
3.5.2 Gastrales Vorkommen des BabA-Rezeptors Le ^b in der Population	68
3.5.3 Bedeutung von BabA für die <i>IL-8</i> Expression <i>in vivo</i>	69
3.5.4 Bedeutung von BabA für die Entstehung der neutrophilen Gastritis	70
3.5.5 Bedeutung von BabA für die Entstehung der intestinalen Metaplasie und Atrophie	71

3.5.6	Einfluß von BabA auf die bakterielle Kolonisation	72
3.5.7	Einfluß der Bakteriendichte auf die IL-8 Sekretion aus Epithelzellen <i>in vitro</i>	73
3.5.8	Assoziation von BabA mit der lymphozytären Infiltration	75
3.5.9	Einfluß von BabA und anderen Virulenzfaktoren auf das Ausmaß der <i>H. pylori</i> induzierten Th1-Antwort	76
4	<i>Diskussion</i>	79
4.1.	Einleitung	79
4.2	Die Rolle von Wirtsfaktoren und bakteriellen Faktoren bei der Entstehung von schweren histologischen Mukosaveränderungen	80
4.2.1	Die bakteriellen Virulenzfaktoren CagA und VacA erhöhen das Risiko für die Entstehung hochgradiger Gastritis, intestinaler Metaplasie und Atrophie.....	80
4.2.2	Proinflammatorische <i>IL-1</i> Polymorphismen sind mit erhöhter IL-1 β Expression und der Entstehung von schweren histologischen Veränderungen der Mukosa assoziiert	81
4.2.3	Die gleichzeitige Bestimmung von bakteriellen Virulenzfaktoren und <i>IL-1</i> Polymorphismen erlaubt die Identifikation von Hoch-Risiko-Patienten für die Entstehung eines Magenkarzinoms	83
4.3	Untersuchung der BabA vermittelten Immunpathogenese und Beschreibung der hierbei beteiligten Mechanismen	86
4.3.1	Der BabA-Rezeptor Lewis ^b wird in über 90 % der Bevölkerung auf Mageneithelzellen exprimiert	88
4.3.2	BabA verstärkt die unspezifische Immunantwort auf <i>H. pylori</i>	88
4.3.3	Mechanismus der BabA vermittelten Wirkung: BabA verstärkt die bakterielle Kolonisation	89
4.3.4	Einfluß von BabA auf die durch <i>H. pylori</i> ausgelöste spezifische Immunantwort.....	91
5	<i>Zusammenfassung</i>	92
	<i>Literaturverzeichnis</i>	95
	<i>Danksagung</i>	113

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AD-PCR	Allelic Discriminating TaqMan PCR
AG	Atrophische Gastritis
BabA	Blood Group Antigen-binding Adhesin A
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Base Pairs
BSA	Bovine Serum Albumin
<i>cagA</i>	Cytotoxin Associated Gene A
cagPAI	Cag Pathogenitätsinsel
CI	Confidence Interval
Ct	Threshold Cycle
DNA	Deoxyribonukleinsäure
ECL	Enterochromaffin-like
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay
G1-G3	Grade der granulozytären Infiltration
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IFN- γ	Interferon Gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
<i>IL-1B</i>	IL-1 β kodierendes Gen
<i>IL-1RN</i>	IL-1RA kodierendes Gen

IL-12R β 2	Interleukin-12 Rezeptor β 2 Kette
IM	Intestinale Metaplasie
kDA	Kilodalton
L1-L3	Grade der lymphozytären Infiltration
Le ^b	Lewis B
LD	Linkage Disequilibrium
OR	Odds Ratio
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	Revolutions Per Minute
RT	Reverse Transcription
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
T _m	Schmelztemperatur
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TNF- α	Tumor Necrosis Factor Alpha
VacA	Vacuolating Cytotoxin
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
WC-Agar	Wilkins Chalgren Agar

1. Einleitung

1.1. Die Entdeckung von *Helicobacter pylori* aus geschichtlicher Sicht

Die Entdeckung von *H. pylori* im Jahre 1983 durch Warren und Marshall (145) und die spätere Aufdeckung des Zusammenhanges der Infektion mit der Entstehung von Ulzera, Lymphomen und Karzinomen (85; 106; 150) revolutionierte die Medizin des Magens. Erkrankungen, wie z.B. rezidivierende Ulzera, die früher chirurgisch behandelt wurden, können heute durch antibiotische Therapie geheilt werden. Aus heutiger Sicht stellt sich jedoch die Frage, wie es möglich ist, daß ein Keim, welcher bereits lichtmikroskopisch sichtbar ist, erst mehr als 400 Jahre nach dem Bau des ersten Mikroskopes entdeckt wurde.

Der Beginn der Bakteriologiegeschichte kann zeitlich nicht genau festgelegt werden. Die erste Idee zur Erklärung der Übertragbarkeit bestimmter Krankheiten stammt von Marcus Terentius Varro (117-26 v. Chr) (55). Der römische Gelehrte vermutete, daß übertragbare Krankheiten durch kleine Tierchen hervorgerufen werden, die mit bloßen Augen nicht gesehen werden können. Er konnte jedoch natürlich zu seiner Zeit diese Hypothese nicht beweisen (55; 65). Die nachfolgenden 1000 Jahre brachten keine wesentlichen neuen Erkenntnisse. Im Mittelalter fiel man zurück in archaische Vorstellungsmuster der Entstehung von Krankheit und erklärte die großen Epidemien unter anderem mit Begriffen wie Strafe Gottes für Sünden, Schicksaal, Werk von Dämonen etc. Erst im Spätmittelalter begann man mit Mitteln der Quarantäne Seuchenprävention zu betreiben. Begünstigt durch den Zustrom von Gelehrten und alten Schriften aus Byzanz nach der Eroberung Konstantinopels begann dann im 15. und 16. Jahrhundert eine intensive Auseinandersetzung mit der Natur, dem Menschen, der Kunst und der Geschichte. Die Fortschritte in verschiedenen Disziplinen der Wissenschaft während der Renaissance boten die Voraussetzungen zur Weiterentwicklung der Bakteriologie. So ermöglichte die Entwicklung von Linsen nicht nur Fortschritte im Bereich der Astronomie, sondern schuf auch die Voraussetzung für den späteren Bau von Mikroskopen im 17. Jahrhundert. Die erste Beschreibung von Einzellern, Rädertierchen und Bakterien geht auf den holländischen Kaufmann Antony van Leeuwenhoek (1632-1723) zurück, der ohne jegliche wissenschaftliche Ausbildung aus mehreren Linsen eine Art „Mikroskop“ baute (55; 65). In den folgenden 170 Jahren

wurden die Beobachtungen Leeuwenhoeks unter Beibehaltung ihres deskriptiven Charakters erweitert und systematisiert, aber sie sind nicht wesentlich vertieft worden. Erst Robert Koch (1843-1910) gelang es einen kausalen Zusammenhang zwischen Mikroorganismen und der Entstehung von Erkrankung herzustellen (74). Der Landarzt Koch konnte 1876 beweisen, daß der Milzbrand der Haustiere nur dann entsteht, wenn die Tiere mit einem bestimmten Keim infiziert werden. Er formulierte daraufhin die Kochschen Postulate (74). Diese Entdeckung war von ungeheurer Bedeutung, da hiermit zum ersten Mal der Verursacher einer Infektionskrankheit eindeutig nachgewiesen werden konnte und somit der Weg geöffnet wurde für die nachfolgende rasante Entwicklung auf dem Feld der Bakteriologie. In den folgenden Jahrzehnten wurden durch Koch, dem Vater der modernen Bakteriologie, Mykobakterien und Vibrionen entdeckt (55; 65). Eine Reihe weiterer Erreger und deren Übertragungsmodus wurden weltweit identifiziert (55). Bei der Bekämpfung großer Seuchen standen nun wirksame Möglichkeiten der Prävention zur Verfügung. Zur gleichen Zeit erfand Louis Pasteur (1822-1895) den Prozeß der Pasteurisierung und entwickelte Impfstoffe, darunter den Tollwutimpfstoff (55; 65). Trotz dieser eindrucksvollen Entwicklung in der letzten Hälfte des 19. Jahrhunderts und der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts sollten nach der Entdeckung von *Bacillus Anthracis* durch Koch noch über 100 Jahre vergehen ehe Warren und Marshall *H. pylori* entdeckten. Es stellt sich also die Frage, wie Generationen von Pathologen den Keim übersehen konnten. Seit der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts gibt es immer wieder Berichte über Bakterien in Tier- und Menschenmägen. An dieser Stelle seien exemplarisch nur einige Namen erwähnt. Einer der ersten Bakteriologen des Magens war G. Böttcher, der in Zusammenarbeit mit seinem französischen Kollegen M. Letulle 1875 Bakterien in und um Ulzera von Tiermägen entdeckte (65). Böttcher war so von dem krankheitserzeugenden Potential dieser Mikroorganismen überzeugt, daß er die Bakterien direkt mit der Ulkuserkrankung in Zusammenhang brachte (71). Diese Theorie war jedoch seinerzeit sehr unpopulär und wurde von der Fachwelt völlig missachtet. 1881 beschrieb C. Klebs ebenfalls Bakterien im Lumen und zwischen den Zellen von Magendrüsen, begleitet von einer Rundzellinfiltration (71). H. Salomon fand 1896 spiral geformte Bakterien im Hundemagen, die er als Spirochäten bezeichnete, und konnte damit Mäuse infizieren (119). Es handelte sich bei diesen Bakterien retrospektiv betrachtet mit Sicherheit um *Helicobacter* Spezies (65; 71). 1940 identifizierten A.S. Freedberg and L. Baron „Spirochäten“ in der Magenmukosa und fanden die Keime häufiger bei Patienten mit

Ulzera als bei Kontrollpatienten (53% versus 14%) (51). Trotz dieser eindrucksvollen Daten folgerten die Autoren in ihrer Diskussion, daß keine absolute ätiopathologische Rolle der Organismen definiert werden kann. Der Grund hierfür war die große Verunsicherung der Wissenschaftler aufgrund der Voruntersuchungen von Doenges und Mitarbeitern, die gegenteiliges beobachtet hatten (32). Es war jedoch zu jener Zeit nicht bekannt, daß die postoperativen Mägen von Doenges zum großen Teil autolytisch waren (65). F.D. Gorham folgerte in seinem Kommentar zur Arbeit von Freedberg und Baron, daß diese azidophilen Bakterien weiter untersucht werden sollten, da sie wahrscheinlich als ätiologisches Agens von Ulzera in Betracht kommen (65). Er behandelte erfolgreich Ulkuspatienten mit dem antibakteriellen Wirkstoff Bismuth, eine Therapie, die bereits im 18. Jahrhundert bekannt war, jedoch keine große Verbreitung fand (65). Es ist fast tragisch diese Berichte zu lesen mit dem Wissen, daß immer noch über 40 Jahre bis zur Entdeckung und endgültigen Definierung der pathogenetischen Rolle von *H. pylori* vergehen sollten. 1975 identifizierte H. Steer Bakterien in Kontakt mit Mageneithelien, und vermutete, daß die von ihm beobachteten mukosalen Leukozyten als Antwort auf die Infektion in die Schleimhaut einwandern (128). Der Versuch den Keim zu isolieren misslang jedoch, da er sich mit mikroaerophilen Kulturtechniken nicht auskannte (18). Robert Warren, ein Pathologe am Royal Perth Hospital in Australien, beobachtete in diesen Jahren auch Bakterien im Magen von Gastritispatienten. Er war überzeugt davon, daß der Keim eine Rolle für die Entstehung von Pathologien des Magens spielt, traute sich jedoch angesichts des vorherrschenden Dogmas der säureinduzierten Ulkuserstehung nicht, seine Ansichten in der breiten Öffentlichkeit zu diskutieren. Im Jahr 1982 las der junge Arzt Barry Marshall die Hypothesen von Warren und es gelang ihm Warren davon zu überzeugen, die Thesen in einer größeren klinischen Studie zu untersuchen. Im Jahr 1983 publizierten Warren und Marshall ihre initialen Ergebnisse, welche später die Medizin des Magens grundlegend verändern sollten in einem Research Letter im *Lancet* (145). Im ersten Teil berichtete Warren über S-förmige campylobacterartige Organismen in 135 Magenbiopsien und beschreibt, daß die Infektion von histologischen Veränderungen in Form einer Gastritis begleitet gewesen sei. In seinem Kommentar zeigte er Unverständnis darüber, daß Bakterien, die bereits lichtmikroskopisch gesehen werden können, fast unbekannt waren, sowohl was ihre Eigenschaften, als auch was ihre pathologische Rolle anbelangt. Im zweiten Teil beschrieb Marshall, daß es ihm gelungen sei, den Keim außerhalb des Organismus anzuzüchten, wobei mikroaerophile Bedingungen notwendig waren. Hiermit waren die

Kochsches Postulate bereits teilweise erfüllt: optischer Keimnachweis bei Kranken (erstes Postulat) und kulturelle Keimanzucht außerhalb von Organismen (zweites Postulat). Marshall versuchte anschließend den Pathogenitätsnachweis zu erbringen (drittes Kochsches Postulat). Nach Koch müssen die außerhalb des Wirtes gezüchteten Mikroorganismen bei Applikation an ein geeignetes Versuchstier eine typische Krankheit hervorrufen. Im Organismus der experimentell krank gemachten Tiere müssen die Mikroorganismen wiederum mikroskopisch und kulturell nachweisbar sein. Marshall entschied sich dazu, selbst das Versuchstier zu sein und führte eine Autoinokulation durch. Nach 14 Tagen entwickelte er uncharakteristische dyspeptische Beschwerden (Übelkeit, Erbrechen, Krankheitsgefühl) sowie Foetor ex ore (83). Histologisch zeigte sich auf die Infektion hin eine ausgeprägte akute Gastritis (83). Trotz dieser eindrucksvollen Ergebnisse war es sehr schwer die breite Fachwelt von der bedeutenden Rolle des Keimes zu überzeugen. Zu sehr war die Maxime von Karl Schwarz „keine Säure – kein Ulkus“ in den Köpfen der Ärzte verwurzelt, als daß Raum vorhanden gewesen wäre für ein Bakterium in der Ulkusätiologie (71; 123). Die Pioniere der *Helicobacter*-Forschung waren zumeist junge Ärzte, deren medizinische Vorstellungen noch nicht durch solche Dogmen präformiert waren (71). Heute lernen Medizinstudenten ganz selbstverständlich, daß *H. pylori* mit dem größten Teil der Magen- und Duodenalulzera sowie der Magenkarzinome ätiologisch in Verbindung steht.

1.2 Spezies Klassifikation und Charakteristiken

Als Warren und Marshall ihr Bakterium aus dem Magen isolierten, klassifizierten sie es als eine neue Spezies des Genus *Campylobacter* (85; 145). *Campylobacter*, *Wolinella* und *Flexispira* gehören zur rRNA Superfamilie VI, eine neue Gruppe innerhalb der gramnegativen Bakterien (102). Phylogenetische Analysen, basierend auf 16S rRNA Sequenzierung sowie das Vorhandensein von Flagellen und die Abwesenheit von Hexadecansäuren im Fettsäureprofil unterschied jedoch dieses Bakterium von anderen Campylobacteridaceae. Dies gab Anlaß zur Schaffung eines neuen Genus, genannt *Helicobacter*, im Jahr 1989 (59). Damals waren lediglich *Helicobacter pylori* und *Helicobacter mustelae* bekannt. Inzwischen umfaßt das Genus *Helicobacter* mehr als 20 Spezies (102). *Helicobacter pylori* ist ein ca. 2-4 µm langes s-förmiges gramnegatives Bakterium, mit 1-3 helixartigen Drehungen *in vivo*. Typischerweise besitzt der Keim bis zu 6 polar angeordnete Flagellen, welche eine aktive Fortbewegung erlauben. *H. pylori* ist microaerophil, mit besten Wachstumseigenschaften in einer Atmosphäre von 5% Sauerstoff und 5-10% Kohlendioxid auf Blut enthaltenden Medien (102). Das Überleben des Keimes unter den niedrigen pH-Bedingungen des Magens wird durch das Enzym Urease ermöglicht, welches Harnstoff zu Ammoniak und Kohlendioxid spaltet (118). Das entstehende apolare Ammoniak gelangt ins bakterielle Periplasma und in die äußere Umgebung des Keimes, wo es die Magensäure puffert. Für ein optimales Wachstum ist ein periplasmatischer pH-Wert von über 6,1 notwendig (117). Die Urease ist hauptsächlich intrazellulär lokalisiert. Die Aufnahme von Harnstoff wird über ein, in der inneren Bakterienmembran verankertes Protein gesteuert (147). Es handelt sich hierbei um den Protonen-gesteuerten Harnstoffkanal UreI, das bei niedrigem pH geöffnet wird und hierbei schnellen Übertritt von großen Mengen Harnstoff in das bakterielle Zytoplasma ermöglicht, was wiederum Voraussetzung ist für die Entstehung von großen Mengen Ammoniak (147).

1.3 Epidemiologie und Übertragung

Die Übertragung von *H. pylori* erfolgt vor allem auf oral-oralem Weg von Person zu Person, vornehmlich innerhalb der Familie. Fäkal-orale Übertragung ist prinzipiell möglich, ist jedoch von untergeordneter epidemiologischer Bedeutung (88). Aus bisher

nicht bekannten Gründen erfolgt die Infektion hauptsächlich im Kindesalter (81). Die Infektionsrate sowie die Reinfektionsrate nach erfolgreicher Eradikation bei Erwachsenen liegt bei unter 1% pro Jahr (81). Faktoren, welche die Übertragung beeinflussen sind der sozioökonomischer Status und damit einhergehende Faktoren (Dichte des Zusammenwohnens, hygienische Voraussetzungen, Bildungsstand), aber auch eine gewisse genetische Prädisposition (46). Ca. 50% der Weltbevölkerung sind befallen, wobei die Gesamtprävalenz in den westlichen Ländern niedriger ist als in der Dritten Welt (USA/UK/Australien 19-57%, China/Thailand/Indien 44-80%). Je älter die untersuchte Bevölkerungsschicht, desto höher ist die Infektionsrate. Hierbei handelt es sich um einen Kohorteneffekt und nicht um einen zunehmenden Erwerb der Infektion mit dem Alter (46). Die Infektionsrate bei Kindern ist in den letzten Jahrzehnten in der westlichen Welt drastisch gesunken. Im Augenblick liegt die Infektionsrate bei Kindern in entwickelten Ländern bei <5%, in Entwicklungsländern hingegen bei 40-83% (46).

1.4 Das Spektrum der durch *H. pylori* hervorgerufenen Erkrankungen

1.4.1 Gastritis und Ulcus pepticum

Das Interesse an *H. pylori* als ein Pathogen wurde durch die Beobachtungen einer assoziierten Gastritis und von Ulzera von Warren und Marshall geweckt (85; 145). Die Induzierbarkeit der Entzündung durch Infektion (83) sowie das Ausheilen der Gastritis nach Eradikation des Keimes (156) bestätigten eindeutig, daß *H. pylori* die Ursache der Gastritis darstellt. Ebenso ist das Risiko eines Ulkus-Rezidivs nach *H. pylori* Eradikation drastisch erniedrigt (84). Abbildung 1 veranschaulicht die Assoziation von verschiedenen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes mit der *H. pylori* Infektion. Ungefähr 90-95% der Duodenalulzera sowie 70-75% der Magenulzera können *H. pylori* zugeordnet werden (39; 131). Die restlichen Ulzera entstehen zumeist auf dem Boden einer chronischen Einnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika. Das Lebenszeitrisiko für die Entwicklung von peptischen Ulzera bei *H. pylori* infizierten Patienten beträgt ca. 10% (39).

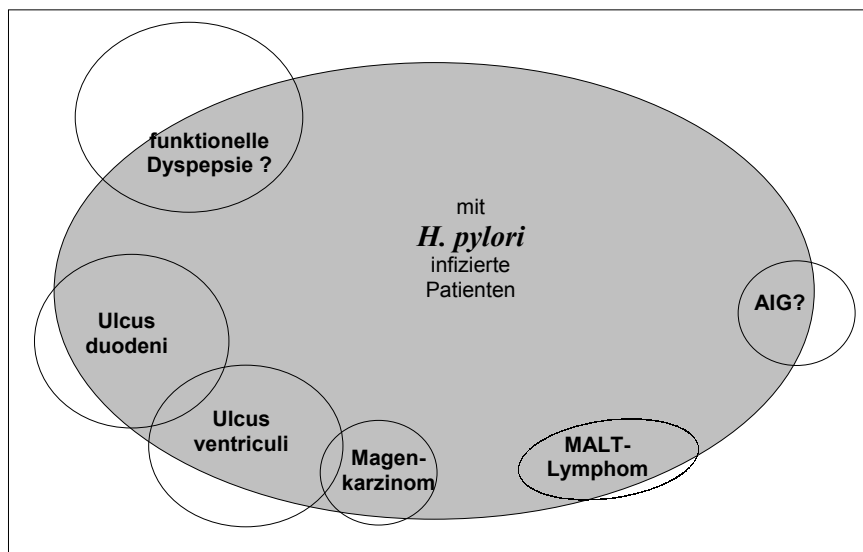


Abbildung 1. Zusammenhang verschiedener gastrointestinaler Erkrankungen mit der *H. pylori* Infektion. Ca. 95% der Duodenalulzera und über 75% der Magenulzera können ursächlich auf eine *H. pylori* Infektion zurückgeführt werden. Die restlichen Magen- und Duodenalulzera sind zumeist durch die chronische Einnahme von nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) bedingt. Mehr als 90% der Patienten mit Magenkarzinomen sind *H. pylori* infiziert. Ebenso ist das MALT-Lymphom mit der Infektion assoziiert. Der Zusammenhang zur funktionellen Dyspepsie und zur autoimmunen Gastritis (AIG) ist hingegen noch nicht eindeutig geklärt (1; 14; 87; 90; 100; 135).

1.4.2 Distales Magenkarzinom und Magenlymphome

Das Magenkarzinom ist weltweit eines der häufigsten Krebstypen und die zweithäufigste krebsassoziierte Todesursache (108). Mit sinkender Prävalenz der *H. pylori* Infektion ist in den entwickelten Ländern auch ein dramatischer Rückgang des Magenkarzinoms zu verzeichnen. So sank die jährliche Inzidenz des distalen Magenkarzinoms in den USA von 33 pro 100000 Einwohnern im Jahr 1935 auf 9 pro 100000 Einwohnern im letzten Jahrzehnt (39). Hingegen bleibt die Inzidenz des Magenkarzinoms in Ländern mit hohen Infektionsraten wie Lateinamerika und Asien sehr hoch (39). Eine Reihe von Studien haben gezeigt, daß die *H. pylori* Infektion mit einem 2,7-12fach erhöhtem Risiko der Entwicklung eines Magenkarzinoms assoziiert ist (39). Bei Kombination mehrerer *Helicobacter*-Nachweismethoden ist sogar bei mehr als 90% der Patienten mit Magenkarzinomen eine aktuelle oder früher stattgehabte Infektion zu verzeichnen. Zudem zeigen prospektive Studien eine eindeutige Assoziation des Magenkarzinoms mit der *H. pylori* Infektion (48; 106; 140). Dies gilt sowohl für den intestinalen als auch für den diffusen Typ des Karzinoms (108; 140). Aus diesen Gründen ist *H. pylori* von der WHO bereits 1994 als ein Typ-1 Karzinogen

eingestuft worden (39). Gewißheit über die Rolle von *H. pylori* bei der Entstehung des Magenkarzinoms liefern auch Untersuchungen an Tiermodellen. So erhöht die chronische *H. pylori* Infektion das Risiko zur Entwicklung eines Magenkarzinoms in mongolischen Wüstenrennmäusen ganz erheblich (99; 146). Darüberhinaus zeigen prospektive Studien, dass die *H. pylori* Eradikation das Karzinomrisiko erniedrigt und vor dem Wiederauftreten von resezierten Frühkarzinomen schützt (140). Für den intestinalen Typ des Magenkarzinoms ist gezeigt worden, daß es auf dem Boden einer chronischen Corpusgastritis entsteht (34). Dem intestinalen Karzinomtyp gehen fast immer histologische Veränderungen wie Atrophie, intestinale Metaplasie und letztlich Dysplasie voraus (22). Demgegenüber ist der diffuse Typ des Magenkarzinoms nicht mit Atrophie und intestinaler Metaplasie assoziiert (108).

Neben dem Magenkarzinom ist das MALT-Lymphom des Magens eine eindeutig nachgewiesene *H. pylori* assoziierte Erkrankung (150; 158; 159). Es handelt sich hierbei um eine monoklonale Proliferation von B-Zellen, wobei *H. pylori* den antigenen Stimulus für die Proliferation liefert. In 70-80% der Fälle kommt es zu einer Regression der MALT Lymphome nach *H. pylori* Eradikation (149; 159).

1.5 Die Rolle von bakteriellen Virulenzfaktoren bei der Entstehung von *H. pylori* induzierten Erkrankungen

1.5.1 Das Vakuolisierende Zytotoxin VacA

Im Jahr 1988 zeigten Leunk und Mitarbeiter, daß manche *H. pylori* Stämme in einer Reihe von Zellkulturlinien Vakuolisierung der Zellen hervorruft (77). Nach Aufreinigung des hierfür verantwortlichen Toxins wurde das kodierende Gen (*vacA*) gleichzeitig durch vier Gruppen kloniert und sequenziert (27; 109; 122; 137). Der Toxinprecursor ist ungefähr 1300 Aminosäuren lang und hat wie die meisten exportierten Proteine eine kurze N-terminale Signalsequenz, welches während des Exportes durch die zytoplasmatische bakterielle Membran erkannt und abgespalten wird (2). Eine weitere Spaltung des Toxinvorläufers findet beim Übertritt durch die äußere Membran statt: hierbei wird eine Region am C-terminalen Ende abgespaltet, welche eine Pore durch die Membran bildet, wodurch das verbleibende Protein nach außen gelangen kann. Dieses besteht aus zwei Domänen, einer 37 kDA Einheit (p37 genannt)

und einer 58 kDa Einheit (p58). Während die Vakuolisierungseigenschaften hauptsächlich an die p37 Einheit gebunden sind, ist die p58 Einheit bei der Bindung an die Zielzelle verantwortlich (93).

Obwohl alle *H. pylori* Stämme das *vacA* Gen besitzen, sind je nach geographischer Region nur 50-90% der Keime toxisch. Dies liegt an Variationen in der Genregion, die für die Signalsequenz kodiert (3). Es gibt zwei Typen der Signalsequenz s1 und s2. Das s2-Allel kodiert ein defektes Signalpeptid und bedingt dadurch einen nur sehr geringen Export von VacA (3; 115). Stämme mit dem s1-Allel können hingegen große Mengen an Toxin exportieren und wurden mit einer verstärkten inflammatorischen Antwort und einer erhöhten Prävalenz von Duodenalulzera assoziiert (2; 4). Eine weitere Variation im *vacA* Gen befindet sich in der mittleren Region, welches für den Anteil des Proteins kodiert, der für die Bindung an die Zielzelle verantwortlich ist (p58 Domäne). Man unterscheidet ein m1- und ein m2-Allel mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften an verschiedene Zelllinien (103; 115). Ein VacA Rezeptor auf Epithelzellen ist in den letzten Jahren entdeckt worden und ist im Mausmodell mit einer Ulkuserkrankung in Zusammenhang gebracht worden (52; 151). Trotz intensiver Toxin-Forschung weltweit, ist noch nicht bekannt, welche die Hauptfunktion des Toxins ist. Die toxische Wirkung von VacA wird einerseits auf die Vakuolisierung zurückgeführt (115), andererseits aber auch auf die Induktion von Apoptose durch das Toxin (26; 53). Desweiteren ist gezeigt worden, dass VacA durch Inhibition Antigenprozessierung auf prälysosomaler Ebene die Antigenpräsentation hemmt (92). Eine kürzlich erschienene Studie konnte auch nachweisen, dass VacA die T-Zell Aktivierung hemmt und somit möglicherweise zur chronischen Persistenz des Keimes beiträgt (16).

1.5.2 Das Cytotoxin Assoziierte Gen A (*cagA*) und die *cag* Pathogenitätsinsel (*cagPAI*)

Initial wurde CagA als ein *H. pylori* Protein beschrieben, das häufiger bei toxischen Stämmen exprimiert wird, als bei nicht-toxischen Stämmen (25), weshalb das Gen später als cytotoxin associated gene A (*cagA*) bezeichnet wurde (23). Das *cagA* Gen wurde gleichzeitig von 2 Gruppen kloniert und sequenziert (23; 138). Sequenzierung der Region um das *cagA* Gen haben gezeigt, daß es Teil einer Pathogenitätsinsel ist, die ungefähr 31 meist gleichzeitig vorkommende Gene umfasst (19). Die *cagPAI* wurde

durch horizontalen Transfer von einem anderen Organismus übernommen und kodiert für ein sogenanntes Typ-IV Sekretionssystem (19). Die Funktion dieses Sekretionssystems ist die Vermittlung von Kommunikationsprozessen zwischen Keim und Zielzelle durch den Transport von makromolekularen Transmittern. Es ist gezeigt worden, dass *H. pylori* mit Hilfe des Typ-IV Sekretionssystems CagA in die Zelle injizieren kann, wo das Protein phosphoryliert wird (6; 24; 63; 98; 124; 129).

In vitro Experimente haben gezeigt, daß *cagPAI* Gene die Expression eines Supersets von Wirtsgenen hochregulieren (20; 60). Hierzu gehören Gene, die für immunologisch relevante Moleküle kodieren sowie Gene, die bei zytoskelettalen „Rearrangementvorgängen“ (Pedestal-Bildung, Zelloberflächen-Remodeling) beteiligt sind (125). Von besonderer Bedeutung ist die NFκB-abhängige Induktion der Interleukin (IL)-8 Produktion aus Epithelzellen, einem potenten Chemokin für Neutrophile (70). Eine Reihe von Genen innerhalb der *cagPAI* sind für die NFκB-abhängige Induktion der IL-8 Sekretion aus Epithelzellen notwendig (5; 19; 78; 139).

Die Mehrzahl der klinischen Studien zeigten, daß eine Infektion mit *cagA*⁺ Stämmen häufiger ist bei Patienten mit Ulkuskrankheit (29; 142), Magenkarzinom (13; 105) sowie schwerer Gastritis mit intestinaler Metaplasie und Atrophie (76; 141). Darüber hinaus sprechen Studien in Tiermodellen dafür, daß CagA der wichtigste krankheitsassoziierte Virulenzfaktor von *H. pylori* ist. Infektion von mongolischen Wüstenrennmäusen mit *cagA*⁺ *H. pylori* Stämmen führte im Gegensatz zur Infektion mit *cagA*-negativen Stämmen zur Entwicklung schwerer Gastritiden, Ulzera oder Magenkarzinomen (99). Ähnlicherweise induzieren im Mausmodell Infektionen mit *cagA*⁻ *H. pylori* Stämmen keine starken Entzündungsreaktionen wohingegen *cagA*⁺ Stämme eine ausgeprägte Inflammation sowie mukosale Schäden hervorrufen (68; 82).

1.5.3 Das Blutgruppenantigen-bindende Adhäsion (BabA)

BabA ist ein Outer-membrane Protein, das in einer Subgruppe der *H. pylori* Stämme exprimiert wird. Es ist ein Adhärenzfaktor und bindet an difukosylierte Lewis^b (Le^b) Blutgruppenantigene, die auf Magenepithelzellen exprimiert werden (40). 1993 zeigten Boren und Mitarbeiter, daß die Adhärenz von *H. pylori* an Magenepithelien abhängig ist von der Anwesenheit von Le^b Molekülen auf den Epithelzellen (17). 1998 wurde das korrespondierende bakterielle Adhäsion durch die gleiche Arbeitsgruppe identifiziert und

BabA genannt (67). Alle *H. pylori* Stämme besitzen das *babA* Gen, welches jedoch in zwei Variationen vorkommen kann. Während das *babA1* Allel ein „silent allele“ ist, welchem ein Initiationskodon fehlt, enthält das *babA2* Allel, ein 10 bp „repeat motif“, das ein Initiationskodon kreiert (67). *babA2* ist somit das funktionell aktive Allel, während bei Stämmen, die das *babA1* Allel besitzen das Protein nicht exprimiert wird. Falk und Mitarbeiter untersuchten die Rolle der BabA/Le^b Interaktion in einem transgenen Mausmodell. Hierbei kam es nach Infektion von transgenen Mäusen, die Le^b Moleküle auf der Oberfläche von Magenepithelzellen exprimierten zu einer stärker ausgeprägten Gastritis und erhöhtem Parietalzellverlust als in Wildtypmäusen (42; 61). Klinische Studien unserer eigenen Gruppe haben gezeigt, daß *babA2*-positive Stämme mit der Ulkuskrankheit und dem Magenkarzinom assoziiert sind und daß der Nachweis dieser Stämme wesentlich besser zwischen Ulzera und Gastritis bzw. Karzinom und Gastritis diskriminiert als der Nachweis des *cagA* oder *vacAs1* Gens alleine (56). Unklar ist noch ob BabA die Entstehung hochgradiger Gastritiden und von präkanzerösen Läsionen (intestinale Metaplasie und Atrophie) in der Magenschleimhaut fördert.

