

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Professor Dr. U. Pohl

Chemokinmuster bei der *Helicobacter-pylori*-induzierten Gastritis

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang Einsiedl

aus

Traunstein

Jahr

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Enders

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Gabriele Rieder
Priv. Doz. Dr. Gisela Bretzel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. G. Rieder

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2010

Meinen Eltern gewidmet

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
AU	Absorptionseinheit
C	Cytosin
<i>cagA</i>	Gen von CagA
CagA	Zytotoxin-assoziiertes Antigen
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlendioxid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ENA-78	epithelial cell-derived neutrophil activating peptide 78
Fa.	Firma
G	Guanin
Gal	Galaktose
GAPDH	Glycerolaldehydphosphat-Dehydrogenase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-2-ethansulfonsäure
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL-1 α / β	Interleukin-1alpha/beta
IL-8	Interleukin 8
IPTG	Isopropylthiogalactosid
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharide
M.	Morbus
MALT	mucosa associated lymphoid tissue
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MIP-1 α	macrophage inflammatory protein 1 α
MIP-1 β	macrophage inflammatory protein 1 β
MgCl	Magnesiumchlorid
MMLV	Molony-Maus-Leukämie-Virus
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
N ₂	Stickstoff
NF- κ B	Nuklearfaktor kappaB
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
OMP	outer membrane proteins

PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasenkettenreaktion
RANTES	regulated on activation normal T cell expressed and presumably secreted
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
SDS	Natriumdodecylphosphat
T	Thymin
T4SS	<i>Helicobacter pylori</i> Typ IV Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	hitzestabile DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
U _{crit}	kritischer U-Wert
<i>vacA</i>	Gen von VacA
VacA	vakuolisierendes Zytotoxin
UV	ultraviolett
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
WC	Wilkins-Chalgren
WSP	water soluble protein
Xgal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Einheiten

bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CFU	colony forming units
g	Gramm
h	Stunde
Hz	Hertz
l	Liter
m	Meter
M	molar (mol/l)
min	Minute
rpm	Umdrehungen pro Minute
Sek.	Sekunde
V	Volt
W	Watt

Vorsätze

k	kilo	10^3
m	milli	10^{-3}
μ	mikro	10^{-6}
n	nano	10^{-9}
a	ato	10^{-18}

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Bakterium <i>Helicobacter pylori</i>	2
1.1.1	Epidemiologie	2
1.1.2	Morphologie und Physiologie	4
1.1.3	Virulenzfaktoren	4
1.1.4	Diagnostik	7
1.2	Chemokine	10
1.2.1	Funktion und Chemokin-bildende Zellen	10
1.2.2	Aufbau und strukturelle Einteilung	11
1.2.3	Rezeptorbindung und biologische Aktivität	12
1.2.4	Funktionelle Einteilung	12
1.2.5	Erkrankungen	13
1.3	Zielsetzung der Arbeit	13
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Studienteilnehmer	15
2.2	Gewinnung und Lagerung der Magenbiopsien	15
2.3	Histologische Untersuchungen der Magenbiopsien	15
2.4	Bestimmung des <i>Helicobacter-pylori</i> -Infektionsstatus der Studienteilnehmer	16
2.5	Amplifizierung der Chemokine	16
2.5.1	Gewinnung der Gesamt-RNA	16
2.5.1.1	Isolierung	16
2.5.1.2	Konzentrationsbestimmung und qualitative Beurteilung	17
2.5.2	Durchführung der RT-PCR	18
2.5.2.1	Synthese der komplementären DNA (cDNA)	18
2.5.2.2	Durchführung der Polymerasenkettenreaktion (PCR)	19
2.5.3	Gelelektrophorese	22
2.5.4	Dokumentation und semiquantitative Auswertung der Gelbilder	23
2.6	Quantitative RT-Polymerasenkettenreaktion	23
2.7	In-vitro-Stimulation von AGS-Zellen	26
2.7.1	Zelllinie	26
2.7.2	Bakterienstamm	27
2.7.3	Gewinnung des Gesamtproteins, des wasserlöslichen Proteins (water-soluble protein, WSP), der Gesamtmembran und der äußeren Membranproteine (outer membrane proteins, OMP) von <i>Helicobacter pylori</i>	28
2.7.4	Durchführung der In-vitro-Stimulation von AGS-Zellen	29
2.8	Statistik	29
3	ERGEBNISSE	31
3.1	Untersuchung der Studienteilnehmer	31
3.1.1	Einteilung der Studienteilnehmer	31
3.1.2	Histologie der humanen Magenbiopsien	31
3.1.3	Semiquantitative RT-PCR von humanen Biopsien des Magenantrums	32

3.1.3.1	Standardisierung der cDNA-Einsatzmengen	32
3.1.3.2	Transkription von CXC-Chemokinen in Biopsien des Magenantrums	33
3.1.3.3	Transkription von CC-Chemokinen in Biopsien des Magenantrums	37
3.1.4	Quantitative RT-PCR von humanen Biopsien des Magenantrums	44
3.1.4.1	Standardisierung der cDNA-Einsatzmengen	44
3.1.4.2	Transkription von ENA-78 in Biopsien des Magenantrums	45
3.2	Semiquantitative RT-PCR von in vitro stimulierten AGS-Zellen	51
3.2.1	Standardisierung der cDNA-Einsatzmengen	52
3.2.2	Transkription von CXC-Chemokinen in AGS-Zellen	53
3.2.3	Transkription von CC-Chemokinen in AGS-Zellen	55
3.2.4	Transkription von CXC-Chemokinen in AGS-Zellen im Zeitverlauf	59
3.2.4.1	Standardisierung der cDNA-Einsatzmengen	59
3.2.4.2	Transkription von CXC-Chemokinen in AGS-Zellen	59
4	DISKUSSION	62
4.1	Einleitung	62
4.2	Chemokintranskription bei der <i>Helicobacter-pylori</i> -assoziierten Gastritis	63
4.2.1	Transkription der CXC-Chemokine in vivo und in vitro	66
4.2.2	Transkription der CC-Chemokine in vivo und in vitro	69
4.3	Bedeutung der Studienergebnisse für die Pathophysiologie einer <i>Helicobacter-pylori</i> -induzierten Gastritis	75
5	ZUSAMMENFASSUNG	77
6	TABELLENVERZEICHNIS	79
7	ABBILDUGSVERZEICHNIS	80
8	LITERATURVERZEICHNIS	83
9	DANKSAGUNG	100

1 EINLEITUNG

Jahrzehntlang war man der Meinung, dass eine chronische bakterielle Besiedelung des Magens aufgrund seines aggressiv-sauren Milieus nicht möglich ist, obwohl der Pathologe Krienitz bereits 1906 „Über das Auftreten von Spirochaeten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi“ berichtete (Krienitz 1906). Dieser Befund geriet in Vergessenheit bis den beiden Australiern Warren und Marshall 1983 die Wiederentdeckung und erfolgreiche Kultivierung eines spiralförmigen Keims aus Magenbiopsien gelang (Warren et al. 1983). Diese Bakterien, die seit 1989 taxonomisch in die eigene Gattung *Helicobacter* eingeordnet werden, lösten eine wahre Renaissance der Gastritisforschung aus, in deren Folge die Pathophysiologie und Therapie des Magen- und Duodenalulkus revolutioniert (Rauws et al. 1988, Kuipers et al. 1995a, Ernst et al. 2000, Ford et al. 2004) und die Assoziation mit dem MALT-Lymphom des Magens (Mueller et al. 1999), dem Magenkarzinom (Nomura et al. 1991, Parsonnet et al. 1991, Uemura et al. 2001) und dem M. Ménétrier hergestellt werden konnte (Wood et al. 1998).

Trotz der weltweiten intensiven Forschung sind auf dem Gebiet der Pathophysiologie hinsichtlich des Ablaufs einer von *Helicobacter pylori* induzierten Gastritis, angefangen von der Besiedelung des Magens und einer dadurch in Gang gesetzten Signalkaskade bis hin zur Infiltration der Lamina propria mit Leukozyten, zahlreiche Fragen ungeklärt. In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen an Magenbiopsien bzw. einer Magenkarzinomzelllinie auf der Transkriptionsebene einer durch *Helicobacter pylori* induzierten Chemokinproduktion könnten somit einen weiteren Baustein innerhalb der aktivierten Signalkaskade liefern und zu einem besseren pathophysiologischen Verständnis beitragen.

1.1 Das Bakterium *Helicobacter pylori*

1.1.1 Epidemiologie

Nach Angaben der WHO wird die weltweite Infektionsrate mit *H. pylori* auf ungefähr 50% geschätzt (International Agency for Research on Cancer, WHO, 1994). Die Prävalenz beim Erwachsenen schwankt je nach geographischer Region und Alter von 10-50% in den Industrienationen bis zu 80-90% in den Entwicklungsländern (Rothenbacher et al. 2003). Die Eurogast-Studie (The Eurogast Study Group, 1993), in deren Rahmen die Prävalenz innerhalb von 17 Regionen in Europa, Nordafrika, USA und Japan untersucht wurde, zeigte eine Gesamtprävalenz von 35% innerhalb der Gruppe der 25-34 jährigen und von 62% innerhalb der Gruppe der 55-64 jährigen Studienteilnehmer. Je nach Region fanden sich erhebliche Differenzen bezüglich der Prävalenzrate. Sie lag innerhalb der Altersgruppe der 25-34 jährigen Personen z.B. in Dänemark bei 15%, in Griechenland bei 55% und in Polen bei 69%, innerhalb der Altersgruppe der 55-64 jährigen Personen beispielsweise in Dänemark bei 30%, in Belgien bei 54% und in Griechenland bei 75%.

In der Bundesrepublik Deutschland liegt nach Untersuchungen des Robert Koch-Instituts (Seher et al. 2000) die Gesamtprävalenz bei 40%. Innerhalb der Studienteilnehmer konnte mit dem Alter ebenso ein deutlicher Anstieg der Prävalenz von 21,7% (Gruppe der 18-29 jährigen) auf 60,5% (Gruppe der 70-79 jährigen) festgestellt werden. Da heutzutage davon ausgegangen wird, dass die Infektion mit *H. pylori* hauptsächlich in der Kindheit erfolgt, unbehandelt zumeist lebenslang persistiert (Webb et al. 1994, Rothenbacher et al. 2000) und die Neuinfektionsrate gering ist, sie lag z. B. innerhalb untersuchter Kollektive von Cullen et al. (1994) und Kuipers, Uytterlinde et al. (1995) durchschnittlich bei 0,3% pro Jahr, wird der Anstieg der Prävalenz mit dem Lebensalter als sog. Kohortenphänomen interpretiert. Das bedeutet, dass die Infektionsrate während der Kindheit der heute älteren Generationen höher lag als während der Kindheit der heute jüngeren Generationen (Banatvala et al. 1993, Roosendaal et al. 1997). Erklärt wird dieser Rückgang der Infektionsrate durch verbesserte sozioökonomische Faktoren, wie z.B. Einkommen, Bildung und Geschwisterzahl, deren Einfluß auf die Prävalenzrate sich auch in der Studie von Seher et al. zeigte. So wiesen Personen der Unterschicht eine Prävalenzrate von 50,9% auf, wohingegen bei Angehörigen der Mittel- bzw. Oberschicht eine Infektionsrate von 39,3 bzw. 28,9% ermittelt werden konnte. Diesen Untersuchungsbefund erklärten die Autoren auch als hauptverantwortlich für den deutlichen Unterschied innerhalb der Prävalenzrate zwischen den neuen (48,5%) und

alten (37,9%) Bundesländern. Ebenso konnte in dieser Studie eine erhöhte Prävalenzrate mit steigender Geschwisterzahl nachgewiesen werden.

Neben sozioökonomischen Faktoren spielen in den Industrienationen die ethnische Abstammung und das Geburtsland eine beträchtliche Rolle (Perez-Perez et al. 2004). In einer seroepidemiologischen Studie, die die Prävalenzraten von Deutschen und Türken im Rahmen eines Krankenhausaufenthaltes bestimmte, konnte eine Gesamtprävalenz von 13,1% bei in Deutschland lebenden Türken, von 30,4% bei in der Türkei geborenen und jetzt in Deutschland lebenden Türken und von 44,5% bei in der Türkei lebenden Türken nachgewiesen werden (Porsch-Ozcurumez et al. 2003). Ein erheblicher Einfluss der ethnischen Abstammung konnte auch mit Hilfe von epidemiologischen Studien an Schulkindern in Deutschland gezeigt werden. In einer Untersuchung von Grimm et al. (2003) wurde eine Prävalenzrate bei deutschen Kindern von 7,1% und bei ausländischen Kindern von 28,2% bestimmt. Einen ähnlich erheblichen Anstieg der Prävalenzraten bei Kindern in Abhängigkeit von ihrer ethnischen Abstammung zeigten Untersuchungen in Deutschland (Rothenbacher et al. 1999, 2002) und in der Schweiz (Boltshauser et al. 1999).

Hinsichtlich der Infektion, die durch die orale Aufnahme des Bakteriums erfolgt, scheint die Übertragung innerhalb der Familie, und insbesondere von der Mutter auf das Kind, der wesentliche Übertragungsweg zu sein (Rothenbacher et al. 2002, Kivi et al. 2005). Hierfür sprechen die im Rahmen von DNA-Typisierungen nachgewiesenen hohen Konkordanzraten der innerhalb einzelner Familien und bei Mutter und Kind gefundenen *H.-pylori*-Stämme (Bamford et al. 1993, Kivi et al. 2003, Konno et al. 2005).

Bezüglich des Übertragungsweges wird von einem oral-oralen und/oder fäkal-oralen Weg ausgegangen, schlussfolgernd aus der erfolgreichen Kultivierung des Keims aus Vomitibus, Speichel und Faeces (Leung et al. 1999, Parsonnet et al. 1999, Kivi et al. 2006, Kusters et al. 2006).

Einen weiteren Hinweis auf einen oral-oralen Übertragungsweg zeigten Studien aus Deutschland, bei der die Prävalenzraten bei Kindern, deren Mütter rauchten, niedriger waren (Brenner et al. 1998, 2000). Jedoch sei angemerkt, dass in den Entwicklungsländern ein fäkal-oraler Übertragungsweg oder andere außerfamiliäre Infektionsquellen vermutlich vorherrschend sind (Rothenbacher et al. 2003).

1.1.2 Morphologie und Physiologie

Das Bakterium *Helicobacter pylori* gehört zur Gruppe der gramnegativen Bakterien mit dem typischen Zellwandaufbau aus innerer Zytoplasmamembran, dünner Mureinschicht und der äußeren Membran mit seinem Lipopolysaccharid (LPS) als wichtigsten Bestandteil. Morphologisch tritt *H. pylori* als einfach gebogenes, bis zu 3 Windungen spiralförmiges, Stäbchen auf. An einem Pol besitzt es 6-8 Flagellen, die ihm hohe Beweglichkeit verleihen und als charakteristisches Merkmal von einer membranartigen Hülle umgeben sind. Als weitere Identifizierungsmerkmale gelten ein stark positiver Urease-, sowie positiver Oxidase- und Katalasetest, keine Nitratreduktion und keine Hippurat-Hydrolyse, der Nachweis von Gamma-Glutamyltranspeptidase, sowie Resistenz gegen Nalaxidinsäure und Sensibilität gegen Cefalotin (Suerbaum 2000).

1.1.3 Virulenzfaktoren

Nach Suerbaum (2000) werden als Virulenzfaktoren Fähigkeiten eines pathogenen Keims definiert, die ihm erlauben „eine bestimmte ökologische Nische im Körper des Wirts zu kolonisieren und sich dort trotz der Immunantwort und der unspezifischen Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus zu vermehren“.

Für *H. pylori* sind eine Vielzahl von Virulenzfaktoren bekannt. Nachfolgend soll eine Übersicht über die wesentlichen Faktoren gegeben und ihre Hauptfunktionen kurz beschrieben werden.

Als wichtiger Faktor gilt das Enzym Urease, das in der Lage ist Harnstoff in Ammoniak und Kohlendioxid zu spalten und dem Keim, durch Neutralisierung der Magensäure, das Überleben bis zum Erreichen der schützenden Magenschleimhaut sichert und die Besiedelung des Magens ermöglicht (Mobley et al. 1997). Es wird aus 6 großen (UreB) und 6 kleinen (UreA) Untereinheiten gebildet, besitzt eine Molekularmasse von ca. 550 kDa und enthält 12 Nickelatome, die für die Enzymaktivität wesentlich sind (Mobley et al. 1997). Reguliert wird die Ureaseaktivität durch den pH-abhängigen Harnstoffkanal UreI, der bei pH-Werten im sauren Bereich den Zustrom von Harnstoff ins Zytoplasma ermöglicht und sich bei neutralen pH-Werten schließt (Weeks et al. 2000).

Ein weiterer wichtiger Faktor, der *H. pylori* das dauerhafte Überleben im sauren Magenmilieu gewährleistet, ist seine hohe Motilität. Diese wird ihm hauptsächlich durch seine Flagellen

verliehen und ermöglicht ihm, das mit schützendem Mukus bedeckte Magenepithel zu erreichen und dort langfristig zu persistieren (Josenhans et al. 1997).

Als weitere wichtige Eigenschaft zur Kolonisation des Magens zählt auch die Fähigkeit der Bindung (Adhärenz) des Keims an die Zellen des Magenepitheliums. Hierfür besitzt *H. pylori* mehrere sog. Adhäsine, die spezifisch an Rezeptoren von Magenzellen anbinden können (Kamiya et al. 2002). Mit am besten untersucht ist das Adhäsिन BabA, ein Protein der äußeren Membran mit einer Molekularmasse von 78 kDa, das an das Lewis-B-Blutgruppenantigen anbindet (Ilver et al. 1998). Außerdem ist bekannt, dass Personen, die mit *H. pylori*-Stämmen infiziert sind, die das BabA-Adhäsिन besitzen, häufiger von *H. pylori*-assoziierten Folgeerkrankungen betroffen sind, als Personen, deren Keim das BabA-Adhäsिन nicht bildet (Guruge et al. 1998).

Die erste Beschreibung einer zytotoxischen Wirkung von *H. pylori* erfolgte 1988 durch Leunk et al., die beobachteten, dass die Überstände von *H. pylori* Isolaten die Bildung von Vakuolen im Zytoplasma von eukaryontischen Zellkulturen verursachten. Später gelang es dieses vakuolisierende Zytotoxin (VacA), ein 95 kDa-Protein, zu identifizieren (Cover et al. 1992). Die Virulenz von VacA wurde an zahlreichen Tiermodellen untersucht. So fand Ghiara et al. (1995) nach Verfütterung von VacA-haltigen Zellkulturüberständen bei Mäusen Epithelzellschäden, eine Infiltration mit mono- und polynukleären Zellen in der Magenmukosa und eine Verminderung der Mukusschichtdicke. Hinsichtlich der Fähigkeit zur Kolonisation scheint VacA keine wesentliche Rolle zu spielen, da zum einen bei Patienten Bakterien isoliert wurden, deren *VacA*-Gene inaktiv waren und zum anderen VacA-negativen Bakterienstämmen im Tiermodell eine erfolgreiche Kolonisation gelingt (Suerbaum et al. 2002). Jedoch fanden sich Wildtypen von *H. pylori* hinsichtlich der Kolonisation gegenüber VacA-negativen Mutanten überlegen (Salama et al. 2001).

Untersuchungen des *VacA*-Gens und des zugehörigen Proteins zeigten je nach Bakterienstamm eine hohe Variabilität, die sich im Ausmaß der Proteinexpression, des vakuolisierenden zytotoxischen Effekts und dem Vermögen an bestimmte Zelltypen anzubinden, äußerte (Atherton et al. 1995, Pagliaccia et al. 1998).

Das über die äußere Membran und nach Proteolyse abgegebene Zytotoxin (Wandersmann 1992) hat die Tendenz ein Oligomer in Form einer Rosette zu bilden (Lupetti et al. 1996), das bei sauren oder basischen pH-Werten in die aktive monomere Form übergeht (Cover et al. 1997). Nach dem Anbinden des monomeren Zytotoxins an einen Zellrezeptor bildet es einen Anionen-selektiven und spannungsabhängigen Kanal durch welchen Bicarbonate und organische Anionen freigesetzt werden, die vermutlich der Nährstoffversorgung von *H. pylori*

dienen (Szabo et al. 1999). Nach Endozytose des Toxins kommt es durch die Fusion zwischen frühen und späten Endosomen zur Bildung von Vakuolen (Salama et al. 2001), für deren Bildung auch eine vakuoläre ATPase (vATPase) notwendig ist und die zum Anschwellen der Vakuolen führt. Durch Hemmung der vATPase ist eine Vakuolenbildung nicht möglich (Cover et al 1993, Papini et al.1993).

Es wird angenommen, dass durch die Behinderung des natürlichen Reifungsprozesses von Endosomen die Antigen-Bearbeitung und -Präsentation gehemmt wird. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass VacA auch die Reifung von Phagosomen und deren Fusion mit Lysosomen in Makrophagen hemmt und somit ein längeres Überleben innerhalb der Wirtszelle gewährleistet (Zheng et al. 2003). Neben der Vakuolenbildung führt VacA auch zur Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrienmembranen und induziert somit die Zellapoptose (Galmiche et al. 2000).

H.-pylori-Stämme werden je nach der Expression von VacA und einem weiteren Virulenzfaktor, dem sog. zytotoxin-assoziierten Antigen (CagA), in Typ-I- oder, bei deren Fehlen, in Typ-II-Stämme eingeteilt. Typ-I-Stämme sind bei Patienten in westlichen Industrienationen häufiger mit einer Duodenitis, einem Duodenalulkus und einem Magenkarzinom assoziiert als Typ-II-Stämme, wobei dieser Zusammenhang an z.B. japanischen oder chinesischen Populationen nicht nachgewiesen werden konnte (Pan et al 1997, Shimoyama et al. 1997).

Die Expression des CagA-Proteins, das eine variable Molekularmasse von 120-140 kDa besitzt und stark immunogen ist (Covacci et al. 1993, Tummuru et al. 1993), ist an das Vorhandensein der sog. *cag* Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) gekoppelt und wird heutzutage als dessen Marker betrachtet (Censini et al. 1996). Neben dem Gen für das CagA-Protein kodiert die *cag* Pathogenitätsinsel auch ein sog. Typ-IV-Sekretionssystem (T4SS), das, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, einen Pilus bildet (Kwok et al. 2007, Rohde et al. 2003) und die Injektion von CagA (Odenbreit et al. 2000) und den Übertritt von Peptidoglykanen (Viala et al. 2004) in die Wirtszelle ermöglicht. T4SS bindet über das Adhäsion CagL an das Integrin $\alpha_5\beta_1$ und bewirkt, durch dessen Aktivierung, schließlich den Transport von CagA in die Wirtszelle. In der Wirtszelle wird CagA phosphoryliert (Asahi et al. 2000, Stein et al. 2000) und bindet an verschiedene Zellproteine, die eine SH2-Domäne enthalten. Bisher wurden in diesem Zusammenhang die Tyrosin-Phosphatase Shp-2, die Tyrosin-Kinase Csk und das Adaptorprotein Crk beschrieben (Higashi et al. 2002, Tsutsumi et al. 2003, Suzuki et al. 2005), die alle drei als Interaktionspartner bei der durch *H.-pylori*-induzierten Umgestaltung des Aktinzytoskeletts eine Rolle spielen. Daneben sind auch von

der Phosphorylierung unabhängige Effekte von CagA bekannt, wie u.a. das Zerreißen von Tight junctions oder das Anstoßen proliferatorischer und proinflammatorischer Signalkaskaden (Backert et al. 2008). Ausgehend von der Beobachtung, dass neben CagA-positiven Bakterienstämmen auch CagA-negative *H. pylori*-Mutanten in der Lage sind die Bildung von IL-8 in der Wirtszelle zu induzieren (Crabtree, Xiang et al. 1995, Sharma et al. 1995) wurde davon ausgegangen, dass das CagA-Protein keine wesentliche Rolle in der Induktion von Chemokinen spielt. Unterstützt wird diese Annahme von den Untersuchungen von Fischer et al. (2001), die einzelnen Gene der *cag* Pathogenitätsinsel der Reihe nach überprüften und zu der Ansicht gelangten, dass die *cag* Pathogenitätsinsel kein Effektorprotein codiert, das über das Typ-IV-Sekretionssystem in die Wirtszelle gelangt und zur Induktion von IL-8 führt. Auch zeigten Censini et al. (1996) und Selbach et al. (2002) mit Hilfe von gezielt durchgeführten Mutationen in einzelnen Genen der *cag*-PAI, dass die Induktion von IL-8 an ein intaktes T4SS gebunden ist, aber unabhängig vom CagA-Protein erfolgt. Jedoch entdeckte erst kürzlich Brandt et al. (2005), dass, neben der von Viala et al. (2004) beschriebenen Aktivierung von NF- κ B (Nuklearfaktor kappaB) und Induktion von IL-8 durch Peptidoglykane, die über das Typ-IV-Sekretionssystem in die Wirtszelle gelangt sind, auch CagA in der Lage ist über eine 2. Signalkaskade NF- κ B zu aktivieren und die IL-8 Produktion zu induzieren.

Ein weiterer Virulenzfaktor von *H. pylori* ist das Neutrophilen-aktivierende Protein (HP-NAP), ein 150 kDa schweres Protein, das bei neutrophilen Zellen einerseits die Adhäsion an Endothelzellen fördert und andererseits die Produktion von Sauerstoffradikalen induziert (Evans et al. 1995). Satin et al. (2000) konnten mit Hilfe eines gereinigten und rekombinierten HP-NAP seine chemotaktische Wirkung auf neutrophile Zellen und Monozyten des Menschen zeigen. Auch konnten sie die hohe Immunogenität von HP-NAP durch den Nachweis spezifischer Antikörper im Serum von 60% eines mit *H. pylori* infizierten Patientenguts belegen.

1.1.4 Diagnostik

Zum Nachweis einer Infektion mit *Helicobacter pylori* stehen zwei Gruppen an Testverfahren zur Verfügung, zum einen die invasiven Tests, die mit Biopsien aus dem Antrum und dem Corpus der Magenschleimhaut durchgeführt werden, und zum anderen die nicht-invasiven Tests. Nachfolgend wird eine Übersicht über die wichtigsten invasiven (Urease-Test,

Histologie, Kultur, PCR) und nicht-invasiven Tests (^{13}C -Harnstoff-Atemtest, Stuhl-Antigentest, Antikörpertests) gegeben.

Der Urease-Test, der unmittelbar im Rahmen einer Gastroskopie durch die Entnahme von Biopsien aus dem Antrum und dem Corpus durchgeführt wird, basiert auf der bakteriellen Produktion von Urease, die Harnstoff in Ammoniak und Kohlendioxid spaltet und somit durch den Farbumschlag eines pH-Indikators in einem harnstoffhaltigen Medium ein rasches Testergebnis liefert (Mégraud et al. 2002). Es gibt verschiedene kommerzielle Tests, deren Sensitivität zwischen 70-97% und Spezifität zwischen 90 und 100% liegt (Lee et al. 1994).

Auch histologisch kann der Nachweis einer Infektion mit aus dem Antrum und Corpus entnommen Biopsien geführt werden. Dieser ist bereits durch eine Routinefärbung mit Eosin und Hämatoxylin möglich, besser geeignet sind jedoch Spezialfärbungen wie die Warthin-Starry-Färbung oder eine modifizierte Giemsa-Färbung (Nilius et al. 2000). Die Sensitivität wird je nach Studie mit 92-100%, die Spezifität mit 88-100% angegeben (Nilius et al. 2000). Ein Nachteil histologischer Nachweisverfahren ist die Abhängigkeit von der Erfahrung des jeweiligen Untersuchers, ein Vorteil die Möglichkeit die Magenmukosa mit zu beurteilen (Mégraud et al. 2002).

Als Goldstandard in der Diagnostik gilt die kulturelle Anzucht von *H. pylori* aus Magenbiopsien, da bereits nur wenige Keime zur erfolgreichen Kultivierung ausreichend sind (Nilius et al. 2000). Die Anzucht des Keims erfolgt wie unter 2.7.2. beschrieben. Bis Kolonien sichtbar werden ist ein Minimum von 3 Tagen notwendig. Die Identifizierung erfolgt mikroskopisch und durch den Nachweis typischer physiologischer Merkmale, wie sie unter 1.1.2 angegeben sind (Mégraud et al. 2002).

Ein weiteres Verfahren mit hoher Sensitivität und Spezifität ist der Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte von *H. pylori* aus Magenbiopsien mit Hilfe der PCR und entsprechender Primer (Mégraud et al. 2002). Bezüglich des Prinzips der Durchführung sei auf die ausführliche Darstellung im Methodenteil (Abschnitt 2) verwiesen.

Als Vertreter der nicht-invasiven Tests sei der ^{13}C -Harnstoff-Atemtest genannt, der ebenso wie der Urease-Test auf dem Nachweis bakterieller Urease beruht. Hierzu muß der Proband ^{13}C -Harnstoff oral zu sich nehmen, das von Urease in $^{13}\text{CO}_2$ und Ammoniak abgebaut und über die Atemluft abgegeben wird. Schließlich wird anhand einer Atemprobe $^{13}\text{CO}_2$ in einem Massen- oder Infrarotspektrometer gemessen. Der ^{13}C -Harnstoff-Atemtest besitzt eine Sensitivität und Spezifität von über 90%, ist vom Untersucher unabhängig und hat seine Indikation als Screening-Test und als Kontrolluntersuchung nach stattgehabter Eradikationstherapie (Mégraud et al. 2002).

Daneben spielt auch der serologische Nachweis in der Erstdiagnostik eine Rolle. Der Infektionsstatus wird über den Nachweis von IgG-Antikörpern im Serum, die gegen spezifische Antigene von *H. pylori* gerichtet sind, geführt. Hierzu steht eine Vielzahl an kommerziellen ELISAs zur Verfügung, deren Sensitivität zwischen 79,9 und 99,3% und Spezifität zwischen 86,5 und 98,6% liegt (Feldman et al. 1995).

Ein weiterer nicht-invasiver Test ist der Stuhl-Antigentest, bei dem im Patientenstuhl Antigene von *H. pylori* mit Hilfe spezifischer Antikörper und einem ELISA nachgewiesen werden können (Mégraud et al. 2002). Der Test ist einfach auszuführen, bedarf keinerlei spezieller Transportbedingungen und erreichte in einer europäischen Multizentrumsstudie eine Sensitivität von 94,1% und eine Spezifität von 91,8% (Vaira et al. 1999).

Erfolgte im Abschnitt 1.1 die Darstellung wichtiger allgemeiner Aspekte über das Bakterium *H. pylori* wird nun im Abschnitt 1.2 eine Übersicht über Funktion, Aufbau, Ursprung und Einteilung von Chemokinen gegeben, die, neben ihrer Beteiligung an verschiedensten Erkrankungen, auch in der Pathophysiologie der *H.-pylori*-assoziierten Gastritis eine wesentliche Rolle spielen.

1.2 Chemokine

1.2.1 Funktion und Chemokin-bildende Zellen

Chemokine sind chemotaktische Zytokine, die als Mediatoren des Immunsystems und bei Entzündungen eine entscheidende Rolle spielen und deren Hauptaufgabe darin besteht, Leukozyten anzulocken (Baggiolini 1998, 2001). Ende der 80er Jahre wurde mit Interleukin-8 (IL-8, CXCL8) das erste Chemokin entdeckt, mittlerweile werden beim Menschen an die 50 Chemokine und 20 Chemokin-Rezeptoren beschrieben (Baggiolini 2001). Tabelle 1 gibt eine Auswahl an CXC- und CC-Chemokinen mit ihrem Namen, ihrer systematischen Bezeichnung, ihrem Genort und dem jeweiligen Rezeptor wieder (Baggiolini 2001).

Tab. 1: Auswahl an CXC- und CC-Chemokinen (nach Baggiolini 2001)

CXC-Chemokine			
Name (Abkürzung)	systematische Bezeichnung	Genort	Rezeptor
-growth regulated protein α , β und γ (GRO α , β und γ)	CXCL1, -2 und -3	4q21.1	CXCR2
-epithelial cell-derived neutrophil activating peptide 78 (ENA-78)	CXCL5	4q21.1	CXCR2
-interleukin-8 (IL-8)	CXCL8	4q21.1	CXCR1, CXCR2
CC-Chemokine			
Name (Abkürzung)	systematische Bezeichnung	Genort	Rezeptor
-monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)	CCL2	17q11.2	CCR2
-macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α)	CCL3	17q12	CCR1, CCR 5
-macrophage inflammatory protein 1 β (MIP-1 β)	CCL4	17q12	CCR5
-regulated on activation normal T cell expressed and presumably secreted (RANTES)	CCL5	17q12	CCR1, CCR3, CCR5

Produziert werden Chemokine beispielsweise im Rahmen der Immunabwehr bei Entzündungen von Leukozyten und einer Vielzahl von Gewebezellen. Tabelle 2 nennt eine

Auswahl an Chemokin-bildenden Zellen, die im Rahmen von in vitro durchgeführten Stimulierungsversuchen, mit Hilfe von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 α , und -1 β , TNF α oder dem Endotoxin von *Escherichia coli* (LPS), identifiziert werden konnten.

Tab. 2: Auswahl an Chemokin-produzierenden Zellen (nach Baggiolini 1994)

Chemokin	Quelle
Interleukin-8	Monozyten/Makrophagen, neutroph. Granulozyten, T-Lymphozyten, Endothelzellen (HUVEC: Human umbilical vein endothelial cell), Epithelzellen z.B. der Niere, Leber und Lunge, Fibroblasten z.B. der Lunge und Haut, Astrozyten, Chondrozyten, Tumorzellen z.B. des Melanoms, Nieren- und Lungenkarzinoms, usw.
ENA-78	neutroph. Granulozyten, Monozyten, Epithelzellen des Nierenkortex und der Lunge, Endothelzellen, usw.
MCP-1	Monozyten, Endothelzellen der Aorta und Lunge, Epithelzellen der Lunge und Retina, Keratinozyten, Fibroblasten der Lunge, usw.
MIP-1 α	T- und B-Lymphozyten, Fibroblasten der Mundhöhle, usw.
MIP-1 β	Monozyten, T- und B-Lymphozyten, Fibroblasten der Lunge, usw.
RANTES	T-Lymphozyten, Thrombozyten

1.2.2 Aufbau und strukturelle Einteilung

Chemokine bestehen aus 70-130 Aminosäuren und enthalten vier charakteristische Cysteine. Je nachdem, ob sich zwischen den ersten beiden Cysteinen der Aminosäuresequenz eine weitere Aminosäure befindet oder beide Cysteine unmittelbar aufeinanderfolgen, werden zwei Hauptgruppen, die CXC- und CC-Chemokine (auch als α - und β -Chemokine bezeichnet), unterschieden. Zwischen dem ersten und dritten und dem zweiten und vierten Cystein werden zwei Disulfidbrücken gebildet, die dem Protein eine 3-dimensionale Faltung verleihen und für die biologische Aktivität der Chemokine wesentlich ist (Baggiolini 2001). Als weitere strukturelle Gemeinsamkeiten weisen die Chemokine am N-terminalen Ende des Proteins eine kurze, aus 3-10 Aminosäuren bestehende Sequenz auf, die dem ersten Cystein vorausgeht. Des weiteren befindet sich am C-terminalen Ende eine α -Helix, die aus 20-60 Aminosäuren

gebildet wird und außerdem zwischen dem zweiten und vierten Cystein antiparallel verlaufende β -Stränge, die über Schleifen miteinander verbunden sind (Baggiolini 1998, 2001).

1.2.3 Rezeptorbindung und biologische Aktivität

Damit Chemokine an ihren Zielzellen biologisch aktiv werden können ist sowohl die Bindung an einen der entsprechenden Chemokin-Rezeptoren, die aus 7-Transmembran-Helices aufgebaut und an ein G-Protein gekoppelt sind, als auch dessen Aktivierung notwendig. Für Chemokine konnten hierfür zwei wesentliche Regionen innerhalb des Chemokin-Proteins ausfindig gemacht werden. Zum einen die Schleifenregion zwischen dem zweiten und dritten Cystein mit dem das Chemokin an seinen Rezeptor anbindet (sog. „docking domain“), zum anderen eine Region im amino-terminalen Abschnitt, die den Rezeptor aktiviert (sog. „triggering domain“) (Baggiolini 2001). Für eine Vielzahl der CXC-Chemokine, wie z.B. IL-8 und ENA-78, konnte für die Aktivierung der beiden IL-8 Rezeptoren (CXCR1 und CXCR2), im N-terminalen Abschnitt die sogenannte ELR-Sequenz, die von den Aminosäuren Glutaminsäure, Leucin und Arginin gebildet wird, beschrieben werden (Baggiolini 1994).

In vitro und in vivo durchgeführte Stimulierungsversuchen mit Leukozyten sind für Chemokine eine Vielzahl biologischer Wirkungen festgestellt worden. So bewirken Chemokine bei Leukozyten beispielsweise eine rasche Formänderung, die als Ausdruck für die Chemotaxis gilt, eine Hochregulierung und Aktivierung von Integrinen, die Leukozyten ermöglicht an Endothelzellen anzubinden und dann ins Gewebe auszuwandern (Springer 1994), eine Erhöhung der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration, die Produktion bioaktiver Lipide und die Freisetzung intrazellulär gespeicherter Proteasen aus neutrophilen Granulozyten, Monozyten, CD8^+ T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen, Histamin aus basophilen Granulozyten und zytotoxischen Proteinen aus eosinophilen Granulozyten (Baggiolini 1994, 2001).

1.2.4 Funktionelle Einteilung

Neben der oben erwähnten strukturellen Einteilung in CXC- und CC-Chemokine lassen sich Chemokine auch nach ihrer Funktion in zwei Gruppen einteilen, nämlich in inflammatorische und sogenannte „homing“-Chemokine. Inflammatorische Chemokine, deren Hauptaufgabe darin besteht Leukozyten anzulocken, werden von vielen verschiedenen Gewebezellen und

eingewanderten Leukozyten nach Induktion durch Bakterientoxine und inflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-1 oder Interferonen gebildet. Im Gegensatz dazu werden die sog. „homing“-Chemokine konstitutiv vorwiegend im Lymphgewebe gebildet und dienen z.B. der Migration von Lymphozyten innerhalb des Immunsystems (Baggiolini 2001).

1.2.5 Erkrankungen

Für eine Vielzahl von Erkrankungen konnte im entsprechenden Tiermodell die Beteiligung von Chemokinen an der Pathogenese gezeigt werden. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Vielfalt der entsprechenden Erkrankungen beim Menschen.

Tab. 3: Übersicht über Chemokine und ihre Beteiligung an einzelnen Krankheitsbildern beim Menschen (nach Gerard et al. 2001)

Kategorie	Erkrankungen
Autoimmunerkrankungen	Rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematodes, Multiple Sklerose
Transplantatabstoßungen	Abstoßung von homologen Herz- oder Nierentransplantaten
Infektionen	Akute und chronische bakterielle und virale Infektionen (insbesondere HIV), Sepsis
Entzündungen oder Allergien	Asthma, Arthritis, Colitis, Psoriasis
Neoplasien	Leukozytenrekrutierung bei Neoplasien, Angiogenese
Vaskuläre Erkrankungen	Atherosklerose, Bluthochdruck, Reperfusion bei Ischämie

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Augenmerk dieser Arbeit richtete sich auf die Pathophysiologie und insbesondere auf den Ablauf einer von *Helicobacter pylori* induzierten Gastritis. Da *H. pylori* ein nicht-invasives Bakterium ist, müssen entweder bakterielle Produkte, die durch die Epithelbarriere gelangen, Makrophagen anregen und/oder das Bakterium stimuliert durch seinen unmittelbaren Kontakt das Epithelium. Durch diese beiden denkbaren Aktivierungswege könnten Mediatoren freigesetzt werden, die in der Lage sind Leukozyten zum Auswandern aus Blutgefäßen zu

veranlassen. In zahlreichen In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen konnte bereits eine gesteigerte Expression des CXC-Chemokins IL-8 nachgewiesen werden (Crabtree et al. 1994, Crowe et al. 1995, Fan et al. 1995, Huang et al. 1995, Sharma et al. 1995, Yamaoka et al. 1995). Die Aufmerksamkeit richtete sich nun insbesondere auf das CXC-Chemokin ENA-78, dessen gesteigerte Expression bei chronischen Darmentzündungen beschrieben wurde (Z'Graggen et al. 1997), und eine Auswahl an CC-Chemokinen (RANTES, MIP-1 α , -1 β , MCP-1). Mit Hilfe von In-vivo-Untersuchungen an Magenbiopsien und In-vitro-Untersuchungen an einer Epithelzelllinie eines humanen Adenokarzinoms des Magens (AGS) wurde im Besonderen folgenden Fragen nachgegangen:

1. Findet sich in Biopsien von Patienten vermehrt IL-8 und ENA-78?
2. Lässt sich dies mit Hilfe der quantitativen PCR für ENA-78 exakt bestimmen?
3. Ist auch die Transkriptionsrate ausgewählter CC-Chemokine gesteigert?
4. Besteht eine Korrelation zwischen dem Ausprägungsgrad der Gastritis und der Transkriptionsrate einzelner Chemokine?
5. Lassen sich die in vivo an Magenbiopsien gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der Chemokintranskription auch in vitro an der verwendeten Epithelzelllinie simulieren?
6. Besteht in vitro bezüglich des Transkriptionsbeginns zwischen IL-8 und ENA-78 ein zeitlicher Unterschied?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studienteilnehmer

Die Magenbiopsien stammten von Patienten der Chirurgischen Klinik des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München, die aufgrund dyspeptischer Beschwerden einer endoskopischen Untersuchung des oberen Gastrointestinaltraktes unterzogen wurden. Als Ausschlußkriterien für die Aufnahme in die Studie galten Malignom- und Stoffwechselerkrankungen, eine Immunsuppression und eine aus der Anamnese bekannte Magenoperation. Außerdem wurden Personen, die vier Wochen vor Entnahme der Biopsie Antibiotika, Wismut-Präparate, Protonenpumpeninhibitoren, Steroide oder nichtsteroidale Antirheumatika eingenommen haben, nicht berücksichtigt.

2.2 Gewinnung und Lagerung der Magenbiopsien

Die Biopsien wurden aus der Tunica mucosa des Magenantrums, dem primären Ansiedlungsort des Keims, endoskopisch entnommen. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Gewebeproben für die molekularbiologischen Untersuchungen in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingelagert. Die Gewebeproben für die histologischen Untersuchungen wurden in 3,7%iger (v/v) Formalinlösung konserviert.

2.3 Histologische Untersuchungen der Magenbiopsien

Durch histologische Untersuchungen der Magenbiopsien, die von Herrn Prof. Dr. Stolte vom Pathologischen Institut am Klinikum Bayreuth durchgeführt wurden, wurde der Ausprägungsgrad der Gastritis, gemäß dem histologischen Teil der Klassifikation der Gastritiden, nach dem aktualisierten Sydney-System (Dixon et al. 1996) ermittelt. Hierbei wurde entsprechend dem Ausmaß der Infiltration der Lamina propria mit neutrophilen Granulozyten der Grad der Aktivität der Gastritis auf einer Skala von „nicht aktiv“ (Grad 0) über „geringgradig aktiv“ (Grad 1) und „mittelgradig aktiv“ (Grad 2) bis „hochgradig aktiv“ (Grad 3) bestimmt. Der Grad der Chronizität der Gastritis wurde entsprechend dem Ausmaß der Infiltration der Lamina propria mit Lymphozyten und Plasmazellen gemäß einer Skala von „keine krankhafte Veränderung“ (Grad 0) über „gering“ (Grad 1) und „mäßig stark“

(Grad 2) ausgeprägt bis „stark ausgeprägte Veränderung“ (Grad 3) festgelegt. Zusätzlich wurde mit Hilfe der Versilberungsmethode nach Warthin-Starry, neben dem Nachweis einer *Helicobacter-pylori*-Infektion, auch die Dichte der Kolonisation bestimmt.

2.4 Bestimmung des *Helicobacter-pylori*-Infektionsstatus der Studienteilnehmer

Der Nachweis einer Infektion mit *Helicobacter pylori* erfolgte, neben dem bereits unter 2.3 erwähnten histologischen Nachweis, durch die serologische Bestimmung des gegen *H. pylori* gerichteten Immunglobulin G Antikörper-Titers. Zu diesem Zweck wurde zunächst allen Patienten heparinisiertes Blut entnommen, dieses bei 600 g zentrifugiert und der Serumüberstand bis zur Verarbeitung bei -20°C gelagert. Das Serum wurde dann mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit (Cobas-Core, Hoffmann La Roche, Grenzach-Wyhlen, BRD) auf das Vorhandensein von Immunglobulin G (IgG) Antikörper gegen *H. pylori* untersucht. Entsprechend dem Fehlen oder Vorhandensein von IgG-Antikörpern und unter Berücksichtigung des histologischen Befundes wurde der Patient der Gruppe der *H.-pylori*-negativen bzw. *H.-pylori*-positiven Personen zugeordnet.