1.6 Genetische Faktoren des Menschen bei der *H. pylori* assoziierten Inflammation

Die *H. pylori* Infektion kann zur Ausbildung von Magenkarzinomen und Duodenal- bzw. Magenulzera führen (131). Jedoch entwickelt nur ein kleiner Teil der Patienten eine Pathologie. Die Mehrzahl (90%) bleibt ein Leben lang asymptomatisch (131). Wie bereits oben erwähnt spielen bakterielle Virulenzfaktoren eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Erkrankungen im Verlauf der *H. pylori* Infektion (11). Seit langer Zeit ist jedoch bekannt, daß Patienten mit *H. pylori* induzierten Duodenalulzera ein sehr viel niedrigeres Karzinomrisiko haben als andere *H. pylori* Träger (62; 140). Da die bisher bekannten Virulenzfaktoren sowohl die Entstehung von Karzinomen als auch die von Ulzera begünstigen, scheinen Wirtsfaktoren die unterschiedliche Entwicklung in Richtung Karzinom oder Duodenalulkus zu lenken (34).

1.6.1 Rolle der Säuresekretion bei der Entstehung der *H. pylori* assoziierten Erkrankungen

Mitte der 90er Jahre ist erkannt worden, daß Gastritiden, die auf das Antrum begrenzt sind, mit Duodenalulzera und gleichzeitig mit einer hohen Säuresekretion assoziiert sind (37). Im Gegensatz hierzu führt eine Gastritis, welche die säureproduzierende Korpusregion mitbetrifft zu Hypochlorhydrie, progressiver Atrophie und einem erhöhten Risiko der Entwicklung eines Magenkarzinoms (36). Das Ausmaß der Magensäuresekretion und das damit verbundene unterschiedliche Kolonisationsmuster scheint die unterschiedliche Entwicklung in Richtung Magenkarzinom und Duodenalulkus zu beeinflussen (34). Bei der initialen Infektion mit *H. pylori* werden Teile des Magens kolonisiert, die einen höheren pH-Wert haben, denn ein sehr saures Milieu hemmt das bakterielle Wachstum. Eine hohe Säuresekretion durch Parietalzellen im Magenkörper scheint vor einer Kolonisation des Korpus zu schützen. In Wirten mit geringer Säuresekretion ist das Bakterium fähig den Korpus zu besiedeln, wo es zu einer aggressiveren Gastritis führt und damit die Karzinomentwicklung fördert. Gleichzeitig kommt es hierbei durch den progredienten Verlust von Parietalzellen zu einer weiteren Hemmung der Säurebildung und damit zum verminderten Risiko der Entstehung von Duodenalulzera (34).

1.6.2 Rolle von IL-1 β bei der Regulation der Säuresekretion

Das wichtigste Zytokin bei der Regulation der Säuresekretion ist Interleukin (IL)-1 β , dessen Expression während der *H. pylori* Infektion hochreguliert wird (96; 107; 152). IL-1 β ist ein extrem potenter Hemmer der Säurebildung (143). In der Arbeitsgruppe von Prof. Prinz konnten in früheren Studien die Mechanismen dieser IL-1 β induzierten Hypochlorhydrie aufgedeckt werden. Einerseits wirkt IL-1 β direkt über IL-1 Rezeptoren auf Parietalzellen antisekretorisch (10; 121). Andererseits hemmt IL-1 β die Histaminsekretion aus ECL-Zellen und induziert die Apoptose dieser Zellen (80; 113). Histamin ist der wichtigste Stimulus der Säurebildung (114). Durch Hemmung der Histaminsekretion bewirkt IL-1 β auf indirekte Art und Weise eine Hypochlorhydrie (114). Da während der *H. pylori* Infektion die IL-1 β Expression erhöht ist (96; 107; 152), könnte auf diese Art und Weise die bei manchen Patienten beobachtete *H. pylori*

assoziierte Hypochlorhydrie entstehen. Auch andere Zytokine, wie Tumor-Nekrosis-Faktor (TNF)- α werden bei der *H. pylori* induzierten Gastritis hochreguliert und bewirken eine Hemmung der Säureexpression (64; 94).

1.6.3 *IL-1* Polymorphismen sind mit Hypochlorhydrie und Magenkarzinomen assoziiert

Die *IL-1* Genfamilie auf Chromosom 2q besteht aus drei Genen *IL-1A*, *IL-1B* und *IL-1RN*, die für IL-1 α , IL-1 β und ihren endogenen Rezeptorantagonisten IL-1RA kodieren (66). Ein Basenaustausch (C zu T) an Position -511 im *IL-1B* Gen ist mit höherer IL-1 β Sekretion aus *in vitro* aktivierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) assoziiert worden (110; 120). Darüber hinaus ist ein T zu C Austausch an Position -31 in der TATA-Box Sequenz des *IL-1B* Promotors, welches in komplettem „Linkage Disequilibrium“ mit dem -511 (C zu T) Polymorphismus ist, mit erhöhter Kernfaktorbindung an diese Region assoziiert worden (35). Das *IL-1RN* Gen hat ein penta-allelisches 86-bp Tandemrepeat (VNTR, variable number of tandem repeats) im Intron 2 (66). Allel 2 (*IL-1RN*2*) ist mit erhöhter *in vitro* IL-1 β Produktion assoziiert worden (120). Der Mechanismus, der dieser Assoziation zugrunde liegt, ist unbekannt, jedoch besitzt die *IL-1RN* VNTR drei potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, die eine mögliche funktionelle Signifikanz implizieren (136).

Kürzlich erschienene Studien haben eine Assoziation zwischen *IL-1* Polymorphismen mit hoher IL-1 β Sekretion und Hypochlorhydrie sowie Magenkarzinomen gefunden: die proinflammatorischen Allele *IL-1B-31/C (-511T)* und *IL-1RA*2* waren häufiger zu finden bei Patienten mit niedriger Säuresekretion und mit Magenkarzinomen als bei Kontrollpatienten (35; 47; 79).

Neben der säurehemmenden Wirkung von IL-1 β könnte die proinflammatorische Wirkung dieses Zytokins für die Beobachtungen verantwortlich sein. IL-1 β trägt wesentlich zur Vermittlung der *H. pylori* induzierten Entzündungsreaktion im Magen bei (38) und könnte auf diese Art und Weise zur Karzinogenese beitragen.

Zum Gegenwärtigen Zeitpunkt ist nicht bekannt welchen Einfluß *IL-1* Polymorphismen auf die Entstehung der Entzündungsreaktion im Magen und auf die Entstehung von präkanzerösen Läsionen haben. Des weiteren ist nicht klar in welcher Weise *IL-1* Polymorphismen die IL-1 β Expression während der *H. pylori* Infektion *in vivo*

beeinflussen. Schließlich ist auch unbekannt, ob die Wirkung der Polymorphismen unabhängig ist, oder an das Vorhandensein bakterieller Virulenzfaktoren gebunden ist.

1.7 Die durch *H. pylori* ausgelöste Immunantwort und Immunpathogenese

Die durch *H. pylori* induzierte Immunantwort kann in eine unspezifische (angeborene, innate) und eine spezifische Immunantwort eingeteilt werden (112). Es wird postuliert, daß die Entzündungsreaktion maßgeblich an der Entstehung der Pathologie im Magen verantwortlich ist (39). Die durch die *H. pylori* Infektion ausgelöste Infiltration der Mukosa mit immunologischen Effektorzellen (aktivierte Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile) führt zu einer Schädigung der epithelialen Integrität durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen, NO, proteolytischen Enzymen und der Induktion von Apoptose (38; 112). Die Schleimhautschädigung ist demnach nicht allein eine Folge direkter Einwirkung von *H. pylori* und dessen Produkten auf das Epithel sondern entsteht auch durch die Infiltration der Mukosa mit Entzündungszellen und konsekutiver entzündungsassoziierter Gewebedestruktion (126).

1.7.1 Angeborene Immunantwort (innate immunity)

Der primäre Abwehrmechanismus von Mikroben ist in der Regel eine granulozytäre und monozytäre Antwort. Bei der initialen Infektion mit *H. pylori* kommt es zu einer starken granulozytären Antwort (126). Interessanterweise persistiert eine neutrophile Komponente auch während der chronischen *H. pylori* Infektion, was für eine besondere Bedeutung dieser Zellen bei der durch *H. pylori* ausgelösten Entzündungsreaktion spricht. Nach Kontakt mit Epithelzellen kommt es zur Induktion der IL-8 Ausschüttung aus diesen Zellen (15; 28). IL-8 ist ein potenter Chemoattraktant für Granulozyten und stimuliert die Degranulierung dieser Zellen (7). Dies trägt zur *H. pylori* induzierten Schleimhautschädigung bei (15; 39). Interessanterweise sind eine Reihe von Genen innerhalb der cagPAI für die NFκB-abhängige Induktion der IL-8 Sekretion aus Epithelzellen notwendig (19; 139). Neben IL-8 spielen auch weitere Chemokine der C-X-C-Familie bei der Vermittlung der granulozytären Antwort eine Rolle, z.B. GRO-α

(152). Darüber hinaus sind die CC-Chemokine MCP-1 und RANTES bei der Chemotaxis von Monozyten und Lymphozyten beteiligt. Der primäre Ursprung dieser CC-Chemokine sind jedoch Immunzellen und nicht Epithelzellen. (152). Noch unklar ist, welche Rolle Toll-like Rezeptoren bei der Vermittlung der innate Immunity spielen.

1.7.2 Spezifische Immunität (adaptive immunity)

Das Vorhandensein von T-Lymphozyten und Plasmazellen im Entzündungsinfiltrat sowie die Ausbildung von Lymphfollikeln läßt vermuten, daß antigen-spezifische zelluläre und humorale Immunmechanismen bei der *H. pylori* Infektion von Bedeutung sind. CD4⁺ T-Zellen (Helferzellen, Th-Zellen) spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der antigen-spezifischen Immunität. Th-Zellen werden in zwei Haupttypen eingeteilt. Th1 Lymphozyten bilden IFN- γ und sind Vermittler von zellulären Immunvorgängen. Im Gegensatz hierzu produzieren Th2 Zellen IL-4, IL-5 und IL-10 und sind bei der Aktivierung von humoralen Immunmechanismen beteiligt, nämlich bei der B-Zell-Aktivierung und Antikörperproduktion (133). Die im Rahmen der *H. pylori* Infektion ausgelöste Th-Zell Antwort ist vom Th1 Phänotyp (91). In der *H. pylori* infizierten Mukosa sind die mRNA Spiegel von IFN- γ und IL-12 erhöht (152). T-Zellen von infizierten Mäusen (127), Rhesus Makaken (86) und Menschen (8; 69) bilden hauptsächlich IFN- γ und nicht IL-4. Darüber hinaus zeigt die Mehrzahl der *H. pylori* reaktiven T-Zell-Klone, die aus Antrumbiopsien von infizierten Patienten generiert wurden, nach Stimulation mit *H. pylori* Antigenen ein Th1-Zytokin-Profil (30). Das wichtigste Zytokin bei der Vermittlung der Th1-Antwort ist IL-12, daß zum größten Teil aus antigenpräsentierenden Zellen stammt (112). Der spezifischste Marker einer Th-1 Antwort ist die IL-12 Rezeptor β 2-Kette (IL-12R β 2). Der IL-12 Rezeptor, bestehend aus zwei Untereinheiten, ist ein typischer Rezeptor, der auf Th-Zellen exprimiert wird (111). Die IL-12R β 2 Kette wird selektiv nur auf Th1-Zellen exprimiert, wohingegen die β 1 Kette auf Th1 und Th2 Zellen vorkommt (116; 132). Die Expression der β 2-Kette wird im Rahmen von Erkrankungen hochreguliert, die durch einen Th1-polarisierten Immunstatus gekennzeichnet sind (104; 157). Ein weiteres Zytokin, das bei einer Th1 vermittelten Immunantwort vermehrt exprimiert wird, ist TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) (153). Obwohl während der *H. pylori* Infektion eine Th1-Antwort prädominiert, was zu einer zellvermittelten Immunität führt, wird auch eine humorale

Immunität beobachtet. *H. pylori* spezifische IgA, IgG und IgM Antikörper können mittels ELISA in einem Drittel der infizierten Patienten im Magensaft nachgewiesen werden (29). Darüber hinaus kann in mehr als 90% der infizierten Patienten *H. pylori* spezifisches IgG im Serum nachgewiesen werden (75).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, welchen Einfluß bestimmte bakterielle Virulenzfaktoren und genetische Variationen des Menschen auf die Entstehung von schweren histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut im Rahmen der *H. pylori* Infektion haben. Des weiteren sollten Wirkmechanismen dieser Faktoren beschrieben werden. Hierzu wurde einerseits eine über 700 Patienten umfassende Magenbiopsiebank aufgebaut. Dies erlaubt simultane genetische und histologische Untersuchungen am Menschen und am infizierenden Keim an einem großen Patientenkollektiv. Andererseits sollten Ergebnisse aus Untersuchungen an der Biopsiebank und die dadurch entstehenden Assoziationen mit Hilfe von funktionellen *in vitro* Experimenten weiter erhärtet werden.

Im ersten Teil der Arbeit sollte der Einfluß von humanen Polymorphismen in den Genen *IL-1B* und *IL-1RN* auf die IL-1 β Expression und die Entstehung von histologischen Veränderungen der Magenmukosa während der Infektion untersucht werden. Proinflammatorische Polymorphismen in diesen Genen wurden mit Magenkarzinomen assoziiert (34). Ziel war es den funktionellen Zusammenhang zwischen diesen genetischen Variationen und der IL-1 β Expression zu finden und andererseits die Konsequenz für die resultierende Inflammation aufzudecken. Gleichzeitig sollte parallel der Einfluß der bakteriellen Virulenzfaktoren CagA und VacA auf die Entstehung von hochgradigen histologischen Veränderungen untersucht werden. Eine weitere Frage war, wie sich das gleichzeitige Vorhandensein von bakteriellen Virulenzfaktoren und von genetischen Risikofaktoren des Menschen auf die Entstehung von gastraler Histopathologie auswirkt. Ein wichtiges Ziel war hierbei die Identifikation von Patienten mit hohem Risiko zur Entstehung von Krebsvorstufen um solche Patienten einer frühzeitigen präventiven Eradikation zuführen zu können.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte im speziellen auf ein erst kürzlich identifiziertes bakterielles Adhäsion (BabA) eingegangen werden. Hierbei war von Interesse, welche

Bedeutung BabA für die Entstehung einer spezifischen und unspezifischen Immunantwort spielt. Es stellte sich die Frage, wie BabA die durch *H. pylori* induzierte Th1-Antwort und die unspezifische Chemokinantwort beeinflusst. Des Weiteren sollte untersucht werden, inwieweit der BabA-Rezeptor auf der Magenschleimhaut, Lewis^b in der Population vorhanden ist. Nicht bekannt war zudem, welchen Einfluß das Adhäsin auf die bakterielle Kolonisationsfähigkeit hat, und wie die Kolonisationsstärke die resultierende Inflammation und Immunpathogenese beeinflusst. Umfangreiche molekularbiologische und histologische Untersuchungen an der Biopsiebank und *in vitro* sollten diese Fragen klären.

2 Material und Methoden

2.1 Anlegen einer Biopsiebank von 742 Patienten

2.1.1 Patientenpopulation

Je 5 Biopsien aus dem Antrum und Corpus wurden von 742 Patienten im Zeitraum zwischen 1996 und 2002 im Rahmen von Routineendoskopien gesammelt. In die Studie eingeschlossen waren Patienten mit chronischer *H. pylori* assoziierter Gastritis. Aus der Studie ausgeschlossen wurden Patienten, die sich einer Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren, H₂-Rezeptorantagonisten oder NSAR unterzogen, und solche mit endoskopisch gestellter Diagnose eines Ulcus ventriculi oder duodeni sowie Patienten mit Magenkarzinom.

2.1.2 Sammlung und Bearbeitung von Biopsiematerial

Biopsien wurden an der Technischen Universität von München sowie am Akademischen Lehrkrankenhaus München-Bogenhausen gesammelt. Von jedem Patienten wurden 10 gastrale Biopsien entnommen (5 aus dem Corpus, 5 aus dem Antrum). Je zwei Corpus- und Antrumbiopsien wurden zur histologischen Untersuchung und zum *H. pylori* Nachweis in das Institut für Pathologie geschickt. Die restlichen sechs Biopsien wurden in Eppendorftubes aufgenommen und sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um eine Degradation von Nukleinsäuren zu vermeiden. Anschließend wurde das Biopsat gemörsert und entweder unverzüglich weiterverarbeitet (DNA- oder RNA-Isolierung), oder sofort wieder eingefroren und bis zur Weiterverwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.1.3 Histopathologische Untersuchung der Biopsien

Je zwei Antrum- und Korpusbiopsien gelangten in das Institut für Pathologie, wo einerseits die histologische Gastritisklassifizierung und andererseits eine Untersuchung auf *H. pylori* erfolgte. Die histologische Beurteilung der gastralen Pathologie erfolgte an

Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitten. Um interindividuelle Unterschiede bei der Auswertung zu vermeiden wurden alle Biopsien von Frau PD Dr. Ingrid Becker (Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie, Klinikum rechts der Isar der TU München) untersucht. Der direkte *H. pylori* Nachweis erfolgte an HE-gefärbten Schnitten bzw. zum Teil nach immunhistochemischer Färbung. Desweiteren erfolgte eine Gastritis-Klassifizierung entsprechend der "updated" Sydney-Klassifikation (31). Sie beinhaltet eine Kombination von topographischen, morphologischen und ätiologischen Informationen und klassifiziert diese Veränderungen anhand endoskopischer und histologischer Kriterien. Hierbei wurden einerseits die verschiedenen Grade der granulozytären und lymphozytären Infiltration sowie die Präsenz von intestinaler Metaplasie (IM) und Atrophie (AG, atrophische Gastritis) erfaßt. Das Ausmaß der granulozytären Infiltration bestimmt die Aktivität der Gastritis. Neutrophile finden sich dabei nahezu ubiquitär in der gesamten Magenschleimhaut in der Lamina propria, im Epithel und auch im Drüsenlumen, wo sie Grübchenabszesse bilden. Man unterscheidet hierbei verschiedene Stärken der neutrophilen Infiltration (G0 keine, G1 milde, G2 mäßige, G3 ausgeprägte granulozytäre Infiltration). Die gesunde Magenmukosa enthält nur sehr wenige mononukleäre Zellen (CD4/CD8 positiven Lymphozyten, B-Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten, Mastzellen). Bei der Beurteilung der Chronizität der Gastritis unterscheidet man verschiedene Grade der lymphozytären Infiltration (L0 keine, L1 milde, L2 mäßige, L3 ausgeprägte lymphozytäre Infiltration). Die mononukleären Infiltrationen verschwinden nach Eradikation nur sehr langsam, wohingegen die Granulozyten bereits wenige Tage nach Beginn der Eradikation nicht mehr nachweisbar sind (148). Die Atrophie der spezialisierten Magenschleimhaut wird als Untergang von Drüsengewebe und Ausdünnung der gastralen Mukosa definiert. Sie führt durch den Verlust von Parietalzellen zu einer verminderten Magensäuresekretion und ist hierbei mit einem erhöhten Risiko der Karzinomentwicklung assoziiert (108; 130). Die intestinale Metaplasie entsteht auf dem Boden einer chronischen Gastritis. Sie ist durch den Nachweis von Becherzellen, wie man sie normalerweise nur in der Schleimhaut des Dünndarmes findet, charakterisiert. Es werden folgende Typen der intestinalen Metaplasie unterschieden: Typ I (= komplett), Typ II (= inkomplett) und 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 Sulfomycin-sezernierenden Typ) aus (130).

2.2 Isolation von Nukleinsäuren

2.2.1 Isolation von DNA

2.2.1.1 Materialien

- QIAamp Tissue Kit (Quiagen, Hilden)
- 96% Ethanol (Merck, Darmstadt)
- Proteinase K (Sigma, Deisenhofen)

2.2.1.2 Prinzip und Durchführung der DNA-Isolation

Der erste Schritt der DNA-Isolation umfaßt die Lyse des Gewebes. Hierbei wurden nach Mörsern der Biopsie 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (Sigma) auf das Gewebe gegeben, geschüttelt, und mindestens 3h bei 55°C inkubiert. Im zweiten Schritt wurde die DNA durch die Zugabe von 200 µl AL-Puffer und die anschließende 10-minütige Inkubation bei 70°C ausgefällt. Als Nächstes folgte die Trennung der DNA von den restlichen Bestandteilen der Biopsie. Hierzu wurden der Lösung 210 µl Ethanol (96-100%) zugegeben, gut geschüttelt und die Mischung auf eine Säule aufgetragen. Bei der anschließenden Zentrifugation (6000 g, 1 Minute) wurde die DNA in der Silicamembran der Säule gebunden, während die restlichen Biopsiebestandteile im Sammel tube aufgefangen und verworfen wurden. Das Waschen der DNA erfolgte dann mit 500 µl AW-Puffer (Auftragung auf die Säule und Zentrifugation bei 6000 g für 1 Minute). Der Waschschritt wurde wiederholt, wobei nun das Zentrifugieren bei 10000 g und für 3 min erfolgte. Zuletzt wurde die DNA zweimal eluiert. Hierzu stellte man die Säule in ein Eppendorf-Tube, gab 200 µl AE-Puffer (auf 70°C vorgewärmt) auf die Säule und zentrifugierte diese bei 6000 g für eine Minute. Die aufgefangene DNA-Lösung wurde bis zur Weiterverwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2 Isolation von RNA

2.2.2.1 Materialien

- peqGOLDTrifast Reagenz (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- Chloroform (Merck)
- Isopropylalkohol (Merck)
- 70% Ethanol (Merck)
- RNase freies Wasser (Merck)

2.2.2.2 Prinzip und Durchführung der RNA-Isolation

Die RNA-Isolierung erfolgte nach der von Chomczynski und Mitarbeitern entwickelten Methode (21). Der erste Schritt umfaßte die Zellyse. Hierbei wurden KATO-III Zellen bzw. die gemörserte Biopsie in 1 ml peqGOLDTrifast Reagenz aufgenommen und 30 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der anschließenden Phasenpräparation wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt, die Probe 15 Sekunden mit der Hand geschüttelt und 15 bis 30 Minuten, bis zur Bildung von zwei Phasen, auf Eis inkubiert. Die Probe wurde dann 30 Minuten bei 4°C mit 12000 g zentrifugiert (Eppendorf Kühlzentrifuge 5403). Im nächsten Schritt erfolgte die Phasenpräparation, wobei die wäßrige obere Phase, welche die RNA enthält, abgenommen und mit 500 µl Isopropylalkohol vermischt wurde. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe bei 4°C und 12000 g für 45 Minuten zentrifugiert (Präzipitation). Der Überstand wurde dann abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde dann zwei Mal mit je 1 ml 75 % igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation mit 12000 g für jeweils 15 - 30 Minuten). Nach restloser Entfernung des Alkohols aus dem Tube wurde das Pellet 10 Minuten getrocknet und schließlich in 50 ml RNase freiem Wasser aufgenommen.

2.2.2.3 Maßnahmen zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen

Um einen Abbau der RNA durch exogene RNasen zu vermeiden, wurden folgende Maßnahmen ergriffen: Frisch isolierte RNA-Pellets wurden in Rnase-freiem Wasser aufgenommen. Bei allen Arbeitsschritten wurden Einmalhandschuhe getragen und diese

regelmäßig gewechselt. Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Lösungen wurden 2 Stunden bei 121°C und 2 Bar autoklaviert und anschließend 4 Stunden bei 100°C getrocknet. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis ausgeführt.

2.2.2.4 Zusätzliche Reinigung der RNA

Da die erhaltene RNA Inhibitoren der cDNA-Synthese enthielt, wurde eine zusätzliche Aufreinigung mittels einer Lithiumchloridfällung notwendig. Hierzu wurde die RNA-Lösung in äquivalentem Volumen 8 M LiCl aufgenommen, geschüttelt, und über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach einer dreistündigen Inkubation bei -4°C (oder -20°C über Nacht) wurde die Lösung für 30 Minuten bei 10000g und 4° C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet in einem weiteren Zentrifugationsschritt mit 70% igem Ethanol gewaschen. Zuletzt erfolgte die Auflösung der RNA in RNase freiem Wasser.

2.2.3 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die isolierten Nukleinsäurekonzentrationen wurden mit einem Photometer (Beckman DU 640 Spectrometer) bestimmt. Die Konzentration errechnet sich dabei durch folgende Formel:

$$\text{Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = OD_{260\text{ nm}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 40$$

Für die quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren muss der Faktor 40 eingesetzt werden, da 1 OD einer Konzentration von 40 µg/ml entspricht.

2.3 Reverse Transkription

2.3.1 Prinzip der Reversen Transkription

Bei der reversen Transkription erfolgt mit Hilfe einer reversen Transkriptase die Umschreibung von RNA in komplementäre DNA (cDNA). Die reverse Transkriptase stammt aus Viren, z.B. dem Affen-Myeloblastosis-Virus (AMV) oder dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV). Sie synthetisiert einen neuen cDNA-Strang, der festgelegt ist durch den benutzten Primer. Verwendet man ein Gemisch aus kurzen Oligonukleotiden mit zufälliger Sequenz (= Random Primer), findet die Transkription an verschiedenen, unspezifischen Stellen der RNA statt. Will man nur eine bestimmte RNA-Sequenz umschreiben, verwendet man einen genspezifischen Primer. Die aus der reversen Transkription resultierende cDNA kann in einer Polymerase-Ketten-Reaktion eingesetzt werden um die Genexpression zu analysieren.

2.3.2 Reagenzien

In der vorliegenden Studie wurde die reverse Transkription initial mit 2 verschiedenen Reversen Transkriptasen durchgeführt (Superscript Reverse Transkriptase von der Firma Gibco und Multiscribe Reverse Transkriptase von der Firma Perkin Elmer).

Tabelle 1. Reagentien für die reverse Transkription mit Superscript Reverse Transcriptase (Gibco BRL, USA)

5x Reaktionspuffer	Tris	250 mM
	KCl	375 mM
	MgCl ₂	15 mM
	pH	8,3
Dithiothreitol (DTT)		1 mM
Deoxynucleotid-Mix	dATP	je 10 mM
	dTTP	
	dCTP	
	dGTP	
Primer	Random Primer (dN) ₆	0,02A ₂₆₀ Units/μl
	Superskript™ II	200 Units/μl

Tabelle 2. Reagentien für die reverse Transkription mit Multiscribe Reverse Transcriptase (TaqMan Reverse Transcription Reagents, Perkin Elmer, Weiterstadt)

10x TaqMan Puffer 1	KCl	500 mM
	Tris-HCl	100 mM
	pH	8,3
dNTPs	dATP	je 2,5 mM
	dTTP	
	dCTP	
	dGTP	
Random Primer	[d(N) ₆]	50 µM
MgCl ₂		25 mM
Reverse Transkriptase	MultiScribe	50 U/µl
RNAse Inhibitor		20 U/µl

Da die RT-PCR mit dem Multiscribe Enzym in der nachfolgenden real-time TaqMan PCR eine höhere Spezifität und Sensitivität erbrachte, sowie einer bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bedingte, wurde quantitative Zytokinanalyse der Biopsiebank nur die Multiscribe Reverse Transkriptase benutzt.

2.3.3 Durchführung der Reversen Transkription

Folgendes Arbeitsprotokoll wurde für die Synthese von 20 µl cDNA mit der Superscript Reversen Transkriptase angewendet:

Ansatz 1: 1 µl Random Primer (1:4 verdünnt)
 11 µl RNA-Lösung

Es erfolgte eine 10-minütige Inkubation des Ansatzes 1 bei 70°C. In der Zwischenzeit wurde der 2. Ansatz hergestellt:

Ansatz 2: 4 µl 5x First Strand Buffer
 2 µl 0,1 M DTT
 1 µl 10 mM dNTP Mix
 1 µl Superscript

Dieser Ansatz wurde zum ersten Reaktionsgemisch pipettiert. Anschließend wurde der Gesamtansatz im Primus Thermocycler 9600 (MWG Biotech, Ebersberg) folgenden Temperaturschritten ausgesetzt:

25°C 10 min
42°C 50 min
70°C 15 min

Bis zur Verwendung wurden die Proben bei –20°C aufbewahrt

Folgender Ansatz wurde zur Synthese von 50 µl cDNA mit der Multiscribe Reversen Transkriptase erstellt:

5 µl	RNA
15µl	H ₂ O dest.
11 µl	MgCl ₂
10 µl	dNTP-Mix
5 µl	RT-Puffer
2,5 µl	Random Primer
1 µl	RNAse Inhibitor
0,5 µl	Reverse Transkriptase

Das Reaktionsgemisch wurde dann im Thermocycler folgenden Reaktionsschritten ausgesetzt:

25°C 10 min
48°C 30 min
95°C 5 min

Bis zur Verwendung wurden die Proben bei –20°C aufbewahrt

2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.4.1 Prinzip der PCR

Die PCR ist eine *in vitro* Technik zur gezielten Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Analog zur DNA-Replikation in eukaryotischen Zellen erfolgt die Amplifikation von DNA-Abschnitten bei der PCR mittels einer DNA-Polymerase. Diese benötigt als Starthilfe Oligonukleotidprimer. Dabei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu einer definierten Sequenz der DNA-Matrize sind und sich an diese anlagern. Auf diese Art und Weise können gezielt ganz bestimmte DNA-Abschnitte amplifiziert und anschließend nachgewiesen werden. Die PCR ist ein Verfahren, welches in Zyklen verläuft. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten mit wechselnden Temperaturen. Im ersten Schritt (Denaturierung) bei 95°C kommt es zu einer Trennung von DNA-Doppelsträngen. Im zweiten Schritt (Annealing) bei 37-65°C kommt es zur Anlagerung der Primer an die Zielsequenz. Die Anlagerungstemperatur richtet sich nach GC-Gehalt und Länge der verwendeten Primer. Schließlich kommt es im letzten Schritt (Extension) bei 72°C zur Kettenverlängerung durch die Polymerase. Durch 20-40-fache Wiederholung eines solchen Zyklus erfolgt eine, exponentiell steigende Anreicherung des Amplifikates.

2.4.2 Primer für die PCR

Die für die *H. pylori*-Typisierung und für die Genotypisierung von *IL-1* Polymorphismen verwendeten Primer wurden anhand der in Genbank™ publizierten Sequenzen erstellt. Hierbei wurde darauf geachtet, daß die Primersequenzen zwischen 17 und 25 Basen lang waren, einen GC-Gehalt von 50 - 60 % aufwiesen und ähnliche Schmelztemperaturen hatten. Die Primer wurden bei der Firma MWG Biotech synthetisiert. Die lyophilisierte DNA wurde in sterilem Wasser aufgenommen, wobei jeweils eine Primerkonzentration von 20 pM erstellt wurde. Die Sequenzen der Primer mit den dazugehörigen Annealingtemperaturen und Zykluszahlen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3. Primer für die PCR

PCR-Produkt	T_m^a		Primersequenzen
<i>Urease B</i>	58°C	FP ^b	5'- TTCACCCCAACAAATCCCTACAG -3'
685 bp		RP ^c	5'- ACGGCCCATCGCTTGAGAGT -3'
<i>cagA</i>	59°C	FP	5'- GTATGGGGGCAATGGTGGTC -3'
567 bp		RP	5'- GATTCTTGGAGGCGTTGGTGTAT -3'
<i>babA2</i>	56°C	FP	5'- AATCAAAAAAGGAGAAAAAGTATGAAA -3'
830 bp		RP	5'- TGTTAGTGATTTTCGGTGTAGGACA -3'
<i>vacAs</i>	56°C	FP	5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3'
^d 259/284 bp		RP	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'
<i>IL-1RN</i>	50°C	FP	5'-CTCAGCAACACTCCTAT-3'
^e 240-595bp		RP	5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA-3'.
<i>IL-1B-511</i>	55°C	FP	5'-TGGCATTGATCTGGTTCATC-3'
304 bp		RP	5'-GTTTAGGAATCTTCCCCTT-3'.

^aAnnealingtemperatur; ^bForwärtsprimer; ^cRückwärtsprimer;

^d *vacAs1*=259 bp, *vacAs2*=284 bp;

^e Allel-1 (A1) = 410 bp, A2 = 240 bp, A3 = 500 bp, A4 = 325 bp, A5 = 595 bp

2.4.3 Materialien und Durchführung der PCR

Alle konventionellen PCRs wurden mit dem *Taq* PCR Master Mix Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Dieser enthält folgende Inhaltsstoffe: steriles H₂O_{dest.} und einen Master Mix bestehend aus Reaktionspuffer, *Taq* Polymerase und dNTPs. Folgender Ansatz wurde für ein 25 µl Reaktionsgemisch mit Quiagen Master Mix angewandt:

Quiagen MM:	12,5 µl
H ₂ O steril	9,0 µl
Primer 1	0,5 µl
Primer 2	0,5 µl
DNA	2,5 µl (ca. 100ng)

Der Reaktionsansatz wurde in einem Primus Thermo-Cycler 9600 (MWG Biotech, Ebersberg) amplifiziert. Amplifikationsprogramm:

1 Zyklus	Denaturierung:	94° C	5 min
	Anlagerung:	X° C	1 min
	Extension:	72° C	1 min
30 - 35 Zyklen	Denaturierung:	94° C	45 s
	Anlagerung:	X° C	55 s
	Extension:	72° C	1 min
	Extension:	72° C	10 min

X° C = Annealingtemperatur des jeweiligen Primerpaares.

2.5 Agarose-Gelelektrophorese

2.5.1 Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäure-Fragmente durch Wanderung entlang eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach aufgetrennt. Durch Anfärben mit Ethidiumbromid können die Fragmente im UV-Licht (Wellenlänge 254 nm) sichtbar gemacht werden. Dies ermöglicht einerseits die Überprüfung der Qualität von RNA-Molekülen. Im Falle einer RNA-Degradation ist die ribosomale RNA nicht in zwei Banden angeordnet sondern liegt als „Schmier“ über der ganzen Laufstrecke verteilt vor. Andererseits erlaubt Agarose Gelelektrophorese die Größenbestimmung von DNA-Molekülen durch Vergleich mit einem Längenstandard sowie die gezielte Isolierung eines bestimmten DNA-Fragments mittels Gelextraktion.

2.5.2 Agarose Gele für die RNA-Elektrophorese

Bei der Herstellung eines 50 ml RNA-Gels wurden 0,5 g Agarose, 5 ml 10x MOPS-Puffer und 45 ml RNase-freies Wasser (siehe Tabelle 4) vermischt und im Mikrowellenherd zum Kochen gebracht. Nach Abkühlung des Gels auf ca. 40°C wurden 870 µl Formaldehyd zugegeben, das Gel gerührt und anschließend in eine

Gelwanne im Gießstand gegossen. Durch Einsetzen eines Kammes können Taschen im Gel ausgespart werden.

Tabelle 4. Materialien für die Herstellung eines Agarosegels für die RNA-Gelelektrophorese

10 x MOPS-Puffer	MOPS (Morpholinpropansulfonsäure; Merck)	41,8 g
(Tris-Acetat-EDTA-Puffer)	NaOAc (Merck)	4,1 g
	EDTA (Merck)	3,7 g
	H ₂ O dest.	ad 1l; pH 8,5
6x Probenauftragspuffer	Ficoll 400 (Amersham Pharmacia Biotech Europe)	25%
	EDTA (Merck)	50 mM
	Bromphenolblau (Merck)	0,25 %
	Xylencyanol (Merck)	0,25 %
Ethidiumbromid (Merck)	EtBr	10 mg/ml
weitere Materialien	Ultrapure Agarose (Gibco BRL, Karlsruhe), Rnase freies Wasser (Sigma), Formaldehyd (Sigma)	

2.5.4 Agarose Gele für die DNA-Elektrophorese

Die für die DNA-Elektrophorese benutzten Materialien sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Die Agarosekonzentration im Gel sollte abhängig gemacht werden von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente. Je kleiner die DNA-Fragmente, desto höher sollte die Agarosekonzentration im Gel sein. Da die Größe aller untersuchten PCR-Produkte unter 1000 Basenpaaren (bp) lag, wurden in dieser Arbeit 2-3%ige Gele verwendet. Für die Herstellung eines 100 g Gels wurden 2-3 g Ultrapure Agarose (Gibco BRL Karlsruhe) in 98 ml Wasser aufgelöst und in einem konventionellen Mikrowellenofen kurz zum Kochen gebracht. Unter ständigem Rühren muß eine Abkühlung des Gels auf etwa 40°C abgewartet werden, ehe man 5 µl Ethidiumbromid hinzufügt. Anschließend wird das Gel in eine Gelwanne im Gelgießstand gegossen. Durch Einsetzen eines Kammes können Taschen im Gel ausgespart werden.

Tabelle 5. Materialien für die Herstellung eines Agarosegels für die DNA-Gelelektrophorese

50 x TAE-Puffer	Tris (Merck)	2,0 M
(Tris-Acetat-EDTA-Puffer)	Eisessig (Merck)	1,0 M
	EDTA (Merck)	0,1 M
	H ₂ O dest.	ad 1000 ml; pH 8,5
weitere Materialien	Ultrapure Agarose, Ethidiumbromid, Probenauftrags-puffer	

2.5.6 Elektrophoreselauf und Dokumentation

Für die Gelelektrophorese wurde ein horizontales Gelelektrophoresesystem (BioRad GmbH, München) verwendet. Hierbei wurde die Gelwanne mit dem festen Agarose-Gel in die Elektrophorese-Kammer gestellt, mit 1x Puffer bedeckt (MOPS-Puffer für RNA-Elektrophorese, TAE-Puffer für DNA-Elektrophorese) und der Kamm vorsichtig entfernt. Bei der Elektrophorese von DNA-Molekülen wurden jeweils 15 µl eines PCR-Produktes mit 3 µl 6x Probenauftragspuffer vermischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Durch paralleles Mitlaufen eines Längenstandards bei der Elektrophorese kann die ungefähre Größe der unbekanntenen DNA-Fragmente am Gel abgelesen werden. In dieser Arbeit wurde der Längenstandard Bioladder™ (Hybaid Angewandte Gentechnologie Systeme, Heidelberg) von 100 bis 1000 Basenpaaren (bp), in 100 bp Schritten verwendet. Bei der Elektrophorese von RNA-Molekülen wurden jeweils 5 µl RNA mit 3 µl einer Lösung aus Ethidiumbromid und Probenauftragspuffer vermischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 50-90 Volt. Eine Sichtbarmachung von DNA-Molekülen im Gel wird durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid möglich, welches unter UV-Licht (bei einer Wellenlänge von 254 nm) sichtbar wird. Mit Hilfe eines Video-Dokumentationssystems (MWG-Biotech) wurde das Gel digital photographiert.

2.5.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Gelextraktion erlaubt die Isolierung von spezifischen DNA-Fragmenten, die beispielsweise im Rahmen einer PCR amplifiziert wurden. Es wurde hierzu der QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Im ersten Schritt wurde der Gelstreifen, welcher die DNA-Bande enthielt unter UV-Licht aus dem restlichen Gel

geschnitten, in dreifachem Volumen an Puffer QG aufgenommen und unter Schütteln bei 50°C aufgelöst. Im zweiten Schritt wurde die DNA durch Zugabe von Isopropanol (Merck) präzipitiert. Dabei sollte das Isopropanolvolumen dem des anfänglich ausgeschnittenen Gelvolumens gleichen. Anschließend erfolgte die Trennung der DNA von den restlichen Gelbestandteilen durch Auftragung der Lösung auf eine entsprechende Säule und nachfolgender Zentrifugation (10000 g, 1 Minute). Die DNA wurde hierbei an die Silicamembran der Säule gebunden, während restliche Bestandteile der Lösung im Sammel-Tube aufgefangen und verworfen werden. Der nächste Schritt umfaßte das zweimalige Waschen der DNA (0,75 ml Puffer PE auf die Säule; Zentrifugation bei 10000 g für 1 Minute). Die Waschflüssigkeit wurde im Sammel-Tube aufgefangen und verworfen. Zuletzt erfolgte die DNA-Elution (50 µl Puffer EB auf die Säule; Zentrifugation für 1 Minute bei 10000 g). Die DNA Lösung wurde im Sammel-Tube aufgefangen und bis zur Weiterverwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.6 Klonierung von PCR-Produkten

2.6.1 Prinzip der Klonierung

Die Klonierung von PCR-Produkten beinhaltet den Einbau einer DNA-Sequenz in einen Vektor (Ligation) und das anschließende Einschleusen des Vektors in ein Bakterium (Transformation), dessen Vermehrung eine Vervielfältigung des Vektors bedingt. Für die Klonierung der PCR-Produkte wurde in dieser Arbeit der TA-Vektor pGEM[®]-T Vektor angewandt. TA-Vektoren enthalten an der Insertionsstelle an den 3'- Enden je ein Thymidinrest. Bestimmte Polymerasen, u.a. auch die von uns benutzten Taq-Polymerasen, hängen an das 3'- Ende des PCR-Produktes ein Adeninrest. Die überhängenden T- und A-Basen im Vektor und Amplikon erleichtern die Ligation. Die anschließende Transformation erfolgt durch ein Hitzeschock, wobei die Bakterienwand kurzzeitig permeabel wird für bestimmte Moleküle und das Bakterium zur Aufnahme des Plasmids befähigt. Die Bakterien werden dann auf Selektivnährböden angezüchtet. Da der pGEM[®]-T Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen enthält, wachsen nur erfolgreich transfezierte Bakterien auf den Selektivnährböden. Der Erfolg der Ligation kann durch Beimpfen des Nährbodens mit X-Gal und IPTG getestet werden. Im pGEM[®]-T Vektor ist nämlich ein β -Galaktosidase-Gen eingebaut, welches Galaktose (X-Gal) spalten

kann. IPTG fungiert dabei als Enhancer der Reaktion. Bei Insertion des PCR-Produktes wird jedoch dieses Gen zerschnitten und damit inaktiviert. Ist die Insertion jedoch nicht erfolgreich verlaufen, kann X-Gal gespalten werden. Dies führt zu einer Blaufärbung der Kolonien. Eine weitere, genauere Überprüfungsmöglichkeit des Insertionserfolges ist die Restriktionsspaltung des Vektors mittels Restriktionsenzymen deren Schnittstellen im Vektor rechts und links des Inserts liegen. Dies ermöglicht eine nachfolgende Bestimmung der Insertgröße mittels Gelelektrophorese.

2.6.2 Reagenzien, Medien und Selektivnährböden

Table 6. Für die Klonierung verwendete Reagenzien.

T4 Ligase 10X Puffer (Promega)	Tris-HCl	300 mM, pH 8,7
	MgCl ₂	100 mM
	DTT	100 mM
	ATP	10 mM
T4 DNA Ligase (Promega)		100 U
pGEM [®] -T Vector (Promega)		50 ng/μl
JM 109 Competente E. coli (Promega)		
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-β-D-Galaktopyranosid, Sigma)		
IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid, ICN)		

Table 7. Reagenzien für die Herstellung von LB-Medium.

Hefeextrakt (Sigma)	0,5%
Bacto-Trypton (Sigma)	1%
NaCl	1%
Aqua dest, pH 7.6 (eingestellt mit 1N NaOH)	ad 1000 ml

Bei der Herstellung von LB-Medium wurden 10 g Trypton, 5 g Yeast extract und 10 g NaCl mit 950 ml Aqua dest. vermischt. Der pH-Wert wurde durch Titration mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert. Bei Abkühlung auf unter 50° C wurden 50 mg/ml Ampicillin dazugegeben. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Bei Gebrauch kann ein Antibiotikum zugegeben werden. Zur Herstellung von Nährböden wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 15g/l Bacto-Agar zugegeben. Nach dem Autoklavieren ließ man das Medium auf ca. 50°C abkühlen und gab 50

mg/ml Ampicillin dazu. Anschließend wurden die Platten ausgegossen. Bis zum Gebrauch wurden die Petrischalen umgedreht bei 4°C gelagert.

Table 8. Reagenzien für die Herstellung von SOC-Medium.

<i>Bacto</i> [®] -Tryptone (Promega)	2 g
<i>Bacto</i> [®] -Yeast Extract (Promega)	0,5g
NaCl (Promega)	1 M, 1 ml
KCl (Promega)	1 M, 0,25 ml
Glukose (Promega)	2 M, 1 ml
2 M Mg ²⁺ Stock (Promega), 1 ml	1 M MgCl ₂ , 1 M MgSO ₄
Aqua dest.	97 ml

Bei der Herstellung von SOC-Medium wurden Tryptone, Yeast Extrakt, NaCl, KCl und Aqua dest. vermischt und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden Glukose und Mg²⁺-Stocklösung hinzugegeben und der pH mittels NaOH-Titration auf 7,0 eingestellt. Das Medium wurde dann durch eine 0,2 µm Filtereinheit filtriert und bei 4°C gelagert.

2.6.3 Durchführung der Klonierung

Zunächst erfolgte die Ligation des PCR-Produktes in den Vektor, wobei folgendes Pipettierschema angewandt wurde:

T4 DNA Ligase 10X Puffer	1 µl
pGEM [®] -T Vektor	1 µl
PCR-Produkt	1,5 µl (3 : 1 molares Verhältnis zu Vektor)
T4 DNA Ligase	1µl
H ₂ O	5,5 µl (zu einem Endvolumen von 10µl)

Die so erhaltene Lösung wurde geschüttelt und für mindestens 3 h bei 4°C inkubiert. Im zweiten Schritt wurde die Transformation von E. coli durchgeführt. Zuerst wurden 2 µl Ligationslösung und 50 µl JM109-Zellen zusammen pipettiert, durch vorsichtiges Schütteln vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 50 sec einem Hitzeschock (42°C) ausgesetzt und sofort wieder für 2 min auf Eis gelegt.

Nach Hinzufügen von 950 µl SOC-Medium zur Lösung wurde diese einem weiteren Inkubationsschritt ausgesetzt (37°C, 90 min, unter Schütteln). Das Anzüchten der Kolonien erfolgte auf Ampicillin-haltigen Selektivnährböden. Diese wurden mit je 40 µl X-Gal und IPTG beimpft und 30 min inkubiert. Anschließend wurden pro Platte 100 µl der Transformationslösung auf der Platte verteilt. Diese wurde 16-24 h bei 37°C inkubiert. Weiße Kolonien wurden anschließend über Nacht in LB-Medium vermehrt. Das Vorhandensein der gewünschten Sequenz wurde mittels PCR oder Restriktionsverdau und anschließender Gelelektrophorese bestätigt.

2.6.4 Plasmidisolation

Die Plasmidisolation wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits von der Firma Quiagen durchgeführt. *E. coli* Kulturen wurden in LB Medium angezogen. Nach Zentrifugation wurde das Bakterienpellet mit 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Anschließend erfolgte die alkalische Lyse der Bakterien mittels Zugabe von 250 µl Puffer P2 (Lysispuffer). Die Lösung wurde dann vorsichtig geschüttelt, bis sie viskös und klar war. Nach Zugabe von 350 µl Puffer N3 und leichtem Schütteln erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei 10000 g. Der Überstand wurde auf mitgelieferten Säulen aufgetragen und diese 30-60 sec bei 10000 g zentrifugiert. Hierbei wird die DNA an der Membran der Säule gebunden. Anschließend erfolgte das zweimalige Waschen der DNA mit 0,5 ml Puffer PB bzw. 0,75 ml Puffer PE. Zuletzt wurde die DNA aus der Säulenmembran mit 50 µl Puffer EB eluiert. Das Eluat wurde in einem Eppendorftube aufgefangen und bis zur Weiterverwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.7 Restriktionsfragment Längenpolymorphismus (RFLP) Analyse

Die RFLP Analyse ist eine Methode zum Nachweis von DNA-Mutationen. Hierbei macht man sich die Eigenschaft von Restriktions-Endonukleasen zu Nutze, sequenzspezifisch DNA zu spalten. Durch eine Einzelbasenmutation kann es zur Schaffung oder zur Entfernung einer Restriktionsstelle in der DNA kommen. In der gegenwärtigen Studie wurde der -511C/T SNP im *IL-1B* Gen mittels RFLP Analyse

genotypisiert. Hierbei wurde der entsprechende Genabschnitt zunächst per PCR amplifiziert. 20 µl PCR Produkt wurden dann mit 10 Units *AvaI* Enzym bei 37°C für 3 Stunden verdaut und anschließend mittels Elektrophorese auf einem 3%-igen Agarosegel nachgewiesen. Während das C-Allel geschnitten wurde (190 bp und 114 bp Produkte) ist beim T-Allel die Restriktionsschnittstelle entfernt, so daß das PCR-Produkt nicht verdaut wurde. Es resultierten deshalb bei homozygoten C-Allel Trägern zwei Banden (190 bp und 114 bp), bei homozygoten T-Allel-Trägern ein Bande (304 bp) und bei Patienten mit Heterozygotie drei Banden.

2.8 Real-time quantitative TaqMan RT-PCR

2.8.1 Prinzip der quantitativen RT-PCR

Real-time TaqMan PCR ist eine neue, hochempfindliche Methode zur quantitativen DNA- und cDNA-Analyse, die sich die 5' → 3' Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA Polymerase zu Nutze macht. Sämtliche Schritte der herkömmlichen PCR laufen auch bei der TaqMan PCR in der gleichen Weise ab. Zur Quantifizierung wird eine spezielle fluoreszente Sonde (Probe) eingesetzt. Sie besteht aus einem Oligonukleotid, dessen Enden mit Farbstoffen markiert sind: das 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporterfarbstoff (Fluoreszeinderivat), das 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff (Rhodaminderivat). Die Sonde ist in ihrer Nukleotidsequenz spezifisch für die zu amplifizierende DNA-Matrize. Während der PCR hybridisiert sie deshalb zusammen mit den Primern am Matrizenstrang. Solange die Sonde intakt ist, ist die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes sehr gering. Aufgrund der räumlichen Nähe der zwei Farbstoffe unterdrückt nämlich der Quencher die Reporterfluoreszenz. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz-Energie-Transfer (FET) bezeichnet. In der Extensionsphase trifft die Taq Polymerase nun auf die Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5' → 3' Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA Polymerase aktiviert und die Sonde geschnitten wird. Hierbei wird die räumliche Nähe – und damit auch die FET – zwischen den beiden Farbstoffen unterbrochen, was zu einer Zunahme der Reporterfluoreszenz führt. Da freie, nicht hybridisierte Sonde nicht gespalten wird, ist die Zunahme der Reporterfarbstofffluoreszenz zu jedem Zeitpunkt der PCR direkt proportional zur Konzentration der amplifizierten

Zielsequenz. Die Veränderung der Fluoreszenzen der verschiedenen Farbstoffe kann mit Hilfe des 7700 ABI PRISM Sequence Detectors (Applied Biosystems) Zyklus für Zyklus erfaßt werden. Hierbei ermittelt das Gerät für jede Probe den sogenannten Ct-Wert. Der Ct-Wert bezeichnet jene Zykluszahl, bei der zum ersten Mal die Reporterfluoreszenz das Baselinesignal meßbar überschreitet, das heißt, wenn zum ersten Mal die durch die PCR-Amplifikation entstandene Fluoreszenz detektierbar wird. Der Ct-Wert wird zum Vergleich verschiedener Proben herangezogen und ist somit der wichtigste Parameter bei der TaqMan-PCR. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde der sogenannte Amperase-Verdau durchgeführt. Hierbei werden am Anfang eines jeden Laufes mittels des Enzyms Amperase alle UTP enthaltenden PCR Nukleotide verdaut. Da bei der PCR statt TTP immer UTP verwendet wird, erfolgt immer am Anfang der PCR der Verdau von eventuellen Kontaminationen mit alten PCR-Produkten, wohingegen die cDNA nicht verdaut wird.

2.8.2 Reagenzien

Bei der TaqMan-PCR wurde der TaqMan Universal Master Mix angewandt. Dessen Inhaltsstoffe sind in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9. Inhaltsstoffe des TaqMan Universal Master Mix Kits (Perkin Elmer, Weiterstadt).

DNA-Polymerase	AmpliTaQ Gold	5 U/ μ l
AmpErase UNG		1 U/ μ l
dNTPs	dATP	10 mM
	dCTP	10 mM
	dGTP	10 mM
	dUTP	10 mM
10 X TaqMan Buffer A	KCl	500 mM
	EDTA	0,1 mM
	Tris-HCl	100 mM
	passiver Referenzfarbstoff	600 nM
	ROX	
	pH	8,3
MgCl ₂		25 mM

2.8.3 Primer und Probes für die TaqMan-PCR

Primer- und Probesequenzen wurden mittels der Primerdesign Software Primer-Express erstellt. Um die Amplifikation von genomischer DNA zu verhindern wurden die Primer in unterschiedliche Exons gelegt. Die Primer wurden von der Firma MWG-Biotech in lyophilisierter Form geliefert. Die lyophilisierte DNA wurde in sterilem Wasser aufgenommen, wobei jeweils eine Primerkonzentration von 25 pM erstellt wurde. Ebenfalls in lyophilisierter Form wurden die flourogenen Oligonukleotidsonden (Probes) geliefert. Sie wurden der Firma Perkin Elmer hergestellt. Bei der Auflösung in sterilem Wasser wurde eine Probekonzentration von 10 pM erstellt. Die Primer- und Probesequenzen mit den dazugehörenden Annealingtemperaturen sowie die Größe der jeweiligen cDNA sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 10. Für die quantitative TaqMan RT-PCR verwendete Primer- und Probesequenzen.

PCR-Produkt	<i>T_m</i>^a		<i>Primer- und Probesequenzen</i>
<i>GAPDH</i> 246 bp	58°C	FP ^b	5'- ACGGATTTGGTCGTATTGGGC -3'
		RP ^c	5'- TTGACGGTGCCATTGAATTTG -3'
		P ^d	5'- CCTGGTCACCAGGGCTGCTTTTAA-3'
<i>TNF-α</i> 180 bp	58°C	FP	5'- GCCCAGGCAGTCAGATCATCTTC -3'
		RP	5'-TGAGGTACAGGCCCTCTGATGG -3'
		P	5'- CGAAACCCGAGTGACAAGCCTGTAGC-3'
<i>IFN-γ</i> 150 bp	58°C	FP	5'- CCTGGCTTTTCAGCTCTGCATC -3'
		RP	5'- CTTCAAAATGCCTAAGAAAAGAGTTCC -3'
		P	5'- TTGGGTTCTCTTGGCTGTTACTGCCA-3'
<i>IL-12Rβ₂</i> 192 bp	58°C	FP	5'- CACATACTTTTAGAGGATGCTCATTGG -3'
		RP	5'- CTTCAAAATGCCTAAGAAAAGAGTTCC -3'
		P	5'- TTGGGTTCTCTTGGCTGTTACTGCCA-3'
<i>IL-1β</i> 72 bp	58°C	FP	5'- CTGATGGCCCTAAACAGATGAAG -3'
		RP	5'- GGTCGGAGATTCGTAGCTGGAT -3'
		P	5'- TTCCAGGACCTGGACCTCTGCCCTC-3'
<i>IL-8</i> 73 bp	58°C	FP	5'- GCCAACACAGAAATTATTGTAAAGCTT-3'
		RP	5'- AATTCTCAGCCCTCTTCAAAAACCTT-3'
		P	5'- AGAGCTCTGTCTGGACCCCAAGGAAAAC-3'

^aAnnealingtemperatur, ^bForwärtsprimer, ^cRückwärtsprimer, ^dProbe

2.8.4 Durchführung der TaqMan-PCR

Folgender Ansatz wurde für ein 30 µl Reaktionsgemisch mit Universal Master Mix (Perkin Elmer) angewandt:

Universal MM:	15 µl
H ₂ O steril	8,2 µl
Primer 1	0,6 µl
Primer 2	0,6 µl
Probe	0,6 µl
cDNA	5 µl

Der Reaktionsansatz wurde in einem Sequence Detector 7700 amplifiziert.

Amplifikationsprogramm für alle PCR-Produkte:

1 Zyklus	AmpErase-Verdau	50°C	2 min
	Denaturierung:	95° C	10 min
	Anlagerung:	58° C	20 sec
	Extension:	72° C	30 min
2 - 40 Zyklus	Denaturierung:	94° C	15 sec
	Anlagerung:	58° C	20 sec
	Extension:	72° C	30 sec

2.8.5 Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde die Standard-Verdünnungs-Methode angewandt. Hierbei wurden Plasmide verwendet, welche die zu untersuchende Zielsequenz enthielten. Zunächst wurde das PCR-Produkt kloniert. Nach Plasmidisolierung wurde die DNA-Menge photometrisch bestimmt. Bei Kenntnis der Plasmidgröße konnten dann Plasmidkopienzahlen errechnet werden und Plasmidverdünnungsreihen, mit bekannten Plasmidkopienzahlen hergestellt werden. Bei jeder PCR von unbekanntem Proben wurden die Plasmidverdünnungsreihen

mituntersucht. Das Gerät ermittelte die Ct-Werte der Plasmidverdünnungen und konstruierte eine Standardkurve indem es jeder Plasmidverdünnung mit ihrer Ausgangskopienzahl den entsprechenden Ct-Wert zuordnete. Aus der Kurve entsteht eine Gerade, wenn man die Kopienzahl in logarithmischem Maßstab darstellt. Durch Projektion der Ct-Werte von unbekanntem Proben auf die Standardkurve wurde anschließend deren Kopienzahl ermittelt. Da die zu untersuchenden Proben unterschiedlich viel cDNA enthielten (z.B. durch unterschiedliche Biospiegröße), war eine Normalisierung für die quantitative Auswertung unerlässlich. Hierzu mußten die ermittelten Kopienzahlen auf ein Housekeeping-Gen bezogen werden, dessen Expression konstant ist, und folglich ein Maß für die Gesamt-cDNA-Menge in allen Proben ist. Hierfür wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) gewählt. Die cDNA Kopien für die einzelnen Zytokine wurden dann pro 10000 Kopien GAPDH angegeben.

2.9 Allelic-discriminating (AD) TaqMan-PCR

2.9.1 Prinzip der AD-PCR

Die AD-TaqMan PCR ist eine Methode zum Nachweis von Mutationen einzelner oder mehrerer Basen. Es eignet sich beispielsweise zur Unterscheidung von verschiedenen Allelen eines Single Nucleotide Polymorphismus (SNPs). Hierbei werden gleichzeitig zwei Sonden in die PCR eingesetzt, jeweils spezifisch für eines der zwei Allele eines SNPs. Die Sonden sind mit verschiedenen Reportererfarbstoffen markiert, z.B. die Allel-1-spezifische Sonde mit FAM, die Allel-2-spezifische Sonden mit TAMRA. Die PCR läuft in der gleichen Art und Weise ab, wie bei der quantitativen TaqMan Analyse, mit dem Unterschied, daß bei der AD-PCR nicht cDNA, sondern genomische DNA eingesetzt wird. Bei Homozygotie für das Allel-1 findet eine effizientere Anlagerung und damit Spaltung der Allel-1-spezifischen Sonde, wodurch die Allel-1-spezifische Fluoreszenz hoch ist. Gleichzeitig hat man eine geringe Allel-2-spezifische Fluoreszenz. Bei Homozygotie für das Allel-2 verhält es sich umgekehrt und bei Heterozygotie sind die Fluoreszenzen der beiden Sonden ähnlich hoch. Nach jedem PCR-Lauf erfolgt ein Plate-Read-Lauf, wobei die End-Fluoreszenzen gemessen werden und die Auswertung erfolgt. In der gegenwärtigen Studie wurden die Polymorphismen *IL-1B-31T/A* und des

IL-1B-511A/T mittels AD-PCR genotypisiert. Die Primer- und Probesequenzen wurden aus der Literatur übernommen (35). Die Primer- und Probekonzentrationen wurden wie bei der quantitativen RT-PCR gewählt.

2.9.2 Durchführung der AD-PCR

Die PCR wurde in der gleichen Weise durchgeführt wie die real-time Taqman RT-PCR. Folgender Ansatz wurde für ein 30 µl Reaktionsgemisch angewandt:

Universal MM:	15 µl
H ₂ O steril	8,2 µl
Primer 1	0,6 µl
Primer 2	0,6 µl
Probe 1	1 µl
Probe 2	1 µl
DNA	100 ng

Der Reaktionsansatz wurde in einem Sequence Detector 7700 amplifiziert. Das Amplifikationsprogramm war identisch zu dem bei der TaqMan-RT-PCR. Als Positivkontrollen für beide Allele wurden die PCR Produkte von bereits genotypisierter Patienten-DNA kloniert. Jeweils 8 Positivkontrollen wurden auf jede 96-well Platte pipettiert. Nach dem Ende eines jeden PCR-Laufes erfolgte ein Plate-Read Lauf, bei dem die Endfluoreszenzen gemessen wurden. Durch Vergleich der Fluoreszenzwerte der Positivkontrollen mit jenen der unbekanntem Kontrollen erfolgte dann die Genotypisierung der unbekanntem Proben.

2.10 Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay

2.10.1 Prinzip des ELISA

Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) ist eine semiquantitative Nachweismethode für Proteine. In dieser Arbeit ist die IL-8 Protein-Menge aus KATO III Zellen nach Stimulation mit *H. pylori* aus dem Überstand bestimmt worden. Beim ELISA wird zunächst eine ELISA-Kunststoffplatte mit dem, für das nachzuweisende Protein spezifischen Antikörper (Capture antibody) beschichtet. Anschließend wird die Proteinlösung zugesetzt. Nach Abwaschen von freiem Protein erfolgt dann die Detektion des gebundenen Proteins mittels eines biotinylierten Detektionsantikörpers. Nach erneutem Abwaschen der Platte erfolgt dann die Zugabe einer Substrat-Chromogen-Lösung, die nach einer bestimmten Zeit eine der Konjugatkonzentration äquivalente Färbung hervorruft. Diese wird anschließend mittels eines Photometers gemessen und die Konzentration des nachzuweisenden Proteins anhand einer Standardkurve berechnet.

2.10.2 Reagenzien für ELISA

Tabelle 11. Reagenzien für den IL-8 ELISA (Biosource, Nivelles, Belgien).

Coating Puffer A	NaCl (Merck)	8,0 g
	Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O (Merck)	1,42 g
	KH ₂ PO ₄ (Merck)	0,2 g
	KCl (Merck)	0,2 g
	H ₂ O dest.	ad 1000 ml, pH 7,4
Blocking Lösung	NaCl	8,0 g
	Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O	1,42 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	KCl	0,2 g
	BSA (Sigma)	5,0 g
	H ₂ O dest.	ad 1000 ml, pH 7,4
Assay Puffer	NaCl	8,0 g
	Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O	1,42 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	KCl	0,2 g
	BSA	5,0 g

	Tween 20 (Biosource)	1 ml
	H ₂ O dest.	ad 1000 ml, pH 7,4
Waschpuffer	NaCl	9,0 g
	Tween 20	1 ml
	H ₂ O dest.	ad 1000 ml, pH 7,4
Stop Lösung	H ₂ SO ₄ (Biosource)	1,8 N
Coating-Antikörper (Biosource)	Maus IgG1	1:1000 Verdünnung in Coating-Puffer-A
Detektions-Antikörper (Biosource)	Maus IgG1	1:1250 Verdünnung in Assay-Puffer
Streptavidin-Horseradish-Peroxidase Conjugate (Biosource)		1:5000 Verdünnung in Assay-Puffer
Tetramethylbenzidin (Biosource)		
Standardverdünnungen (Biosource)	1:2 Verdünnungen beginnend mit 800 pg/ml	

2.10.2 Durchführung des ELISA

Zunächst erfolgte die Beschichtung der ELISA-Platten, wobei je 100 µl einer Capture-Antikörper-Verdünnung in jedes Loch einer 96-Loch NUNC Maxisorb Platte gegeben wurde. Die Platten wurden abgedeckt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach ausklopfen der Platte wurden am nächsten Tag je 300 µl Blocking-Lösung pro Well gegeben (Inkubation für mindestens 2 Stunden). Anschließend wurde die Platte ausgeklopft und mit 300 µl Waschpuffer 3x gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe der Standards und der Proben (je 100 µl in geeigneter Verdünnung, als Doppelbestimmungen). Anschließend wurden je 50 µl des verdünnten biotinylierten Detektionsantikörpers hinzugegeben. Die Platte wurde abgedeckt und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei 700 rpm geschüttelt. Nach 4 maligem Waschen mit 300 µl Waschpuffer wurden 100 µl der Streptavidin-HRP-Lösung (1:5000 in Assay-Puffer verdünnt) pro Well hinzugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 700 rpm geschüttelt. Nach erneutem Waschen (4x mit 300 µl Waschpuffer) erfolgte die Zugabe von 100 µl Chromogen TMB mit anschließender Inkubation für 30 Minuten (700 rpm, im Dunkeln, bei Raumtemperatur). Die Reaktion wurde dann mit 100 µl Stop-Lösung gestoppt. Die Messung und Auswertung erfolgte mit dem Plate Reader bei 450 nm.