2.5 Amplifizierung der Chemokine

2.5.1 Gewinnung der Gesamt-RNA

2.5.1.1 Isolierung

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den Magenzellen der Tunica mucosa wurde der RNeasy™ Total-RNA Kit (Quiagen, Hilden, BRD) verwendet. Die Bezeichnung der Reagenzien wurde aus dem RNeasy™ Handbuch übernommen und durch Anführungszeichen gekennzeichnet.

Von jedem Patienten standen ca. zwei bis drei stecknadelkopfgroße Biopsien zur Verfügung, die im ersten Arbeitsschritt mit 600 μl eines „Lysis-Puffer“, dem frisch β -Mercaptoethanol zugesetzt wurde, in einem 5 ml Reagenzglas lysiert und homogenisiert wurden. Hierbei wurde das Gewebe mit Hilfe des Homogenisators OMNI 2000 (Süd-Laborbedarf, Gauting, BRD) für 30 bis 60 Sekunden bei mittlerer Stufe mechanisch zerkleinert. Laut RNeasy™ Handbuch werden durch den „Lysis-Puffer“ die Zellen unmittelbar lysiert und ein vollständig denaturierendes Milieu geschaffen, durch welches die immer vorhandenen RNAsen blockiert

werden. Anschließend wurde das Lysat in ein Eppendorfggefäß überführt und drei Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge Biofuge A, Heraeus Christ, BRD), um noch nicht lysierte Zellfragmente abzutrennen. Der dadurch erhaltene klare Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in einem neuen Eppendorfggefäß mit 70%igem Ethanol im Verhältnis 1:1 gemischt. Danach erfolgte die Trennung der RNA über deren Bindung an Silikat. Dazu wurden 600 µl des Lysats auf eine Säule mit einer Silikatmembran, die Gesamt-RNA ab einer Größe von 200 Basenpaaren bindet, gegeben, 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert und der erhaltene Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde mit dem restlichen Lysat wiederholt.

Nun folgten mehrere Waschschrirte, um Verunreinigungen zu beseitigen. Zunächst gab man 700 µl des Waschpuffers „RW1“ in die Säule, zentrifugierte 15 Sekunden bei 10000 rpm und verwarf den Durchfluss. Daraufhin erfolgte ein zweimalige Waschschrirte mit jeweils 500 µl Waschpuffer „RPE“. Das erste Mal wurde 15 Sekunden, das zweite Mal zwei Minuten lang bei 10000 rpm zentrifugiert. Da der Waschpuffer „RPE“ als Konzentrat geliefert wird, musste diesem zuvor 96-100%iger Ethanol zugesetzt werden (Mischungsverhältnis Waschpuffer „RPE“ zu Ethanol = 1:4). Der letztgenannte zweiminütige Zentrifugationsschrirte ist wichtig, um die Silikatmembran der Säule zu trocknen, da an der Membran verbleibendes Ethanol mit nachfolgenden Reaktionen interferieren kann. Zuletzt wurde die Gesamt-RNA mit Wasser, das mit dem RNase-Inhibitor DEPC (Diethylpyrocarbonat) vorbehandelt wurde, aus der Silikatmembran eluiert. Zu diesem Zweck gab man 50 µl Wasser direkt auf die Membran, ließ es ca. 10 Minuten einwirken und erhielt, nach einminütigem Zentrifugieren bei 10000 rpm, als Durchfluss das 1. Eluat. Die Säule setzt man anschließend in ein neues Eppendorfggefäß und wiederholte den oben geschilderten Vorgang mit 35 µl Wasser. Auf diese Weise gewann man das 2. Eluat. Das 1. und 2. Eluat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingelagert.

2.5.1.2 Konzentrationsbestimmung und qualitative Beurteilung

Der Erfolg der RNA-Isolierung wurde mit Hilfe eines Photometers (Spectrophotometer DU 7500, Beckmann, BRD) bestimmt, indem in einer 100 µl Lösung aus DEPC-Wasser und 1. bzw. 2. Eluat (Mischungsverhältnis DEPC-Wasser zu 1. bzw. 2. Eluat = 100:1) die Absorption der Lösung bei 260 nm und 280 nm gemessen und daraus ihre Konzentration in µg/ml errechnet wurde. Dabei entsprach 1 Absorptionseinheit (AU) einer Konzentration von 30µg/ml RNA. Lag der aus den Absorptionswerten errechnete Quotient (A_{260}/A_{280}) im

Bereich von 1,7 bis 2,0 konnte davon ausgegangen werden, dass die isolierte RNA einen sehr hohen Reinheitsgrad besaß (RNeasy Handbuch).

Um sicherzustellen, dass während des Isolierungsvorganges die qualitative Beschaffenheit der RNA keinen Schaden genommen hat, wurde RNA auf ein mit Ethidiumbromid gefärbtes 1%iges Agarosegel (Promega, Madison, USA) aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung sind dabei unter UV-Licht zwei scharf begrenzte Banden, die bei der RNA eukaryontischer Zellen der 28S- und 18S-rRNA entsprechen, zu sehen und bestätigen die Intaktheit der gewonnenen RNA. Stellten sich hingegen die beiden ribosomalen RNA-Banden auf dem Gel diffus verschwommen dar, so musste ein Abbau der RNA während ihrer Gewinnung angenommen werden.

2.5.2 Durchführung der RT-PCR

Zum Begriff RT-PCR sei angemerkt, dass hiermit zusammenfassend die Vorgehensweise bezeichnet wird, aus isolierter RNA, mittels reverser Transkription (RT), komplementäre DNA (cDNA) zu synthetisieren, die nachfolgend bei der Polymerasenkettenreaktion (PCR) als Matrize diene.

2.5.2.1 Synthese der komplementären DNA (cDNA)

Die aus den Magenbiopsien isolierte Gesamt-RNA diene als Matrize für die Reverse Transkriptase vom Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV), die zur einsträngigen mRNA einen komplementären DNA-Strang bildete, so dass als Endprodukt doppelsträngige, sogenannte komplementäre DNA (cDNA) vorlag. Zuerst wurden je Probe 2,0 µg Gesamt-RNA mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 15,7 µl verdünnt, zentrifugiert und drei Minuten auf 75°C mit Hilfe der Heizplatte eines DNA-Thermocyclers (Perkin-Elmer 480, Cetus Corp., Norwalk, USA) erhitzt. Im Anschluss daran wurden je Probe folgende Komponenten hinzugegeben: 1,0 µl (1,5 mM) Oligo(dT)₁₅ Primer (Boehringer, Mannheim, BRD), 6,0 µl 5X First Strand Puffer (Gibco BRL, Paisley, Schottland), bestehend aus 375 mM KCL, 15mM MgCl₂ und 250mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 µl (0,6 mM) Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs), zusammengesetzt aus gleichen Anteilen von dATP, dGTP, dCTP und dTTP (New England Biolabs, Schwalbach, BRD), 3,0 µl (0,1 mM) Dithiothreitol (Gibco BRL), 0,8 µl (32 Units) RNase Inhibitor (Boehringer) und 2,0 µl (400 Units) MMLV Reverse Transkriptase (Gibco BRL). Das Reaktionsgemisch, mit einem

Gesamtvolumen von 30 µl, wurde wieder gemischt, kurz zentrifugiert und für 60 Minuten auf eine Temperatur von 37°C erwärmt. Gestoppt wurde die Reaktion, indem das Gemisch 10 Minuten auf 95°C erhitzt wurde. Die auf diese Weise hergestellte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingelagert.

2.5.2.2 Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Durchführung der PCR diente komplementäre DNA (cDNA) als Matrize für spezifische Primer (MWG-Biotech, Ebersberg, BRD) (siehe Tab. 4), die eine ausgewählte cDNA-Region des jeweiligen Chemokins bzw. „housekeeping“-Gens amplifizierten.

Tab. 4: Amplikongröße und Primersequenz

Primer	Amplikongröße in Basenpaaren (bp)	Primersequenzen von 5' nach 3'
GAPDH	983 bp	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT und CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC
IL-8	255 bp	ATTTCTGCAGCTCTGTGTGAA und TGAATTCTCAGCCCTCTTCAA
ENA-78	216 bp	CTGTGTTGAGAGAGCTGCGTTGC und GTTTTCTTGTTTCCACCGTCC
MIP-1 α	582 bp	CTCAGAATCATGCAGGTCTCC und GACAGCCACTCGGTTGTCAC
MIP-1 β	439 bp	CAATACCATGAAGCTCTGCG und GACACCTAATAACAATAACACGG
MCP-1	354 bp	CAAACCTGAAGCTCGCACTCTCGCC und ATTCTTGGGTTGTGGAGTGAGTGTTC
RANTES	236 bp	ACGCCTCGCTGTCATCCTC und TGTACTCCCGAACCCATTTC

Die Primerlokalisationen wurden so gewählt, dass sich PCR-Produkte, die von cDNA oder eventueller Verunreinigung durch genomischer DNA stammten, in ihrer Anzahl an Basenpaaren unterschieden und somit nach elektrophoretischer Auftrennung auf dem Gelbild zu differenzieren waren.

Zunächst wurde je Probe 3,0 µl cDNA mit 5,0 µl 10 X Puffer (Boehringer), bestehend aus 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl und 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,0 µl Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs) (Zusammensetzung siehe 2.5.2.1), je 1,0 µl (400 nM) 3'- und 5'-Primer und 0,2 µl (1 Unit) hitzestabiler *Taq*-DNA-Polymerase (Boehringer) gemischt und mit RNase-freiem Wasser auf 50 µl verdünnt. Um das Verdampfen der einzelnen Reagenzien während der Amplifizierung zu vermeiden, wurden ca. 50 µl RNase-freies Mineralöl (Sigma Chemie, Deisenhofen, BRD) auf das Reaktionsgemisch gegeben.

Zu Beginn der PCR wurden die Proben einmalig auf 95°C erhitzt, um die cDNA zu denaturieren (sog. Prädenaturierung). Anschließend wurde je nach Chemokin bzw. „housekeeping“-Gen eine unterschiedlich hohe Anzahl an Zyklen durchlaufen, um nicht in einen Sättigungsbereich zu kommen und dadurch eventuell bestehende Unterschiede bezüglich der Anzahl an amplifizierten Transkripten zu verdecken. Die Amplifizierung erfolgte in einem Cycler mit Temperaturgradienten (Robocycler, Stratagene, Heidelberg, BRD) oder in einem DNA-Thermocycler (Perkin-Elmer 480 , Cetus Corp., Norwalk, USA), wobei die Zeitdauer und die Temperatur für das Auftrennen der doppelsträngigen cDNA (denaturation), die Anlagerung der Primer an die cDNA (annealing) und die Verlängerung der Primer (extension) entsprechend dem jeweiligen Amplikon ausgewählt wurde (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Amplifizierungsbedingungen der semiquantitativen RT-PCR

Amplikon	GAPDH	IL-8	ENA-78	MIP-1 α	MIP-1 β	MCP-1	RANTES
Prädenaturierung	94°C / 60 Sekunden						
Denaturierung	94°C / 45 Sekunden						
Annealing	60°C / 45 Sek.	55°C / 45 Sek.	60°C / 45 Sek.	58°C / 30 Sek	52°C / 25 Sek.	60°C / 45 Sek.	55°C / 45 Sek.
Extension	72°C / 90 Sek.	72°C / 60 Sek.	72°C / 60 Sek.	72°C / 25 Sek.	72°C / 20 Sek.	72°C / 20 Sek.	72°C / 60 Sek.
Extensionsdauer des letzten Zyklus	72°C / 10 Minuten						
Anzahl der Zyklen	22 / 28	30 / 35	30 / 35	35 / 40	35	35 / 40	25 / 30

Abgeschlossen wurde die Amplifikation dadurch, dass die Extensionsdauer des letzten Zyklus auf 10 Minuten verlängert wurde, damit alle gebildeten DNA-Stränge zu Ende synthetisiert werden konnten.

Um zu gewährleisten, dass von jedem Individuum die gleiche cDNA-Menge eingesetzt wurde, wurde mit einem Enzym aus der Glykolyse, der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH), das bei allen Zellen eine weitgehend konstante Transkriptionsrate aufweist, die ursprünglich eingesetzte cDNA-Menge von je 3,0 μ l solange verändert, bis alle Banden die gleiche Signalintensität aufwiesen. Waren mit dieser Methode die cDNA-Einsatzmengen standardisiert, konnte, wie oben beschrieben, mit der Amplifikation der einzelnen Chemokine begonnen werden.

Das Gelingen der PCR wurde überprüft, indem bei jeder Versuchsreihe eine Negativ- und eine entsprechende Positivkontrolle parallel vervielfältigt wurden (siehe Tab. 6).

Tab. 6: Negativ- und Positivkontrollen

Amplikon	Negativkontrolle	Positivkontrolle
GAPDH	Gesamt-RNA	HUVEC 10 ¹
IL-8	Gesamt-RNA	HUVEC 10 ¹
ENA-78	Gesamt-RNA	KATO III ² mit und ohne LPS Stimulation
MIP-1 α	Gesamt-RNA	PBMC ³ mit LPS Stimulation
MIP-1 β	Gesamt-RNA	PBMC ³ mit LPS Stimulation
MCP-1	Gesamt-RNA	PBMC ³ mit LPS Stimulation
RANTES	Gesamt-RNA	PBMC ³ mit LPS Stimulation

¹HUVEC (**h**uman **u**mbilical **v**ein **e**ndothelial **c**ells) humane Endothelzellen der Umbilikalvene, die mit Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α ; 10 ng/ml) stimuliert wurden.

²KATO III (ATCC HTB 103) eine Adenokarzinom-Zelllinie des Magens (American Type Culture Collection, Rockville, MD), die mit oder nicht mit Lipopolysacchariden (LPS, 10 μ g/ml) von *Escherichia coli* stimuliert wurde.

³PBMC (**p**eripheral **b**lood **m**ononuclear **c**ells) mononukleäre periphere Blutzellen, die mit Lipopolysacchariden (LPS; 10 μ g/ml) von *Escherichia coli* stimuliert wurden.

2.5.3 Gelelektrophorese

Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte mittels elektrophoretischer Auftrennung auf einem Agarosegel (Promega) in einer mit TAE-Pufferlösung (siehe Tab. 7) gefüllten Elektrophoresekammer (Midi-Gel, MWG-Biotech).

Tab. 7: Zusammensetzung der TAE-Pufferlösung (50-fach)

Trishydroxyaminomethan	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8)	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

Je nach Größe des Amplikons, die durch den DNA-Abschnitt festgelegt wird, der vom Primerpaar eingrenzt wird, wurde eine Konzentration des Agarosegels zwischen 1,0 und 1,5% gewählt.

Es wurden je Probe 10 µl der PCR-Produkte und 2 µl Ladepuffer (Sigma Chemie), bestehend aus 0,1 M Na-EDTA (pH 8,0), 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 40% (w/v) Sucrose und 0,5% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), auf das Gel aufgetragen und die Banden nach einer Laufzeit von ca. 1-1,5 h und einer angelegten Spannung von ca. 100 V mit Hilfe eines UV-Transilluminators (Fluo-Link, Bachhofer, BRD) sichtbar gemacht. Zu diesem Zweck wurden vor dem Gießen des Agarosegels der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der in die DNA interkaliert, in einem Mischungsverhältnis von 1:20 000 hinzugefügt. Zur Größenbestimmung der vervielfältigten DNA-Abschnitte wurde in benachbarten Spuren des Gels ein 100 bp-DNA-Größenmarker (MBI-Fermentas, Litauen), sowie die mit der PCR amplifizierten Negativ- und Positivkontrollen, aufgetragen.

2.5.4 Dokumentation und semiquantitative Auswertung der Gelbilder

Zur Dokumentation der Ergebnisse und zur densitometrischen Auswertung der Gelbanden mit dem Bio-ID Programm (LTF-Labortechnik, Wasserburg/Bodensee) wurden die Agarosegelbilder mit einer Videokamera (Video Camera Module CCB, LTF-Labortechnik) digitalisiert.

Die Densitometrie beruht darauf, dass das digitalisierte Bild in einzelne Pixel zerlegt und deren Intensität einer Skala von 256 Graustufen zugeordnet wird. Für die einzelnen Gelbanden wurde aus der Summe der Grauwerte der einzelnen Pixel ein Intensitätswert errechnet, der einen Vergleich der Banden ermöglichte (Bio-ID Handbuch).

2.6 Quantitative RT-Polymerasenkettenreaktion

Um das Ausmaß der Genexpression von ENA-78 in den Zellen der Magenmukosa zu bestimmen, wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt.

Hierzu wurde neben cDNA, als Target-DNA, eine Kompetitor-DNA, die als interner Standard fungierte, benötigt. Diese Kompetitor-DNA, die mit den selben Primern vervielfältigt wird wie die Target-DNA, muss ein kleineres oder größeres PCR-Produkt liefern, damit Target-DNA und Kompetitor-DNA an Hand der Größe auf einem Agarosegel unterschieden werden können. Für die Herstellung der Kompetitor-DNA wurde aus cDNA, die von einem Gastritis-

Patienten mit einem starken ENA-78 Signal stammte, ENA-78 wie unter 2.6.2 beschrieben amplifiziert. Die ENA-78 PCR-Produkte mit einer Amplikongröße von 216 bp wurden gereinigt (Purification kit, Qiagen, Hilden, BRD) und ihre 3'- und 5'-Enden geglättet (PCR polishing kit, Stratagene, Heidelberg, BRD). Das so vorbehandelte PCR-Amplikon wurde nun mit dem pCR-Script™-Klonierungsvektor (2916bp), der eine *SrfI*-Restriktionsstelle besitzt, in eine Ligationslösung, die die Restriktionsendonuklease *SrfI* und T4-DNA-Ligase enthält, gegeben (pCR-Script cloning kit, Stratagene). Der Ort der Ligation innerhalb des pCR-Script™-Klonierungsvektor wird als „multiple cloning site“ bezeichnet.

Nach vier Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Ligationsreaktion durch Erwärmen beendet. Anschließend erfolgte die Transformation in kompetente Zellen von *Escherichia coli* TOP 10F' gemäß dem 'One spot' Kit (Invitrogen, NV Leek, Holland). Der pCR-Script™-Klonierungsvektor besitzt zwei Gene, das *amp^R*-Gen, das den transformierten Zellen durch Bildung einer β -Lactamase die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin verleiht und das *lacZ'*-Gen, das einen Teil der Synthese der β -Galactosidase steuert. Somit läßt sich der Erfolg der Transformation und der Rekombination wie folgt überprüfen. Es werden 0,1 ml der vermeintlich transformierten Zellen auf Agaroseplatten, die das Vollmedium Luria broth (Sigma Chemie, Deisenhofen, BRD), Ampicillin (50 μ g/ml), Isopropylthiogalactosid (IPTG) (1mM) und Xgal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) enthalten, ausplattiert und über 36 Stunden bei 37°C inkubiert. Zellen, bei denen die Transformation von statten ging, besitzen das Resistenzgen gegen Ampicillin und können einzelne Kolonien auf dem Agar bilden.

Zur Erfolgskontrolle, ob das ENA-78 PCR-Produkt auch in den Klonierungsvektor ligiert wurde, wurde, wie oben erwähnt, IPTG und Xgal dem Agarosegel zugesetzt. IPTG sorgte dafür, daß die *lacZ'*-Expression nicht unterdrückt wurde und hatte somit die Funktion als Induktor der *lac*-Gene. Xgal ist ein Substrat der β -Galaktosidase, woraus das Enzym ein dunkelblaues Produkt bildet. In das *lacZ'*-Gen wird nun bei der Ligation das ENA-78 PCR-Produkt eingefügt und dadurch inaktiviert. Das hat zur Folge, dass Zellen bei denen die Rekombination zustande kam, keinen blauen Farbstoff bilden können und auf den Agaroseplatten als weiße Kolonien in Erscheinung treten. Die weißen Kolonien wurden nun von den Platten genommen und jede einzeln über Nacht in 4ml Luria broth (Sigma Chemie), versetzt mit Ampicillin, kultiviert. Das pCRENA-Plasmid (3177 bp), das das ENA-78 PCR-Produkt als Insert enthielt wurde mit dem Qiaprep spin plasmid Kit (Qiagen) isoliert. Um zu kontrollieren, ob auch das richtige PCR-Produkt in das Plasmid eingebaut wurde, wurde eine

Amplifizierung mit den ENA-78 Primern durchgeführt und die Amplikongröße auf einem Agarosegel mit einem DNA-Größenmarker bestimmt.

Wie bereits erwähnt, muß die Kompetitor-DNA von der Target-DNA in ihrer Anzahl an Basenpaaren verschieden sein, um sie auch auf dem Agarosegel unterscheiden zu können. Zu diesem Zweck wurde in das pCRENA-Plasmid (3177 bp) ein Insert mit einer Größe von 143bp eingefügt. Zuerst wurde das pCRENA-Plasmid durch Zugabe der Restriktionsendonuklease *StyI* (New England Biolabs, Schwalbach, BRD) linearisiert und die Enden der Schnittstellen geglättet (PCR polishing kit). Die Restriktionsendonuklease *StyI* wurde ausgewählt, weil das eingefügte ENA-78 PCR-Produkt für dieses Enzym nur eine einzige, der pCR-Script™-Vektor hierfür jedoch keine, Schnittstelle besitzt.

Anschließend wurde in das pCRENA-Plasmid ein geglättetes DNA-Fragment aus 143 bp ligiert. Das Mischungsverhältnis zwischen Vektor und DNA-Fragment betrug 1:100. Die resultierende Insertionsmutante pCRENAGR (3320 bp) wurde analog, wie oben für das pCRENA-Plasmid beschrieben, in *Escherichia coli* TOP10F' mit Hilfe des 'One spot' kit (Invitrogen) transformiert.

Der Erfolg der Transformation konnte jetzt nicht mehr durch Selektion der weißen von den blauen Kolonien bestimmt werden, da dieses Auswahlverfahren bereits durch die vorausgegangene Ligation von ENA-78 in den Klonierungsvektor zerstört wurde. Deshalb wurden 24 Kolonien über Nacht in Vollmedium Luria broth (Sigma Chemie), versetzt mit Ampicillin, kultiviert und am darauffolgenden Tag das pCRENAGR-Plasmid mit dem Quiaprep spin plasmid kit (Qiagen) isoliert. Der Erfolg dieser Ligation wurde kontrolliert, indem mit den ENA-78 Primern eine PCR durchgeführt und die PCR-Produkte auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Das PCR-Produkt der Insertionsmutante hatte die Größe von 359 bp (216 bp + 143 bp). Die Erfolgsquote der Ligation lag bei ca. 10%. Anhand der photometrisch bestimmten Konzentration der pCRENAGR-Insertionsmutante wurde eine Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich von 5 bis 1×10^{-4} amol (10^{-18} mol) hergestellt. Um nun festzustellen wie hoch die Anzahl der ENA-78 Transkripte der einzelnen Studienteilnehmer war, wurde zu jedem Ansatz der Verdünnungsreihe die gleiche Menge an cDNA gegeben. Im Anschluß wurde eine Amplifizierung (Amplifizierungsbedingungen siehe Tabelle 8) durchgeführt und die PCR-Produkte wie unter 2.5.3 beschrieben auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Tab. 8: Amplifizierungsbedingungen der kompetitiven PCR

Prädenaturierung	94°C / 60 Sekunden
Denaturierung	94°C / 45 Sekunden
Annealing	60°C / 45 Sekunden
Extension	72°C / 60 Sekunden
Extensionsdauer des letzten Zyklus	72°C / 10 Minuten
Zyklenzahl	35

Auf den Gelbildern erschienen pro Spur zwei Gelbanden, wovon die obere Bande die Kompetitor-DNA und die untere die regulären PCR-Produkte darstellten. Enthielt ein Ansatz zu Beginn der Amplifikation genauso viele Kompetitor-DNA Kopien wie zugegebene ENA-78 Transkripte, so zeigten sich nach der Amplifizierung zwei gleich starke Gelbanden. Waren die Konzentrationen in den einzelnen Ansätzen verschieden, so differierten auch die Bandensignale innerhalb eines Ansatzes und es wurde als Konzentration der Bereich zwischen dem stärksten Bandensignal der Kompetitor-DNA und dem stärksten Bandensignal der cDNA gewählt.

2.7 In-vitro-Stimulation von AGS-Zellen

2.7.1 Zelllinie

Um den Einfluss von *H. pylori* und einzelner Bakterienbestandteile auf die Transkription von Chemokinen zu untersuchen, wurden AGS-Zellen (ATCC CRL 1739), die von einer Zelllinie eines humanen Adenokarzinoms des Magens stammten (American Type Culture Collection, Rockville, MD) stimuliert. Die AGS-Zellen wurden mit Hilfe des RPMI-Mediums (Seromed, Biochrom KG, Berlin), dem 2 mM L-Glutamin und 5% (v/v) fötales Kälberserum zugegeben wurden, bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre, bestehend aus 95% Luft und 5% CO₂, kultiviert.

2.7.2 Bakterienstamm

Zur Stimulaton der AGS-Zellen wurde *H.-pylori*-Stamm NCTC 11637 verwendet, der unter mikroaerophilen Bedingungen, d.h. in einer Atmosphäre bestehend aus 80% N₂, 11% O₂ und 9% CO₂, bei 37°C auf Wilkins-Chalgren-Dent-Nährboden angezüchtet wurde. Die Tabellen 9-11 geben Auskunft über die Zusammensetzung des Wilkins-Chalgren Agars (WC), des *H.-pylori*-Selektiv-Supplements (Dent) und des WC-Dent-Nährbodens.

Tab. 9: Wilkins-Chalgren-Agar (WC)

Trypton	10g
Gelatinepepton	10g
Hefeextrakt	10g
Glukose	5g
Natriumchlorid	1g
L-Arginin	5g
Natriumpyruvat	1g
Menadion (Vitamin K3)	1g
Haemin	0,5mg
Agar	10g
Aqua dest.	ad 1000ml

Tab. 10: *H.-pylori*-Selekt-Supplement (Dent)

Vancomycin	5mg
Trimethoprim	2,5mg
Cefsulodin	2,5mg
Amphotericin B	2,5mg

Tab. 11: WC-Dent-Nährboden

Wilkins-Chalgren-Agar	21,5g
Kaliumnitrat	0,2g
Pferdeblut	50ml
Dent	12,5mg
Aqua dest.	ad 500ml

Nach einer zweitägigen Bebrütungszeit wurden die Bakterien von den Nährböden abgerntet und in einer Phosphat-gepufferten-Kochsalzlösung (PBS, siehe Tab. 12) (Seromed, Berlin) resuspendiert. Mit Hilfe der McFarland-Skala wurden die Bakterien auf eine Konzentration von 5×10^8 bis 1×10^9 Zellen pro ml verdünnt. Um die genaue Bakterienkonzentration zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe der Suspension von 10^{-2} bis 10^{-7} hergestellt und 100µl der Verdünnungsstufen 10^{-5} bis 10^{-6} auf WC-Dent-Nährböden gegeben. Nach einer Bebrütungszeit von 5 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt und die CFU (colony forming units) berechnet.

Tab. 12: Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS, 10-fach)

0,58 M Na_2HPO_4	82,3 g
0,17 M NaH_2PO_4	23,5 g
0,68 M NaCl	40,0 g
Aqua dest.	ad 1000ml

2.7.3 Gewinnung des Gesamtproteins, des wasserlöslichen Proteins (water-soluble protein, WSP), der Gesamtmembran und der äußeren Membranproteine (outer membrane proteins, OMP) von *Helicobacter pylori*

Die einzelnen Bakterienbestandteile wurden vom unter 2.7.2 genannten Bakterienstamm gewonnen. Die Bakterien wurden wie unter 2.7.1 beschrieben angezchtet und nach dem Abernten in 3ml HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-Ethansulfonsäure) Puffer (10mM, pH 7,4) resuspendiert. Die Bakterien wurde per Ultraschall (400W, 20kHz, 5x/Min.) unter Eiskühlung lysiert (Labsonic, Braun, Melsungen). Das gewonnene Lysat (Gesamtprotein)

wurde 30 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert, um feste Bakterienbestandteile zu entfernen und somit das wasserlösliche Protein (WSP) zu erhalten. Die Gewinnung der äußeren Membranproteine erfolgte nach einer Methode von Doig und Trust (1994). Hierzu wurde ein Teil des gewonnenen wasserlöslichen Proteins in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und 1h bei 100000 rpm und 4°C ultrazentrifugiert (Rotor 60 Ti, Beckmann, München), um das gelöste Zytoplasma von der sedimentierbaren Gesamtmembran zu trennen. Der Überstand wurde abpipettiert und das Membranpellet in 10ml HEPES-Sarcosyl-Puffer (10 mM HEPES (pH 7,4), 1% (w/v) Natrium-Laurylsarkosinat) resuspendiert. Ein Teil der so gewonnenen Gesamtmembran wurde erneut 1h bei 100000 rpm und 4°C ultrazentrifugiert. Der Überstand (gelöste innere Membran) wurde abpipettiert und das OMP-Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Die Proteinkonzentration des Gesamtproteins, des wasserlöslichen Proteins (WSP), der Gesamtmembran und der äußeren Membran (OMP) wurden nach einer Methode von Bradford (1976) basierend auf einer Coomassie-blue-Lösung bestimmt.

2.7.4 Durchführung der In-vitro-Stimulation von AGS-Zellen

Die AGS-Zellen (siehe 2.7.1) wurden mit Hilfe von Trypsin aus den Kulturflaschen gelöst und auf 10^6 Zellen/ml in RPMI-Medium (siehe 2.7.1) resuspendiert und 2 ml auf Petrischalen (Greiner, Solingen) mit einem Durchmesser von 3,5 cm gegeben. Es erfolgte eine 2 stündige Inkubation, um eine Zelladhäsion zu ermöglichen. Anschließend wurden die AGS-Zellen mit lebendem *H. pylori* (siehe 2.7.2) in einer Konzentration von 10^8 CFU/ml, dem Gesamtprotein in einer Konzentration von 10 µg/ml, mit WSP in einer Konzentration von 25 µg/ml, mit der Gesamtmembran in einer Konzentration von 10µg/ml, mit dem äußeren Membranprotein in einer Konzentration von 10 µg/ml und zur Kontrolle mit 2 ml RPMI-Medium bei 37°C und 5% CO₂ 24 Stunden stimuliert. Am Ende der Stimulation wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 350 µl Lysis-Puffer (Quiagen, Hilden) aufgenommen. Das Lysat wurde bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingelagert. Die RNA-Gewinnung erfolgte ebenso wie sie für die Magenbiopsien unter 2.5.1 beschrieben wurde.

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mit Hilfe des U-Tests nach Mann und Whitney. Lag das Testergebnis $P \leq \alpha = 0,05$ (für Stichprobenumfänge $1 \leq N_1 \leq N_2 \leq 10$) bzw. unterschritt der kleinere U-Wert den bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$

genannten kritischen U-Wert (U_{crit}) (für Stichprobenumfänge $N_1 = 1-20$ und $N_2 = 9-20$) wurde das Ergebnis als statistisch signifikant angesehen (Bortz et al. 1998).

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchung der Studienteilnehmer

3.1.1 Einteilung der Studienteilnehmer

Die ausgewählten Studienteilnehmer wurden je nach Infektionsstatus der Gruppe der *H. pylori*-negativen oder -positiven Personen zugeordnet. Tabelle 13 gibt Auskunft über die Anzahl, die Geschlechterverteilung und das Durchschnittsalter innerhalb der Gesamtgruppe der Studienteilnehmer und innerhalb der Gruppe der *H. pylori*-negativen und -positiven Personen.

Tab. 13: Studienteilnehmer

	Anzahl	Geschlechterverteilung	Durchschnittsalter (Altersspanne)
Studienteilnehmer insgesamt	$n_{1+2} = 55$	28 Frauen und 27 Männer	52,9 Jahre (23-76 Jahre)
Anteil der <i>H.-p.</i> -negativen Personen	$n_1 = 25$	11 Frauen und 14 Männer	50,9 Jahre (26-76 Jahre)
Anteil der <i>H.-p.</i> -positiven Personen	$n_2 = 30$	17 Frauen und 13 Männer	54,5 Jahre (23-76 Jahre)

3.1.2 Histologie der humanen Magenbiopsien

Tabelle 14 fasst die histologischen Befunde für beide Untersuchungsgruppen hinsichtlich der Ausprägung der Warthin-Starry-Färbung und dem Grad der Aktivität und Chronizität der Gastritis zusammen.

Tab. 14: Histologische Befunde der Studienteilnehmer

	<i>H.-pylori</i> -negative Personen	<i>H.-pylori</i> -positive Personen
Anzahl der Personen	25	30
Ausprägung der Warthin- Starry-Färbung im Magenantrum:		
-negativ	25	0
-geringgradig positiv	0	2
-mittelgradig positiv	0	8
-hochgradig positiv	0	20
histologischer Grad der Aktivität der Gastritis im Magenantrum:		
-nicht aktiv (Grad 0)	24	1
-geringgradig aktiv (Grad 1)	1	7
-mittelgradig aktiv (Grad 2)	0	19
-hochgradig aktiv (Grad 3)	0	3
histologischer Grad der Chronizität der Gastritis im Magenantrum:		
-keine krankhafte Veränderung (Grad 0)	2	0
-gering (Grad 1)	22	2
-mässig stark (Grad 2)	1	16
-stark ausgeprägt (Grad 3)	0	12

3.1.3 Semiquantitativen RT-PCR von humanen Biopsien des Magenantrums

3.1.3.1 Standardisierung der cDNA-Einsatzmengen

Wie unter 2.5.2.2 bereits ausgeführt wurde, müssen, um von jedem Studienteilnehmer die gleiche Menge an cDNA einzusetzen, die cDNA-Mengen solange verändert werden, bis alle Banden bei der Amplifizierung der Glycerolaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) die gleiche Signalintensität aufwiesen. Abbildung 1 zeigt exemplarisch das Agarosegel der RT-PCR-Produkte nach dem abschließenden Angleichungsschritt der cDNA-Einsatzmengen.

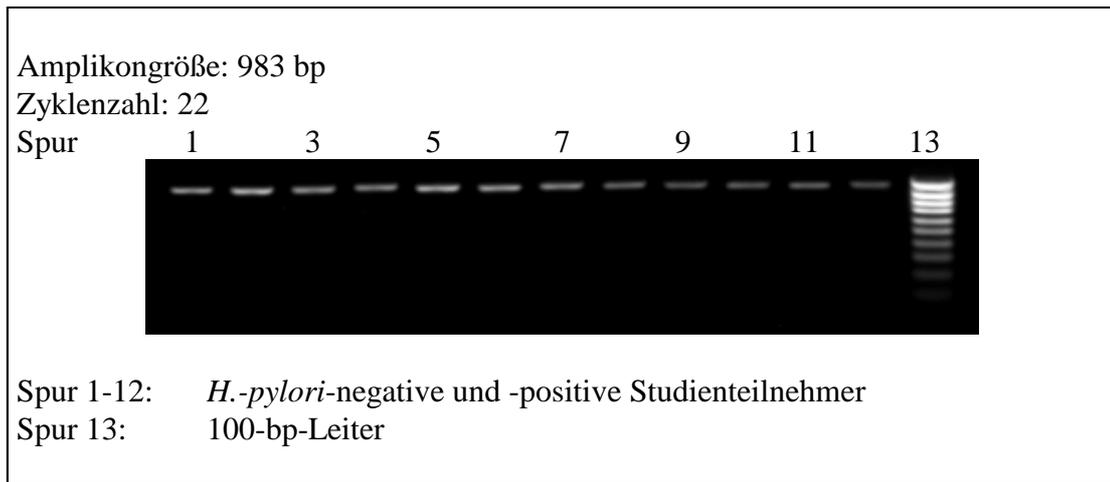


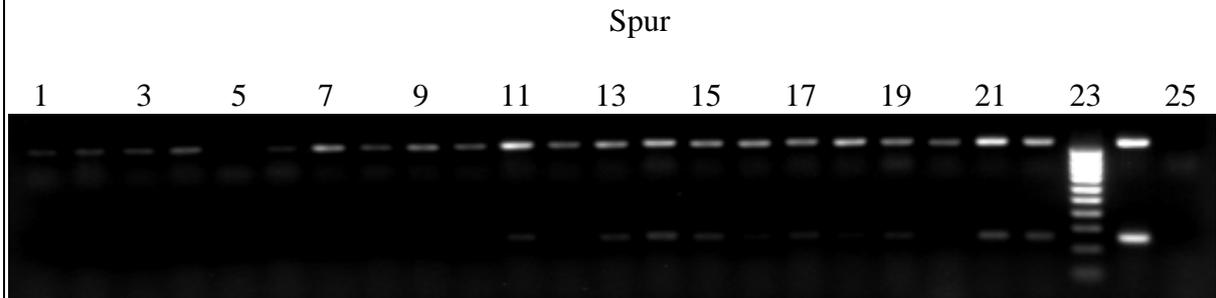
Abb. 1: Agarosegel (1,5%) der RT-PCR-Produkte von GAPDH mRNA aus Magenbiopsien

3.1.3.2 Transkription von CXC-Chemokinen in Biopsien des Magenantrums

Aus der Gruppe der CXC-Chemokine wurden die Transkriptionsraten von IL-8 (Interleukin-8, CXCL8) und ENA-78 (epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78, CXCL5) bestimmt. Abbildung 2 bzw. 4 zeigt das Agarosegelbild nach elektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Produkte von IL-8 bzw. ENA-78 mRNA. Die ersten sieben bzw. sechs Gelbanden stammen von *H. pylori*-negativen Individuen, die nachfolgenden Banden von *H. pylori*-positiven Individuen. In den letzten drei Spuren des jeweiligen Gelbildes befindet sich eine Positiv- und eine Negativkontrolle und als DNA-Größenmarker eine 100-bp-Leiter. Unter dem jeweiligen Agarosegelbild ist die densitometrische Auswertung der einzelnen Gelbanden mit dem jeweiligen densitometrischen Messwert aufgeführt (Abb. 3 und 5). Es zeigte sich, dass der densitometrische Messwert und somit auch die Anzahl an IL-8 bzw. ENA-78 mRNA-Kopien bei Individuen, die mit *H. pylori* infiziert waren, höher war, als bei Personen, deren Magenmukosa nicht mit dem Keim besiedelt war.

Amplikongröße: 255 bp

Zyklenzahl: 35 (obere Bandenreihe), 30 (untere Bandenreihe)



Spur 1-7: *H. pylori*-negative Studienteilnehmer

Spur 8: *H. pylori*-positiver Studienteilnehmer (Grad der Aktivität 0)

Spur 9-10: *H. pylori*-positive Studienteilnehmer (Grad der Aktivität 1)

Spur 11-20: *H. pylori*-positive Studienteilnehmer (Grad der Aktivität 2)

Spur 21-22: *H. pylori*-positive Studienteilnehmer (Grad der Aktivität 3)

Spur 23: 100-bp-Leiter (aufgetragen mit der unteren Bandenreihe)

Spur 24: Positivkontrolle

Spur 25: Negativkontrolle

Abb. 2: Agarosegel (1,5%) der RT-PCR-Produkte von IL8 m-RNA aus Magenbiopsien

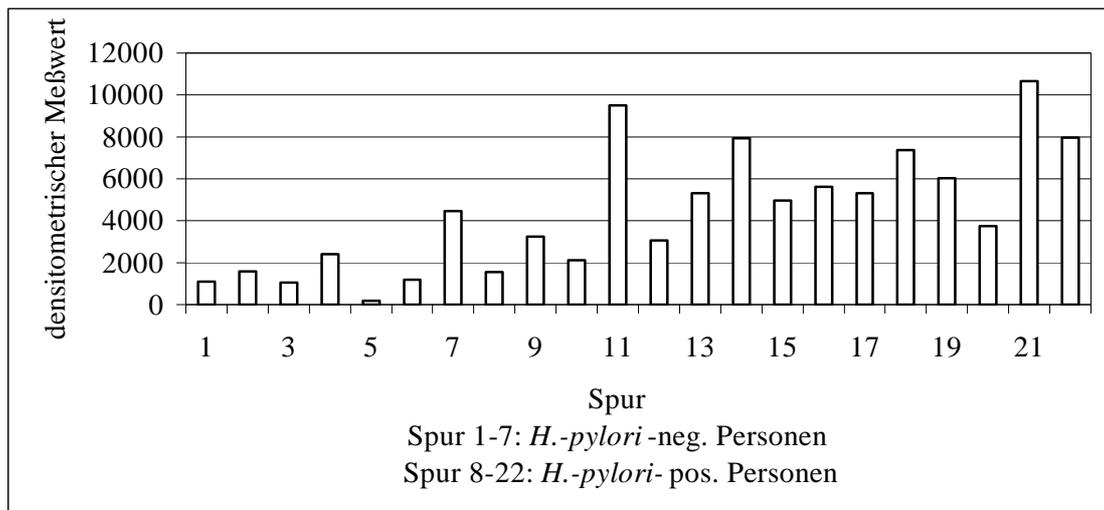


Abb. 3: Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von IL-8 mRNA (obere Bandenreihe von Abb. 2) aus Magenbiopsien

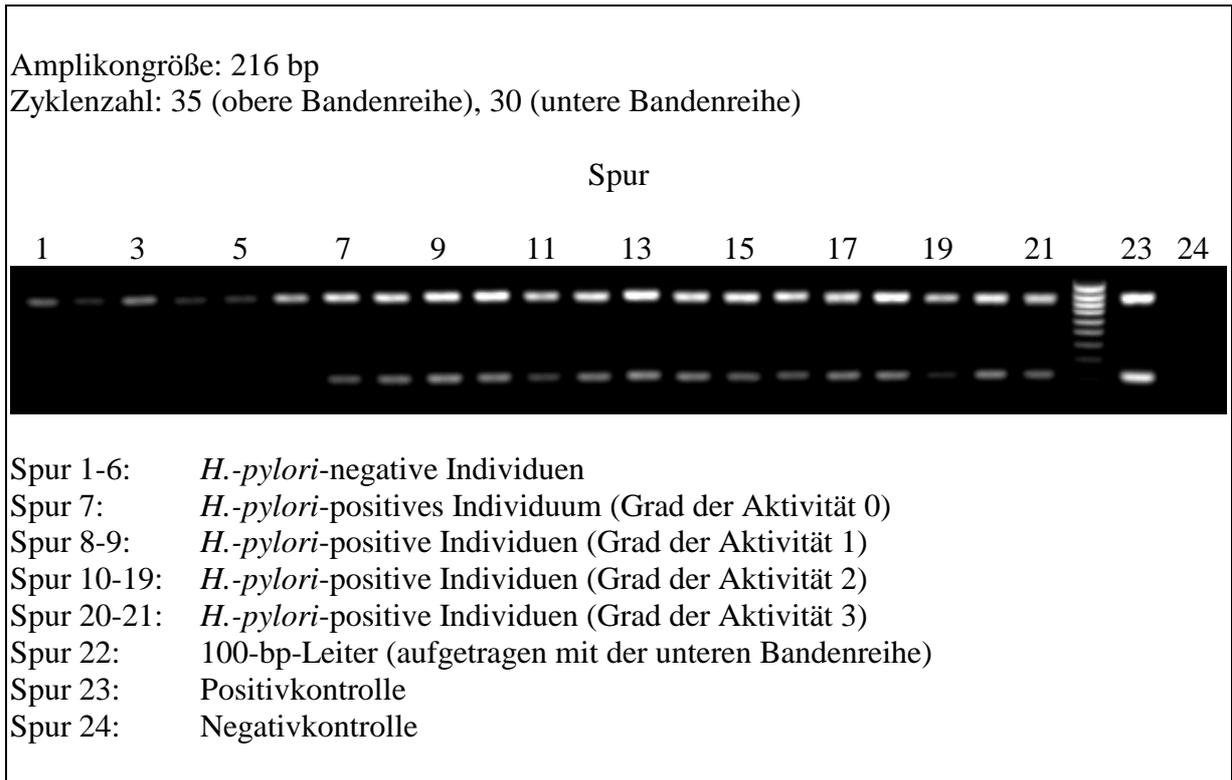


Abb. 4: Agarosegel (1,5%) der RT-PCR-Produkte von ENA-78 mRNA aus Magenbiopsien

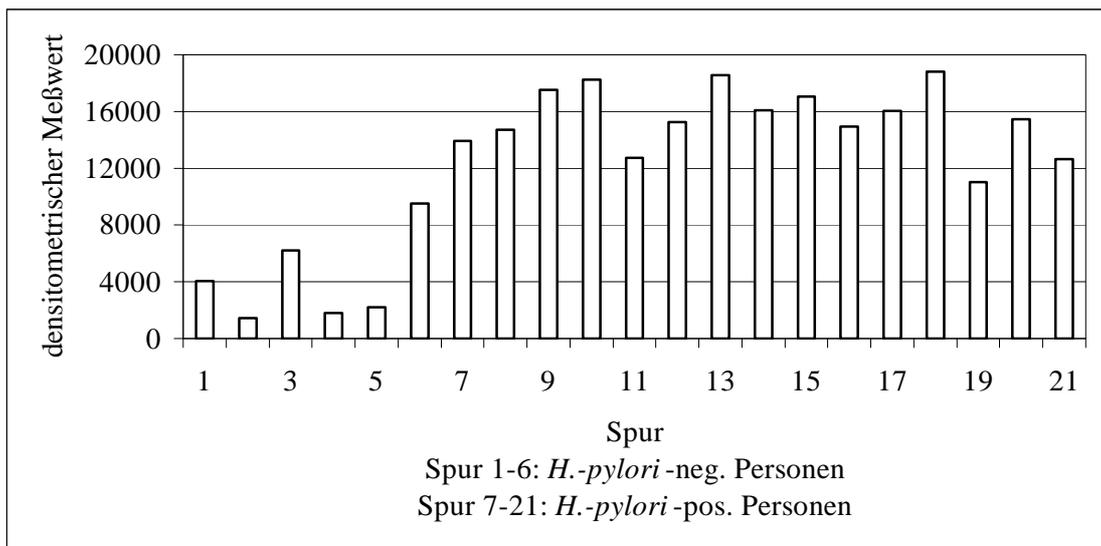


Abb. 5: Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von ENA-78 mRNA (obere Bandenreihe von Abb. 4) aus Magenbiopsien

Um den Unterschied in den densitometrischen Messwerten zu veranschaulichen, wurden alle densitometrischen Einzelwerte für die Gruppe der *H. pylori*-negativen und die Gruppe der *H. pylori*-positiven Personen zusammengefasst und in einem Box-Plot graphisch dargestellt (Abb. 6 und 7). Der Box-Plot zeigt den jeweils größten und kleinsten gemessenen densitometrischen Messwert, das 1. und 3. Quartil und den Median an.