2.11 Indirekte Immunhistochemie

2.11.1 Prinzip der indirekten Immunhistochemie

Die Immunhistochemie erlaubt einen direkten Nachweis von Strukturen auf oder in Zellen bzw. Geweben mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Für immunhistochemische Färbungen wurde in der vorliegenden Arbeit die indirekte markierte Streptavidin-Biotin-Methode (= labelled streptavidin-biotin technique [LSAB]) angewandt. Zunächst wird hierbei ein für das Epitop spezifischer Primärantikörper auf das Gewebe gegeben. Im zweiten Schritt erfolgt die Zugabe eines biotinylierten sekundären Antikörpers, der an den Primärantikörper bindet. Anschließend gibt man Streptavidin dazu, welches mit dem Enzym Alkalische Phosphatase konjugiert ist. Aufgrund ihrer hohen Affinität zu Biotin lagern sich mehrere Streptavidinmoleküle an den Sekundärantikörper an. Zum Schluß wird eine Lösung aus Chromogenen (Diazoniumsalze) und Substraten der alkalischen Phosphatase (Naphtholphosphatester) aufgetragen. Das Naphtholphosphatester wird von der alkalischen Phosphatase zu Phenolkomponenten und Phosphaten gespalten. Die Phenole reagieren mit den farblosen Diazoniumsalzen und bilden so unlösliche Azofarbstoffe.

2.11.2 Reagenzien

Tabelle 12. Reagenzien für die Immunhistochemie

Primärantikörper	IgG ₁ - monoklonal, Maus-anti-Le ^b (Chemikon)	1: 1000
	IgG ₁ - monoklonal Hase-anti- <i>H. pylori</i> (DAKO)	1: 200
Sekundärantikörper	biotinylierter Ziege-anti-Maus-Antikörper (DAKO)	1: 1000
	biotinylierter Ziege-anti-Hase-Antikörper (DAKO)	1: 1000
Komplexlösung	LSAB-Lösung (DAKO)	
chromogene	Lösung mit Diazoniumsalzen und Naphtolphosphatester (DAKO)	
Substratlösung		
Tris-Puffer	Tris (Merck)	1,21 g
	NaCl (Merck)	0,58 g
	H ₂ O dest.	ad 100 ml; pH 7,5 mit HCl eingestellt
	Magermilchpulver	1 g
weitere Reagenzien	Xylol (Sigma), Ethanol unterschiedlicher Konzentrationen (Merck), FCS (Gibco BRL)	

2.11.3 Durchführung

Als Ausgangsmaterial für immunhistochemische Färbungen von Le^b Molekülen der Magenschleimhaut sowie von *H. pylori* dienten formalinfixierte, paraffineingebettete Proben aus Routinebiopsien. Aus diesen Paraffinblöcken wurden 2-3 µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom gefertigt, auf Super Frost Plus Objektträger (Carl Roth GmbH & Co.) aufgebracht und für 2 h bei 50°C getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte 2 x 10 Minuten in Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe bestehend aus 96 %, 80 % und 50 % Ethanol für jeweils 2 Minuten rehydriert, 2 Minuten in destilliertes Wasser gegeben und schließlich in Tris-Puffer gewaschen. Für die *H. pylori* Färbung erfolgte noch eine Vorbehandlung (Dampfkochtopf für 7 Minuten). Anschließend wurden je 100 µl des Primärantikörpers in geeigneter Verdünnung hinzugefügt und für 1 Stunde inkubiert. Nach Spülung der Schnitte in Tris-Puffer (2 x 5 min) wurden 100 µl des Sekundärantikörpers aufgetragen und 30 Minuten inkubiert. Nach erneuter Spülung der Schnitte in Tris-Puffer (2 x 5 min) erfolgte die Auftragung von 100 µl LSAB-Komplexlösung, eine 30 minütige Inkubation und Spülung. Danach wurden 100 µl chromogener Substratlösung für 10 Minuten auf die Schnitte gegeben und diese mit Tris-Puffer gespült. Nach Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun wurden die Schnitte mit warmem Leitungswasser gespült und in aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Zum Schluß erfolgte die Abdeckung der Objektträger mit Glasplättchen und das Verkleben mit Eukitt.

2.12 Kultur von *H. pylori*

2.12.1 Kulturmedien und Selektivnährböden

Die Anzucht von *H. pylori* erfolgte in BHI-Medium (Brain heart infusion) oder auf WC-Agarplatten. Tabelle 13 und 14 faßt die hierfür nötigen Reagenzien zusammen. Bei der Herstellung von BHI-Medium wurden BHI und Hefeextrakt in 1000 ml destilliertem Wasser aufgenommen und vermischt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert. Bei Gebrauch des Flüssigmediums erfolgte die Zugabe von 10% FCS und Antibiotika. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Für die Herstellung von WC-Agarplatten wurden WC-Agar, Hefeextrakt und destilliertes Wasser vermischt und die Lösung autoklaviert. Nach

anschließender Abkühlung auf unter 50°C wurden 10% FCS und DENT-Supplement zugesetzt. Anschließend wurden die Platten ausgegossen. Bis zum Gebrauch wurden die Petrischalen umgedreht bei 4°C gelagert.

Tabelle 13. Reagenzien zur Herstellung von BHI-Medium (Brain Heart Infusion)

BHI (Sigma)	36g/l
Hefeextrakt (Sigma)	0,25%
Aqua dest	ad 1000 ml
FCS ^a	10%
DENT-Supplement (Oxoid) ^a	2 Röhrchen/1000ml
- Vancomycin 5mg	
- Trimethoprim Lactat 2,5 mg	
- Cefsulodin 2,5 mg	
- Amphotericin B 2,5 mg	

^aZugabe nach dem Autoklavieren bei maximal 56°C

Tabelle 14. Reagenzien zur Herstellung von WC-Agar-Platten (Wilkins Chalgren)

WC-(Wilkins Chalgren)-Agar (Oxoid)	43g/l
Hefeextrakt (Sigma)	0,25%
Aqua dest	ad 1l
FCS ^a	10%
DENT-Supplement (Oxoid) ^a	2 Röhrchen/1000ml

^aZugabe nach dem Autoklavieren bei maximal 56°C

2.12.2 Kultur von *H. pylori* in Überschichtungskultur

In der gegenwärtigen Studie wurden zwei *H. pylori* Standardstämme verwendet: G27 und Hp2808. Beide Stämme sind positiv für *cagA*, *vacAs1* und *babA2*. *H. pylori* ist als ein S2-pflichtiges Humanpathogen eingestuft. Alle Arbeiten wurden deshalb unter der Sicherheitsbank in Laborräumen durchgeführt, die für Arbeiten mit S2-Status zugelassen sind. 100 µl einer Glycerinkultur (siehe unten) wurden in 500 µl BHI/10%FCS Medium aufgenommen und je 100 µl auf BHI-Agarplatten ausplattiert. Die Kultur erfolgte anschließend unter mikroaerophilen Bedingungen (10% CO₂, 5% O₂ und 85% N₂) bei 37°C im Brutschrank. Das Anwachsen der Kulturen benötigte bei

dieser Animpfdichte ungefähr 3 Tage. Beim Ernten der Stämme wurde die Vitalität lichtmikroskopisch überprüft. Hierbei wurde besonders auf die Morphologie (helikal oder kokkoid) und auf die Beweglichkeit geachtet. Für Kokultorexperimente wurden nur solche Kulturen eingesetzt, bei welchen die Keime in helikaler und in überwiegend beweglicher Form vorlagen.

2.12.3 Kultur von *H. pylori* in Flüssigmedium

Für die Vermehrung von größeren *H. pylori* Mengen wurden Flüssigkulturen eingesetzt. Hierbei wurde das Medium mit *H. pylori* beimpft, bis eine OD₅₇₈ von 0,1-0,2 erreicht war. Anschließend erfolgte die Kultur in Zellkulturflaschen mit Membranverschluß unter mikroaerophilen Bedingungen (10% CO₂, 5% O₂ und 85% N₂) bei 37°C im Brutschrank. Die Kultur wurde hierbei auf einem Inkubationsschüttler mit 130 rpm geschüttelt. Nach ungefähr 24h erfolgte das Ernten der Stämme. Nach diesem Zeitraum wurde eine von OD₅₇₈ von 0,7-1 erreicht.

2.12.4 Langzeitlagerung von *H. pylori*

Für die Langzeitlagerung von *H. pylori* wurden Keime aus Überschichtungskulturen geerntet und in BHI aufgenommen. Zur Standardisierung wurde diese initiale Kultur auf eine OD₅₇₈ von 1,0 eingestellt. 10ml einer solchen Lösung wurden abzentrifugiert und anschließend in 1ml BHI mit 20% Glycerin und 10% FCS aufgenommen. Je 100µl wurden in 1,5 ml Eppendorfröhrchen bei -80°C eingefroren.

2.13 Kokultur von *H. pylori* mit KATO III Zellen

2.13.1 Materialien

Die für die Kokultur von KATO III Zellen mit *H. pylori* benutzten Reagenzien sind in Tabelle 15 zusammengefaßt.

Tabelle 15. Reagenzien für die Kokultur von *H. pylori* mit KATO III Zellen

Kulturmedium für KATO III Zellen	RPMI 1640 Medium (Gibco)	79%
	Fetal Bovine Serum ^a (Gibco)	20%
	Penicillin ^a (100U/ml)	1%
	Streptomycin ^a (100µg/ml)	
0,15M PBS (phosphate buffered saline)	KCl	0,2 g
	NaCl	8,0 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄	1,44 g
	H ₂ O dest.	ad 1000 ml, pH 7,4

^aZugabe nach dem Autoklavieren bei maximal 56°C

2.13.2 Durchführung der Kokultur

Kato III Zellen wurden in Zellkulturflaschen unter sterilen Bedingungen angezüchtet. Es wurde ein Subklon von Kato III Zellen gewählt, der bei immunhistochemischen Färbungen Le^b positiv war. Für *H. pylori* Kokulturrexperimente wurden 300000 Kato III Zellen pro Loch in 6-Loch-Platten ausgesät und über Nacht in 2 ml Medium kultiviert. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml serumfreiem und antibiotikafreiem RPMI 1640 Medium pro Loch erfolgte die Stimulation mit *H. pylori*. Hierbei wurden die Experimente mit verschiedenen *H. pylori* Konzentrationen durchgeführt (Bakterie/Zelle: 1:100, 1:10, 1:1, 10:1, 20:1, 50:1, 100:1). Die Bakterienzahl wurde nach photometrischer Einstellung einer *H. pylori* Lösung auf OD₅₇₈=1 (entspricht 10⁶ Keime pro µl) für das jeweilige Experiment errechnet. Für die Untersuchung der IL-8 mRNA Expression (RNA-Isolation und quantitative TaqMan RT-PCR) erfolgte die Kokultur für 2 Stunden wonach die Zellen gewaschen wurden und in 1ml peqGOLDTrifast Reagenz (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) aufgenommen wurden. Die Sekretion von IL-8 Protein wurde nach 24 Stunden Kokultur aus dem Medium mittels IL-8 ELISA bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Aufbau einer Magenbiopsiebank (742 Patienten)

Im Zeitraum zwischen 1996 und 2002 wurden Magenbiopsien von insgesamt 742 Patienten gesammelt und systematisch archiviert. Biopsien aus dem Antrum und Corpus wurden von jedem Patienten im Rahmen von Routineendoskopien entnommen. Das Gewebematerial wurde weiterverwendet für DNA- und RNA-Isolation sowie für die Herstellung von Schnitten für histologische und immunhistochemische Färbungen. Dies ermöglicht einerseits, am Biopsiematerial Eigenschaften des infizierenden *H. pylori* Stammes auf DNA-Ebene zu untersuchen. Andererseits können aber gleichzeitig genetische Analysen, Genexpressionsanalysen und histopathologische Untersuchungen an der Magenschleimhaut des Wirtes durchgeführt werden. Der Nachweis einer *H. pylori* Infektion erfolgte durch histopathologische Evaluation sowie durch *vacA* und *ureB* PCR. 210 Patienten (103 Frauen und 107 Männer) waren mit *H. pylori* infiziert. Das Durchschnittsalter betrug 62,7 Jahre (32-92). 88,6% der infizierten Patienten hatten die deutsche Nationalität, 7,6% waren türkisch, die restlichen Patienten kamen aus verschiedenen anderen europäischen Ländern, vornehmlich aus verschiedenen Balkanländern (Griechenland, Bosnien, Serbien, Kroatien) sowie aus Italien. Afrikanische, asiatische oder amerikanische Patienten wurden nicht in die Studie eingeschlossen.

3.2 Einfluß von *IL-1* Polymorphismen auf die *IL-1 β* Expression und auf die Entstehung von schweren histologischen Veränderungen der Magenmukosa während der *H. pylori* Infektion

3.2.1 Allelhäufigkeiten von *IL-1B* und *IL-1RN* Polymorphismen

Abbildung 2 und 3 zeigen schematisch die verschiedenen Polymorphismen im *IL-1B* Gen und im *IL-1RN* Gen sowie die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Allele in der untersuchten Population von 210 *H. pylori* infizierten Patienten. *IL-1B-511C* war in komplettem Linkage Disequilibrium (100%) mit *IL-1B-31T*. In westlichen Bevölkerungen sind die Allelhäufigkeiten für *IL-1B-511/-31* als 59% für *-31T/-511C* und 41% für *-31C/-511T* beschrieben worden (35; 66). In dieser Studie war das *-31T/-511C* Allel häufiger (70%). Methodische Fehler wurden jedoch ausgeschlossen, da die Allelbestimmungen mit zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt wurden, Allelic Discriminating TaqMan PCR und RFLP-Analyse. Die Häufigkeitsverteilung der *IL-1RN* Allele stimmt mit jener aus anderen europäischen Populationen überein (66).

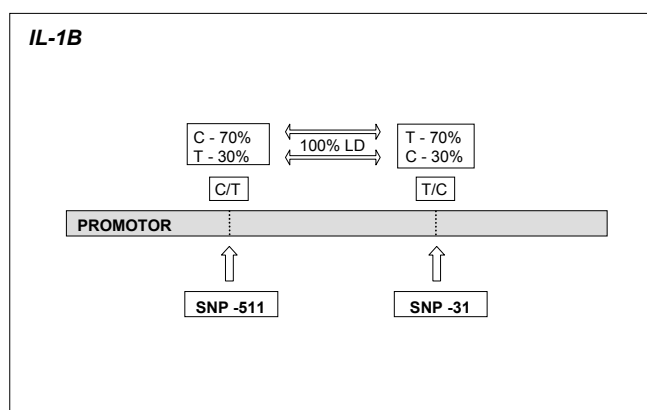


Abbildung 2. Schematische Darstellung von Polymorphismen im *IL-1B* Gen. Gezeigt sind die SNPs in der Promotorregion an Position *-511C/T* und *-31T/C*. Die Allelhäufigkeiten sind in den oberen Kästchen angezeigt. Zwischen *-511C* und *-31T* bestand 100% Linkage Disequilibrium (LD). *-511T/-31C* sind in früheren Studien mit erhöhter *IL-1 β* Sekretion aus stimulierten PBMC *in vitro* assoziiert worden (66). Die Bestimmung der Allele erfolgte mittels RFLP Analyse und AD-PCR.

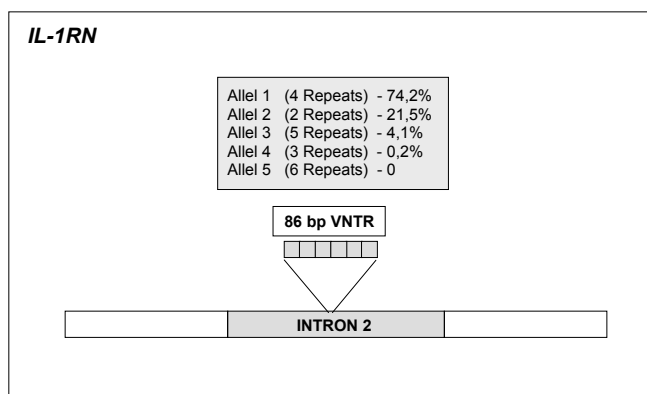


Abbildung 3. Schematische Darstellung von *IL-1RN* Polymorphismen. Das *IL-1RN* Gen besitzt ein penta-allelisches 86-bp Tandemrepeat (VNTR, variable number of tandem repeats) im Intron 2. Allel 2 (*IL-1RN*2*) ist mit erhöhter *IL-1β* Produktion aus stimulierten PBMC *in vitro* assoziiert worden (66; 120). Die Häufigkeiten der Allele sind gezeigt. Die Bestimmung der Allele erfolgte mittels PCR: Allel-1 (A1) = 410 bp, A2 = 240 bp, A3 = 500 bp, A4 = 325 bp, A5 = 595 bp.

3.2.2 Assoziation von *H. pylori* Stammtypen mit *IL-1* Polymorphismen

Da bakterielle Virulenzfaktoren eine bedeutende Rolle für die Entstehung der Gastritis und von präkanzerösen Läsionen spielen, war es wichtig auszuschließen, daß mögliche Assoziationen der *IL-1* Polymorphismen mit gastraler Histopathologie nicht aufgrund zufälliger Koinzidenz von bakteriellen Virulenzfaktoren und bestimmten proinflammatorischen Polymorphismen zustande kommt. Nach DNA-Isolierung aus Biopsiematerial wurde deshalb das Vorhandensein von bakteriellen Virulenzfaktoren mittels PCR bestimmt. Der *vacAs1* Genotyp war in 78% (164/210) und *cagA* in 71% (149/210) der Fälle vorhanden. Bei Analyse der Verteilung von bakteriellen Virulenzfaktoren und *IL-1* Polymorphismen des Wirtes konnten keine signifikanten Assoziationen zwischen bestimmten *IL-1* Polymorphismen und der Infektion mit *vacAs1*-positiven oder *cagA*-positiven Stämmen gefunden werden. Da BabA-Präsenz immer mit *cagA* assoziiert ist, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit die Auswertung nur für *cagA*⁺/*vacAs1*⁺ positive Stämme gezeigt. Die Häufigkeiten der Infektion mit *vacAs1*⁺ oder *cagA*⁺ Stämmen unter den Patienten mit unterschiedlichen *IL-1* Polymorphismen war wie folgt: *IL-1B-511CC*: 83% *vacAs1*⁺ (85/102) und 71% *cagA*⁺ (72/102); *IL-1B-511T* Träger: 73% *vacAs1*⁺ (79/108) und 71% *cagA*⁺ (77/102); *IL-1RN*1/1*: 80% *vacAs1*⁺ (98/122) und 70% *cagA*⁺ (85/122); *IL-1RN*2* Träger: 76% *vacAs1*⁺ (58/76) und 75% *cagA*⁺ (57/76). Diese Ergebnisse zeigen, daß eine

Kolonisation mit bestimmten *H. pylori* Stämmen nicht durch *IL-1* Polymorphismen beeinflusst wird. Gleichzeitig schließen diese Analysen falsch-positive oder falsch-negative Assoziationen von *IL-1* Polymorphismen mit gastraler Histopathologie aus.

3.2.3 Einfluß von *IL-1* Polymorphismen auf die *IL-1* β Expression bei der *H. pylori* Infektion

3.2.3.1 Kalibration des TaqMan RT-PCR Systems

Der Zusammenhang zwischen mukosaler Zytokin-Expression im Magenantrum und der Infektion mit verschiedenen *H. pylori* Stämmen wurde mittels quantitativer TaqMan RT-PCR untersucht. Zytokin mRNA Kopienzahlen wurden in einer Untergruppe von Patienten (n=83) bestimmt und wurden in Kopien pro 10000 Kopien GAPDH angegeben. Zur Ermittlung von absoluten mRNA Kopienzahlen wurden zunächst Plasmidverdünnungsreihen mit der entsprechenden Zielsequenz hergestellt. Diese dienten der Konstruktion einer Standardkurve. Die Plasmidverdünnungsreihen umfaßten folgende Kopienzahlen an eingesetzten Zielsequenzen: 33000, 11000, 3660, 1220, 400, 140 und 46 für *IL-8*, *IFN- γ* , *TNF- α* , *IL-12R β 2* und *IL-1 β* ; 1000000, 500000, 250000, 125000, 62500 und 30000 für GAPDH. Über diesen weiten dynamischen Bereich waren die Ct-Werte eine lineare Funktion der eingesetzten cDNA, mit Korrelationskoeffizienten von 0,95-1. Abbildung 4 und 5 zeigen die Amplifikationskurven einer solchen Plasmidverdünnungsreihe und die dazugehörige Standardkurve. Durch Projektion der Ct-Werte von unbekanntem Proben auf Standardkurven wurden anschließend deren absolute Kopienzahlen ermittelt. Da die einzelnen Biopsien unterschiedlich viel cDNA enthalten, je nachdem wie hoch die eingesetzte Materialmenge ist (z.B. je nach Biopsiegröße), wurde eine Normalisierung der Werte durch Bezug der Zytokinkopienzahlen auf ein Referenzgen durchgeführt. Hierzu wurde das konstitutiv exprimierte GAPDH Gen gewählt. mRNA Kopienzahlen von Zytokinen wurden jeweils pro 10000 Kopien GAPDH angegeben.

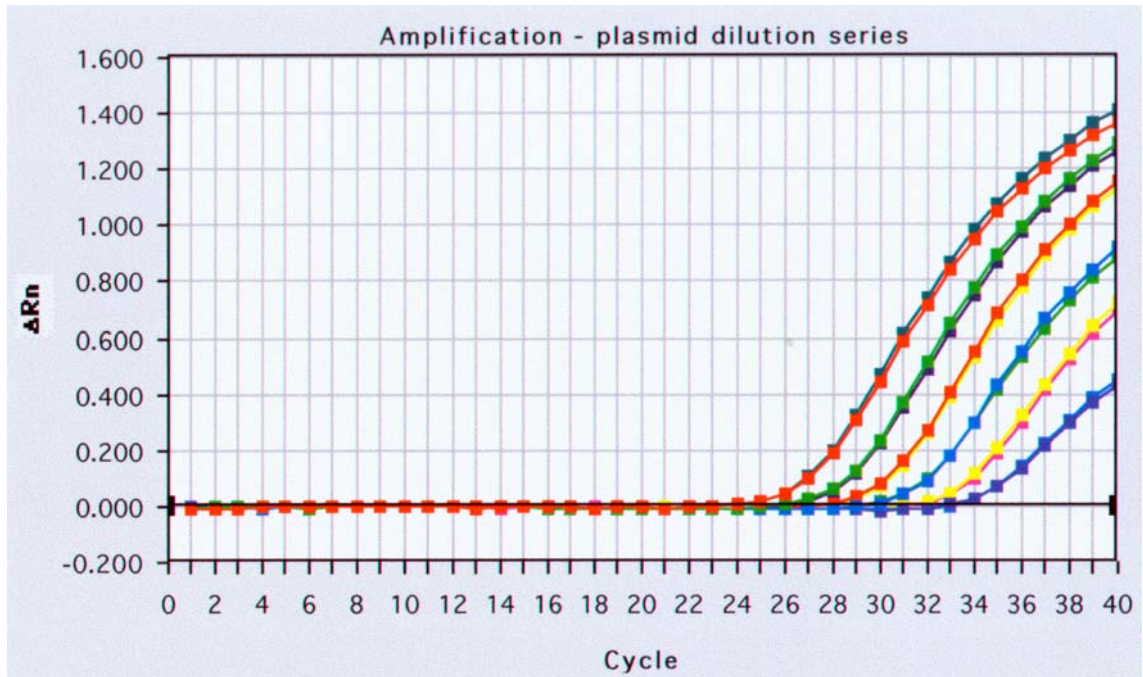


Abbildung 3. TaqMan-RT-PCR. Amplifikationskurven einer Zytokin-Plasmidverdünnungsreihe. Nach Klonierung des PCR-Produktes und Plasmidisolation wurden Plasmidverdünnungsreihen mit bekannter Plasmid-Kopienzahl hergestellt und quantitativ analysiert. Auf der y-Achse stellt ΔR_n das Verhältnis von Reporter-Floureszenz zu Quencherfloureszenz dar, welches ein Maß für die entstehende Amplifikatmenge ist. Bis zum Zyklus 24 ist die entstehende Floureszenz nicht detektierbar (Baseline). Anschließend folgt die detektierbare Phase der exponentiellen Floureszenzzunahme. In diesem Bereich erfolgen die Auswertungen. Schließlich folgt ein Abflachen der Kuven mit immer geringerer Amplifikationsrate.

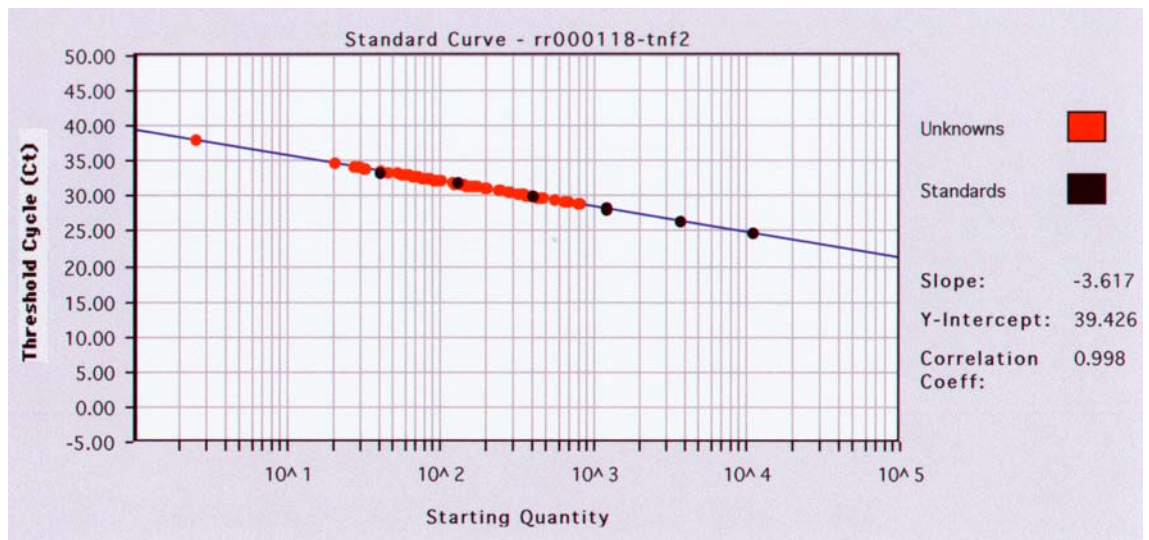


Abbildung 4. Standardkurve bei der quantitativen TaqMan RT-PCR. Schwarze Kreise stellen die Standards in Doppelbestimmung dar. Die roten Kreise stellen je eine unbekannte Probe dar. Deren Kopienzahl wird durch Projektion des Ct-Wertes auf die Standardkurve ermittelt. Hier wurde ein Korrelationskoeffizient von 0.998 erreicht.

3.2.3.2 Einfluß von *IL-1* Polymorphismen auf die *IL-1* β Expression

Polymorphismen im *IL-1B* und *IL-1RN* Gen sind in früheren Studien mit erhöhter *IL-1* β Sekretion aus *in vitro* aktivierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) assoziiert worden (110; 120). Der Einfluß dieser Polymorphismen auf die gastrale *IL-1* β Expression bei der *H. pylori* Infektion ist bisher nicht gezeigt worden. Um diesen Zusammenhang zu untersuchen, wurde die *IL-1* β Expression mittels quantitativer TaqMan RT-PCR in der Mukosa von infizierten Patienten untersucht. Wie in Abbildung 6 ersichtlich wird, waren die *IL-1* β mRNA Mengen höher bei Patienten mit dem *IL-1B-511T* Allel, verglichen mit *-511CC* Trägern, jedoch waren die Unterschiede zwischen den zwei Gruppen nicht signifikant. Im Gegensatz hierzu, waren die *IL-1* β mRNA Kopienzahlen signifikant höher bei Trägern von zumindest einem *IL-1RN*2* Allel als bei *IL-1RN1/1* Trägern. Die höchsten Zytokin-mRNA Spiegel wurden bei Patienten gefunden, die gleichzeitig zumindest ein proinflammatorisches Allel der zwei Polymorphismen besaßen (gleichzeitige *IL-1B-511T* and *IL-1RN*2* Träger). Diese Ergebnisse zeigen, daß *IL-1* Polymorphismen die gastrale *IL-1* β Expression bei der *H. pylori* Infektion beeinflussen und funktionell synergistisch wirken.

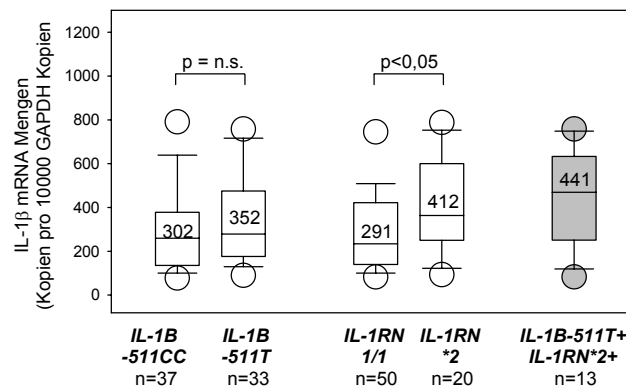


Abbildung 6. *IL-1* β Expression bei Patienten mit unterschiedlichen *IL-1B* und *IL-1RN* Polymorphismen. Querbalken geben mediane Werte an. Die Zahlen in den Graphiken repräsentieren Mittelwerte der *IL-1* β mRNA Kopienzahlen (bezogen auf 10000 GAPDH Kopien).

3.2.4 Einfluß von humanen *IL-1* Polymorphismen auf die Entstehung der gastralen Histopathologie

Nachdem gezeigt werden konnte, daß *IL-1* Polymorphismen die IL-1 β Expression während der *H. pylori* Infektion beeinflussen, wurde untersucht welchen Einfluß diese genetischen Variationen auf die entstehende Gastritis haben. Hierzu wurde der jeweilige Genotyp mit den entsprechenden histopathologischen Befunden korreliert. Tabelle 16 zeigt die Häufigkeit von hochgradiger granulozytärer und lymphozytärer Infiltration (G3 bzw. L3) sowie IM und AG im Antrum und im Corpus von Patienten mit unterschiedlichen Allelen der *IL-1B-511/-31* Loci. Die niedrigste Prävalenz von L3/G3/IM/AG wurde bei Patienten mit dem *IL-1B-511CC/-31TT* Genotyp gefunden. Unter Trägern des *IL-1B-511T/-31C* Allels war die Häufigkeit dieser Pathologien 1,2-2,1 mal höher. Jedoch erreichten die Unterschiede keine statistische Signifikanz, außer für L3 im Antrum. Die höchste Prävalenz von L3/G3/IM/AG zeigte sich bei Patienten mit dem *IL-1B-511TT/-31CC* Genotyp. Aufgrund der niedrigen Zahl der Patienten mit diesem Genotyp (n=19) waren jedoch die Unterschiede statistisch nicht signifikant (berechnet mit dem Fishers Exact Test).

Tabelle 16. Prävalenz von schweren histologischen Veränderungen (L3, G3, IM, AG) der Magenmukosa bei Patienten mit unterschiedlichen Allelen der *IL-1B* Loci -511/-31.

		-511CC/ -31TT n= 102	-511CT/ -31TC n=89	-511TT/ -31CC n= 19	-511T/31C carriers n= 108	p Wert ^a -511CC vs. -511CT	p-Wert ^a -511CC vs. -511TT	p-Wert ^a -511CC -511T Träger
L3	Antrum	14,7% (15)	28,1% (25)	26,3% (5)	27,8% (30)	0,03	0,31	0,03
	Corpus	4,9% (5)	9,0% (8)	15,8% (3)	10,2% (11)	0,39	0,11	0,20
G3	Antrum	15,7% (16)	21,3% (19)	31,6% (6)	23,2% (25)	0,35	0,11	0,22
	Corpus	4,9% (5)	10,1% (9)	10,5% (2)	10,2% (11)	0,27	0,30	0,20
IM	Antrum	28,4% (29)	31,5% (28)	42,1% (8)	33,3% (36)	0,75	0,28	0,46
	Corpus	5,9% (6)	6,7% (6)	15,8% (3)	8,3% (9)	1,0	0,15	0,60
AG	Antrum	21,6% (22)	24,7% (22)	31,6% (6)	25,9% (28)	0,61	0,38	0,52
	Corpus	5,9% (6)	6,7% (6)	15,8% (3)	8,3% (9)	1,0	0,15	0,60

L3, hochgradige lymphozytäre Infiltration; G3, hochgradige granulozytäre Infiltration; IM, intestinale Metaplasie; AG, atrophische Gastritis; ^aberechnet mit einem Fisher's Exakt Test.