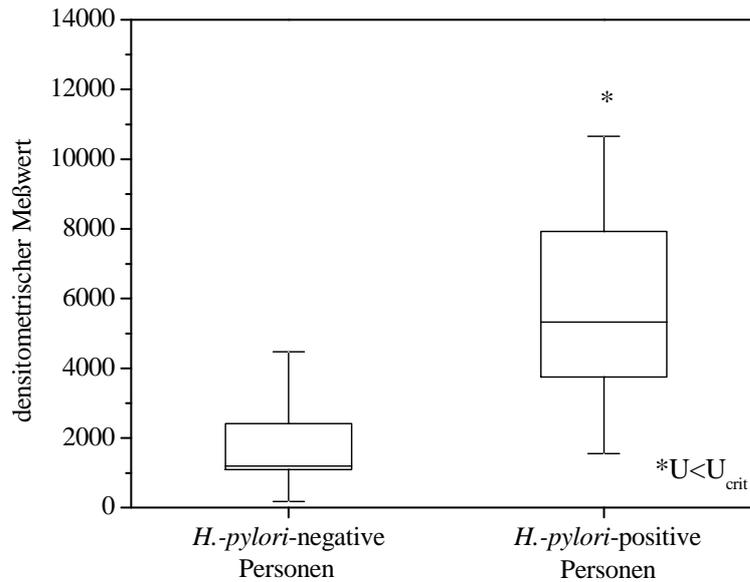


Abb. 6: Box-Plot der densitometrischen Messwerte von IL-8 mRNA (Abb. 3) für *H. pylori*-negative und *H. pylori*-positive Personen (* $U < U_{crit}$: siehe Text)

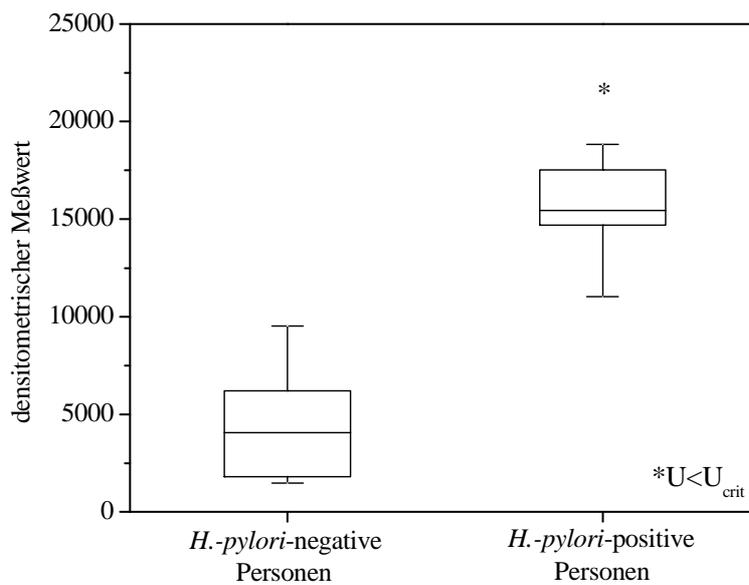


Abb. 7: Box-Plot der densitometrischen Messwerte von ENA-78 mRNA (Abb. 5) für *H. pylori*-negative und *H. pylori*-positive Personen (* $U < U_{crit}$: siehe Text)

Mit Hilfe des U-Tests nach Mann und Whitney konnte sowohl für IL-8 als auch für ENA-78 errechnet werden, daß die densitometrischen Messwerte für *H.-pylori*-positive Personen signifikant höher waren (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$) im Vergleich zu *H.-pylori*-negativen Personen ($U < U_{\text{crit}}$).

3.1.3.3 Transkription von CC-Chemokinen in Biopsien des Magenantrums

Aus der Gruppe der CC-Chemokine wurden MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , CCL3), MIP-1 β (macrophage inflammatory protein-1 β , CCL4), RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed and presumably secreted, CCL5) und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1, CCL2) ausgewählt. Nachfolgend sind die Agarosegelbilder der jeweiligen Chemokine nach elektrophoretischer Auftrennung ihrer Amplifikationsprodukte (Abb. 8, 10, 12 und 14) und unmittelbar darunter die densitometrische Auswertung (Abb. 9, 11, 13 und 15) der einzelnen Gelbanden aufgeführt.

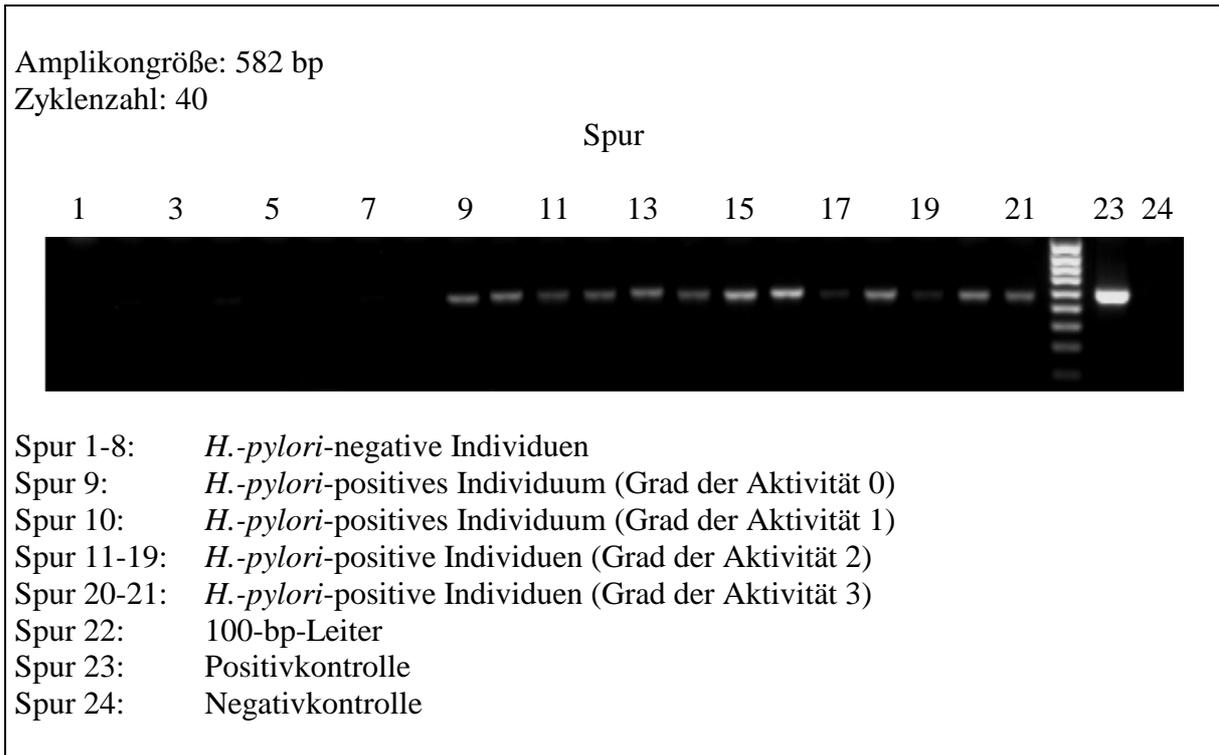


Abb. 8: Agarosegel (1,2%) der RT-PCR-Produkte von MIP-1 α mRNA aus Magenbiopsien

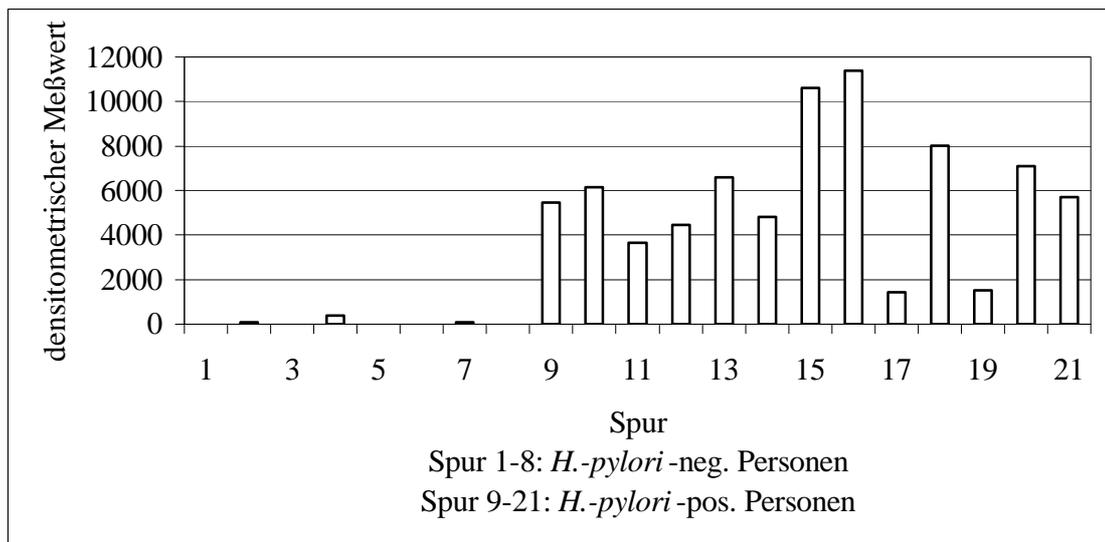
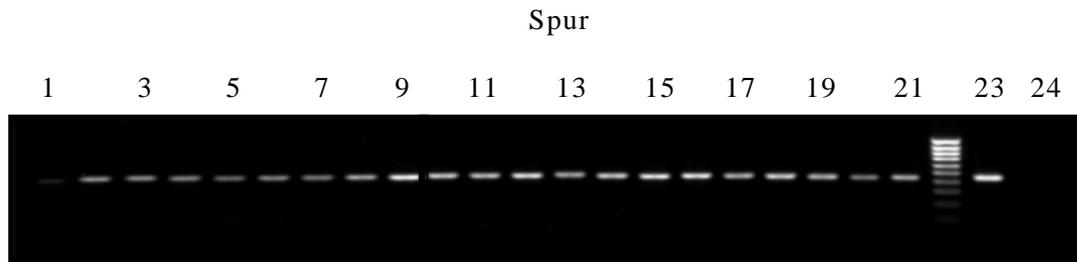


Abb. 9: Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von MIP-1 α (Abb. 8) aus Magenbiopsien

Amplikongröße: 439 bp
Zykluszahl: 35



Spur 1-8: *H. pylori*-negative Individuen
 Spur 9: *H. pylori*-positives Individuum (Grad der Aktivität 0)
 Spur 10: *H. pylori*-positives Individuum (Grad der Aktivität 1)
 Spur 11-20: *H. pylori*-positive Individuen (Grad der Aktivität 2)
 Spur 21: *H. pylori*-positives Individuum (Grad Aktivität 3)
 Spur 22: 100-bp-Leiter
 Spur 23: Positivkontrolle
 Spur 24: Negativkontrolle

Abb. 10: Agarosegel (1,2%) der RT-PCR-Produkte von MIP-1 β mRNA aus Magenbiopsien

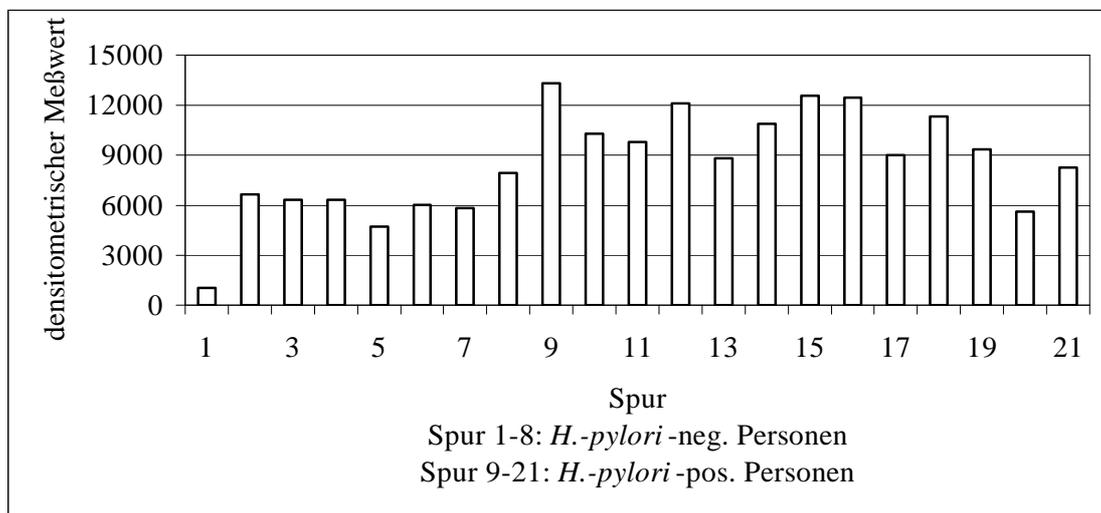


Abb. 11: Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von MIP-1 β mRNA (Abb. 10) aus Magenbiopsien

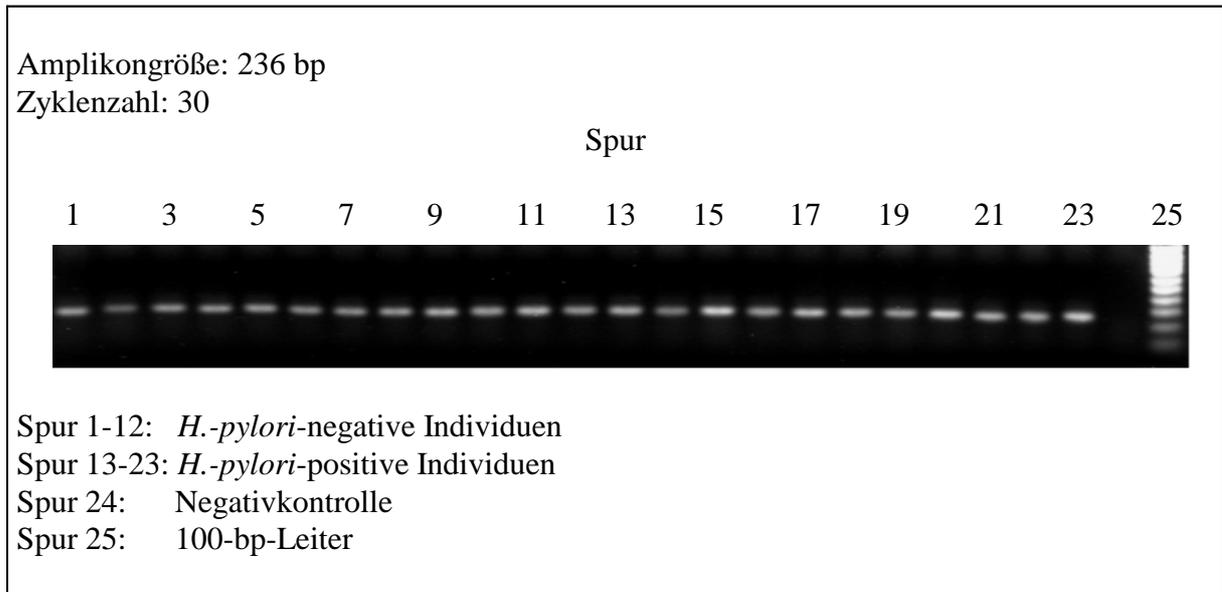


Abb. 12: Agarosegel (1,0%) der RT-PCR-Produkte von RANTES mRNA aus Magenbiopsien

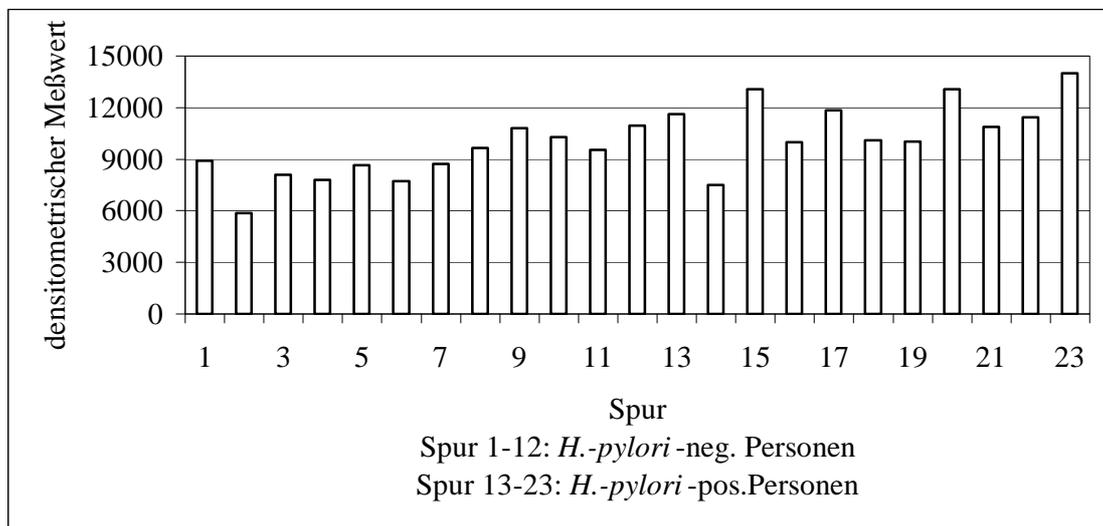


Abb. 13: Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von RANTES mRNA (Abb. 12) aus Magenbiopsien

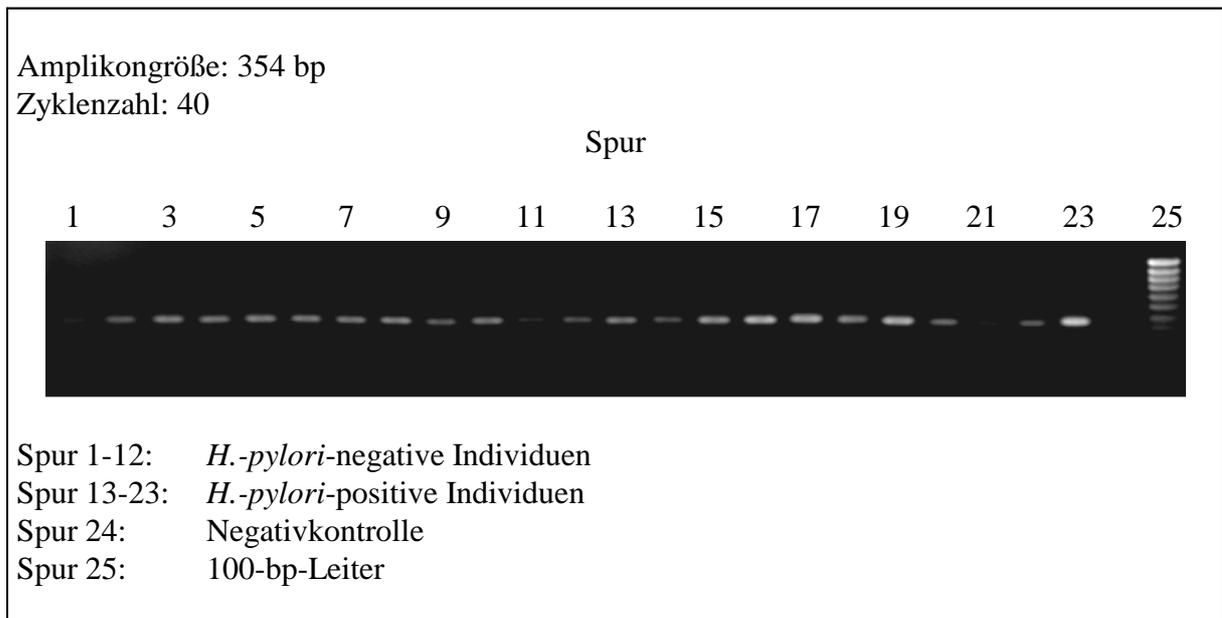


Abb. 14: Agarosegelbild (1,0%) der RT-PCR-Produkte von MCP-1 mRNA aus Magenbiopsien

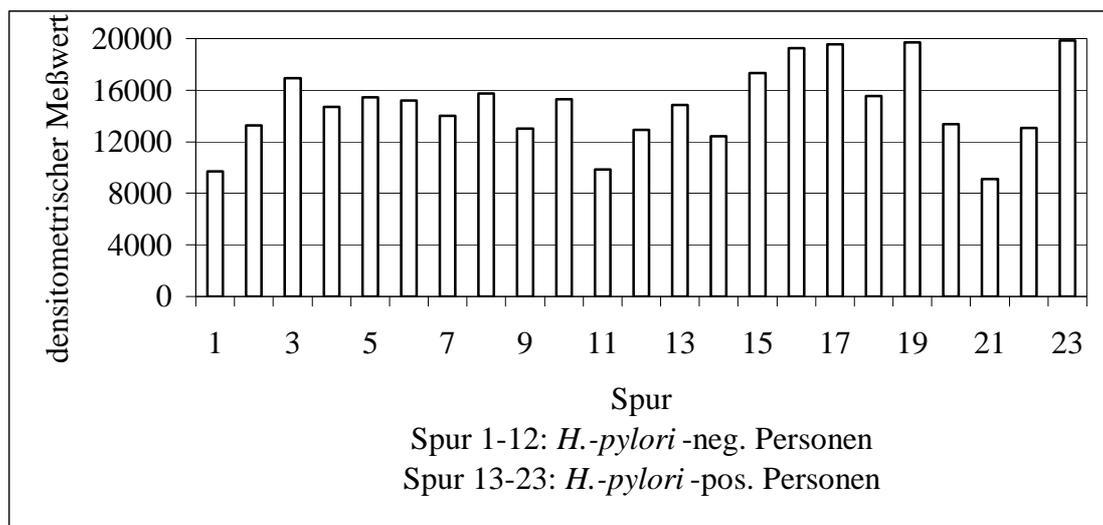


Abb.: 15: Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von MCP-1 mRNA (Abb.14) aus Magenbiopsien

Es ist zu erkennen, dass die densitometrischen Messwerte von MIP-1 α (Abb. 9), MIP-1 β (Abb. 11) und RANTES (Abb. 13) bei *H. pylori*-positiven Personen ansteigen, wohingegen bei MCP-1 (Abb. 15) eine konstitutive Transkription zu beobachten ist.

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurden die densitometrischen Meßwerte von *H. pylori*-negativen und *H. pylori*-positiven Personen für MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und MCP-1 zusammengefasst und in einem Box-Plot dargestellt (Abb. 16-19).

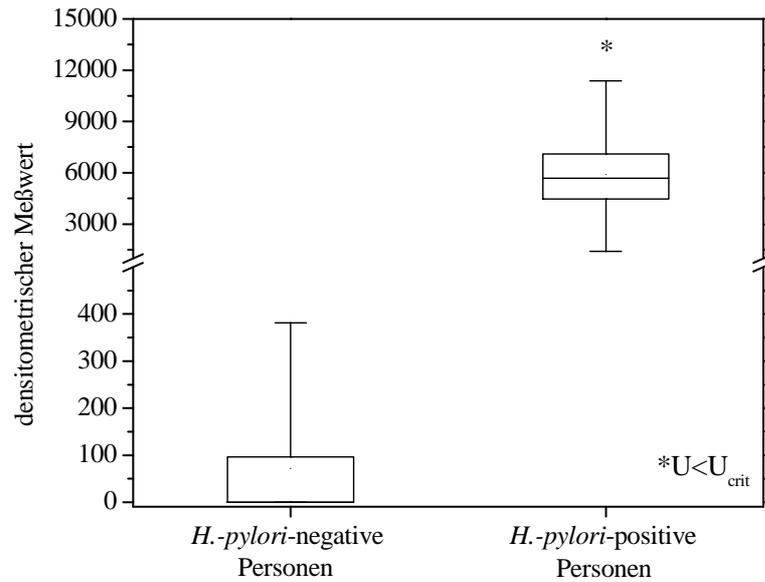


Abb. 16: Box-Plot der densitometrischen Messwerte von MIP-1 α mRNA (Abb. 9) für *H.-pylori*-negative und *H.-pylori*-positive Personen (* $U < U_{crit}$: siehe Text)

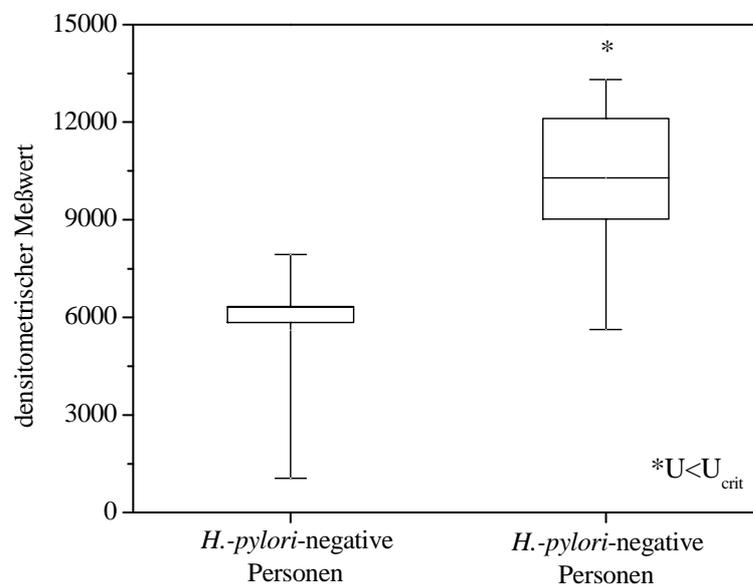


Abb. 17: Box-Plot der densitometrischen Messwerte von MIP-1 β mRNA (Abb. 11) für *H.-pylori*-negative und *H.-pylori*-positive Personen (* $U < U_{crit}$: siehe Text)

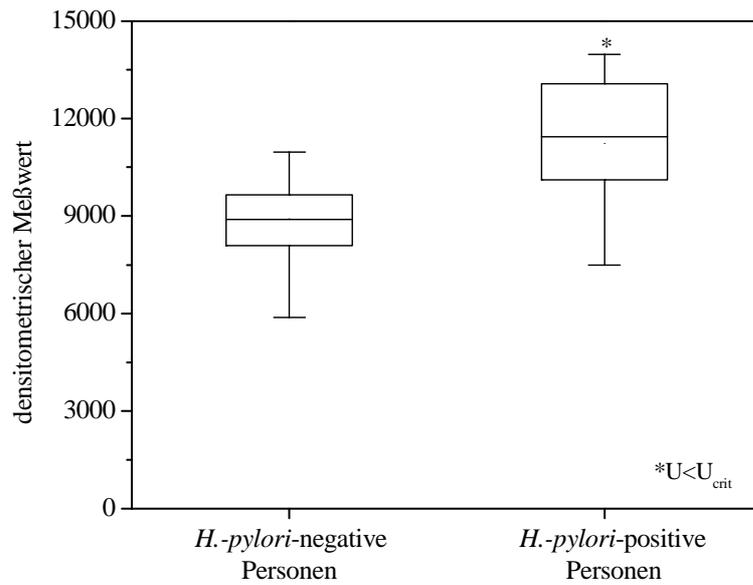


Abb. 18: Box-Plot der densitometrischen Messwerte von RANTES mRNA (Abb. 13) für *H.-pylori*-negative und *H.-pylori*-positive Personen (* $U < U_{crit}$: siehe Text)

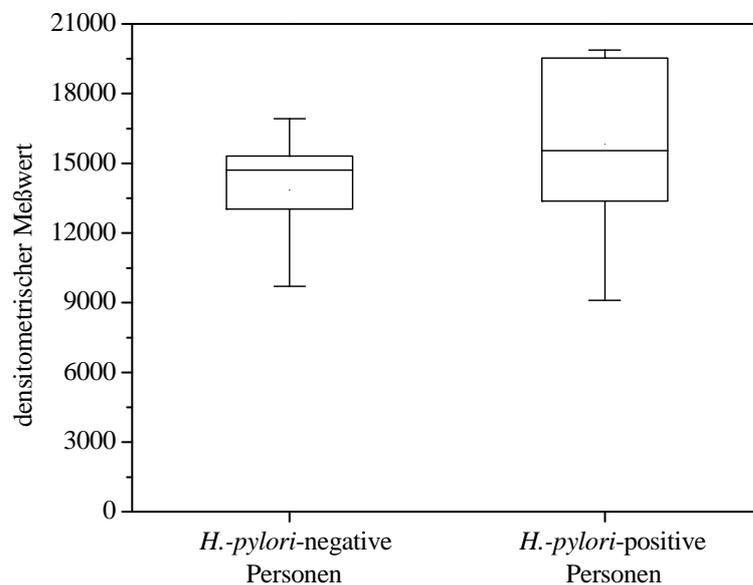


Abb. 19: Box-Plot der densitometrischen Messwerte von MCP-1 mRNA (Abb. 15) für *H.-pylori*-negative und *H.-pylori*-positive Personen

Der U-Test nach Mann und Whitney ergab für MIP-1 α , -1 β und RANTES einen signifikant höheren densitometrischen Messwert für *H.-pylori*-positive Studienteilnehmer im Vergleich

zu *H.-pylori*-negativen Studienteilnehmern ($U < U_{crit}$). Für die densitometrischen Messwerte von MCP-1 konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

3.1.4 Quantitative RT-PCR von humanen Biopsien des Magenantrums

Die bisherige Auswertung der RT-PCR erfolgte nach Angleichung der eingesetzten cDNA-Menge bei einer definierten Zyklenzahl. Dies kann nur eine Annäherung an die exakte Anzahl an mRNA-Kopien bedeuten, da Variationen in der Reaktion nicht berücksichtigt werden können. Der Goldstandard für die Quantifizierung stellt aber die sogenannte quantitative RT-PCR dar.

3.1.4.1 Standardisierung der cDNA-Einsatzmengen

Die Bestimmung der Anzahl an ENA-78 Transkripten wurde bei insgesamt 13 Personen durchgeführt. Neun Personen waren *H.-pylori*-positiv und vier Personen *H.-pylori*-negativ. Innerhalb der Gruppe der *H.-pylori*-positiven Individuen hatten jeweils drei Personen eine geringgradig, eine mittelgradig und eine hochgradig aktive Gastritis. Um von jeder Person identische cDNA-Mengen einzusetzen, wurden die cDNA-Einsatzmengen solange angeglichen bis alle Personen gleichstarke Gelbanden nach Amplifizierung von GAPDH aufwiesen. Abbildung 20 zeigt das Agarosegelbild nach Amplifizierung der GAPDH nach dem 3. Angleichungsschritt der Einsatzmengen von cDNA für zehn Personen. Die fehlenden drei Personen wurden im 3. Angleichungsschritt nicht mehr amplifiziert, weil die eingesetzte cDNA bereits nach dem 2. Angleichungsschritt identische Bandenstärken aufwiesen.

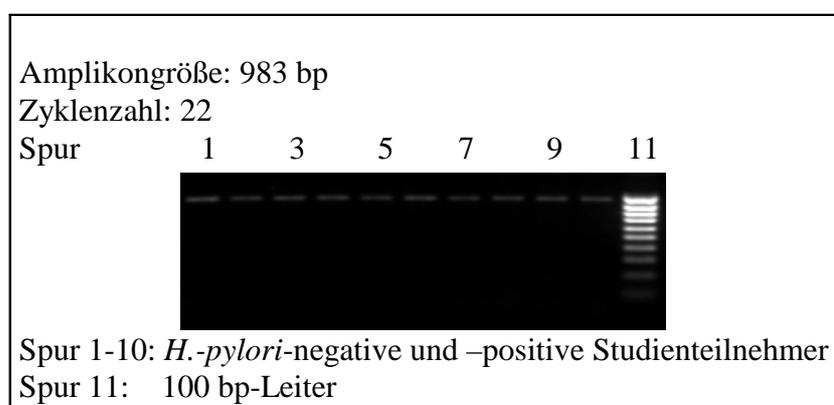
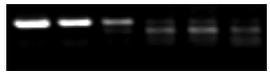
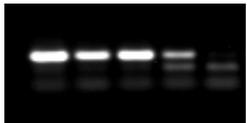
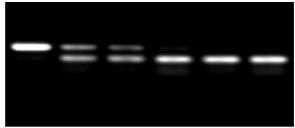
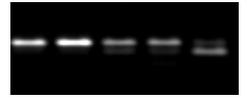


Abb. 20: Agarosegelbild (1,0%) der RT-PCR-Produkte von GAPDH mRNA aus Magenbiopsien

3.1.4.2 Transkription von ENA-78 in Biopsien des Magenantrums

Die Untersuchungsergebnisse sind, je nach *H.-pylori*-Infektionsstatus der Studienteilnehmer, in den Tabellen 15 bis 18 aufgeführt. Für die Gruppe der *H.-pylori*-positiven Personen wurden die Studienteilnehmer, je nach Aktivitätsgrad der Gastritis, in eine eigene Tabelle zusammengefasst (Tab. 16-18). Die einzelnen Tabellen zeigen die Agarosegelbilder nach elektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Produkte und geben Auskunft über die jeweiligen Konzentrationsbereiche der zugegebenen Kompetitor-DNA, die vom Agarosegel abgelesene Anzahl an ENA-78 Transkripten in amol (entspricht 10^{-18} mol) und die aus der Teilchenzahl errechnete Anzahl an mRNA-Kopien. Gekennzeichnet wurden die einzelnen Studienteilnehmer in den Tabellen und Abbildungen mit den Buchstaben A bis M.

Studien- teilnehmer	Agarosegelbild	Konzentration der Kompetitor-DNA (obere Banden- reihe) in amol	Konzentration der ENA-78 mRNA Transkripte in amol	Anzahl der ENA-78 mRNA Transkripte
A	 Spur 1 Spur 6	5×10^{-1} (Spur 1) bis 1×10^{-3} (Spur 6)	3×10^{-2}	ca. $1,8 \times 10^4$
B	1. Amplifizierung  Spur 1 Spur 6	5×10^{-1} (Spur 1) bis 1×10^{-3} (Spur 6)	3×10^{-2}	ca. $1,8 \times 10^4$
	2. Amplifizierung  Spur 1 Spur 5	5×10^{-1} (Spur 1) bis 5×10^{-3} (Spur 5)	$7,5 \times 10^{-3}$	ca. $4,5 \times 10^3$
C	1. Amplifizierung  Spur 1 Spur 6	5×10^{-1} (Spur 1) bis 1×10^{-3} (Spur 6)	1×10^{-1}	ca. $6,0 \times 10^4$
	2. Amplifizierung  Spur 1 Spur 4	1×10^{-1} (Spur 1) bis 5×10^{-3} (Spur 4)	5×10^{-2}	ca. $3,0 \times 10^4$
D	1. Amplifizierung  Spur 1 Spur 6	5×10^{-1} (Spur 1) bis 1×10^{-3} (Spur 6)	$7,5 \times 10^{-2}$	ca. $4,5 \times 10^4$
	2. Amplifizierung  Spur 1 Spur 5	5×10^{-1} (Spur 1) bis 5×10^{-3} (Spur 5)	$7,5 \times 10^{-3}$	ca. $4,5 \times 10^3$

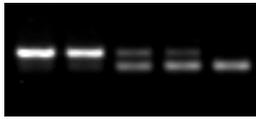
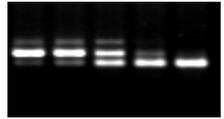
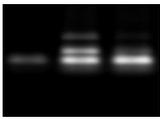
Tab. 15: Ergebnisse der quantitativen RT-PCR von *H. pylori*-negativen Studienteilnehmern

Studien- teilnehmer	Agarosegelbild	Konzentration der Kompetitor-DNA (obere Banden- reihe) in amol	Konzentration der ENA-78 mRNA Transkripte in amol	Anzahl der ENA-78 mRNA Transkripte
E	1. Amplifizierung  Spur 1 Spur 6	10 (Spur 1) bis 5×10^{-2} (Spur 6)	3,0	ca. $1,8 \times 10^6$
	2. Amplifizierung  Spur 1 Spur 5	10 (Spur 1) bis 1×10^{-1} (Spur 5)	3,0	ca. $1,8 \times 10^6$
F	 Spur 1 Spur 6	10 (Spur 1) bis 5×10^{-2} (Spur 6)	3,0	ca. $1,8 \times 10^6$
G	 Spur 1 Spur 6	10 (Spur 1) bis 5×10^{-2} (Spur 6)	1,0	ca. $6,0 \times 10^5$

Tab. 16: Ergebnisse der quantitativen RT-PCR von *H.-pylori*-positiven Studienteilnehmern mit einer geringgradig aktiven Gastritis

Studien- teilnehmer	Agarosegelbild	Konzentration der Kompetitor-DNA (obere Banden- reihe) in amol	Konzentration der ENA-78 mRNA Transkripte in amol	Anzahl der ENA-78 mRNA Transkripte
H	1. Amplifizierung  Spur 1 Spur 6	10 (Spur 1) bis 5×10^{-2} (Spur 6)	3×10^{-1}	ca. $1,8 \times 10^5$
	2. Amplifizierung  Spur 1 Spur 6	5 (Spur 1) bis 1×10^{-2} (Spur 6)	3×10^{-1}	ca. $1,8 \times 10^5$
I	1. Amplifizierung  Spur 1 Spur 6	50 (Spur 1) bis 1×10^{-1} (Spur 6)	1,0	ca. $6,0 \times 10^5$
	2. Amplifizierung  Spur 1 Spur 6	50 (Spur 1) bis 1×10^{-1} (Spur 6)	3,0	ca. $1,8 \times 10^6$
J	1. Amplifizierung  Spur 1 Spur 6	50 (Spur 1) bis 1×10^{-1} (Spur 6)	1,0	ca. $6,0 \times 10^5$
	2. Amplifizierung  Spur 1 Spur 6	50 (Spur 1) bis 5×10^{-1} (Spur 5)	3,0	ca. $1,8 \times 10^6$

Tab. 17: Ergebnisse der quantitativen RT-PCR von *H.-pylori*-positiven Studienteilnehmern mit einer mittelgradig aktiven Gastritis

Studien- teilnehmer	Agarosegelbild	Konzentration der Kompetitor-DNA (obere Banden- reihe) in amol	Konzentration der ENA-78 mRNA Transkripte in amol	Anzahl der ENA-78 mRNA Transkripte
K	1. Amplifizierung  Spur 1 Spur 5	10 (Spur 1) bis 1×10^{-1} (Spur 5)	1,0	ca. $6,0 \times 10^5$
	2. Amplifizierung  Spur 1 Spur 6	10 (Spur 1) bis 5×10^{-2} (Spur 6)	3,0	ca. $1,8 \times 10^6$
L	1. Amplifizierung  Spur 1 Spur 5	10 (Spur 1) bis 1×10^{-1} (Spur 5)	1,0	ca. $6,0 \times 10^5$
	2. Amplifizierung  Spur 1 Spur 3	5 (Spur 1) bis 5×10^{-1} (Spur 3)	1,0	ca. $6,0 \times 10^5$
M	 Spur 1 Spur 5	10 (Spur 1) bis 1×10^{-1} (Spur 5)	3,0	ca. $1,8 \times 10^6$

Tab. 18: Ergebnisse der quantitativen RT-PCR von *H.-pylori*-positiven Studienteilnehmern mit einer hochgradig aktiven Gastritis

Die Anzahl der Transkripte ist für jede der 13 Personen in Abbildung 21 nochmals graphisch dargestellt. Wurde bei der zweimaligen Durchführung der kompetitiven PCR bei einer Person (in Tabelle 15-18 mit 1. und 2. Amplifizierung gekennzeichnet) eine unterschiedliche Anzahl an ENA-78 Transkripten bestimmt, so wurde der Mittelwert gebildet. Dieser Unterschied in der Bestimmung der Anzahl an ENA-78 mRNA-Kopien lässt sich auf die Empfindlichkeit der PCR gegenüber zahlreichen Einflußgrößen, wie z.B. der Aktivität der verwendeten *Taq*-Polymerase oder dem Alter der eingesetzten cDNA, zurückführen.

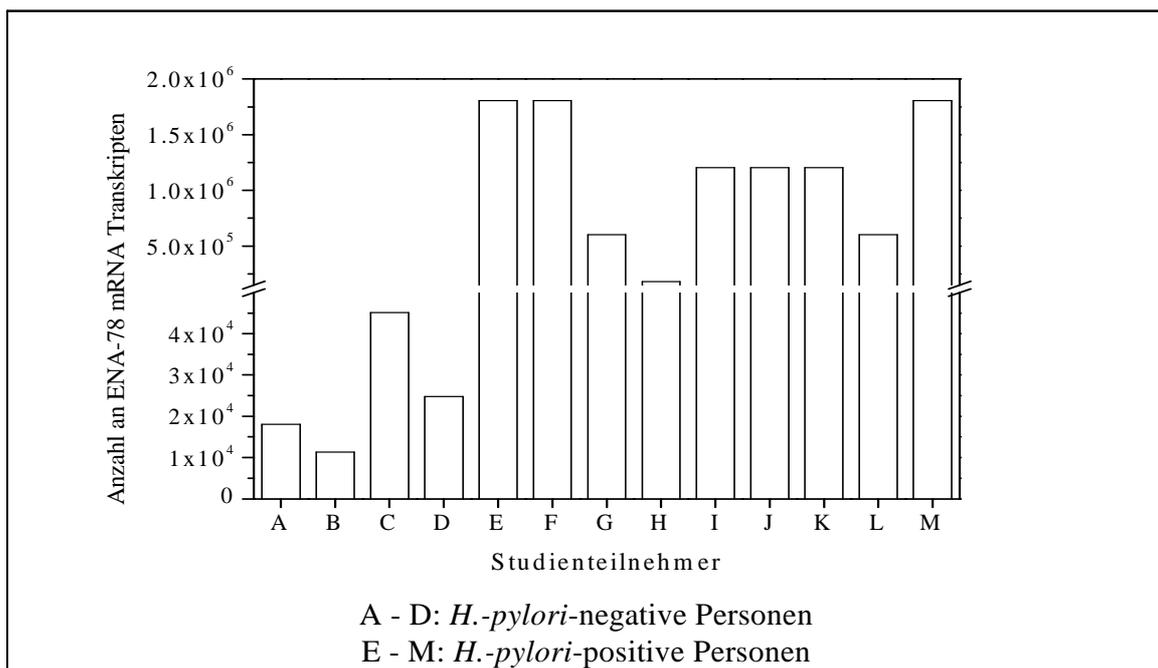


Abb. 21: Anzahl an ENA-78 mRNA Transkripten von *H.-pylori*-negativen und -positiven Personen

Berechnet man nun den Mittelwert an ENA-78 mRNA-Kopien, so lag dieser für die Gruppe der *H.-pylori*-negativen Personen bei ca. $2,5 \times 10^4$, für *H.-pylori*-positiven Personen mit einer geringgradig aktiven Gastritis bei ca. $1,4 \times 10^6$, für *H.-pylori*-positiven Personen mit einer mittelgradig aktiven Gastritis bei ca. $8,6 \times 10^5$ und für *H.-pylori*-positiven Personen mit einer hochgradig aktiven Gastritis bei ca. $1,2 \times 10^6$. Der Mittelwert für alle *H.-pylori*-positiven Personen lag bei ca. $1,15 \times 10^6$ ENA-78 Transkripten, d.h. dass die durchschnittliche Anzahl an ENA-78 mRNA-Kopien bei *H.-pylori*-positiven Personen um den Faktor 46 höher lag als bei *H.-pylori*-negativen Personen.

Für Abbildung 22 wurde die Anzahl der Transkripte für *H.-pylori*-negative und für *H.-pylori*-positive Individuen zusammengefasst und in einem Box-Plot dargestellt.