Als Nächstes wurde der Einfluß von verschiedenen *IL-1RN* Polymorphismen auf die Entstehung von L3/G3/IM/AG untersucht. Tabelle 17 zeigt, daß die niedrigste Prävalenz aller Pathologien bei Patienten mit dem *IL-1RN1/1* Genotyp gefunden wurde.

Häufiger waren L3/G3/IM/AG bei heterozygoten *IL-1RN1/2* Trägern, jedoch erreichten die Unterschiede keine statistische Signifikanz. (Fisher's Exact Test). Die höchste Prävalenz aller Pathologien fanden sich bei *IL-1RN*2* Homozygoten, jedoch waren auch die Unterschiede zwischen dieser Gruppe und den *IL-1RN1/1* Trägern statistisch meist nicht signifikant, wenn auch in vielen Fällen p Werte von 0,05 nur knapp verfehlt wurden.

Tabelle 17. Prävalenz von schweren histologischen Veränderungen (L3, G3, IM, AG) der Magenmukosa bei Patienten mit unterschiedlichen Allelen des VNTR im *IL-1RN* Gen.

		<i>IL1RN-1/1</i> n=122	<i>IL1RN-1/2</i> n=55	<i>IL1RN-2/2</i> n=17	<i>IL1RN andere</i> n=16	<i>IL1RN*2</i> Träger n=76	p Wert <i>IL1RN-1/1</i> vs. <i>IL1RN-1/2</i>	p Wert <i>IL1RN-1/1</i> vs. <i>IL1RN-2/2</i>	p Wert <i>IL1RN-1/1</i> vs. <i>IL1RN*2</i> Träger
L3	Antrum	18,9% (23)	27,3% (15)	29,4% (5)	12,5% (2)	27,6% (21)	0,24	0,34	0,16
	Corpus	4,9% (6)	12,7% (7)	17,7% (3)	0	13,2% (10)	0,12	0,08	0,06
G3	Antrum	18,0% (22)	23,6% (13)	29,4% (5)	6,3% (1)	23,7% (18)	0,42	0,32	0,37
	Corpus	5,7% (7)	10,9% (6)	5,9% (1)	12,5% (2)	9,2% (7)	0,23	1,0	0,40
IM	Antrum	25,4% (31)	38,2% (21)	47,1% (8)	31,3% (5)	40,8% (31)	0,11	0,08	0,03
	Corpus	4,1% (5)	12,7% (7)	17,6% (3)	0	13,2% (10)	0,05	0,06	0,03
AG	Antrum	20,5% (25)	23,6% (13)	35,5% (6)	37,5% (6)	26,3% (20)	0,69	0,21	0,38
	Corpus	4,1% (5)	10,9% (6)	23,5% (4)	0	13,2% (10)	0,10	0,01	0,03

L3, hochgradige lymphozytäre Infiltration; G3, hochgradige granulozytäre Infiltration; IM, intestinale Metaplasie; AG, atrophische Gastritis; ^aberechnet mit einem Fisher's Exakt Test.

Als Nächstes wurde der Einfluß von Polymorphismuskombinationen auf die Entstehung von Histopathologien untersucht. Hierfür wurden zwei Patientengruppen miteinander verglichen: a). Patienten, die gleichzeitig zumindest ein proinflammatorisches *IL-1RN*2* Allel als auch ein proinflammatorisches *IL-1B-511T/-31C* Allel hatten (PPC⁺ Patienten; Träger der proinflammatorischen Polymorphismus Kombination); b). Patienten, die zumindest eines dieser proinflammatorischen Allele im *IL-1B* und *IL-1RN* Gen nicht trugen (PPC-negative Patienten). Abbildung 7 zeigt die Häufigkeit von hochgradigen histologischen Veränderungen der Mukosa bei Trägern der zwei Genotypenkombinationen. Die Prävalenz von L3/G3/IM/AG war höher bei PPC⁺ Patienten als bei PPC⁻ Patienten. Alle p Werte waren signifikant, bis auf eines (AG im Antrum). Die Odds Ratios (ORs; 95% CI, Confidenz Intervall) beim Vergleich von PPC⁺ und PPC⁻ Patienten lagen zwischen 2,3 (1,2-4,6) und 4,4 (1,5-12,9)

(siehe Abbildung 7). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß eine synergistische Interaktion zwischen den Polymorphismen im *IL-1RN* und im *IL-1B* Gen existiert, was zur höchsten Prävalenz von schweren histologischen Veränderungen bei der PPC⁺ Patientengruppe führt.

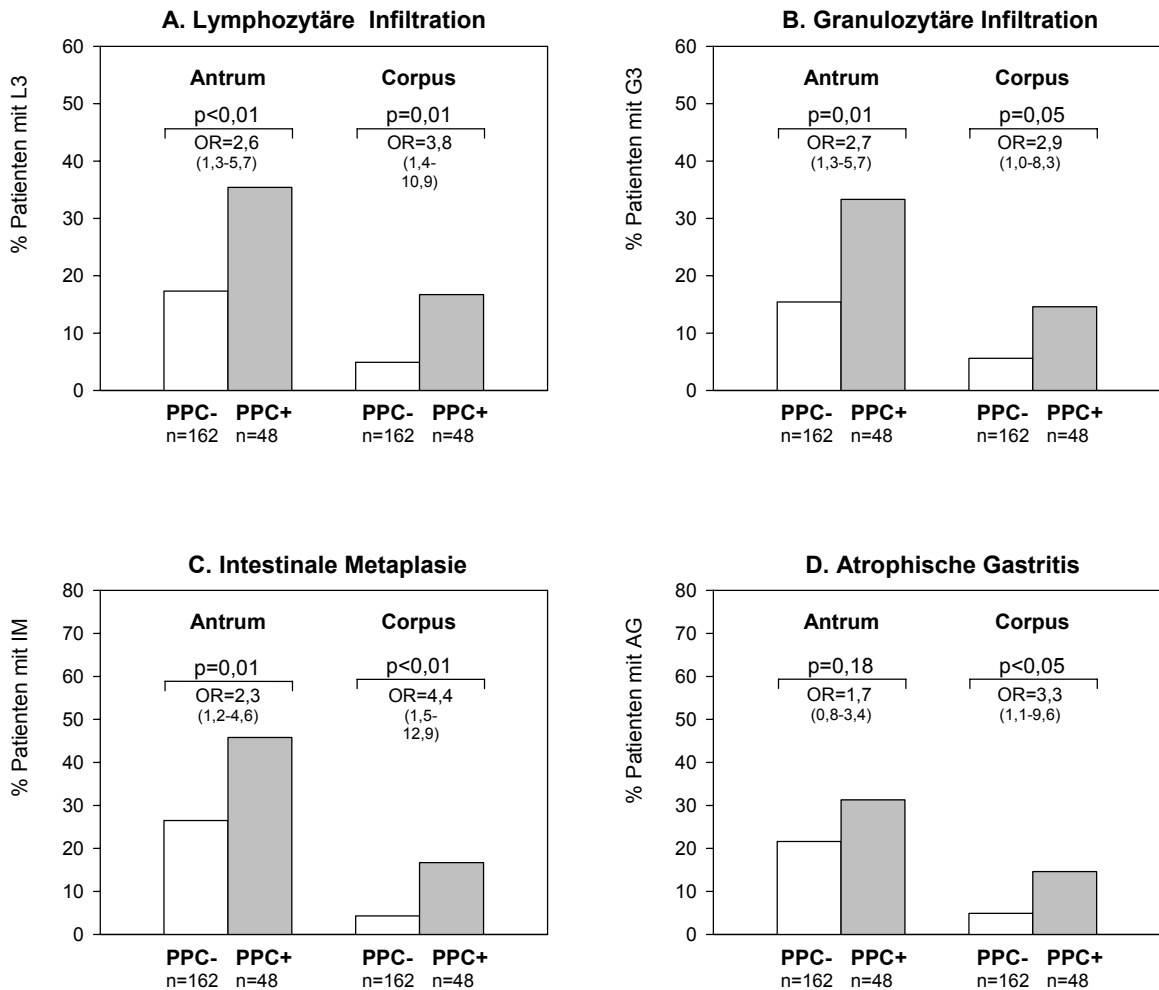


Abbildung 7. Prävalenz von schweren histologischen Veränderungen der Magenmukosa bei Patienten mit unterschiedlichen *IL-1* Polymorphismen Kombinationen. **Graue Balken:** Patienten, die gleichzeitig sowohl das proinflammatorische *IL-1RN**2 Allel als auch das proinflammatorische *IL-1B*-511T/-31C Allel besitzen (proinflammatorische Polymorphismus-kombination, PPC⁺). **Weißer Balken:** Patienten, die zumindest eines der beiden proinflammatorischen Polymorphismen nicht besitzen (PPC). Der Fisher's Exakt Test wurde verwendet um p Werte zu berechnen. Odds Ratios (OR) und korrespondierende 95% Konfidenzintervalle (CI) wurden mittels StatXact Software (Version 4.0.1; Cytel) berechnet. L3, hochgradige lymphozytäre Infiltration; G3, hochgradige granulozytäre Infiltration; IM, intestinale Metaplasie; AG, atrophische Gastritis.

3.3 Rolle der bakteriellen Virulenzfaktoren CagA und VacA bei der Entstehung schwerer histologischer Veränderungen der Mukosa

Um den Einfluß dieser bakteriellen Virulenzfaktoren auf die Entstehung schwerer histologischer Veränderungen der Mukosa zu untersuchen wurde die Infektion mit *vacAs1*⁺ und *cagA*⁺ Stämmen mit der Diagnose von L3/G3/IM/AG korreliert. Tabelle 18 zeigt, daß alle diese pathologischen Veränderungen mit den *vacAs1* und *cagA* Genotypen von *H. pylori* assoziiert waren.

Tabelle 18. Prävalenz von schweren histologischen Veränderungen (L3, G3, IM, AG) der Magenmukosa bei Patienten mit unterschiedlichen *H. pylori* Stammtypen. Der Fisher's Exakt Test wurde verwendet um p Werte zu berechnen. Odds Ratios (OR) und korrespondierende 95% Konfidenzintervalle (CI) wurden mittels StatXact Software (Version 4.0.1; Cytel) berechnet. Da bei Patienten mit *cagA*-negativen und *vacAs1*-negativen Stämmen L3/G3/IM/AG im Corpus nicht vorkamen, konnten für den Korpus keine ORs berechnet werden.

		<i>vacAs1</i> - n=46	<i>vacAs1</i> + n=164	<i>cagA</i> - n=61	<i>cagA</i> + n=149	p Wert OR (95% CI) <i>vacAs1</i> - vs <i>vacAs1</i> +	p Wert OR (95% CI) <i>cagA</i> - vs. <i>cagA</i> +
L3	Antrum	2,2% (1)	26,8% (44)	3,3% (2)	28,9% (43)	0,0001 16,5 (2,2-123)	<0,0001 12,0 (2,8-51,2)
	Corpus	0	9,8% (16)	0	10,7% (16)	0,03 OR: n.a.	0,004 OR: n.a.
G3	Antrum	6,5% (3)	23,2% (38)	4,9% (3)	25,5% (38)	0,01 4,3 (1,3-14,7)	0,0004 6,6 (2,0-22,4)
	Corpus	0	9,8% (16)	0	10,7% (16)	0,03 OR: n.a.	0,004 OR: n.a.
IM	Antrum	19,6% (9)	34,1% (56)	14,8% (9)	37,6% (56)	0,07 2,1 (0,96-4,7)	0,001 3,5 (1,6-7,6)
	Corpus	0	9,1% (15)	0	10,1% (15)	0,05 OR: n.a.	0,007 OR: n.a.
AG	Antrum	13,0% (6)	26,8% (44)	13,1% (8)	28,2% (42)	0,08 2,4 (0,97-6,2)	0,02 2,6 (1,1-5,9)
	Corpus	0	9,1% (15)	0	10,1% (15)	0,05 OR: n.a.	0,007 OR: n.a.

L3, hochgradige lymphozytäre Infiltration; G3, hochgradige granulozytäre Infiltration; IM, intestinale Metaplasie; AG, atrophische Gastritis;

Diese Assoziation war im Corpus besonders eindrucksvoll: alle Patienten mit L3/G3/IM/AG waren mit einem *cagA*⁺ und *vacAsI*⁺ Stamm infiziert. Da also im Corpus keine schweren histologischen Veränderungen bei *cagA*- oder *vacAsI*- (*typeI*-) Stammefall vorkommen konnten ORs für das Corpus nicht berechnet werden.

Im Antrum war die Prävalenz schwerer histologischer Veränderungen ebenfalls sehr niedrig. Hierbei lagen die ORs beim Vergleich der Prävalenz von L3/G3/IM/AG bei Patienten mit *vacAsI*⁺ versus *vacAsI*⁻ Stämmen zwischen 2,1 und 16,5 (siehe Tabelle 18). Ebenso hatten Patienten mit *cagA*⁺ Stämmen ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von schweren histologischen Veränderungen der Magenmukosa.

3.4 Synergistischer Effekt von Wirtsfaktoren und bakteriellen Faktoren auf die Entstehung von schweren histologischen Mukosaveränderungen

Wie bereits gezeigt, spielen bakterielle Virulenzfaktoren eine bedeutende Rolle für die Entstehung von gastraler Pathologie. Nachdem proinflammatorische *IL-1* Polymorphismen ebenfalls die Entstehung von gastraler Histopathologie beeinflussen, stellte sich nun die Frage, ob es beim gleichzeitigen Vorkommen von pathogenen Stämmen und einem proinflammatorischen *IL-1* Wirtstyp zu einer weiteren Erhöhung des Risikos für die Entstehung schwerer histologischer Veränderungen der Mukosa kommt. Um Interaktionen zwischen *IL-1* Polymorphismen und bakteriellen Virulenzfaktoren zu untersuchen wurde die Prävalenz von schweren histologischen Veränderungen der Magenmukosa bei Patienten mit kombinierten Wirts/Bakterien-Genotypen bestimmt. Abbildung 8 faßt die Ergebnisse dieser Auswertungen zusammen. Zunächst wurde die Prävalenz von L3/G3/IM/AG bei Patienten ermittelt, die mit *vacAsI*⁻ oder *cagA*⁻ Stämmen (weiße Balken in Abbildung 8) infiziert waren, unabhängig vom Polymorphismusstatus. Die Prävalenz aller Pathologien war bei dieser Patientengruppe insgesamt sehr niedrig im Antrum. Noch eindrucksvoller ist die Situation bei Auswertung der Corpusdaten. Wie aus Abbildung 8 hervorgeht, hatte keiner der mit *vacAsI*⁻/*cagA*⁻ Stämmen infizierten Patienten schwere histologische Veränderungen L3/G3/IM/AG im Corpus. Dies zeigt, daß die Infektion mit *vacAsI*⁺/*cagA*⁺ Stämmen einen Hauptfaktor bei der Entwicklung von mukosalen Schäden ist. Bei Patienten, die mit *vacAsI*⁻/*cagA*⁻ Stämmen infiziert sind haben die *IL-1*

Polymorphismen nur einen geringen oder gar keinen Einfluß auf die Entwicklung von schweren histologischen Veränderungen.

Die grauen Balken in Abbildung 8 repräsentieren Patienten, die zwar mit einem *vacAsI*⁺/*cagA*⁺ Stamm infiziert sind, die jedoch entweder kein *IL-1B-511T/-31C* Allel und/oder kein *IL-1RN*2* Allel besitzen (*vacAsI*⁺/*cagA*⁺/PPC-negative Patientengruppe). Diese Patienten hatten eine bedeutend höhere Prävalenz von L3/G3/IM/AG als die mit *vacAsI*⁻/*cagA*⁻ Stämmen infizierte Patientengruppe. P Werte wurden mit einem Fishers Exact Test berechnet. Dies unterstreicht erneut die besondere Bedeutung von bakteriellen Virulenzfaktoren bei der Pathogenese. ORs (95% CI) beim Vergleich dieser Patientengruppe (graue Balken) mit Trägern von *vacAsI*⁻/*cagA*⁻ Stämmen (weiße Balken) waren wie folgt im Antrum: L3: 10,8 (2,3-44,1); G3: 4,0 (1,3-12,1); IM: 2,5 (1,2-5,5); AG: 1,7 (0,8-3,6). Da im Corpus keine schweren histologischen Veränderungen bei Infektion mit *vacAsI*⁻/*cagA*⁻ Stämmen vorhanden waren, konnten ORs für das Corpus nicht berechnet werden.

Schließlich wurde die Prävalenz von L3/G3/IM/AG bei Patienten berechnet, die mit *type1* Stämmen befallen waren und gleichzeitig die proinflammatorische Polymorphismenkombination besaßen (*vacAsI*⁺/*cagA*⁺/PPC⁺, schwarze Balken in Abbildung 8). Wie aus der Abbildung ersichtlich wird, war bei dieser Patientengruppe die Prävalenz von L3/G3/IM/AG am höchsten. ORs (95% CI) beim Vergleich von *vacAsI*⁺/*cagA*⁺/PPC⁺ Patienten (schwarze Balken) mit *vacAsI*⁻/*cagA*⁻ Patienten (weiße Balken) sind in der Abbildung 8 gezeigt. Diese Ergebnisse zeigen, daß bei Infektion mit *vacAsI*⁺/*cagA*⁺ Stämmen das zusätzliche Vorhandensein einer proinflammatorischen *IL-1* Polymorphismenkombination das Risiko zur Entwicklung von schweren histologischen Veränderungen in der Magenmukosa beträchtlich erhöht. Man hat also eine synergistische Wirkung von bakteriellen Virulenzfaktoren und *IL-1* Polymorphismen während der Karzinogenese.

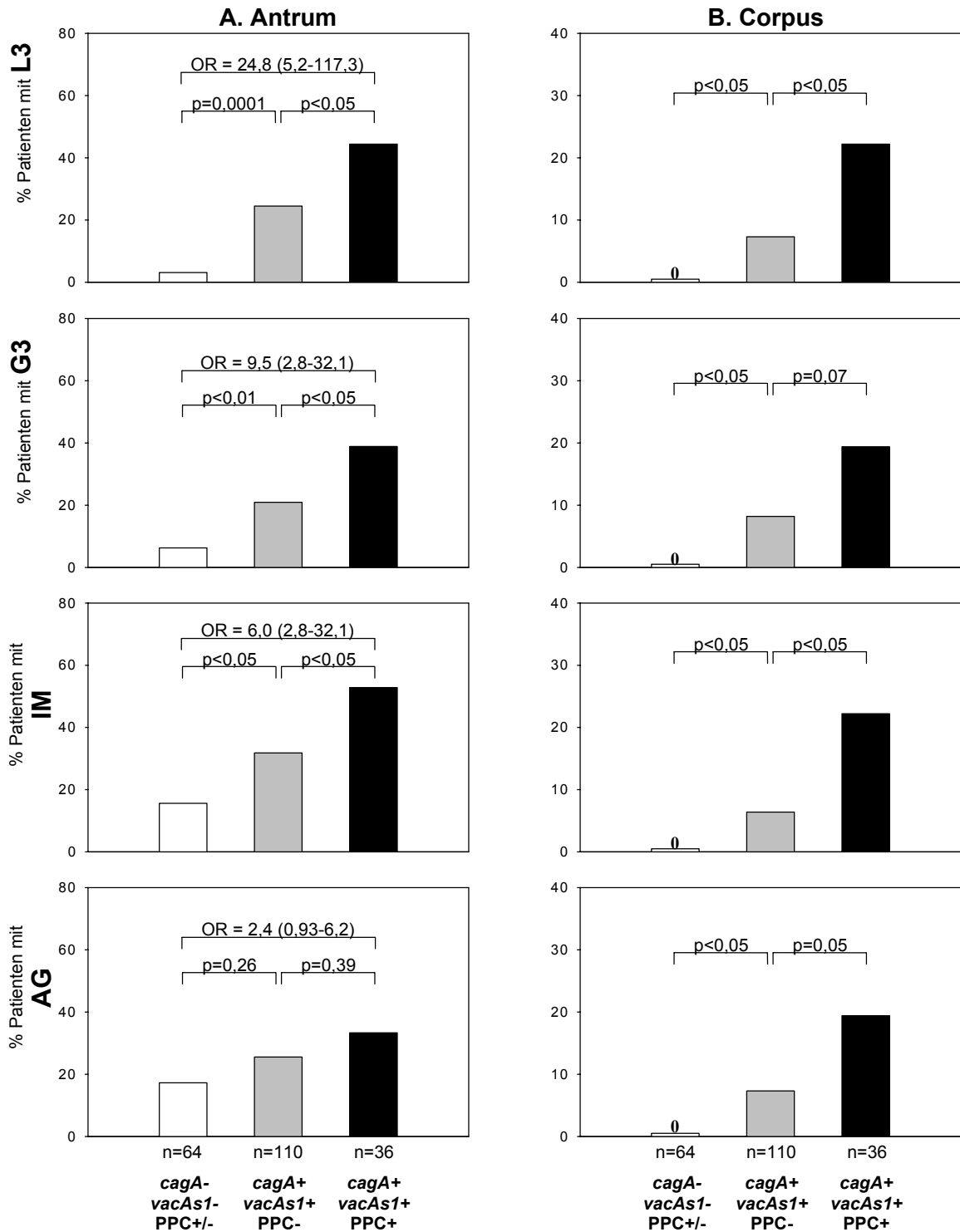


Abbildung 8. Prävalenz von schweren histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut bei Patienten mit verschiedenen IL-1 Polymorphismen sowie Infektion mit unterschiedlichen *H. pylori* Stämmen. **Weisse Balken:** Patienten, die mit *cagA*⁻/*vacAsI*⁻ Stämmen infiziert waren (unabhängig vom IL-1 Polymorphismsstatus). **Graue Balken:** Patienten, die mit *cagA*⁺/*vacAsI*⁺ Stämmen infiziert waren, die jedoch keine proinflammatorische Polymorphismuskombination (*IL-1B-511T/31C* und *IL-1RN*2*) besaßen (PPC). **Schwarze Balken:** Patienten die mit *cagA*⁺/*vacAsI*⁺ Stämmen infiziert waren und gleichzeitig PPC⁺ waren. Der Fisher's Exakt Test wurde verwendet um p Werte zu berechnen. Odds Ratios (OR) und korrespondierende 95% Konfidenzintervalle (CI) wurden mittels StatXact Software (Version 4.0.1; Cytel) berechnet. Im Corpus konnten ORs aufgrund des fehlenden Vorkommens von L3/G3/IM/AG bei Patienten mit *cagA*⁻/*vacAsI*⁻ Stämmen nicht berechnet werden. L3, hochgradige lymphozytäre Infiltration; G3, hochgradige granulozytäre Infiltration; IM, intestinale Metaplasie; AG, atrophische Gastritis.

3.5 Einfluß des bakteriellen Adhäsins BabA auf Inflammation und Kolonisation. Mechanismus der BabA-vermittelten Pathogenese

3.5.1 Assoziation von BabA mit weiteren bakteriellen Virulenzfaktoren

Nach DNA-Isolierung aus Biopsiematerial wurde das Vorhandensein von bakteriellen Virulenzfaktoren mittels PCR bestimmt. In einer Untergruppe von 141 *H. pylori* infizierten Patienten wurde neben der CagA- und VacA-Typisierung auch der BabA-Status bestimmt. Abbildung 9A zeigt die Genotypenverteilung in dieser Patientengruppe. Der *babA2* Genotyp wurde in 38% der Fälle nachgewiesen, *cagA* in 65% und *vacAs1* in 74%. *babA2* ist mit *cagA* und *vacAs1* assoziiert (Abbildung 9b), da fast alle *babA2*⁺ Stämme (50 von 53) auch gleichzeitig *vacAs1/cagA*-positiv waren (*vacAs1*⁺/*cagA*⁺ = *type1*). Um die Bedeutung von BabA für die Pathogenese zu bestimmen, wurden *vacAs1*⁺/*cagA*⁺ Stämme abhängig vom BabA Status in zwei Gruppen geteilt (Abbildung 9b): *type1* Stämme, die *babA2*-positiv sind (*vacAs1*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁺; n = 50) und *type1* Stämme, die *babA2*-negativ sind (*vacAs1*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁻; n= 38).

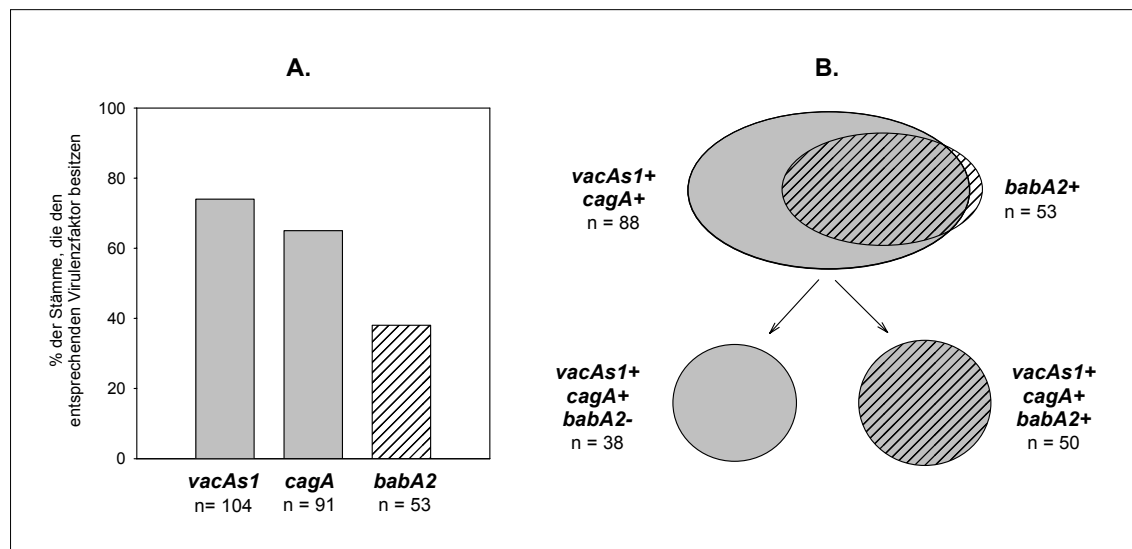


Abbildung 9. (A) Prävalenz von *vacAs1*, *cagA* und *babA2* in einer Population von 141 *H. pylori* infizierten Patienten. (B) Schematische Darstellung des Vorkommens von *babA2* bei *vacAs1*⁺/*cagA*⁺ und *vacAs1*⁻/*cagA*⁻ Stämmen. Die *vacAs1*⁺/*cagA*⁺ Stämme sind durch die grau gefüllten Kreise repräsentiert. Die schraffierten Kreise stellen die Gruppe der *babA2* positiven Stämme dar. Fast alle *babA2*⁺ Stämme waren auch gleichzeitig *vacAs1*⁺ und *cagA*⁺ (50 von 53). *vacAs1*⁺/*cagA*⁺ Stämme können somit in Abhängigkeit vom BabA Status weiter unterteilt werden.

3.5.2 Gastrales Vorkommen des BabA-Rezeptors Le^b in der Population

Das Vorhandensein von Le^b, dem korrespondierenden Bindungsmolekül des bakteriellen Adhäsins BabA, wurde am antralen Magenepithel von 131 *H. pylori* positiven Patienten und in 141 nicht-infizierten Patienten mittels Immunhistochemie nachgewiesen. Abbildung 10 zeigt immunhistochemische Färbungen der Magenschleimhaut von Le^b-positiven und -negativen Patienten. Die Immunhistochemische Färbung wurde zunächst mit Zelllinien etabliert (HT29 Zellen als Negativkontrolle und SW480 Zellen als Positivkontrolle). Alle negativen Schnitte wurden ein zweites Mal gefärbt um methodische Fehler auszuschließen.

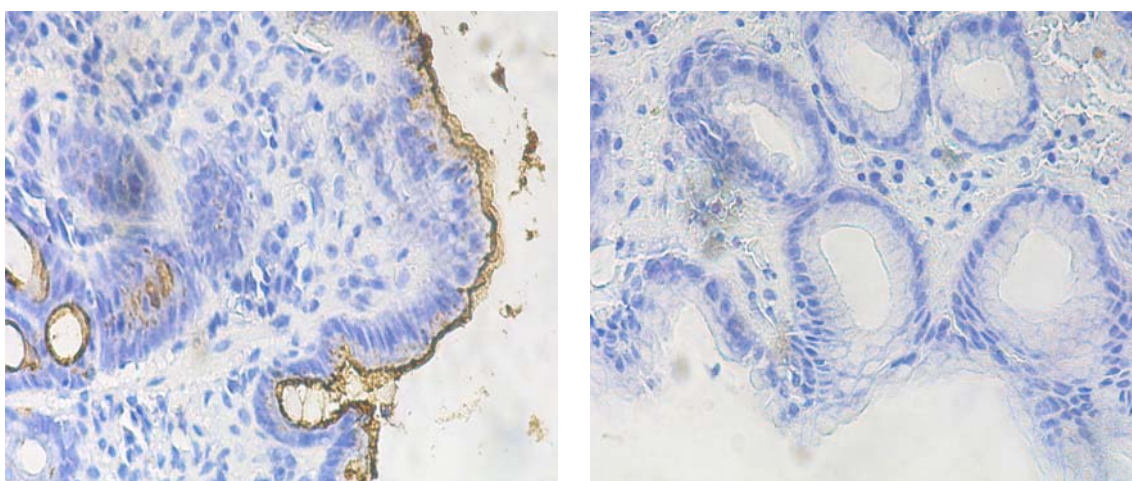


Abbildung 10. Immunhistochemische Lewis^b Färbung an Magenschleimhautschnitten. Links: Lewis^b positive Mukosa. Rechts: Lewis^b negative Schleimhaut

Unter den infizierten Patienten waren 90,8% Le^b-positiv. Nur bei 12 der 131 Patienten konnte kein Le^b nachgewiesen werden. Drei dieser Patienten waren mit *vacAsI*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁺ Stämmen infiziert, vier mit *vacAsI*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁻ Stämmen und fünf mit *vacAsI*⁻/*cagA*⁻/*babA2*⁻ Stämmen. Keiner dieser Le^b-negativen Patienten entwickelte eine hochgradige Gastritis, Intestinale Metaplasie oder Atrophie, trotz teilweisem Befall mit hochpathogenen Stämmen. Unter den nicht-infizierten Patienten war Le^b auch bei über 90% vorhanden (127/141 = 90,1%). Der Le^b Status scheint also unter infizierten und nicht-infizierten Patienten identisch zu sein.

3.5.3 Bedeutung von BabA für die IL-8 Expression *in vivo*

Das Chemokin IL-8, daß bei der Infektion in großen Mengen aus Epithelzellen freigesetzt wird, ist eines der wichtigsten Vermittler der *H. pylori* induzierten granulozytären Infiltration. Um den Einfluß von bakteriellen Virulenzfaktoren auf die Entstehung dieser unspezifischen Immunantwort zu untersuchen, wurde die IL-8 Expression und die granulozytäre Infiltration in Magenbiopsien untersucht. Abbildung 11 zeigt die IL-8 Expression in einer Untergruppe von Patienten (n=83) in Abhängigkeit vom infizierenden *H. pylori* Stammtyp.

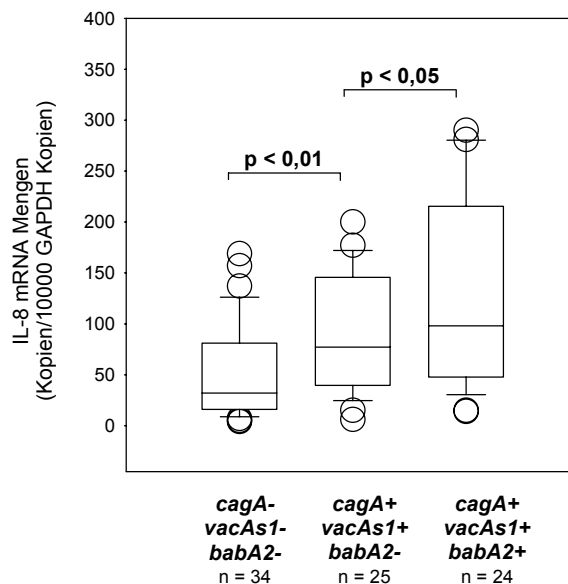


Abbildung 11. IL-8 mRNA Kopienzahlen in der Magenmukosa von verschiedenen Patientengruppen, in Abhängigkeit vom infizierenden *H. pylori* Stammtyp. *p* Werte wurden mittels eines Mann-Whitney U Tests errechnet.