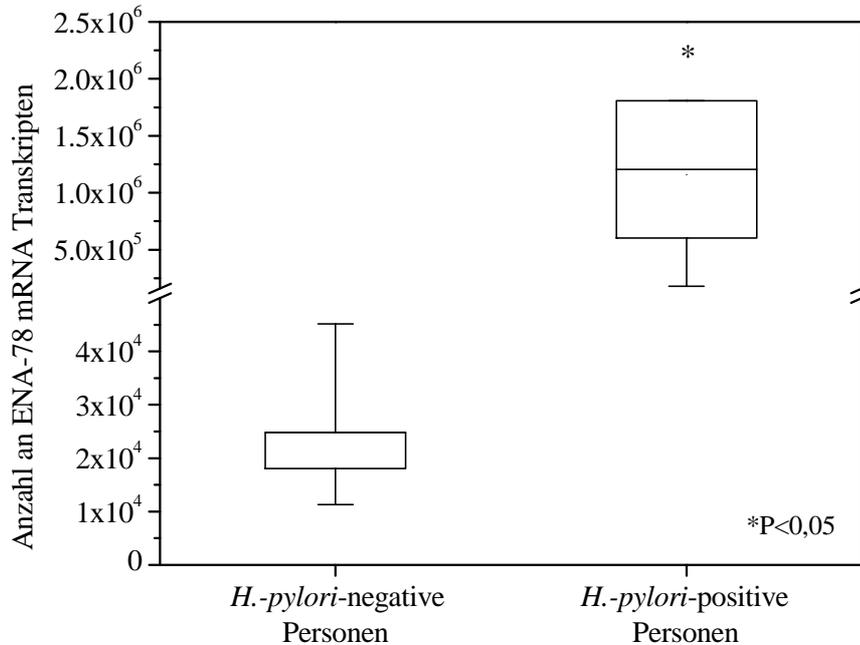


Abb. 22: Box-Plot der Anzahl an ENA-78 mRNA Transkripten für *H.-pylori*-negative und *H.-pylori*-positive Personen (*P < 0,05: siehe Text)

Der U-Test nach Mann und Whitney ergab, dass die Anzahl an ENA-78 mRNA-Kopien bei *H.-pylori*-positiven Personen im Vergleich zu *H.-pylori*-negativen Personen signifikant erhöht war (P < 0,05). Zwischen den einzelnen Aktivitätsgraden *H.-pylori*-positiver Personen bestand kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an ENA-78 Transkripten.

3.2 Semiquantitative RT-PCR von in-vitro-stimulierten AGS-Zellen

Um nähere Aufschlüsse über den Stimulationsmechanismus zu erhalten, wurde der direkte Einfluss von *H. pylori* und bestimmter Bakterienbestandteile auf die Transkription von CXC- und CC-Chemokinen untersucht. Zu diesem Zweck wurden AGS-Zellen entweder mit der Gesamtproteinfraktion, dem wasserlöslichen Protein (WSP), der Gesamtmembran, der äußeren Membran (OMP) des Bakteriums oder mit dem lebenden Bakterium stimuliert. Die

Gewinnung der mRNA und die Durchführung der PCR wurden analog, wie für die Magenbiopsien beschrieben, ausgeführt.

3.2.1 Standardisierung der cDNA-Einsatzmengen

Die Standardisierung der cDNA-Einsatzmengen erfolgte analog wie für die Magenbiopsien beschrieben. Abbildung 23 zeigt das Agarosegelbild der GAPDH mRNA nach elektrophoretischer Auftrennung.

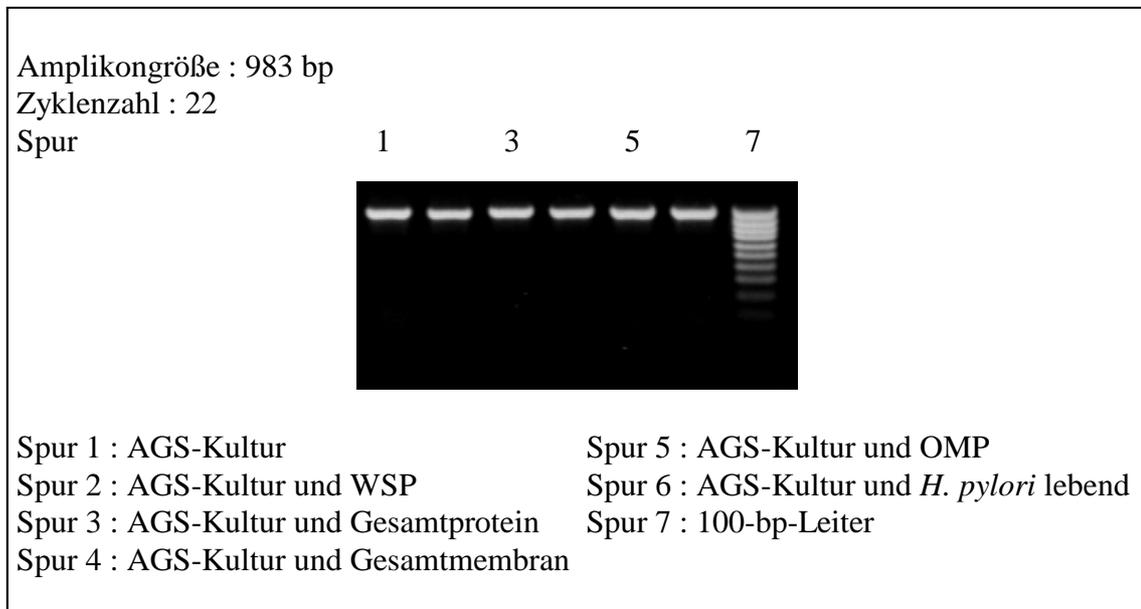


Abb. 23: Agarosegelbild (1,0%) der RT-PCR-Produkte von GAPDH mRNA aus AGS-Zellen

3.2.2 Transkription von CXC-Chemokinen in AGS-Zellen

In den Abbildungen 24 und 26 sind die RT-PCR Produkte der beiden CXC-Chemokine IL-8 und ENA-78 nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem Agarosegel zu sehen.

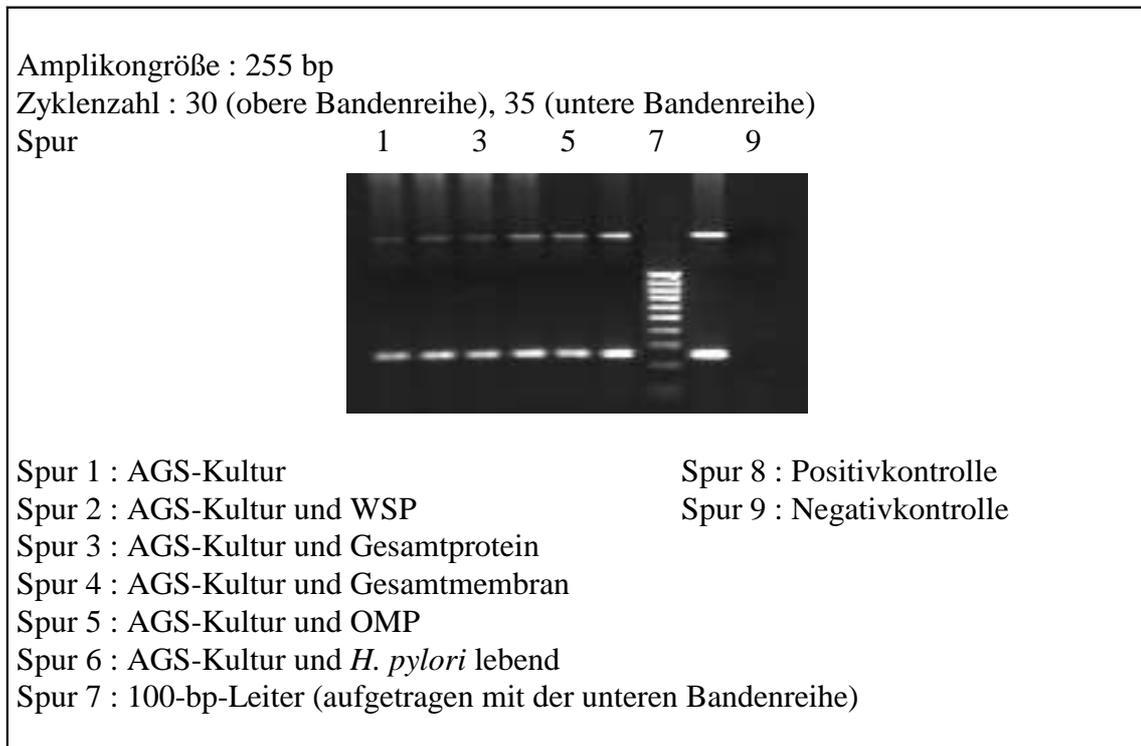


Abb. 24: Agarosegelbild (1,5%) der RT-PCR-Produkte von IL-8 mRNA aus AGS-Zellen

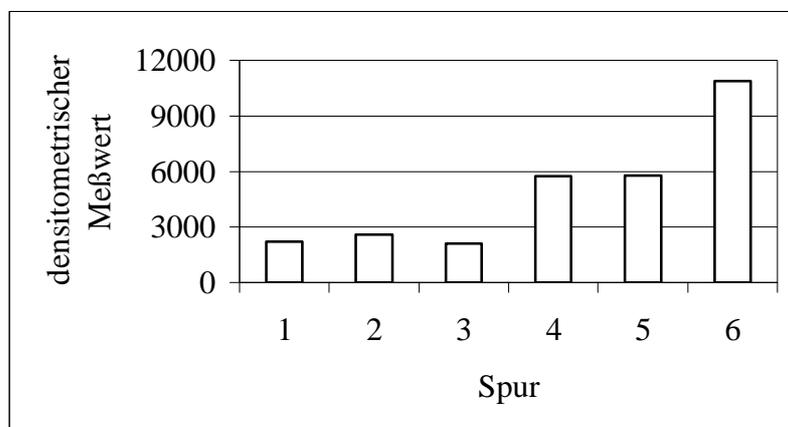


Abb. 25: Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von IL-8 mRNA (obere Bandenreihe von Abb. 24) aus AGS-Zellen

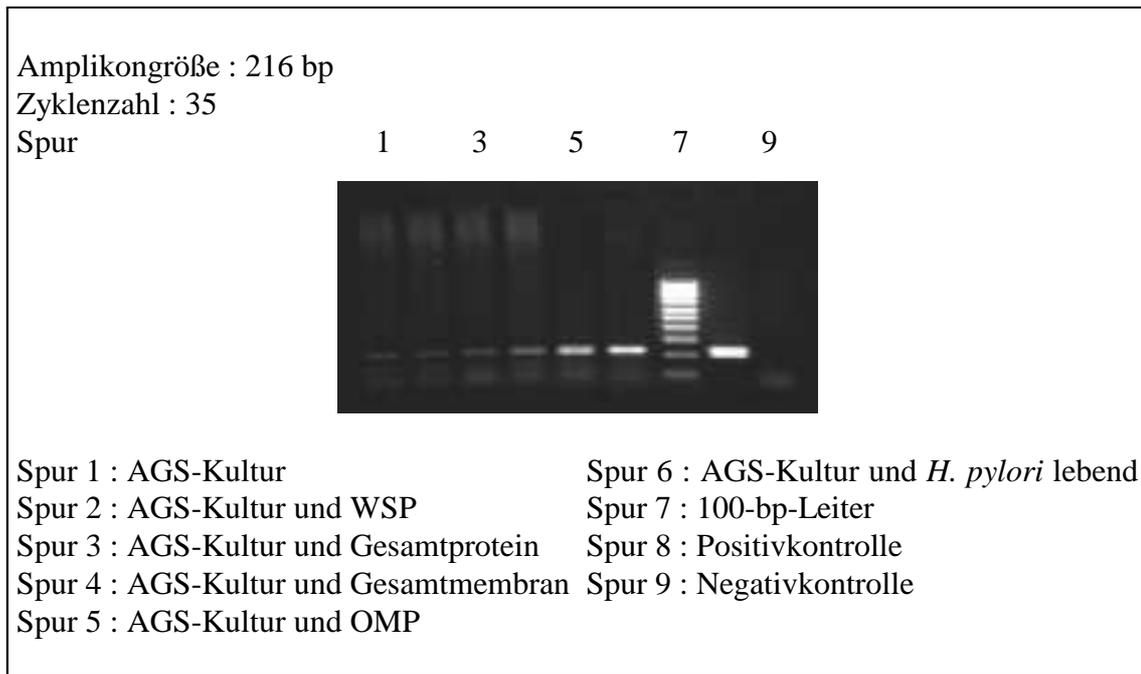


Abb. 26: Agarosegelbild (1,5%) der RT-PCR-Produkte von ENA-78 mRNA aus AGS-Zellen

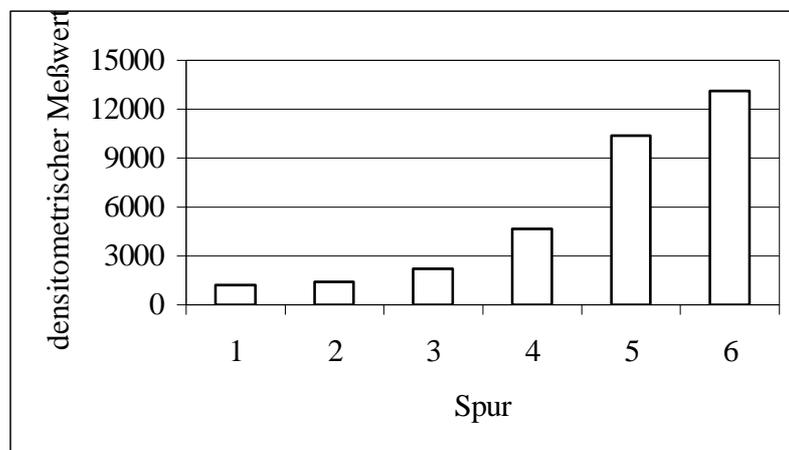


Abb. 27: Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von ENA-78 mRNA (Abb. 26) aus AGS-Zellen

Die densitometrische Auswertung der einzelnen Gelbanden (Abb. 25 und 27) zeigte eine Zunahme der mRNA Transkriptionsrate von IL-8 und ENA-78 durch die Gesamtmembran (Spur 4) und OMP (Spur 5). Es ist zu erkennen, dass die Transkriptionsrate der beiden CXC-Chemokine in AGS-Zellen durch die Stimulierung mit dem lebenden Bakterium (Spur 6) die stärkste Induktion erfuhr. Keine oder eine nur geringe Auswirkung auf die Transkription hatten dahingegen WSP (Spur 2) und das Gesamtprotein des Bakteriums (Spur 3).

3.2.3 Transkription von CC-Chemokinen in AGS-Zellen

Die Abbildungen 28 und 29 lassen erkennen, dass die stärkste Zunahme der Signalintensität des CC-Chemokins MIP-1 α v.a. durch die Gesamtmembran (Spur 4) und das lebende Bakterium (Spur 6) bewirkt wurden. Durch das Gesamtprotein (Spur 3) und OMP (Spur 5) kam es nahezu zu einer Verdoppelung des densitometrischen Messwerts. Die geringste Steigerung der Transkriptionsrate zeigte WSP (Spur 2).

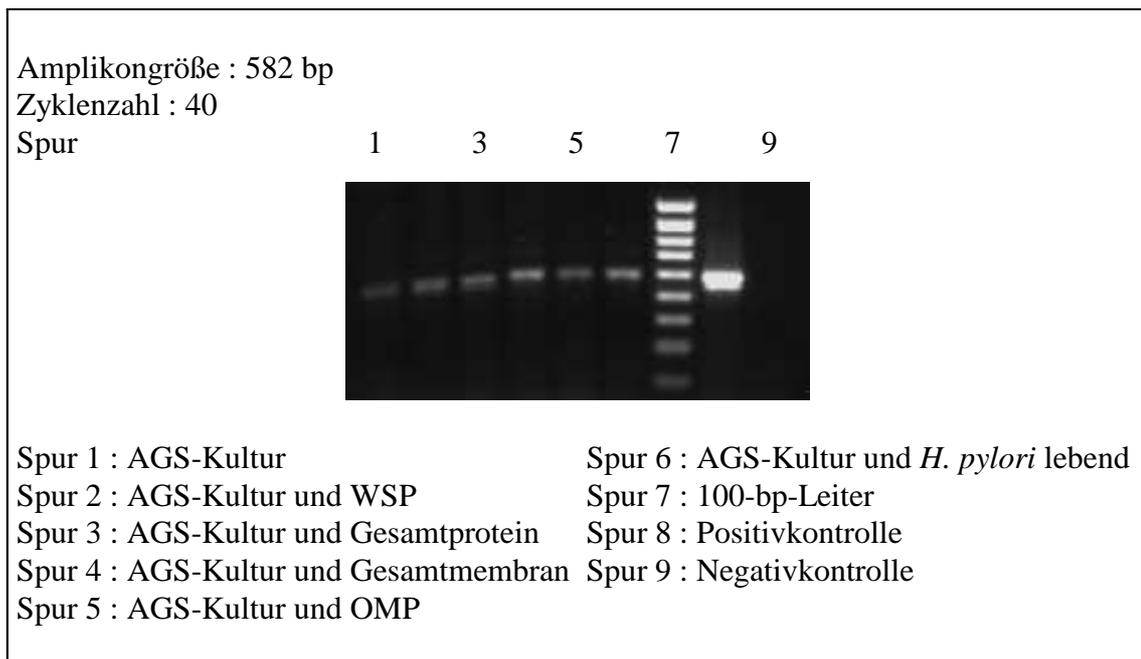


Abb. 28: Agarosegelbild (1,0%) der RT-PCR-Produkte von MIP-1 α mRNA aus AGS-Zellen

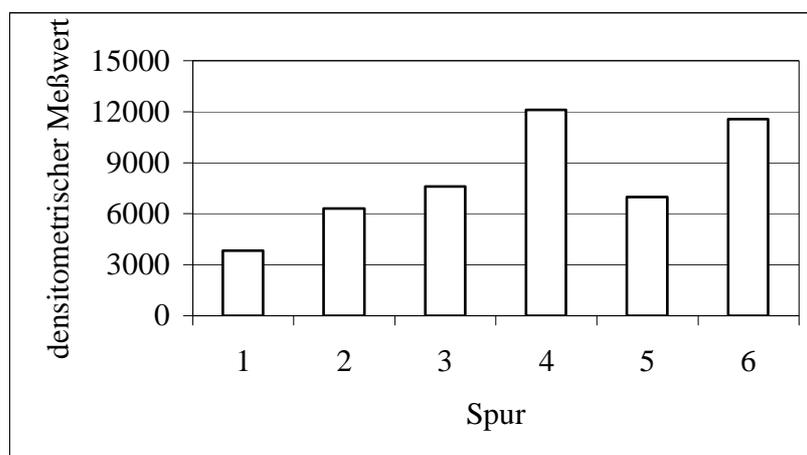


Abb. 29: Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von MIP-1 α mRNA (Abb. 28) aus AGS-Zellen

Die densitometrische Auswertung für MIP-1 β (Abb. 30 und 31) zeigte mehr als eine Verdoppelung der densitometrischen Messwerte durch die Stimulation mit der Gesamtmembran (Spur 4), OMP (Spur 5) und lebendem *H. pylori* (Spur 6). Nahezu keinen steigernden Effekt auf die Transkriptionsrate von MIP-1 β besaß das Gesamtprotein (Spur 3). Keinen Einfluß hatte WSP (Spur 2).

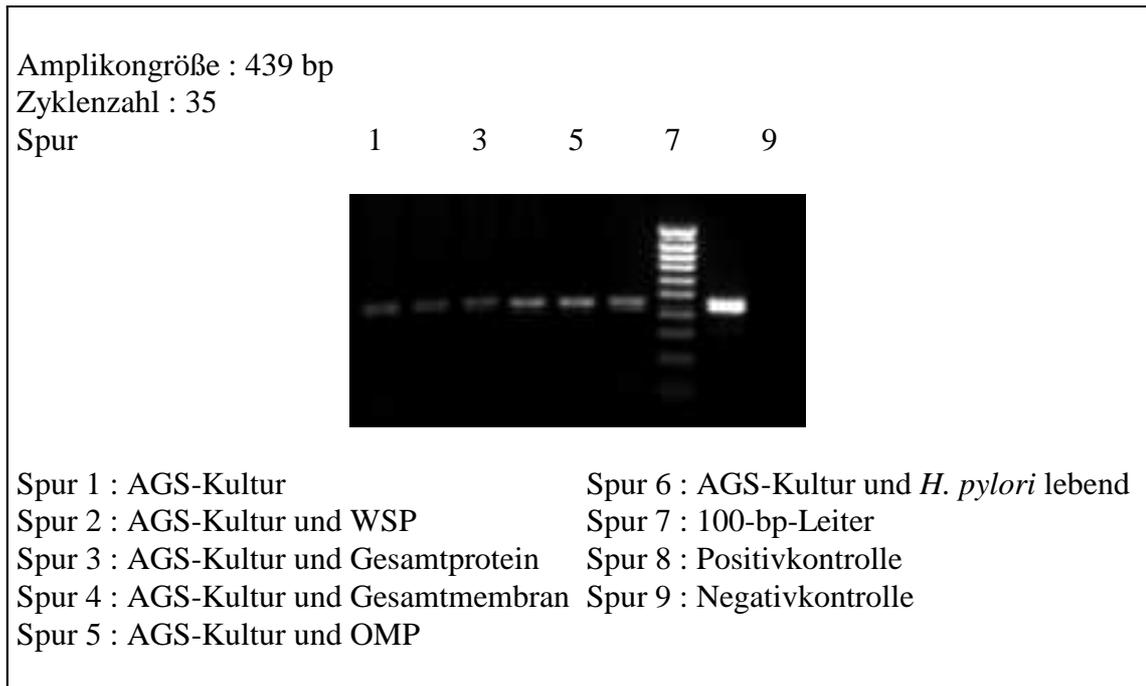


Abb. 30: Agarosegelbild (1,2%) der RT-PCR-Produkte von MIP-1 β mRNA aus AGS-Zellen

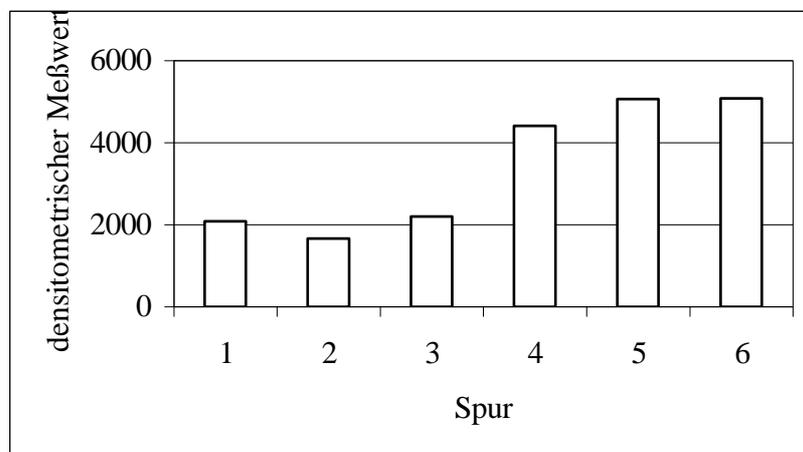


Abb. 31: Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von MIP-1 β mRNA (Abb. 30) aus AGS-Zellen

Für das Chemokin RANTES (Abb. 32) zeigte die densitometrische Auswertung (Abb. 33), dass die Transkription durch das Gesamtprotein (Spur 3) und das lebende Bakterium (Spur 6) nicht, durch WSP (Spur 2) und die Gesamtmembran (Spur 4) geringfügig und durch OMP (Spur 5) am stärksten gesteigert wurde.