Wie aus der Abbildung 11 ersichtlich wird, wurden die niedrigsten IL-8 mRNA Kopienzahlen bei Patienten gefunden, die mit *vacAs1*⁻/*cagA*⁻/*babA2*⁻ Stämmen infiziert waren. Die *vacAs1*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁻ Bakterien induzierten eine höhere IL-8 Expression, mit signifikanten Unterschieden zur ersteren Gruppe (Mann-Whitney *U* Test). Die höchsten IL-8 mRNA Mengen wurden in der Mukosa von Patienten gefunden, die mit *vacAs1*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁺ Stämmen befallen waren. Die Unterschiede zu den einzelnen Gruppen waren signifikant. *P*-Werte wurden mit einem Mann-Whitney Rank Sum Test

errechnet. Die Infektion mit einem BabA-positiven Stamm ist also mit einer erhöhten IL-8 Expression assoziiert. Dies zeigt, daß BabA für die Induktion einer unspezifischen Immunantwort von Bedeutung ist.

Darüber hinaus wurde die IL-8 Expression mit der granulozytären Infiltration korreliert. Es zeigte sich eine positive Korrelation der IL-8 mRNA Kopienzahlen mit den steigenden Graden der granulozytären Infiltration ($p < 0,05$; $r = 0,33$; Spearman Rank Test).

3.5.4 Bedeutung von BabA für die Entstehung der neutrophilen Gastritis

Um den Einfluß von BabA auf die Pathogenese der neutrophilen Gastritis zu bestimmen, wurde die Präsenz von verschiedenen Stammtypen mit dem Vorhandensein unterschiedlicher Grade der granulozytären Infiltration im Antrum korreliert. Abbildung 12 faßt die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammen.

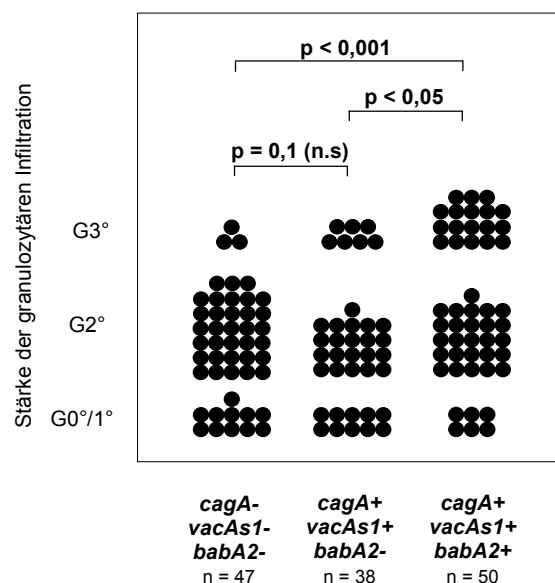


Abbildung 12. Stärke der antralen granulozytären Infiltration bei Patienten mit unterschiedlichen *H. pylori* Stämmen (G0, fehlende; G1, milde; G2, mäßige; G3, starke granulozytäre Infiltration). Jeder Kreis repräsentiert einen Patienten. *p* Werte wurden mit Hilfe eines Mann-Whitney U Tests errechnet.

Abbildung 12 zeigt, daß Patienten, die mit *H. pylori* Stämmen befallen sind, denen *vacAs1*, *cagA* und *babA2* fehlen, vor allem niedriggradige bis moderate Gastritisgrade hatten. Patienten, die mit *vacAs1*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁻ Stämmen infiziert waren hatten höhere Gastritisgrade, jedoch waren die Unterschiede zu den Patienten mit *vacAs1*⁻/*cagA*⁻/*babA2*⁻ Stämmen nicht signifikant. p-Werte wurden mit einem Mann-Whitney Rank Sum Test ausgerechnet. Die höchsten Grade der granulozytären Infiltration wurde bei solchen Patienten festgestellt, die mit *vacAs1*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁺ Stämmen infiziert waren. Die Unterschiede zu den beiden anderen Patientengruppen waren signifikant. Dies zeigt die bedeutende Rolle von BabA für die Entstehung der granulozytären Infiltration.

3.5.5 Bedeutung von BabA für die Entstehung der intestinalen Metaplasie und Atrophie

Als nächstes wurde der Einfluß der verschiedenen Virulenzfaktoren für die Entstehung der intestinalen Metaplasie (IM) und Atrophie (AG) untersucht. Abbildung 13 zeigt die Prävalenz der IM bzw. AG in Patientengruppen, die mit verschiedenen *H. pylori* Stämmen infiziert sind.

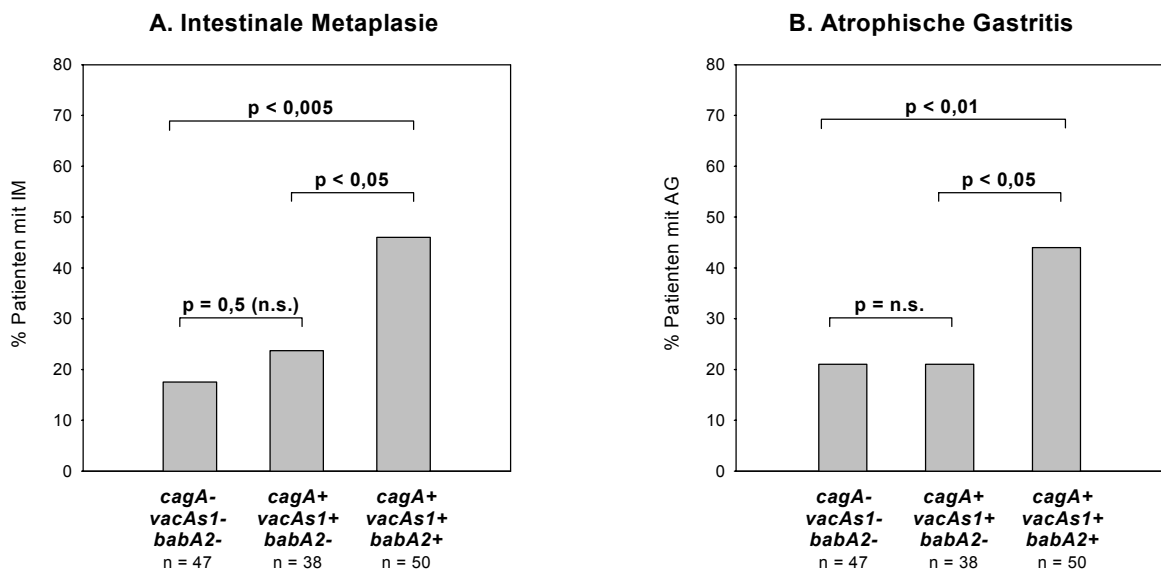


Abbildung 13. Prävalenz der intestinalen Metaplasie (IM) und atrophischen Gastritis (AG) bei Patienten mit unterschiedlichen *H. pylori* Stammtypen. Statistische Unterschiede wurden mittels eines χ^2 Tests errechnet.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, waren die IM und AG bei Patienten, die mit *vacAsI*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁺ Stämmen infiziert waren ca. zweifach höher als in den anderen Patientengruppen. Diese Unterschiede waren jeweils statistisch signifikant, wobei ein χ^2 Test angewandt wurde um p Werte auszurechnen. Dahingegen waren die Unterschiede zwischen Patienten mit *vacAsI*⁻/*cagA*⁻/*babA2*⁻ Stämmen und solchen mit *vacAsI*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁻ Stämmen nicht signifikant. Diese Ergebnisse unterstreichen die Schlüsselrolle von BabA für die Entstehung der IM/AG bei der *H. pylori* Infektion.

3.5.6 Einfluß von BabA auf die bakterielle Kolonisation

Da BabA ein Adhärenzfaktor ist und eine bessere Adhärenz möglicherweise die Kolonisationsfähigkeiten des Keimes verbessert, wurde im nächsten Schritt der Einfluß von BabA auf die Kolonisationsdichte von *H. pylori* untersucht. In einer Untergruppe von Patienten (n=95) wurde die bakterielle Kolonisation im Magenantrum mittels immunhistochemischer Färbung dargestellt und anschließend mittels mikroskopischer Auswertung semiquantitativ bestimmt. Hierbei wurden 4 verschiedene Kolonisationsdichten unterschieden (0 = ganz vereinzelt Keime sichtbar; 1 = Keimansammlungen in den Drüsen oder an der Schleimhautoberfläche, 2 = Keimansammlungen in den Drüsen und der Schleimhautoberfläche, 3 = durchgehender dichter Befall). Abbildung 14 zeigt das immunhistochemische Bild einer Grad 1 Kolonisation.

Die Abhängigkeit der Kolonisationsdichte vom infizierenden *H. pylori* Stammtyp zeigt Abbildung 15. Es zeigte sich, daß die Kolonisationsdichten viel geringer waren bei Patienten, die mit *babA2*⁻ Stämmen befallen waren als bei solchen, die mit *babA2*⁺ Stämmen infiziert waren (p<0,005; Mann-Whitney Rank Sum Test). Wie aus der Abbildung hervorgeht, zeigten *vacAsI*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁻ Stämme einen dichteren Befall als *vacAsI*⁻/*cagA*⁻/*babA2*⁻ Stämme, jedoch waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant. Die höchsten Kolonisationsdichten wurden bei Patienten gefunden, die mit *vacAsI*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁺ Stämmen infiziert waren und der Unterschied zur *vacAsI*⁻/*cagA*⁻/*babA2*⁻ Gruppe war signifikant. Diese Assoziation von BabA mit erhöhter Bakteriendichte läßt vermuten, daß BabA die Kolonisationsfähigkeit von *H. pylori* verbessert.

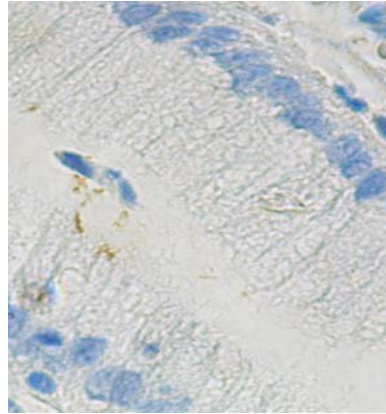


Abbildung 15. Immunhistochemische *H. pylori* Färbung an Magenbiopsien zur semiquantitativen Bestimmung der Kolonisationsdichte. Hier dargestellt ist eine geringe Kolonisationsdichte (Grad 1).

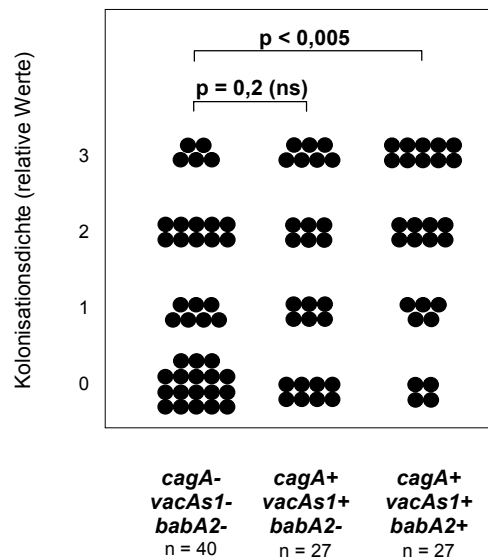


Abbildung 15. Bakterielle Kolonisationsdichte bei Patienten mit unterschiedlichem *H. pylori* Stammefall. Jeder Kreis repräsentiert die Kolonisationsdichte bei einem Patienten. Der Mann-Whitney U Test wurde für den statistischen Vergleich der Gruppen verwendet.

3.5.7 Einfluß der Bakteriendichte auf die IL-8 Sekretion aus Epithelzellen *in vitro*

Wie oben beschrieben ist BabA sowohl mit einer erhöhten IL-8 Expression als auch mit einer erhöhten bakteriellen Kolonisationsdichte assoziiert. Im nächsten Schritt stellte sich die Frage, ob die durch diese Keime bedingte höhere Kolonisationsdichte für die erhöhte mukosale IL-8 Expression verantwortlich ist. Um den Effekt der Bakterienzahl

auf die IL-8 Sekretion zu untersuchen, wurden KATO III Zellen mit verschiedenen Mengen an *H. pylori* kokultiviert und anschließend die IL-8 Produktion dieser Zellen auf mRNA und Proteinebene bestimmt. IL-8 mRNA Kopienzahlen wurden nach zwei Stunden Stimulation mittels quantitativer TaqMan PCR bestimmt. IL-8 Protein hingegen wurde nach 24 Stunden Inkubation aus dem Überstand durch ELISA bestimmt. Für die Stimulation wurden zwei *vacAsI*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁺ Stämme eingesetzt: *H. pylori* G27 und *H. pylori* 2808. Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der Stimulationsexperimente mit *H. pylori* Stamm G27.

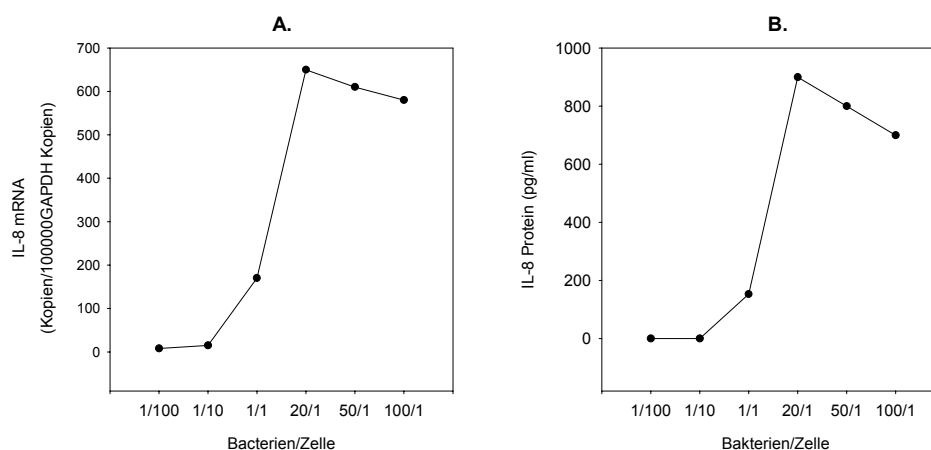


Abbildung 16. IL-8 mRNA Expression (A) und Proteinsekretion (B) aus KATO III Zellen nach Kokultivierung mit steigenden *H. pylori* Mengen. Die Ergebnisse wurden bei Stimulation mit dem *cagA*⁺/*vacAsI*⁺/*babA*⁺ Stamm G27 erzielt. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach Stimulation mit dem *H. pylori* Stamm 2808 erzielt.

Die eingesetzte Bakterienzahl ist pro Zelle angegeben. Wie aus der Abbildung ersichtlich wird, steigen die IL-8 mRNA- und Proteinkonzentrationen mit steigender Bakterienzahl bis zu einem Verhältnis von ca. 20 Bakterien/Zelle. Bei unphysiologischen Konzentrationen von über 20 Bakterien/Zelle sanken die IL-8 Mengen wieder. Möglicherweise liegt dies an der vermehrten Apoptose, die durch so hohe Bakterienkonzentrationen hervorgerufen werden. Diese Experimente zeigen eindeutig, daß die Bakterienzahl die Höhe der IL-8 Sekretion aus Epithelzellen beeinflusst. Gerade im Bereich von physiologischen Bakterienkonzentrationen (Verhältnis Bakterie pro Zelle 1/10 – 20/1) steigt die IL-8 Sekretion stetig mit steigender Bakterienzahl. Dies deutet darauf hin, daß die erhöhte Kolonisationsdichte

bei BabA⁺ Stämmen für die erhöhte mukosale IL-8 Expression verantwortlich ist, was wiederum die verstärkte granulozytäre Infiltration im Rahmen der Infektion mit diesem Stammtyp bedingt.

3.5.8 Assoziation von BabA mit der lymphozytären Infiltration

Um den Einfluß von bakteriellen Virulenzfaktoren auf die lymphozytäre Infiltration zu evaluieren wurde die Infektion mit verschiedenen Stammtypen (in Bezug auf die Präsenz der Gene *vacAs1*, *cagA* und *babA2*) mit den entsprechenden Graden der lymphozytären Infiltration im Magenantrum korreliert. Wie aus Abbildung 17 ersichtlich wird, wurden die höchsten Grade der lymphozytären Infiltration bei Patienten gefunden, die mit *vacAs1*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁺ Stämmen infiziert waren. Die Unterschiede zu den zwei anderen *babA2*-negativen Patientengruppen waren statistisch signifikant (χ^2 Test). Die niedrigsten Grade der lymphozytären Infiltration wurden bei Patienten verzeichnet, die mit *vacAs1*⁻/*cagA*⁻/*babA2*⁻ Stämmen infiziert waren, während Patienten, die mit *vacAs1*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁻ Stämmen befallen waren, hinsichtlich der lymphozytären Infiltrationsstärke eine Mittelstellung einnahmen. Diese Daten zeigen eindeutig eine entscheidende Rolle von BabA bei der Verstärkung der lymphozytären Immunantwort.

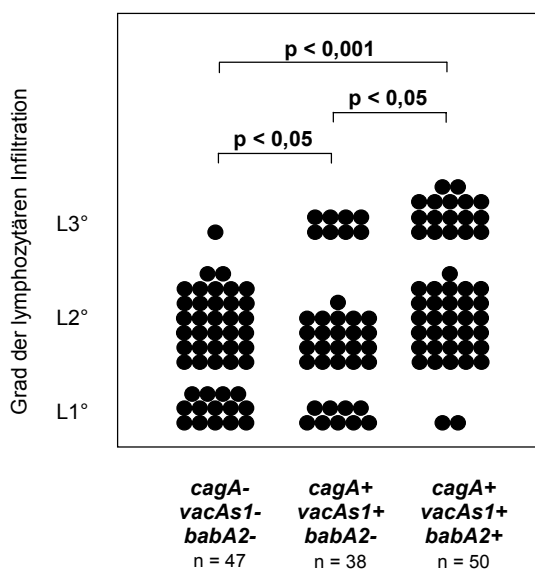


Abbildung 17. Stärke der lymphozytären Infiltration bei Patienten, die mit unterschiedlichen *H. pylori* Stammtypen infiziert sind. L1, milde; L2, mäßige, L3 starke lymphozytäre Infiltration. Statistische Auswertungen erfolgten mit Hilfe eines Mann-Whitney U Tests.

3.5.9 Einfluß von BabA und anderen Virulenzfaktoren auf das Ausmaß der *H. pylori* induzierten Th1-Antwort

Im nächsten Schritt wurde der Einfluß von bakteriellen Virulenzfaktoren auf die Entstehung der *H. pylori* induzierten Th1 Antwort untersucht. Hierzu wurden in 94 Antrumbiopsien mRNA Kopienzahlen der Th1 Marker Interferon (IFN) γ , Tumor Necrosis Factor (TNF) α und der Interleukin-12 Rezeptor $\beta 2$ Kette (IL-12R $\beta 2$) mittels quantitativer TaqMan PCR bestimmt und mit dem Vorhandensein der einzelnen Virulenzfaktoren korreliert. TNF- α wird nicht nur von Th1-Zellen gebildet sondern auch von anderen Zelltypen, wie z.B. Makrophagen. Es ist also kein absolut spezifischer Th1-Marker. Da aber TNF- α während der *H. pylori* induzierten Th1-Antwort eine wichtige Rolle spielt und möglicherweise in entscheidender Weise bei der entzündungsassoziierten Gewebsdestruktion beteiligt ist, wurde dieses Zytokin in unsere Analysen miteinbezogen.

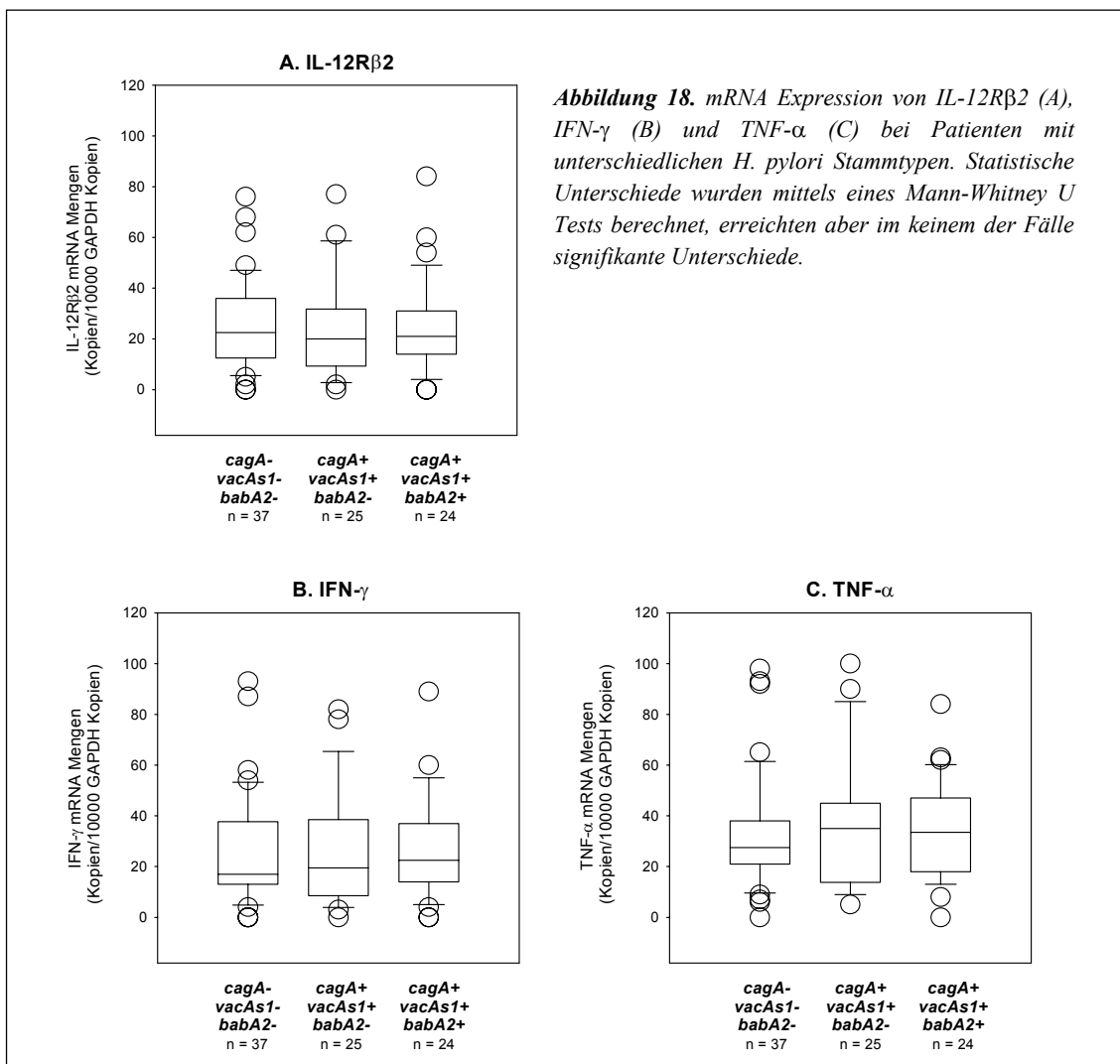


Abbildung 18 zeigt schematisch die mRNA Kopienzahlen der oben genannten Th1 Marker. Interessanterweise waren die mRNA Mengen von IFN- γ , TNF- α und IL-12R β 2 in Patientengruppen, die mit unterschiedlichen *H. pylori* Stammtypen befallen waren, sehr ähnlich. Patienten, die mit *vacAsI*⁻/*cagA*⁻/*babA2*⁻ Stämmen infiziert waren hatten durchschnittlich gesehen ähnliche Mengen der Th1 Marker in der Antrum mukosa wie Patienten, die mit *vacAsI*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁻, oder *vacAsI*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁺ Stämmen infiziert waren. Bakterielle Virulenzfaktoren scheinen also die gegen *H. pylori* gerichtete Th1 Antwort nicht zu beeinflussen.

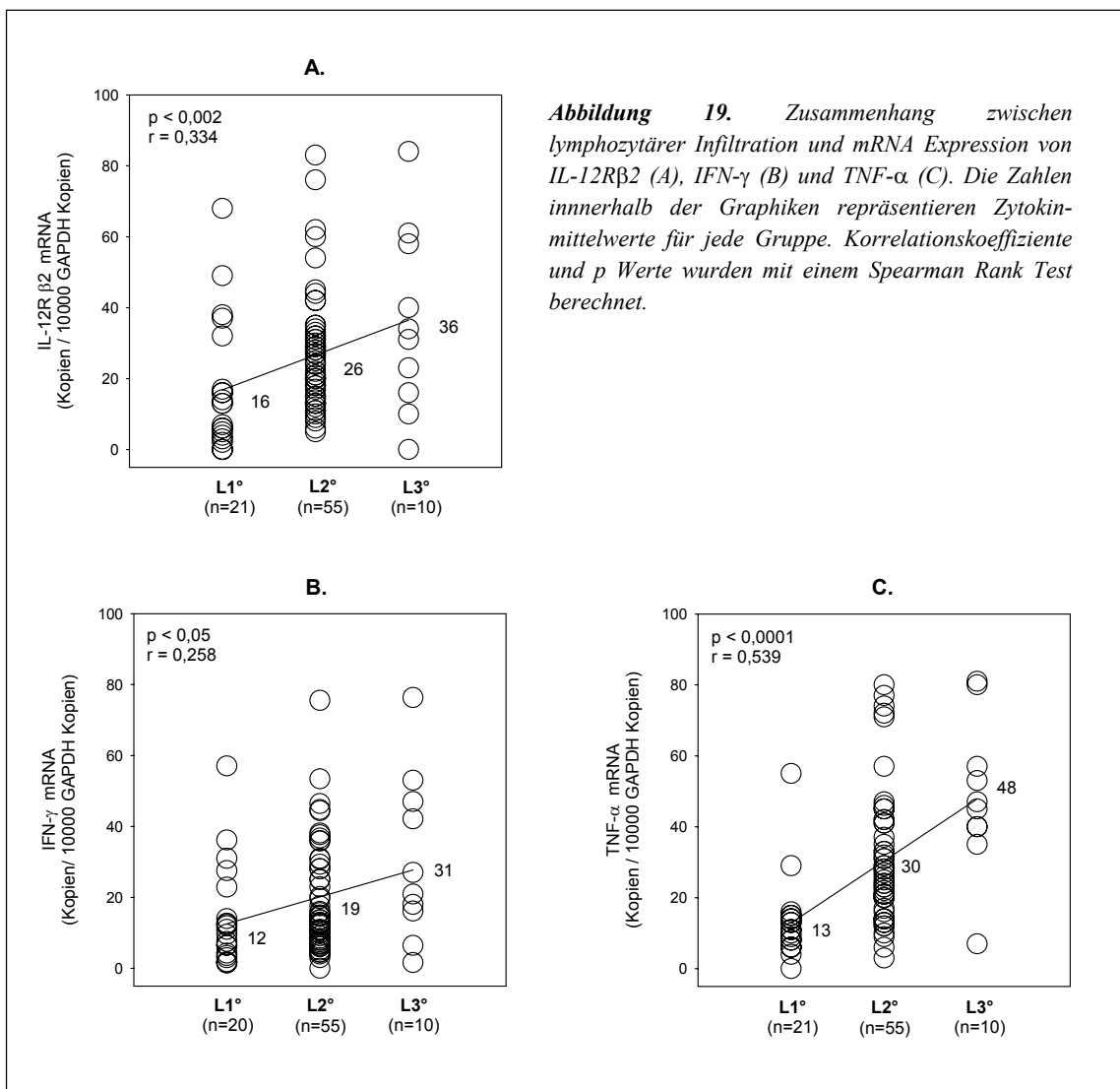


Abbildung 19. Zusammenhang zwischen lymphozytärer Infiltration und mRNA Expression von IL-12R β 2 (A), IFN- γ (B) und TNF- α (C). Die Zahlen innerhalb der Graphiken repräsentieren Zytokin-mittelwerte für jede Gruppe. Korrelationskoeffiziente und p Werte wurden mit einem Spearman Rank Test berechnet.

Die Tatsache, daß Virulenzfaktoren von *H. pylori* nicht mit der Th1 Antwort assoziiert sind, ist erstaunlich, denn die virulenten Stammtypen sind mit erhöhter lymphozytärer Infiltration assoziiert, und man geht davon aus, daß ca. die Hälfte der Lymphozyten in der Mukosa Th1 Zellen sind. Aus diesem Grund wurde nachfolgend die Th1-Antwort mit der lymphozytären Infiltration korreliert. Abbildung 19 zeigt die mRNA Mengen der Th1-Marker bei Patienten mit unterschiedlichen Graden der lymphozytären Infiltration. Wie aus der Abbildung ersichtlich wird, korrelierten die mRNA Mengen an IFN- γ , TNF- α und IL-12R β 2 positiv mit den steigenden Graden der lmyphozytären Infiltration, mit Korrelationskoeffizienten (r) von 0,26 bis 0,53 und signifikanten dazugehörigen p Werten (Spearman Rank Sum Test). Je ausgeprägter die lymphozytäre Infiltration, desto größer ist die Th1 Antwort.

4 Diskussion

4.1. Einleitung

Die Infektion mit *H. pylori* ist die Hauptursache für die Entstehung des Magenkarzinoms (106; 108; 140). Da jedoch nur ein kleiner Anteil der infizierten Patienten ein Karzinom entwickelt, ist es von außerordentlicher Bedeutung bakterielle Faktoren und genetische Risikofaktoren des Menschen zu identifizieren, die mit der Krebsentstehung assoziiert sind. Patienten mit solchen Risikofaktoren könnten frühzeitig identifiziert werden und einer präventiven *H. pylori* Eradikation zugeführt werden.

Die durch *H. pylori* ausgelöste chronische Entzündung der Magenschleimhaut trägt zur Entstehung des Magenkarzinoms bei (38; 49; 50), und die hierbei entstehenden histologischen Veränderungen, wie die intestinale Metaplasie und Atrophie sind mit der Krebsentstehung assoziiert worden (108).

Im ersten Teil der Arbeit wurde an einer Magenbiopsiebank parallel der Einfluß von humanen *IL-1* Polymorphismen und der bakteriellen Virulenzfaktoren VacA und CagA auf die Entstehung von schwerwiegenden histologischen Veränderungen der Magenmukosa untersucht. Es wurde gezeigt, wie sich diese Faktoren einzeln und in Kombination auf die Entstehung der Inflammation, IM und AG auswirken.

Der zweite Teil der Arbeit untersuchte den Einfluß des bakteriellen Adhäsins BabA auf die Kolonisation, Inflammation und Karzinogenese. Es wurde sowohl die Assoziation mit der Magenpathologie gezeigt, wie auch der Mechanismus der BabA vermittelten Pathogenese demonstriert.

4.2 Die Rolle von Wirtsfaktoren und bakteriellen Faktoren bei der Entstehung von schweren histologischen Mukosaveränderungen

4.2.1 Die bakteriellen Virulenzfaktoren CagA und VacA erhöhen das Risiko für die Entstehung hochgradiger Gastritis, intestinaler Metaplasie und Atrophie

Die bisher am besten charakterisierten Virulenzfaktoren von *H. pylori* sind VacA und CagA (11). Epidemiologische Studien, die den Zusammenhang zwischen bakteriellen Virulenzfaktoren und Magenkarzinomen untersuchten, sind widersprüchlich: während ein Teil der Studien eine Assoziation dieser Faktoren mit Magenkarzinomen zeigt, finden andere Studien keinen Einfluß von CagA oder VacA auf die Krebsentstehung (13) (33; 72; 89; 97; 105; 154). Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit die Assoziation von CagA und VacA mit präkanzerösen Läsionen der Magenschleimhaut korreliert. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, daß bakterielle Virulenzfaktoren den primären Trigger für die Entstehung von schweren Gastritiden, intestinaler Metaplasie und Atrophie darstellen. Patienten, die mit *cagA*⁺/*vacAsI*⁺ Stämmen befallen waren hatten eine bis zu 16fach höhere antrale Prävalenz dieser histologischen Veränderungen als Patienten, die mit *cagA*⁻/*vacAsI*⁻ Stämmen infiziert waren. Nur 3-6% der mit *cagA*⁻/*vacAsI*⁻ infizierten Patienten hatten eine dieser Veränderungen im Antrum. Noch eindrucksvoller waren die Daten im Corpus: keiner der mit *cagA*⁻/*vacAsI*⁻ Stämmen infizierten Patienten hatte eine G3/L3/IM/AG im Magenkorpus. Diese Ergebnisse unterstreichen die zentrale Rolle von bakteriellen Virulenzfaktoren bei der Entstehung von schweren histologischen Veränderungen der Magenmukosa und sind im Einklang mit Studien an einem holländischen Patientenkollektiv (76; 141). Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, daß die *cag* PAI eine besondere Rolle für die Induktion der Entzündungsantwort spielt. *In vitro* Experimente haben gezeigt, daß *cag*PAI Gene ein Superset von Wirtsgenen in ihrer Expression hochregulieren, darunter immunologisch bedeutsame Gene (60), was letztlich zu einer erhöhten Entzündungsantwort führt. Darüber hinaus sprechen Studien in Tiermodellen dafür, daß die *cag*PAI der wichtigste krankheitsassoziierte Faktor von *H. pylori* ist. Infektion von mongolischen Wüstenrennmäusen mit *cagA*⁻ *H. pylori* Stämmen führte, im Gegensatz zu Infektion mit *cagA*⁺ Stämmen nicht zur Entwicklung schwerer Gastritiden, Ulzera oder

Magenkarzinomen (68; 99). Ähnlicherweise führen im Mausmodell Infektionen mit *cagA*⁻ *H. pylori* Stämmen nicht zur Entwicklung von starken Entzündungsreaktionen wohingegen *cagA*⁺ Stämme eine stärkere Inflammation sowie mukosale Schäden hervorrufen (82). Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß CagA und das damit assoziierte VacA eine sehr wichtige Rolle für die Entwicklung von schweren histologischen Veränderungen der Magenschleimhaut spielen.

4.2.2 Proinflammatorische *IL-1* Polymorphismen sind mit erhöhter IL-1 β Expression und der Entstehung von schweren histologischen Veränderungen der Mukosa assoziiert

Trotz der entscheidenden Rolle von bakteriellen Virulenzfaktoren für die Entstehung der *H. pylori* assoziierten Magenpathologie ist unklar warum nur ein kleiner Teil der infizierten Patienten hochgradige histologische Veränderungen der Magenschleimhaut oder sogar ein Magenkarzinom entwickelt. Andere Faktoren scheinen also auch eine Rolle für die Entstehung der Magenpathologie zu haben. Darüber hinaus haben *H. pylori* infizierte Patienten, die ein Duodenalulkus entwickeln, ein geringeres Karzinomrisiko als andere *H. pylori* Träger (62; 140). Da die bisher bekannten Virulenzfaktoren sowohl die Entstehung von Karzinomen als auch die von Ulzera begünstigen, scheinen Wirtsfaktoren die unterschiedliche Entwicklung in Richtung Karzinom oder Duodenalulkus zu lenken.

Kürzlich erschienene Studien haben *IL-1* Polymorphismen mit Magenkrebs in Zusammenhang gebracht (35; 47; 79). In der gegenwärtigen Studie wurde eine Assoziation zwischen proinflammatorischen *IL-1* Polymorphismen und der Entwicklung von schweren histologischen Veränderungen der Mukosa gefunden. Träger der *IL-1B-511T/-31C* und *IL-1RN*2* Allele hatten ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von L3/G3/IM/AG, vor allem wenn beide proinflammatorischen Allele gleichzeitig vorhanden waren. Die ORs lagen hierbei zwischen 1,7 und 4,4. Gleichzeitig konnte in der gegenwärtigen Studie gezeigt werden, daß die *H. pylori* induzierte IL-1 β Expression maßgeblich von *IL-1* Polymorphismen beeinflusst wird. Patienten mit dem *IL-1RN*2* Allel und in geringem Maße auch Träger der *IL-1B-511T/-31C* Allele wiesen höhere IL-1 β mRNA Mengen in der Mukosa auf als Kontrollpatienten. Dies

stellt die funktionelle Grundlage dar für die Assoziation von proinflammatorischen Polymorphismen mit der Magenpathologie dar.

Die Erklärung für die Assoziation von *IL-1* Polymorphismen mit präkanzerösen Läsionen des Magens liegt möglicherweise in der Rolle von IL-1 β bei der Kontrolle der Säuresekretion begründet (34). Die individuelle Fähigkeit zur Säureproduktion scheint die unterschiedliche Entwicklung einer *H. pylori* Infektion in Richtung Karzinom oder Duodenalulkus zu lenken. Während Patienten mit hohem Säure-Output vor allem eine Prädisposition zur antrumprädominanten Gastritis und Duodenalulzeration haben, zeigt sich bei Patienten mit Hypochlorhydrie und Corpusgastritis ein höheres Magenkarzinomrisiko (36; 37; 58). IL-1 β , dessen Expression während der *H. pylori* Infektion hochreguliert wird (96; 107; 152), ist eines der stärksten Inhibitoren der Magensäuresekretion (143). Dieser Effekt wird erzielt durch funktionelle Hemmung von ECL-Zellen und Parietalzellen. Einerseits hemmt IL-1 β die Säurefreisetzung aus Parietalzellen über Proteinkinase-C abhängige Mechanismen nach Bindung an IL-1 Rezeptoren (9; 10; 121). Andererseits hemmt IL-1 β die Histaminfreisetzung aus ECL-Zellen über NO-abhängige Mechanismen und durch die Induktion von Apoptose (80; 113). Die genannten Studien zeigen, daß IL-1 β eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der *H. pylori* induzierten Hypochlorhydrie spielen könnte. Diese Hypothese wird unterstützt durch eine kürzlich publizierte Studie, die zeigen konnte, daß Behandlung von *H. pylori* infizierten mongolischen Wüstenrennmäusen mit rekombinant hergestelltem IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1RA) zu einer Erhöhung der Magensäuresekretion führt (134). Da eine hohe Säuresekretion einen wachstumshemmenden Effekt auf *H. pylori* hat (118), wird die Kolonisation der säurebildenden Corpusregion wahrscheinlich durch die IL-1 β vermittelte Hypochlorhydrie gefördert, vor allem bei Patienten mit proinflammatorischen *IL-1* Polymorphismen.

Wie bereits erwähnt, wurde in früheren Studien gezeigt, daß Patienten mit Magenkarzinom meist eine korpusprädominante Gastritis oder eine Pangastritis aufweisen, wohingegen Duodenalulzera mit antrumprädominanter Gastritis assoziiert sind (34). Interessanterweise zeigen die Ergebnisse dieser Studie, daß proinflammatorische *IL-1* Polymorphismen zu einer verstärkten Gastritis sowohl im Antrum als auch im Corpus führen. Der Einfluß auf die Entwicklung der Corpusgastritis war jedoch stärker. Darüber hinaus zeigte sich in dieser Studie, daß fast alle Patienten

mit schwerer Corpusgastritis auch eine schwere Antrumgastritis hatten, so daß die Corpusgastritis in dieser Patientenpopulation als Marker für eine Pangastritis dient. Nichtsdestotrotz könnte man aufgrund der Assoziation von proinflammatorischen *IL-1* Polymorphismen mit hohen antralen Gastritisgraden annehmen, daß diese Polymorphismen auch zur Duodenalulzeration prädisponieren. Ein Hauptmerkmal der Duodenalulzeration ist jedoch die hohe Säuresekretion (34). Da IL-1 β ein potenter Inhibitor der Säuresekretion ist und zur Hypochlorhydrie führt, ist es unwahrscheinlich, daß proinflammatorische *IL-1* Polymorphismen zur Duodenalulzeration prädisponieren. In der Tat hat eine kürzlich erschienene Studie gezeigt, daß Patienten mit proinflammatorischen *IL-1* Polymorphismen ein erniedrigtes Risiko zur Entwicklung von Duodenalulzera haben (54). Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß proinflammatorische *IL-1* Polymorphismen mit einer erhöhten mukosalen IL-1 β Expression assoziiert sind. Dies bedingt, möglicherweise durch die IL-1 β vermittelte Hypochlorhydrie, eine Verstärkung der *H. pylori* induzierten Gastritis sowie die Entstehung der intestinalen Metaplasie und Atrophie.

4.2.3 Die gleichzeitige Bestimmung von bakteriellen Virulenzfaktoren und *IL-1* Polymorphismen erlaubt die Identifikation von Hoch-Risiko-Patienten für die Entstehung eines Magenkarzinoms

Die höchste Prävalenz von schwerwiegenden Veränderungen der Magenschleimhaut wurde bei Patienten gefunden, die mit einem *cagA*⁺/*vacAsI*⁺ Stamm befallen waren (bakterieller Hoch-Risiko-Genotyp) und gleichzeitig proinflammatorische *IL-1* Polymorphismen (*IL-1B-511T/-31C*⁺ /*IL-1RN*2*⁺; menschlicher Hoch-Risiko-Genotyp) besaßen. Die Odds Ratios für die Entwicklung von G3, L3, IM, AG lagen beim Vergleich dieser Patientengruppe (d.h. *cagA*⁺/*vacAsI*⁺ *IL-1B-511T/-31C*⁺ /*IL-1RN*2*⁺) mit Patienten, die mit *cagA*⁻ oder *vacAsI*⁻ Stämmen befallen waren lagen zwischen 2,4 (95% CI, 0,93 - 6,2) und 24,8 (95% CI, 5,2 – 117,3). Diese dramatisch erhöhten Risiken zeigen, daß es eine synergistische Interaktion zwischen bakteriellen Virulenzfaktoren und *IL-1* Polymorphismen gibt. Wenn beide Risikofaktoren vorhanden sind, führt dies zu einem extrem hohen Risiko zur Entwicklung von schweren histologischen Veränderungen der Magenmukosa. Vergleichbar sind diese Zahlen etwa mit dem Risiko

zur Entwicklung eines Bronchialkarzinoms bei täglichem Abusus von 20 Zigaretten. Ein Synergismus zwischen bakteriellen und humanen Faktoren könnte von großer Bedeutung bei der Entwicklung der Hypochlorhydrie spielen. Eine hohe IL-1 β Expression bei Patienten mit proinflammatorischen *IL-1* Polymorphismen führt zu erniedrigter Säuresekretion und einer nachfolgend erhöhten Kolonisation des Corpus. Wenn eine Infektion mit *cagA*⁺/*vacAsI*⁺ Stämmen vorhanden ist, wird die Inhibition der Säuresekretion verstärkt sein, da *cagA*⁺ Stämme, jedoch nicht *cagA*⁻ Stämme induzieren Apoptose von Parietalzellen (95). Die Ergebnisse dieser Studien sind in Einklang mit einer kürzlich publizierten Arbeit (47), die zeigte, daß die Prävalenz des Magenkarzinoms am höchsten ist bei Patienten, die mit *cagA*⁺/*vacAsI*⁺ Stämmen infiziert waren und gleichzeitig die proinflammatorischen Polymorphismen *IL-1B-511T/31C* und *IL-1RN*2* besaßen.

Abbildung 20 faßt die Ergebnisse dieses Teils dieser Arbeit zusammen. Die Studie unterstützt ein sequentielles Modell der gastralen Karzinogenese, bei der sowohl bakterielle Virulenzfaktoren als auch *IL-1* Polymorphismen des Wirtes eine bedeutende Rolle spielen. Bakterielle Virulenzfaktoren sind eine bedeutende Voraussetzung für die Entstehung von schweren histologischen Veränderungen der Magenmukosa. Wenn diese Faktoren vorhanden sind, spielen *IL-1* Polymorphismen eine bedeutende Rolle bei der Verstärkung des Effektes und vor allem bei der Lenkung der Krankheitsentstehung in Richtung Karzinom. Die Ergebnisse unterstreichen, daß bakterielle Virulenzfaktoren und immunologische Faktoren des Wirtes in synergistischer Art und Weise während der gastralen Karzinogenese wirken. Dies ermöglicht ein besseres Verständnis dieser komplexen, multifaktoriellen Erkrankung. Darüber hinaus sind die Ergebnisse von klinischer Relevanz, denn eine kombinierte bakterielle und humane Genotypisierung könnte die Identifizierung von Magenkarzinom-Risiko-Patienten erlauben, lange bevor sich die Erkrankung manifestiert, im Stadium der chronischen Gastritis. Diese Patienten könnten von einer präventiven Eradikation profitieren. Wenn man die hohe Prävalenz der Infektion sowie von Resistenzen und die hohen Kosten der Eradikation berücksichtigt, könnte dieser Ansatz eine sinnvolle Basis für therapeutische Entscheidungen im Stadium der chronischen Gastritis bieten.

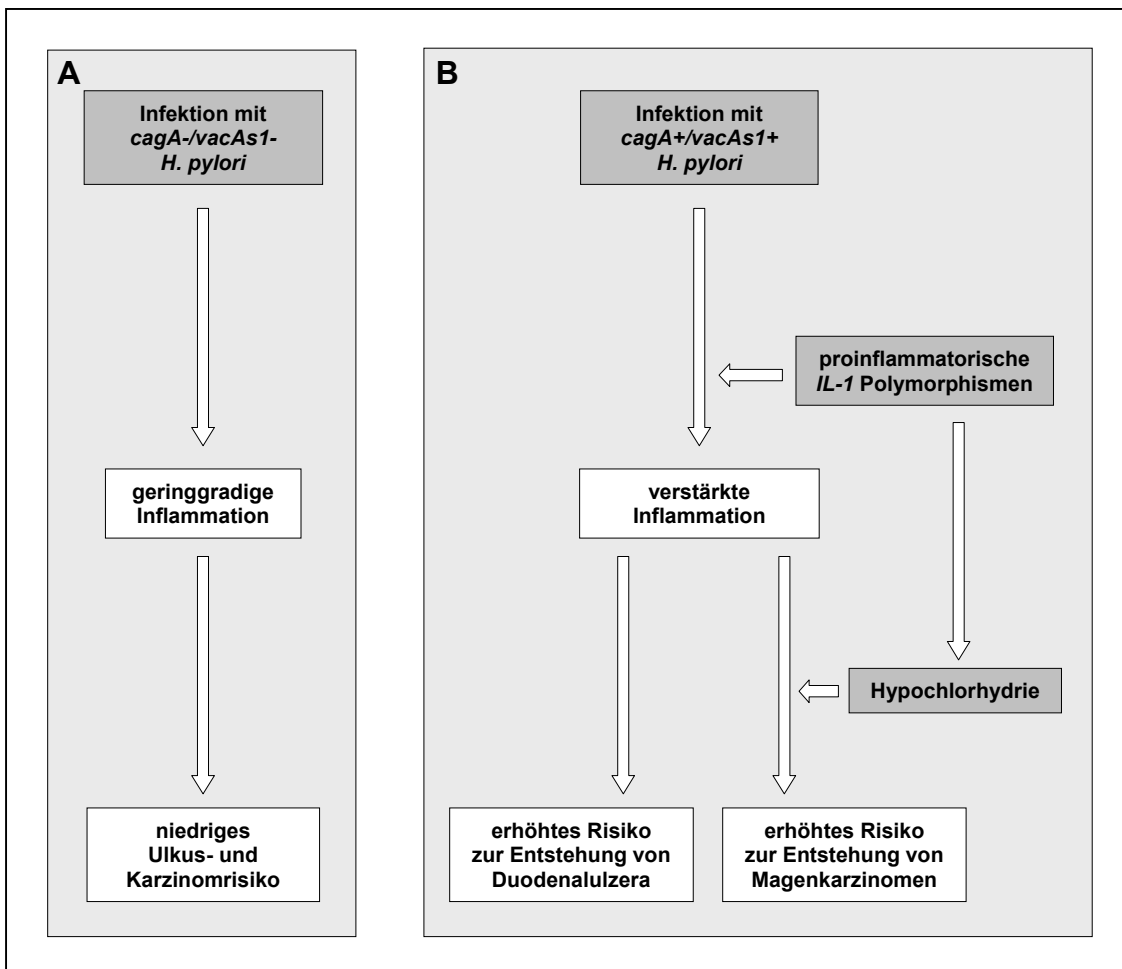


Abbildung 20. Schema der differentiellen Entwicklung von Duodenalulzera und Karzinomen mit Darstellung der hierbei beteiligten Faktoren. (A) Infektion mit *cagA*⁻/*vacAs1*⁻ Stämmen führt zu einer nur gering ausgeprägten Inflammation und ist somit lediglich mit einem geringen Ulkus- und Karzinomrisiko assoziiert. *IL-1* Polymorphismen scheinen hierbei den Krankheitsverlauf nicht zu beeinflussen. (B) Die Infektion mit *cagA*⁺/*vacAs1*⁺ *H. pylori* Stämmen führt hingegen zu einer starken Entzündungsantwort und ist folglich mit einem erhöhten Risiko der Ulkus- und Karzinomentstehung assoziiert. Das Vorhandensein von proinflammatorischen *IL-1* Polymorphismen bei einer Infektion mit diesen Stammtypen führt einerseits zu einer weiteren Verstärkung der Inflammation. Andererseits kommt es durch *IL-1β* vermittelte Hemmung der Säuresekretion zur Entwicklung einer Hypochlorhydrie. Dies führt zu einer korpusprädominanten Gastritis oder Pangastritis und ist mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung eines Magenkarzinoms assoziiert. Gleichzeitig schützt die *IL-1β* vermittelte Hypochlorhydrie bei Patienten mit proinflammatorischen *IL-1* Polymorphismen vor der Entstehung eines Duodenalulkus, dessen Entwicklung an eine hohe Säuresekretion gebunden ist.

4.3 Untersuchung der BabA vermittelten Immunpathogenese und Beschreibung der hierbei beteiligten Mechanismen

1993 zeigten Boren et al, daß die Adhärenz von *H. pylori* an Magenepithelien abhängig ist von der Anwesenheit von Le^b Blutgruppenantigenen auf Epithelzellen (17; 41). 1998 wurde in der gleichen Arbeitsgruppe das korrespondierende bakterielle Adhäsın identifiziert und Blood Group Antigen-binding Adhesin (BabA) genannt (67). BabA ist ein Outer-Membrane Protein, daß in einer Untergruppe der *H. pylori* Stämme exprimiert wird. Die Expression ist an das Vorhandensein des funktionell aktiven Allels *babA2* gebunden. Klinische Studien unserer eigenen Gruppe haben gezeigt, daß *babA2*-positive Stämme mit der Ulkuskrankheit und dem Magenkarzinom assoziiert sind und daß der Nachweis dieser Stämme wesentlich besser zwischen Ulzera und Gastritis bzw. Karzinom und Gastritis diskriminiert, als der Nachweis des *cagA* oder *vacAs1* Gens (56). In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, daß BabA die Entstehung hochgradiger Gastritiden und von präkanzerösen Läsionen (intestinale Metaplasie und Atrophie) in der Magenschleimhaut fördert. Weiterhin deckt die gegenwärtige Studie auf, mit welchen immunologischen Konsequenzen eine Infektion mit BabA-positiven Stämmen einhergeht und zeigt den Mechanismus der BabA-vermittelten Pathogenität. Abbildung 21 faßt die Ergebnisse der Studie zusammen und veranschaulicht die in dieser Studie aufgedeckte mechanistische Abfolge der BabA-vermittelten Pathogenität.

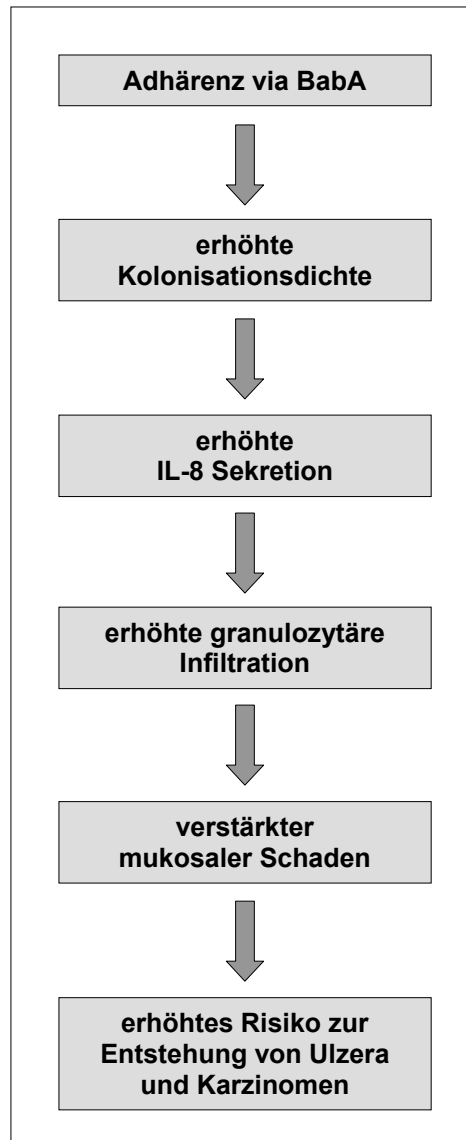


Abbildung 21. Schematisches Modell der BabA vermittelten Pathogenität. Die Ergebnisse der gegenwärtigen Studie lassen auf folgende Abfolge an Ereignissen nach Infektion mit einem BabA positiven *H. pylori* Stamm schließen. Die verstärkte Adhärenz mittels BabA schützt den Keim vor Elimination aus dem Magen (z.B. Elimination durch peristaltische Bewegungen und Ausschwemmung mit der luminalen Flüssigkeit). Dies führt zu einer höheren Kolonisationsdichte. Eine erhöhte Bakteriendichte bedingt eine verstärkte Freisetzung des Chemokins IL-8 aus Epithelzellen, die maßgeblich durch die Keimzahl beeinflusst wird. IL-8 fördert den Influx von Neutrophilen in die Schleimhaut, was eine stärkere mukosale Schädigung durch Freisetzung von reaktiven granulozytären Produkten zur Folge hat. Diese BabA-vermittelte verstärkte Entzündungsreaktion wiederum erklärt die Assoziation des Adhärenzfaktors mit der Entstehung von Ulzera und Karzinomen.

4.3.1 Der BabA-Rezeptor Lewis^b wird in über 90 % der Bevölkerung auf Magenepithelzellen exprimiert

Die Expression von Lewis Blutgruppenantigenen auf hämatologischer Ebene ist gut untersucht (101). Auf Leukozyten wird Le^b bei 70-80% der Patienten exprimiert. Diese Verteilung scheint jedoch nicht die Expression auf epithelialen Zellsystemen wiederzuspiegeln (101). Es ist wenig bekannt über die Expression von Le^b Blutgruppenantigenen auf Magenepithelzellen. Um die Bedeutung des Adhärenzfaktors BabA zu untersuchen, war es deshalb zunächst wichtig das Vorkommen des korrespondierenden Rezeptors in der Population nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde zunächst das Vorkommen von Le^b Antigenen in der Magenschleimhaut von 131 *H. pylori* infizierten und 141 nicht-infizierten Patienten untersucht. Der Prozentsatz an Le^b-negativen Patienten war in beiden Gruppen kleiner als 10%, was sehr viel geringer ist als der Prozentsatz von Non-Sekretoren (20-30%) in westlichen Populationen. Le^b Moleküle, als Bindungspartner für BabA sind also auf Magenepithelzellen des größten Teils der Bevölkerung vorhanden. Die Le^b Expression ist demnach kein limitierender Parameter während der *H. pylori* Infektion, womit gewährleistet ist, daß bei fast allen Patienten, die mit BabA-positiven *H. pylori* Stämmen infiziert sind, eine BabA-vermittelte Bindung auch stattfinden kann.

4.3.2 BabA verstärkt die unspezifische Immunantwort

Früh nach der Entdeckung von *H. pylori* wurde beobachtet, daß eine Infektion mit *type I* Stämmen (*vacAsI*⁺/*cagA*⁺) mit einer erhöhten mukosalen Entzündungsreaktion assoziiert ist. In dieser Studie wurde beobachtet, daß *babA2*, das funktionell aktive *babA* Allel mit der Präsenz von *vacAsI* und *cagA* assoziiert ist: 50 von 53 *babA2*-positive Stämme waren gleichzeitig auch *vacAsI*⁺/*cagA*⁺. Da die bedeutende Rolle der *cagPAI* und des VacA Toxins bei der Pathogenese ausreichend belegt ist, war es wichtig für uns den Effekt von BabA unabhängig von diesen Virulenzfaktoren zu untersuchen. Deshalb wurde die Gruppe der Patienten, die mit *vacAsI*⁺/*cagA*⁺ Stämmen infizierte waren (n=88), abhängig vom BabA Status, in zwei Gruppen unterteilt: Patienten, die mit *vacAsI*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁺ Stämmen infiziert waren (n=50) und Patienten, die mit *vacAsI*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁻ Stämmen befallen waren (n=38). Initial wurde in dieser Studie beobachtet, daß *vacAsI*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁺ Stämme mit einer wesentlich höheren granulozytären Infiltration assoziiert waren, als *vacAsI*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁻ Stämme. Dies

zeigt die bedeutende Rolle von BabA für die Entstehung der granulozytären Immunantwort. Diese Ergebnisse im humanen Modell passen gut zu Untersuchungen am Mausmodell. Guruge und Mitarbeiter (61) untersuchten den Einfluß der BabA/Le^b Interaktion in transgenen Mäusen, die Le^b Epitope auf Magenepithelzellen exprimieren. Eine Infektion dieser Mäuse mit BabA-positiven *H. pylori* Stämmen führte zu einer stärker ausgeprägten Gastritis als in Wildtypmäusen, die kein Le^b exprimierten (61). Diese und unsere Ergebnisse zeigen eindeutig, daß die BabA/Le^b vermittelte Bindung eine bedeutende Rolle für die Entstehung der *H. pylori* assoziierten Inflammation spielt. Die granulozytäre Infiltration ist maßgeblich abhängig von dem Vorhandensein von Chemokinen in der Magenmukosa. Das wichtigste Chemokin für Neutrophile im Rahmen der *H. pylori* Infektion ist das von Epithelzellen freigesetzte IL-8 (15). In der gegenwärtigen Studie konnte gezeigt werden, daß bei Patienten, die mit *vacAsI*⁻/*cagA*⁻ Stämmen infiziert waren, die mukosalen IL-8 Mengen 3-4 mal geringer sind, als bei Trägern von *vacAsI*⁺/*cagA*⁺ Stämmen. Dies unterstreicht die Rolle der *cagPAI* für die Induktion der IL-8 Antwort. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit früheren Studien, die Rolle der *cagPAI* für die IL-8 Sekretion *in vitro* untersucht haben. Hierbei zeigte sich, daß eine Reihe von Genen innerhalb der *cagPAI* für die Induktion der NFκB abhängigen IL-8-Produktion aus Epithelzellen, notwendig sind (5; 19; 78; 139).

Bei der weiteren Unterteilung der, mit *vacAsI*⁺/*cagA*⁺ Stämmen infizierten Patienten in zwei Gruppen, je nach BabA Status, zeigte sich, daß die höchsten IL-8 Werte bei Patienten gefunden wurden, die mit *vacAsI*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁺ Stämmen infiziert waren. Die Unterschiede zu den *vacAsI*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁻ Patienten waren signifikant. Diese Ergebnisse zeigen, daß BabA die Fähigkeit der *type1* Stämme zur Induktion der IL-8 Antwort verbessert. Dies bedingt wahrscheinlich die verstärkte granulozytäre Infiltration, die bei Infektion mit *vacAsI*⁺/*cagA*⁺/*babA2*⁺ Stämmen beobachtet wird.

4.3.3 Mechanismus der BabA vermittelten Wirkung: BabA verstärkt die bakterielle Kolonisation

Auf welche Art und Weise der durch BabA vermittelte Effekt auf die IL-8 Expression und die granulozytäre Infiltration zustande kommt, war zunächst unklar. Mathematische, wie auch experimentelle Modelle lassen vermuten, daß die bakterielle Kolonisation durch die Fähigkeit von Bakterien an Epithelzellen zu adhären

maßgeblich beeinflusst wird (12; 43; 73). Bakterien, die besser adhären können, haben wahrscheinlich Wachstumsvorteile durch die Nähe zum Epithel. So wird z.B. angenommen, daß *H. pylori* durch Exsudate des Wirtsgewebes ernährt wird und nicht direkt durch Nahrungsbestandteile (11). Die Nähe zum Epithel durch starke Adhärenz bietet demnach in erhöhtem Maße Zugriff zu Nährstoffen. Darüber hinaus könnte eine Elimination von Bakterien aus dem Magen durch peristaltische Bewegungen und Ausschwemmung mit der luminalen Flüssigkeit diejenigen Keime, die bessere Adhäsionseigenschaften besitzen, in einem geringeren Maße betreffen (43). Aus diesen Gründen wurde von uns die Hypothese aufgestellt, daß Bakterien, die bessere Adhäsionseigenschaften besitzen, mit höheren Dichten den Magen kolonisieren können. In der Tat konnte bei den anschließenden Analysen in dieser Studie gezeigt werden, daß die BabA-positiven Keime mit höheren Dichten die Schleimhaut kolonisierten als andere *H. pylori* Subtypen. Die BabA vermittelte Adhärenz scheint also die Kolonisationsfähigkeiten von *H. pylori* zu verbessern.

Es stellte sich dann die Frage, ob die bei BabA-positiven Stämmen beobachtete höhere Kolonisationsdichte für die erhöhte IL-8 Sekretion bei Infektion mit diesem Keimtyp verantwortlich sein kann. Die hierzu durchgeführten Kokulturrexperimente mit verschiedenen Keimen zeigten eindeutig, daß die IL-8 Antwort aus KATO-III Zellen in hohem Maße von der eingesetzten Bakterienzahl abhängig ist. Während beim Einsetzen von einer Bakterie pro 10 Zellen nur eine minimale IL-8 Antwort zu beobachten ist, sind die Zytokinspiegel bei Stimulation mit einer Bakterie pro Zelle 150 mal höher und bei Stimulation mit 20 Bakterien pro Zelle ungefähr 900 mal höher. Gerade in diesem Bereich der physiologisch im Magen vorkommenden Bakterienmengen (1/10-20/1 Bakterien/Zelle) ist also die Bakterienzahl ein entscheidender Faktor für die Höhe der IL-8 Sekretion aus Epithelzellen. Diese Daten zeigen indirekt, daß die höhere Kolonisationsdichte bei Infektion mit BabA-positiven Stämmen für die verstärkte IL-8 Antwort bei Infektion mit diesen Stammtypen verantwortlich sein kann, woraus dann wiederum eine höhere granulozytäre Infiltration resultieren kann. Diese Interpretation der Ergebnisse wird unterstützt durch *in vivo* Daten einer kürzlich erschienenen Studie (155). Hierbei wurde gezeigt, daß die IL-8 Sekretion und die bakteriellen Kolonisationsdichten bei Ulkuspatienten, die mit *cagA*⁺ Stämme trugen, höher waren als bei Non-Ulkuspatienten mit *cagA*⁺ Stammbefall. Jedoch war der Anstieg der IL-8 Sekretion in der Ulkusgruppe an eine erhöhte

Bakterienzahl und nicht an eine erhöhte *in vitro* IL-8 Induktion pro *cagA*⁺ Stamm gebunden.

4.3.4 Einfluß von BabA auf die durch *H. pylori* ausgelöste spezifische Immunantwort

Die Aktivierung von adaptiven Immunvorgängen durch Virulenzfaktoren könnte einen weiteren Mechanismus für die BabA-, CagA- oder VacA-vermittelte Induktion der gastralen Inflammation und der konsekutiven Gewebszerstörung darstellen. So ist z.B. im Rahmen der *H. pylori* vermittelten Th1-Antwort eine erhöhte Expression von MHC Klasse II Molekülen auf gastralen Epithelzellen beobachtet worden, was zu einer erhöhten Apoptoserate führte (45). Frühere Studien haben gezeigt, daß die durch *H. pylori* induzierte Helferzellantwort hauptsächlich vom Th1-Phänotyp ist (8; 91; 152). In der gegenwärtigen Arbeit wurden die Th1-Zytokine IFN- γ und TNF- α sowie der sehr spezifische Marker von Th1-Zellen IL-12R β 2 Kette (111; 116; 132) in der Mukosa von 94 *H. pylori* infizierten Patienten bestimmt. Die Expression der Th1-Marker korrelierte positiv mit den steigenden Graden der lymphozytären Infiltration. Obwohl die bakteriellen Virulenzfaktoren ebenfalls mit höheren lymphozytären Infiltrationsgraden assoziiert waren, war die Höhe der Th1 Antwort unabhängig von VacA, CagA oder BabA. Eine frühere Studie untersuchte das Vorhandensein von CagA-spezifischen T-Zellen in der Mukosa von Patienten mit Gastritis und Ulzera (30). T-Zellen von *H. pylori* infizierten Patienten, die hierbei mit exogen zugefügtem CagA Protein *in vitro* stimuliert wurden, proliferierten und exprimierten ein Th1-Zytokinprofil. Dies läßt die Existenz und klonale Proliferation von CagA-spezifischen Th1-Zellen vermuten (30). Wir, sowie auch andere Gruppen konnten jedoch zeigen, daß die Höhe der *H. pylori* induzierten Th1 Antwort *in vivo* unabhängig ist von CagA, VacA oder BabA (152; 153). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte sein, daß *H. pylori* Stämme, die diese Virulenzfaktoren besitzen, gleichzeitig das spezifische Immunsystem angreifen und herunterregulieren können. In der Tat zeigt eine vor kurzem erschienene Arbeit (144), daß *H. pylori* Apoptose von T-Zellen auslösen kann, und daß diese Apoptose abhängig ist vom Vorhandensein der *cagPAI* (144). Die resultierende Herunterregulierung von T-Zell Antworten durch *cagPAI*-positive *H. pylori* Stämme könnte die Existenz von spezifischen Th1-Zellen gegen CagA, VacA oder BabA maskieren.

5 Zusammenfassung

Helicobacter pylori kolonisiert den menschlichen Magen seit den frühesten Zeiten humaner Evolution (44; 57). Die Infektion ist die Hauptursache für die Entstehung von Magen- und Duodenalulzera sowie des Magenkarzinoms und des MALT-Lymphoms (106; 108; 131; 140). Die durch *H. pylori* ausgelöste chronische Entzündung der Magenschleimhaut trägt zur Entstehung des Magenkarzinoms bei (38). Die während der chronischen Entzündung entstehenden histologischen Veränderungen, wie die intestinale Metaplasie und Atrophie sind mit der Krebsentstehung assoziiert worden (108). Da jedoch nur ein kleiner Anteil der infizierten Patienten eine Pathologie entwickelt, ist es von außerordentlicher Bedeutung bakterielle Faktoren und genetische Risikofaktoren des Menschen zu identifizieren, die mit der Krebsentstehung assoziiert sind. Dieses Ziel verfolgend, wurden in der gegenwärtigen Arbeit *in vivo* Analysen an einer hierfür aufgebauten, über 700 Patienten umfassenden Magenbiopsiebank durchgeführt. Des Weiteren wurden neben diesen Assoziationsstudien *in vitro* Experimente zur mechanistischen Untersuchung der Wirkung von Virulenzfaktoren durchgeführt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluß von humanen *IL-1* Polymorphismen und der bakteriellen Virulenzfaktoren VacA und CagA auf die Entstehung von schwerwiegenden histologischen Veränderungen der Magenmukosa untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß bakterielle Virulenzfaktoren den primären Trigger für die Entstehung von schweren Gastritiden (L3, G3), intestinaler Metaplasie (IM) und Atrophie (AG) darstellen. Patienten, die mit *cagA*⁺/*vacAsI*⁺ Stämmen infiziert waren, hatten im Vergleich zu Patienten, die mit *cagA*⁻/*vacAsI*⁻ Stämmen infiziert waren, eine bis zu 16fach höhere antrale Prävalenz dieser histologischen Veränderungen.

Die bisher bekannten Virulenzfaktoren begünstigen sowohl die Entstehung von Karzinomen als auch von Ulzera (11). Interessanterweise haben jedoch *H. pylori* infizierte Patienten, die ein Duodenalulkus entwickeln, ein geringeres Karzinomrisiko als asymptotische *H. pylori* Träger (62; 140). In den letzten Jahren ist gezeigt worden, daß Patienten mit hohem "Säure-Output" vor allem eine Prädisposition zur antrumprädominanten Gastritis und Duodenalulzeration haben, während Patienten mit Hypochlorhydrie und Corpusgastritis ein höheres Magenkarzinomrisiko haben (34; 36; 37; 58). Einer der stärksten Inhibitoren der Magensäuresekretion ist IL-1 β , dessen

Expression während der *H. pylori* Infektion hochreguliert wird (96; 107; 152). Kürzlich erschienene Studien brachten *IL-1* Polymorphismen mit der Entwicklung von Magenkarzinomen in Zusammenhang (35; 79). In der gegenwärtigen Studie wurde deshalb untersucht, welchen Einfluß *IL-1* Polymorphismen auf die *H. pylori* induzierte IL-1 β Expression und auf die Entstehung von schweren histologischen Veränderungen der Mukosa haben. Es wurde eine Assoziation zwischen proinflammatorischen *IL-1* Polymorphismen und der Entwicklung von schweren histologischen Veränderungen der Mukosa gefunden. Träger der Allele *IL-1B-511T/-31C* und *IL-1RN*2* waren mit einer erhöhten IL-1 β Expression assoziiert und hatten ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von L3/G3/IM/AG, vor allem wenn beide proinflammatorischen Allele gleichzeitig vorhanden waren. Die ORs lagen hierbei zwischen 1,7 und 4,4. Dies zeigt eine wichtige Rolle von genetischen Faktoren des Menschen für die *H. pylori* assoziierte Entstehung der Inflammation.

Schließlich wurde untersucht, welchen Einfluß das kombinierte Vorhandensein von bakteriellen und humanen "Hochrisiko-Genotypen" auf die Entstehung der *H. pylori* induzierten Histopathologie hat. Hierbei zeigte sich, dass die höchste Prävalenz von schwerwiegenden Veränderungen der Magenschleimhaut bei denjenigen Patienten vorkam, die mit einem *cagA*⁺/*vacAs1*⁺ Stamm befallen waren (bakterieller Hoch-Risiko-Genotyp) und gleichzeitig proinflammatorische *IL-1* Polymorphismen (*IL-1B-511T/-31C*⁺/*IL-1RN*2*⁺; humaner Hoch-Risiko-Genotyp) besaßen. Das Vorkommen von L3/G3/IM/AG war in dieser Patientengruppe bis zu 25fach im Vergleich zu Kontrollgruppen erhöht. Diese dramatisch erhöhten Risiken zeigen, daß es eine synergistische Interaktion zwischen bakteriellen Virulenzfaktoren und *IL-1* Polymorphismen gibt.

Die gegenwärtige Studie unterstützt ein sequentielles Modell der gastralen Karzinogenese, bei der bakterielle Virulenzfaktoren ganz entscheidend sind für die Entstehung von schweren histologischen Veränderungen der Magenmukosa, während *IL-1* Polymorphismen bei der Verstärkung des Effektes und vor allem bei der Lenkung der Krankheitsentstehung in Richtung Karzinom eine Rolle spielen. Darüber hinaus sind die Ergebnisse von klinischer Relevanz, denn eine kombinierte bakterielle und humane Genotypisierung erlaubt die Identifizierung von Magenkarzinom-Risiko-Patienten, lange bevor sich die Erkrankung manifestiert. Diese Patienten könnten von einer präventiven Eradikation profitieren. Wenn man die hohe Prävalenz der Infektion und

die Kosten der Eradikation berücksichtigt, könnte dieser Ansatz eine sinnvolle Basis für therapeutische Entscheidungen im Stadium der chronischen Gastritis bieten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde im Detail auf ein erst kürzlich identifiziertes bakterielles Adhäsion (BabA) eingegangen (67). Es wurde der Einfluß von BabA auf die Kolonisation, Inflammation und Karzinogenese untersucht und der Mechanismus der BabA vermittelten Pathogenese aufgedeckt. Zunächst wurde gezeigt, daß der BabA-Rezeptor, Lewis^b bei über 90% der Bevölkerung auf Magenepithelien exprimiert wird. Dies stellt die Grundvoraussetzung für eine klinische Relevanz von BabA dar. Es wurde dann untersucht, welchen Einfluß auf BabA auf die Inflammation hat. Zunächst konnte gezeigt werden, daß BabA die Entstehung und das Ausmaß der durch *H. pylori* induzierten spezifischen Immunantwort nicht beeinflusst. Die Expression der Th1-Marker IL-12R β 2, TNF- α und IFN- γ war unabhängig vom Vorhandensein bakterieller Virulenzfaktoren. Es zeigte sich hingegen, daß BabA durch Induktion einer erhöhten IL-8 Expression das Ausmaß der unspezifischen granulozytären Immunantwort verstärkt. Die IL-8 Expression und die Prävalenz der schweren Gastritis waren bei Patienten, die mit BabA⁺ Stämmen infiziert waren, bedeutend höher als bei Patienten mit anderen Stammtypen. In einem *in vitro* Kokulturmodell wurde dann gezeigt, daß die IL-8 Sekretion aus epithelialen Zellen maßgeblich von der Bakteriendichte abhängt. Je höher die Bakterienzahl, desto höher war die IL-8 Sekretion aus Epithelzellen. Schließlich konnte demonstriert werden, daß BabA entscheidend die Kolonisationseigenschaften des Keimes beeinflusst. Die verstärkte Adhärenz der BabA⁺ Keime bietet offensichtlich Schutz vor Elimination durch peristaltische Bewegungen und Ausschwemmung mit der luminalen Flüssigkeit und erlaubt somit eine Kolonisation mit erhöhter Dichte. Dies führt zu einer erhöhten IL-8 Sekretion mit konsekutiv verstärkter Inflammation und mukosalem Schaden führt. Dieses Modell der BabA-vermittelten Pathogenese beschreibt einen neuen Mechanismus bakterieller Pathogenität und erweitert das Verständnis der *H. pylori* induzierten Pathogenese.

Literaturverzeichnis

1. Amedei A, Bergman MP, Appelmelk BJ, Azzurri A, Benagiano M, Tamburini C, van der ZR, Telford JL, Vandenbroucke-Grauls CM, D'Elios MM, Del Prete G. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* antigens and H⁺, K⁺ -- adenosine triphosphatase in human gastric autoimmunity. *J Exp Med* 2003;198:1147-1156.
2. Atherton JC. *H. pylori* virulence factors. *Br Med Bull* 1998;54:105-120.
3. Atherton JC, Cao P, Peek-RM J, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. 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.
4. Atherton JC, Peek-RM J, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997;112:92-99.
5. Audibert C, Burucoa C, Janvier B, Fauchere JL. Implication of the structure of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island in induction of interleukin-8 secretion. *Infect Immun* 2001;69:1625-1629.
6. Backert S, Ziska E, Brinkmann V, Zimny-Arndt U, Fauconnier A, Jungblut PR, Naumann M, Meyer TF. Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* 2000;2:155-164.
7. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989;84:1045-1049.
8. Bamford KB, Fan X, Crowe SE, Leary JF, Gourley WK, Luthra GK, Brooks EG, Graham DY, Reyes VE, Ernst PB. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* 1998;114:482-492.

9. Beales IL, Calam J. Inhibition of carbachol stimulated acid secretion by interleukin 1beta in rabbit parietal cells requires protein kinase C. *Gut* 2001;48:782-789.
10. Beales IP, Calam J. Interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha Inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways. *Gut* 1998;42:227-234.
11. Blaser MJ, Berg DE. Helicobacter pylori genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* 2001;107:767-773.
12. Blaser MJ, Kirschner D. Dynamics of Helicobacter pylori colonization in relation to the host response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8359-8364.
13. Blaser MJ, Perez PG, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, 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.
14. Blum AL, Talley NJ, O'Morain C, van Zanten SV, Labenz J, Stolte M, Louw JA, Stubberod A, Theodors A, Sundin M, Bolling-Sternevald E, Junghard O. Lack of effect of treating Helicobacter pylori infection in patients with nonulcer dyspepsia. Omeprazole plus Clarithromycin and Amoxicillin Effect One Year after Treatment (OCAAY) Study Group. *N Engl J Med* 1998;339:1875-1881.
15. Bodger K, Crabtree JE. Helicobacter pylori and gastric inflammation. *Br Med Bull* 1998;54:139-150.
16. Boncristiano M, Paccani SR, Barone S, Ulivieri C, Patrussi L, Ilver D, Amedei A, D'Elis MM, Telford JL, Baldari CT. The Helicobacter pylori vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med* 2003;198:1887-1897.
17. Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. Attachment of Helicobacter pylori to human gastric epithelium mediated by blood group. *Science* 1993;262:1892-1895.

18. Buckley MJ, O'Morain CA. Helicobacter biology--discovery. Br Med Bull 1998;54:7-16.
19. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, 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.
20. Censini S, Stein M, Covacci A. Cellular responses induced after contact with Helicobacter pylori. Curr Opin Microbiol 2001;4:41-46.
21. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162:156-159.
22. Correa P, Chen VW. Gastric cancer. Cancer Surv 1994;55-76.
23. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N, et al. 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.
24. Covacci A, Rappuoli R. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. J Exp Med 2000;191:587-592.
25. Cover TL, Dooley CP, Blaser MJ. Characterization of and human serologic response to proteins in Helicobacter pylori broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. Infect Immun 1990;58:603-610.
26. Cover TL, Krishna US, Israel DA, Peek RM, Jr. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin. Cancer Res 2003;63:951-957.
27. Cover TL, Tummuru MK, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among Helicobacter pylori strains. J Biol Chem 1994;269:10566-10573.

28. Crabtree JE, Farmery SM, Lindley IJ, Figura N, Peichl P, Tompkins DS. CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines. *J Clin Pathol* 1994;47:945-950.
29. Crabtree JE, Taylor JD, Wyatt JJ, Heatley RV, Shallcross TM, Tompkins DS, Rathbone BJ. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet* 1991;338:332-335.
30. D'Elios MM, Manghetti M, De Carli M, Costa F, Baldari CT, Burrioni D, Telford JL, 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.
31. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, 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.
32. Doenges J. Spirochaetes in gastric glands of *Macacus rhesus* and humans without definite history of related disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1938;38:536-538.
33. Ekstrom AM, Held M, Hansson LE, Engstrand L, Nyren O. *Helicobacter pylori* in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. *Gastroenterology* 2001;121:784-791.
34. El Omar EM. The importance of interleukin 1beta in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut* 2001;48:743-747.
35. El Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF, Jr., Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000;404:398-402.
36. El Omar EM, Oien K, El Nujumi A, Gillen D, Wirz A, Dahill S, Williams C, Ardill JE, McColl KE. *Helicobacter pylori* infection and chronic gastric acid hyposecretion. *Gastroenterology* 1997;113:15-24.

37. El Omar EM, Penman ID, Ardill JE, Chittajallu RS, Howie C, McColl KE. Helicobacter pylori infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. *Gastroenterology* 1995;109:681-691.
38. Ernst P. Review article: the role of inflammation in the pathogenesis of gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13 Suppl 1:13-18.
39. Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of Helicobacter pylori: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:615-640.
40. Evans DJ, Jr., Evans DG. Helicobacter pylori adhesins: review and perspectives. *Helicobacter* 2000;5:183-195.
41. Falk P, Roth KA, Boren T, Westblom TU, Gordon JI, 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.
42. Falk PG, Bry L, Holgersson J, Gordon JI. Expression of a human alpha-1,3/4-fucosyltransferase in the pit cell lineage of FVB/N mouse stomach results in production of Leb-containing glycoconjugates: a potential transgenic mouse model for studying Helicobacter pylori infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1515-1519.
43. Falk PG, Syder AJ, Guruge JL, Kirschner D, Blaser MJ, Gordon JI. Theoretical and experimental approaches for studying factors defining the Helicobacter pylori-host relationship. *Trends Microbiol* 2000;8:321-329.
44. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Megraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang X, Achtman M, Suerbaum S. Traces of human migrations in Helicobacter pylori populations. *Science* 2003;299:1582-1585.
45. Fan X, Crowe SE, Behar S, Gunasena H, Ye G, Haeberle H, Van HN, Gourley WK, Ernst PB, Reyes VE. The effect of class II major histocompatibility

- complex expression on adherence of *Helicobacter pylori* and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage. *J Exp Med* 1998;187:1659-1669.
46. Feldman RA, Eccersley AJ, Hardie JM. Epidemiology of *Helicobacter pylori*: acquisition, transmission, population prevalence and disease-to-infection ratio. *Br Med Bull* 1998;54:39-53.
 47. Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, Capelinha AF, Quint W, Caldas C, van Doorn LJ, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1680-1687.
 48. Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N, Sitas F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ* 1991;302:1302-1305.
 49. Fox JG, Beck P, Dangler CA, Whary MT, Wang TC, Shi HN, Nagler-Anderson C. Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy. *Nat Med* 2000;6:536-542.
 50. Fox JG, Sheppard BJ, Dangler CA, Whary MT, Ihrig M, Wang TC. Germ-line p53-targeted disruption inhibits helicobacter-induced premalignant lesions and invasive gastric carcinoma through down-regulation of Th1 proinflammatory responses. *Cancer Res* 2002;62:696-702.
 51. Freedberg A, Baron L. The presence of spirochetes in human gastric mucosa. *Am J Dig Dis* 1940;7:443-445.
 52. Fujikawa A, Shirasaka D, Yamamoto S, Ota H, Yahiro K, Fukada M, Shintani T, Wada A, Aoyama N, Hirayama T, Fukamachi H, Noda M. Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. *Nat Genet* 2003;33:375-381.

53. Galmiche A, Rasso J, Doye A, Cagnol S, Chambard JC, Contamin S, de T, V, Just I, Ricci V, Solcia E, Van Obberghen E, Boquet P. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J* 2000;19:6361-6370.
54. Garcia-Gonzalez MA, Lanas A, Santolaria S, Crusius JB, Serrano MT, Pena AS. The polymorphic IL-1B and IL-1RN genes in the aetiopathogenesis of peptic ulcer. *Clin Exp Immunol* 2001;125:368-375.
55. Garrison F. *An Introduction to the History of Medicine*. 1929. W.B. Saunders; Philadelphia.
Ref Type: Generic
56. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, Schepp W, Miehlike 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.
57. Ghose C, Perez-Perez GI, Dominguez-Bello MG, Pride DT, Bravi CM, Blaser MJ. East Asian genotypes of *Helicobacter pylori* strains in Amerindians provide evidence for its ancient human carriage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15107-15111.
58. Gillen D, El Omar EM, Wirz AA, Ardill JE, McColl KE. The acid response to gastrin distinguishes duodenal ulcer patients from *Helicobacter pylori*-infected healthy subjects. *Gastroenterology* 1998;114:50-57.
59. Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:1-13.
60. Guillemin K, Salama NR, Tompkins LS, Falkow S. Cag pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15136-15141.
61. Guruge JL, Falk PG, Lorenz RG, Dans M, Wirth HP, Blaser MJ, Berg DE, Gordon JI. Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3925-3930.

62. Hansson LE, Nyren O, Hsing AW, Bergstrom R, Josefsson S, Chow WH, Fraumeni JF, Jr., Adami HO. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *N Engl J Med* 1996;335:242-249.
63. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, Hatakeyama M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 2002;295:683-686.
64. Huber C, Zanner R, Pohlinger A, Mahr S, Neu B, Prinz C. Tumor necrosis factor-alpha effects on rat gastric enterochromaffin-like cells. *Digestion* 2002;65:87-102.
65. Hunt RH, Tytgat GM. *Helicobacter pylori - Basic Mechanisms to Clinical Cure*. 2000. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
66. Hurme M, Lahdenpohja N, Santtila S. Gene polymorphisms of interleukins 1 and 10 in infectious and autoimmune diseases. *Ann Med* 1998;30:469-473.
67. Ilver D, Arnquist A, Ögren J, Frick I, Kersulyte D, Incecik ET, Berg D, Govacci A, Engstrand L, Boren T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigen revealed by retagging. *Science* 1998;279:373-377.
68. Israel DA, Salama N, Arnold CN, Moss SF, Ando T, Wirth HP, Tham KT, Camorlinga M, Blaser MJ, Falkow S, Peek RM, Jr. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001;107:611-620.
69. Karttunen RA, Karttunen TJ, Yousfi MM, el Zimaity HM, Graham DY, el Zaatari FA. Expression of mRNA for interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-12 (p40) in normal gastric mucosa and in mucosa infected with *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:22-27.
70. Keates S, Hitti YS, Upton M, Kelly CP. *Helicobacter pylori* infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 1997;113:1099-1109.

71. Kidd M, Modlin IM. A century of *Helicobacter pylori*: paradigms lost-paradigms regained. *Digestion* 1998;59:1-15.
72. Kikuchi S, Crabtree JE, Forman D, Kurosawa M. Association between infections with CagA-positive or -negative strains of *Helicobacter pylori* and risk for gastric cancer in young adults. Research Group on Prevention of Gastric Carcinoma Among Young Adults. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3455-3459.
73. Kirschner DE, Blaser MJ. The dynamics of *Helicobacter pylori* infection of the human stomach. *J Theor Biol* 1995;176:281-290.
74. Koch R. Untersuchungen über die Aetiologie der Wundinfektionskrankheiten. 1878. FCW Vogel; Leipzig.
75. Kosunen TU, Seppala K, Sarna S, Sipponen P. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1992;339:893-895.
76. Kuipers EJ, Perez PG, Meuwissen SG, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the cagA status. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1777-1780.
77. Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* 1988;26:93-99.
78. Li SD, Kersulyte D, Lindley IJ, Neelam B, Berg DE, Crabtree JE. 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.
79. Machado JC, Pharoah P, Sousa S, Carvalho R, Oliveira C, Figueiredo C, Amorim A, Seruca R, Caldas C, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M. Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2001;121:823-829.

80. Mahr S, Neumayer N, Gerhard M, Classen M, Prinz C. IL-1beta-induced apoptosis in rat gastric enterochromaffin-like cells is mediated by iNOS, NF-kappaB, and Bax protein. *Gastroenterology* 2000;118:515-524.
81. Malaty HM, Nyren O. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2003;8 Suppl 1:8-12.
82. Marchetti M, Arico B, Burroni D, Figura N, Rappuoli R, Ghiara P. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 1995;267:1655-1658.
83. Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust* 1985;142:436-439.
84. Marshall BJ, Goodwin CS, Warren JR, Murray R, Blicow ED, Blackbourn SJ, Phillips M, Waters TE, Sanderson CR. Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet* 1988;2:1437-1442.
85. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;1:1311-1315.
86. Mattapallil JJ, Dandekar S, Canfield DR, Solnick JV. A predominant Th1 type of immune response is induced early during acute *Helicobacter pylori* infection in rhesus macaques. *Gastroenterology* 2000;118:307-315.
87. McColl K, Murray L, El Omar E, Dickson A, El Nujumi A, Wirz A, Kelman A, Penny C, Knill-Jones R, Hilditch T. Symptomatic benefit from eradicating *Helicobacter pylori* infection in patients with nonulcer dyspepsia. *N Engl J Med* 1998;339:1869-1874.
88. Megraud F. Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment Pharmacol Ther* 1995;9 Suppl 2:85-91.
89. Mitchell HM, Hazell SL, Li YY, Hu PJ. Serological response to specific *Helicobacter pylori* antigens: antibody against CagA antigen is not predictive of gastric cancer in a developing country. *Am J Gastroenterol* 1996;91:1785-1788.

90. Moayyedi P, Deeks J, Talley NJ, Delaney B, Forman D. An update of the Cochrane systematic review of *Helicobacter pylori* eradication therapy in nonulcer dyspepsia: resolving the discrepancy between systematic reviews. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2621-2626.
91. Mohammadi M, Czinn S, Redline R, Nedrud J. *Helicobacter*-specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. *J Immunol* 1996;156:4729-4738.
92. 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.
93. Montecucco C, de Bernard M. Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes Infect* 2003;5:715-721.
94. Neu B, Puschmann AJ, Mayerhofer A, Hutzler P, Grossmann J, Lippl F, Schepp W, Prinz C. TNF-alpha induces apoptosis of parietal cells. *Biochem Pharmacol* 2003;65:1755-1760.
95. Neu B, Randlkofer P, Neuhofer M, Volland P, Mayerhofer A, Gerhard M, Schepp W, Prinz C. *Helicobacter pylori* induces apoptosis of rat gastric parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G309-G318.
96. Noach LA, Bosma NB, Jansen J, Hoek FJ, van Deventer SJ, Tytgat GN. 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.
97. Nomura AM, Lee J, Stemmermann GN, Nomura RY, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* CagA seropositivity and gastric carcinoma risk in a Japanese American population. *J Infect Dis* 2002;186:1138-1144.

98. 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 Feb 25 ;287 (5457):1497 -500287:1497-1500.
99. Ogura K, Maeda S, Nakao M, Watanabe T, Tada M, Kyutoku T, Yoshida H, Shiratori Y, Omata M. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J Exp Med* 2000;192:1601-1610.
100. Ohana M, Okazaki K, Oshima C, Kawasaki K, Fukui T, Tamaki H, Matsuura M, Asada M, Nishi T, Uchida K, Uose S, Nakase H, Iwano M, Matsushima Y, Hiai H, Chiba T. Inhibitory effects of *Helicobacter pylori* infection on murine autoimmune gastritis. *Gut* 2003;52:1102-1110.
101. Orntoft TF, Holmes EH, Johnson P, Hakomori S, Clausen H. Differential tissue expression of the Lewis blood group antigens: enzymatic, immunohistologic, and immunochemical evidence for Lewis a and b antigen expression in Le(a-b-) individuals. *Blood* 1991;77:1389-1396.
102. Owen RJ. *Helicobacter*--species classification and identification. *Br Med Bull* 1998;54:17-30.
103. Pagliaccia C, de Bernard M, Lupetti P, Ji X, Burrone D, Cover TL, Papini E, Rappuoli R, Telford JL, Reyrat JM. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:10212-10217.
104. Parrello T, Monteleone G, Cucchiara S, Monteleone I, Sebkova L, Doldo P, Luzzo F, Pallone F. Up-regulation of the IL-12 receptor beta 2 chain in Crohn's disease. *J Immunol* 2000;165:7234-7239.
105. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelmann H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *GUT* 1997;40:297-301.
106. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelmann JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991;325:1127-1131.

107. Peek-RM J, Miller GG, Tham KT, Perez PG, Zhao X, Atherton JC, Blaser MJ. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest* 1995;73:760-770.
108. Peek RM, Jr., Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002;2:28-37.
109. Phadnis SH, Ilver D, Janzon L, Normark S, Westblom TU. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1994;62:1557-1565.
110. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992;22:396-402.
111. Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu CY, Gately MK, Gubler U. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14002-14007.
112. Prinz C, Hafsi N, Volland P. *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. *Trends Microbiol* 2003;11:134-138.
113. Prinz C, Neumayer N, Mahr S, Classen M, Schepp W. Functional impairment of rat enterochromaffin-like cells by interleukin 1 beta. *Gastroenterology* 1997;112:364-375.
114. Prinz C, Zanner R, Gerhard M, Mahr S, Neumayer N, Hohne-Zell B, Gratzl M. The mechanism of histamine secretion from gastric enterochromaffin-like cells. *Am J Physiol* 1999;277:C845-C855.
115. Reytrat JM, Pelicic V, Papini E, Montecucco C, Rappuoli R, Telford JL. Towards deciphering the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Mol Microbiol* 1999;34:197-204.

116. Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U, Sinigaglia F. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* 1997;185:825-831.
117. Sachs G, Shin JM, Munson K, Vagin O, Lambrecht N, Scott DR, Weeks DL, Melchers K. Review article: the control of gastric acid and *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 2000 Nov ;14 (11):1383 -40114:1383-1401.
118. Sachs G, Weeks DL, Melchers K, Scott DR. The Gastric Biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Physiol* 2002.
119. Salomon H. Ueber das Spirillum des Säugertiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen. *Zentralbl Bakteriol* 1896;19:433-442.
120. Santtila S, Savinainen K, Hurme M. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro. *Scand J Immunol* 1998;47:195-198.
121. Schepp W, Dehne K, Herrmuth H, Pfeffer K, Prinz C. Identification and functional importance of IL-1 receptors on rat parietal cells. *Am J Physiol* 1998;275:G1094-G1105.
122. Schmitt W, Haas R. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol* 1994 Apr12:307-319.
123. Schwarz K. Über penetrierende Magen- und Jejunalgeschwüre. *Beitr Klein Chir* 1910;67:96-128.
124. Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS. 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.
125. Segal ED, Lange C, Covacci A, Tompkins LS, Falkow S. Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:7595-7599.

126. Shimoyama T, Crabtree JE. Bacterial factors and immune pathogenesis in *Helicobacter pylori* infection. *GUT* 1998;43 Suppl 1:S2-S5.
127. Smythies LE, Waites KB, Lindsey JR, Harris PR, Ghiara P, Smith PD. *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN-gamma, gene-deficient mice. *J Immunol* 2000;165:1022-1029.
128. Steer HW. Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. *J Clin Pathol* 1975;28:639-646.
129. 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 Feb 1 ;97 (3):1263 -897:1263-1268.
130. 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.
131. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002;347:1175-1186.
132. Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 1997;185:817-824.
133. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 2003;21:713-758.
134. Takashima M, Furuta T, Hanai H, Sugimura H, Kaneko E. Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils. *Gut* 2001;48:765-773.
135. Talley NJ, Vakil N, Ballard ED, Fennerty MB. Absence of benefit of eradicating *Helicobacter pylori* in patients with nonulcer dyspepsia. *N Engl J Med* 1999;341:1106-1111.

136. Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A, Duff GW. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet* 1993;91:403-404.
137. Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burroni D, Bugnoli M, Tecce MF, Censini S, Covacci A, Xiang Z, et al. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med* 1994;179:1653-1658.
138. Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ. 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.
139. Tummuru MK, Sharma SA, Blaser MJ. *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.
140. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001;345:784-789.
141. van der HR, van der EA, Dekker FW, Ten KF, Weel JF, Keller JJ, Kruizinga SP, Dankert J, Tytgat GN. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastritis in relation to cagA: a prospective 1-year follow-up study. *Gastroenterology* 1997;113:25-30.
142. van DL, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, De BW, Quint W. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998;115:58-66.
143. Wallace JL, Cucala M, Mugridge K, Parente L. Secretagogue-specific effects of interleukin-1 on gastric acid secretion. *Am J Physiol* 1991;261:G559-G564.
144. Wang J, Brooks EG, Bamford KB, Denning TL, Pappo J, Ernst PB. Negative selection of T cells by *Helicobacter pylori* as a model for bacterial strain selection by immune evasion. *J Immunol* 2001;167:926-934.

145. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983;1:1273-1275.
146. Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils [see comments]. *Gastroenterology* 1998;115:642-648.
147. Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* 2000 Jan 21 ;287 (5452):482 -5287:482-485.
148. Witteman EM, Mravunac M, Bex MJ, Hopman WP, Verschoor JS, Tytgat GN, de Koning RW. Improvement of gastric inflammation and resolution of epithelial damage one year after eradication of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* 1995;48:250-256.
149. Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de BM, Isaacson PG. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori* [see comments]. *Lancet* 1993;342:575-577.
150. Wotherspoon AC, Ortiz HC, Falzon MR, Isaacson PG. *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma [see comments]. *Lancet* 1991;338:1175-1176.
151. Yahiro K, Wada A, Nakayama M, Kimura T, Ogushi K, Niidome T, Aoyagi H, Yoshino K, Yonezawa K, Moss J, Hirayama T. Protein-tyrosine phosphatase alpha, RPTP alpha, is a *Helicobacter pylori* VacA receptor. *J Biol Chem* 2003;278:19183-19189.
152. Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Imanishi J. *Helicobacter pylori* cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. *Gastroenterology* 1996;110:1744-1752.
153. Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Kashima K, Imanishi J. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive *Helicobacter pylori* strains. *Gut* 1997;41:442-451.

154. Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham DY. Antibody against *Helicobacter pylori* CagA and VacA and the risk for gastric cancer. *J Clin Pathol* 1999;52:215-218.
155. Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, Imanishi J, Kashima K, Graham DY. Relation between clinical presentation, *Helicobacter pylori* density, interleukin 1beta and 8 production, and cagA status. *GUT* 1999;45:804-811.
156. Yeung CK, Fu KH, Yuen KY, Ng WF, Tsang TM, Branicki FJ, Saing H. *Helicobacter pylori* and associated duodenal ulcer. *Arch Dis Child* 1990;65:1212-1216.
157. Zhang M, Gong J, Presky DH, Xue W, Barnes PF. Expression of the IL-12 receptor beta 1 and beta 2 subunits in human tuberculosis. *J Immunol* 1999;162:2441-2447.
158. Zucca E, Bertoni F, Roggero E, Bosshard G, Cazzaniga G, Pedrinis E, Biondi A, Cavalli F. Molecular analysis of the progression from *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis to mucosa-associated lymphoid-tissue lymphoma of the stomach. *N Engl J Med* 1998;338:804-810.
159. Zucca E, Bertoni F, Roggero E, Cavalli F. The gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type. *Blood* 2000;96:410-419.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Christian Prinz für die exzellente Betreuung in fachlicher wie auch in menschlicher Hinsicht, sowie für die Unterstützung und das Vertrauen bei der Durchführung meiner Ideen im Rahmen dieser Arbeit;

Herrn Dr. Markus Gerhard für hervorragende kontinuierliche Betreuung und die stete Hilfsbereitschaft bei der Lösung von Problemen im Laboralltag;

Herrn Dr. Roland Lang für die hervorragende Einarbeitung in die Molekularbiologie und die fachliche wie auch moralische Unterstützung bei vielen Experimenten.

Frau PD Dr. Ingrid Becker und Frau Sabine Noll für die die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung von immunhistochemischen Färbungen;

allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Prinz für den freundlichen Umgang und für die Hilfsbereitschaft bei vielen Fragen des Laboralltags. Erwähnen möchte ich insbesondere Frau Dr. Petra Voland, Frau Dr. Elena Presecan-Siedl, Frau Dr. Sonja Bülau, Dr. Bruno Neu, die MTAs Mathilde Neuhofer, Nina Neumeier und Stefanie Laforsch, sowie meine Mit-Doktoranden Robert Zanner, Martin Schöniger, Christian Huber, Agnes Pohlinger, Pamela Randlkofer, Vidar Stenset und Marco Zeitner;

Mehr als Dank schulde ich meinen Eltern, die mich während des Studiums und der Promotion in allen Lebensbereichen unermüdlich und hingebungsvoll unterstützt haben. Aus tiefstem Herzen danke ich Ihnen hierfür.