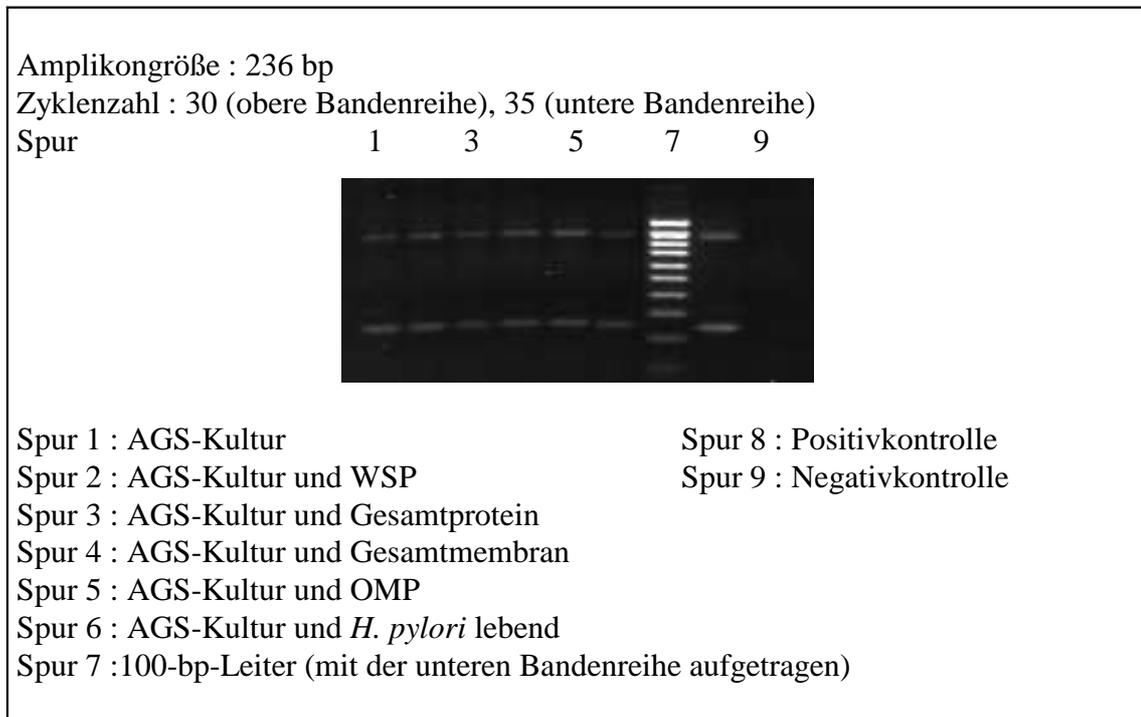


Abb. 32: Agarosegelbild (1,5%) der RT-PCR-Produkte von RANTES mRNA aus AGS-Zellen

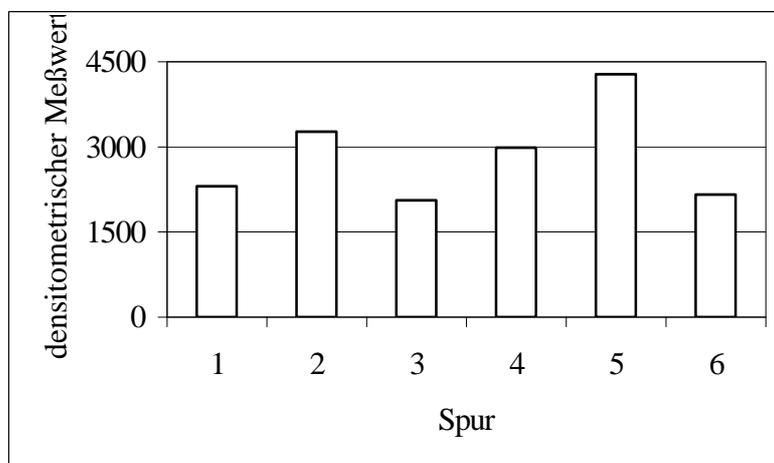


Abb. 33: Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von RANTES mRNA (obere Bandenreihe von Abb. 32) aus AGS-Zellen

Eine Transkription von MCP-1 in AGS-Zellen konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 34). Auch zeigte sich kein Einfluss auf die Bildung von MCP-1 mRNA durch einen der untersuchten Stimuli.

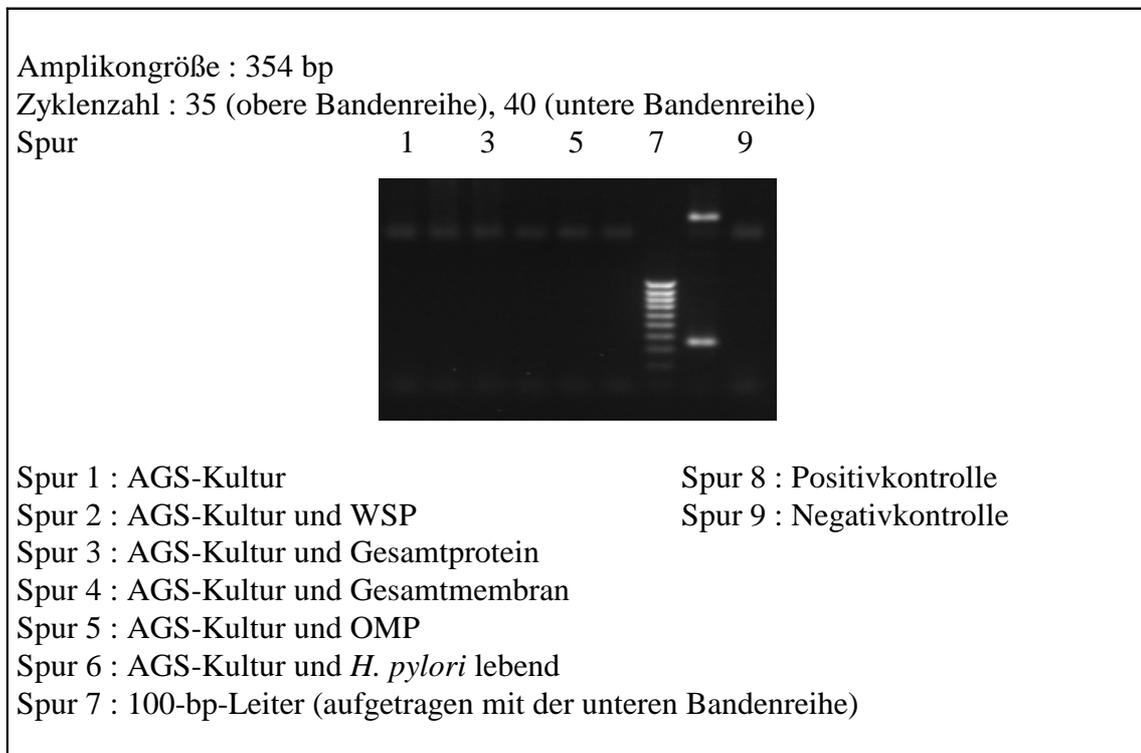


Abb. 34: Agarosegelbild (1,35%) der RT-PCR-Produkte von MCP-1 mRNA aus AGS-Zellen

3.2.4 Transkription von CXC-Chemokinen in AGS-Zellen im Zeitverlauf

3.2.4.1 Standardisierung der cDNA-Einsatzmengen

Die Standardisierung der cDNA-Einsatzmengen erfolgte analog wie es für die Magenbiopsien beschrieben wurde. Abbildung 35 zeigt das zugehörige Agarosegelbild.

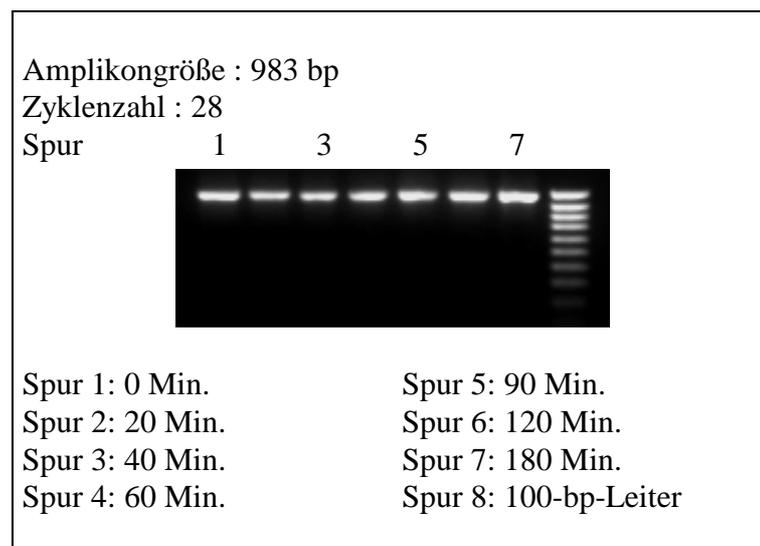


Abb. 35: Agarosegelbild (1%) der RT-PCR-Produkte von GAPDH mRNA aus AGS-Zellen

3.2.4.2 Transkription von CXC-Chemokinen in AGS-Zellen

Um den Zeitverlauf der Transkription der beiden CXC-Chemokine IL-8 und ENA-78 mRNA in AGS-Zellen zu bestimmen, wurden AGS-Zellen mit dem lebenden Bakterium stimuliert. Nach 20, 40, 60, 90, 120 und 180 Minuten wurde die Versuche durch Lysieren der AGS-Zellen beendet, die mRNA isoliert und analog, wie für die Magenbiopsien beschrieben, fortgeföhren.

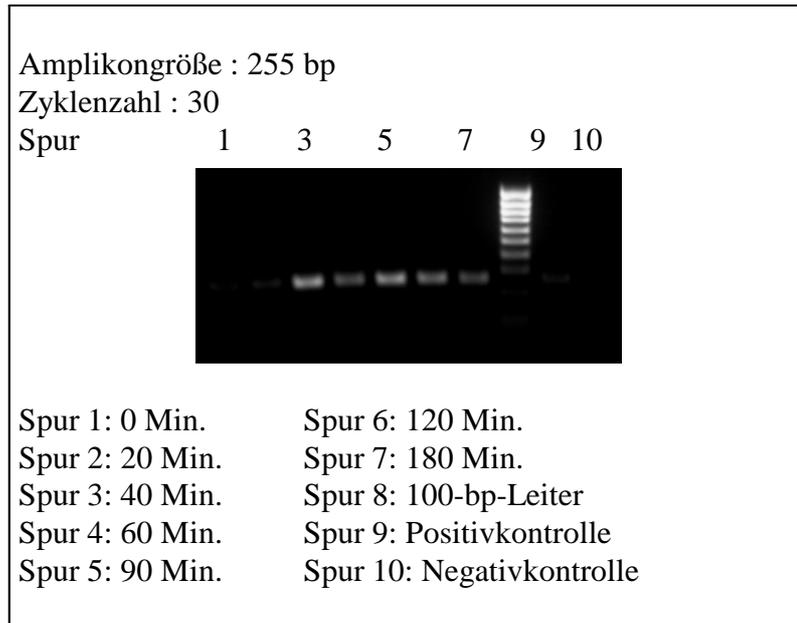


Abb. 36: Agarosegelbild (1%) der RT-PCR-Produkte von IL-8 mRNA aus AGS-Zellen

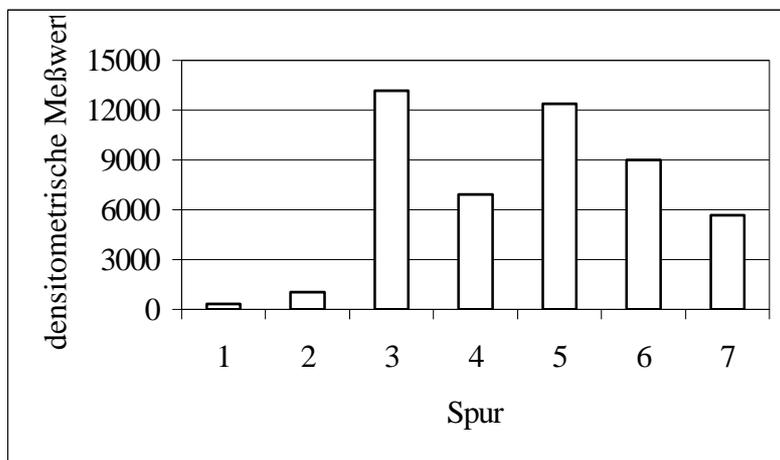


Abb. 37: Densitometrische Messwerte der RT-PCR-Produkte von IL-8 mRNA (Abb. 36) aus AGS-Zellen

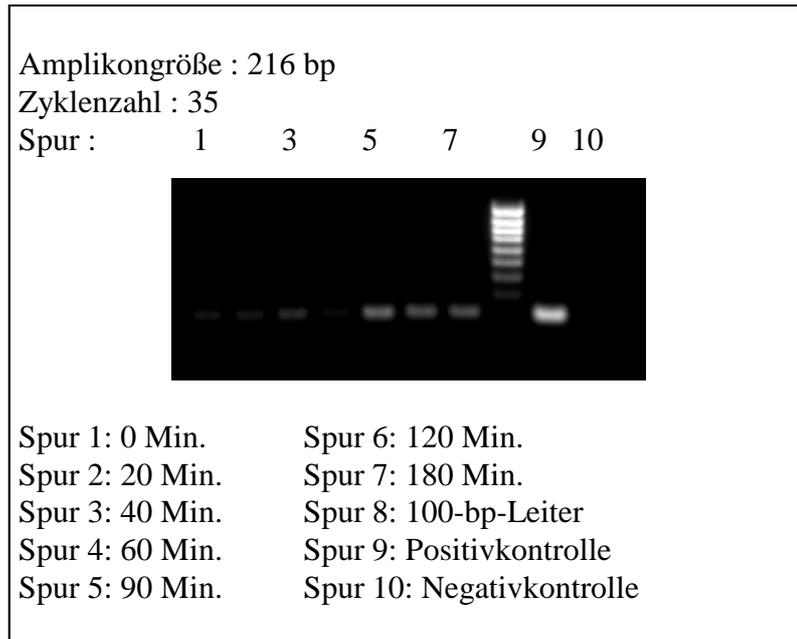


Abb. 38: Agarosegelbild der RT-PCR-Produkte von ENA-78 mRNA aus AGS-Zellen

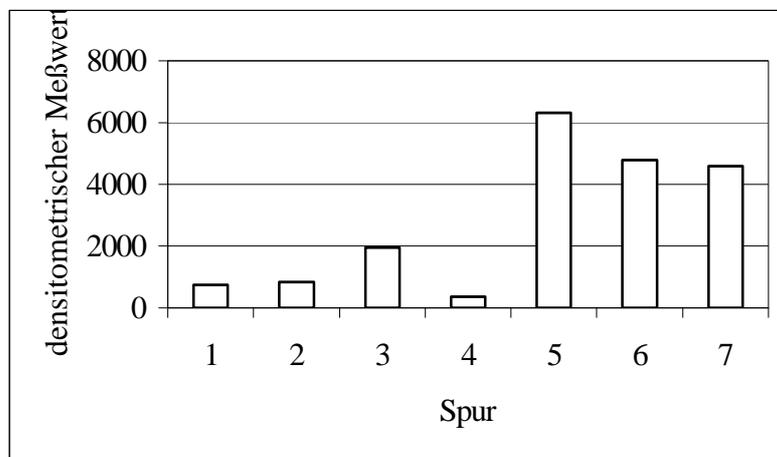


Abb. 39: Densitometrische Messwerte der RT-PCR-Produkte von ENA-78 mRNA (Abb. 38) aus AGS-Zellen

Die Abbildungen 36 und 37 zeigen, dass die Induktion von IL-8 mRNA durch das lebende Bakterium nach 40 Minuten (Spur 3) seinen Höhepunkt erreichte und im weiteren zeitlichen Verlauf nach 120 (Spur 6) und 180 Minuten (Spur 7) rasch abnahm. Hingegen wurde ENA-78 mRNA (Abb. 38 und 39) zeitlich verzögert in AGS-Zellen gebildet. Die maximale Transkriptionsrate wurde nach 90 Minuten (Spur 5) erreicht. Im weiteren zeitlichen Verlauf nahm die Transkriptionsrate von ENA-78 im Vergleich zu IL-8 weniger schnell ab.

4 DISKUSSION

4.1 Einleitung

Die Kolonisierung des Magens durch das Bakterium *Helicobacter pylori* führt bei nahezu allen infizierten Individuen über eine akute Gastritis zu einer chronisch-aktiven Gastritis (Kusters et al. 2006). Zeigt die histologische Untersuchung gesunder Magenmukosa lediglich einige wenige mononukleäre Leukozyten in der Lamina propria, so ist die *H.-pylori*-induzierte, chronisch-aktive Gastritis durch die deutliche Zunahme der Infiltration mit mononukleären Leukozyten und dem Auftreten neutrophiler Granulozyten, die bis zur Lamina epithelialis eingewandert sind, gekennzeichnet (Hatz et al. 1992, Dixon et al 1994). Erfolgt keine entsprechende Eradikationstherapie bleibt diese chronisch-aktive Gastritis lebenslang persistieren (Kuipers et al. 1995c) und hat eine fortwährende Immunantwort des Individuums zur Folge. Das Ausmaß dieser individuell verschieden ausgeprägten Immunantwort, die bakterielle Ausstattung mit Virulenzfaktoren, entsprechende Umweltfaktoren wie die Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren oder nichtsteroidalen Antirheumatika oder der Konsum von Alkohol und Zigaretten beeinflussen maßgeblich das regionale Verteilungsmuster der bakteriellen Besiedelung, den daraus resultierenden Schweregrad und Verteilungstyp der Gastritis und das Auftreten *H.-pylori*-assoziiierter Folgeerkrankungen (Kusters et al. 2006). Insbesondere konnte nachgewiesen werden, dass u.a. die Menge an produzierter Salzsäure im Magen eine wesentliche Einflussgröße darstellt. So siedelt sich in Individuen mit einer regelrechten Salzsäureproduktion der Keim überwiegend im Magenantrum an, wo sich weniger säureproduzierende Parietalzellen befinden und es kommt zu einer im Antrum betonten Gastritis. Hingegen findet sich bei einer herabgesetzten Salzsäureproduktion, sei es durch die Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren, infolge einer Vagotomie oder durch einen Parietalzellverlust im Rahmen einer atrophischen Gastritis, eine im Corpus dominierende Pangastritis (Kuipers et al. 1995b). Hinsichtlich einer geschätzten Lebenszeitprävalenz für Keimträger von 10-15% für eine Ulkuserkrankung (Sipponen et al. 1990) und von 1-2% für das distale Magenkarzinom (Kuipers 1999), ist es von grundlegender Bedeutung das pathophysiologische Verständnis dieser Folgeerkrankungen einer chronisch-aktiven Gastritis zu erweitern, um zu gewährleisten, die vorhandenen therapeutischen Optionen fortwährend anpassen und verbessern zu können.

4.2 Chemokintranskription bei der *Helicobacter-pylori*-assoziierten Gastritis

Eine Kernfrage hinsichtlich des pathophysiologischen Ablaufs einer *H.-pylori*-induzierten Gastritis ist, wie das Bakterium, das als nicht-invasives Pathogen gilt (Hemalatha et al. 1991, Dytoc et al. 1992), eine Signalkaskade aktiviert in deren Folge es zur Infiltration der Lamina propria mit Leukozyten kommt. Mehrere Arbeitsgruppen konnten beispielsweise nachweisen, dass verschiedene lösliche Bestandteile der Bakterienmembran eine direkte chemotaktische Wirkung auf Mono- und Granulozyten ausüben (Craig et al. 1992, Mai et al. 1991, 1992, Yosihida et al. 1993, Enders et al. 1995). Denkbar wäre auch, dass lösliche bakterielle Produkte Makrophagen stimulieren und/oder *H. pylori* durch seinen unmittelbaren Kontakt das Magenepithelium aktiviert, entsprechende Mediatoren freizusetzen. Bisher konnte in zahlreichen In-vivo-Untersuchungen an Magenbiopsien erhöhte Transkriptions- bzw. Expressionsraten des Mediators Interleukin 8 (IL-8) nachgewiesen werden (Crabtree et al. 1993, 1994, Fan et al. 1995, Peek et al. 1995, Yamaoka et al. 1995, 1996, 1998, Shimoyama et al. 1998). Zum Beispiel fanden Crabtree et al. (1993) im Überstand von in vitro kultivierten Biopsien aus dem Magenantrum bei Personen mit einer *H.-pylori*-assoziierten Gastritis signifikant gesteigerte Proteinkonzentrationen von IL-8 im Vergleich zu *H.-pylori*-negativen Personen. Fan et al. (1995) haben mit Hilfe eines Radioimmunoassays (RIA) in antralen Magenbiopsien und im Magensaft bei *H.-pylori*-positiven Probanden signifikant erhöhte IL-8 Proteinkonzentrationen gemessen im Vergleich zu nicht infizierten Probanden. Yamaoka et al. (1998) wiesen bei *H.-pylori*-positiven Personen mit Hilfe der RT-PCR in 79,4% der untersuchten Biopsien aus dem Magenantrum eine positive IL-8 Transkription nach im Gegensatz von nur 2,5% in der *H.-pylori*-negativen Kontrollgruppe und konnten dieses signifikante Ergebnis auch auf der Proteinebene bestätigen. Crabtree et al. (1994) gelang in diesem Zusammenhang mit Hilfe einer Immunfluoreszenzuntersuchung das Magenepithel als wesentliche Produktionsquelle von IL-8 zu identifizieren. Ergänzend zu diesen Befunden ließ sich in mehreren In-vitro-Studien die Induktion von IL-8 durch *H. pylori* in Epithelzellen verschiedener Magenkarzinomzelllinien (u.a. in AGS, Kato III und MKN28) aufzeigen (Crabtree, Covacci et al. 1995, Crowe et al. 1995, Huang et al. 1995, Sharma et al. 1995), in deren Rahmen von Rieder et al. (1997) auch die Adhärenz des Bakteriums an das Magenepithel als wesentliche Voraussetzung beschrieben wurde.

Diese Untersuchungsergebnisse legen eine aktive Beteiligung des Magenepithels an der Vermittlung des Entzündungsprozesses einer *H.-pylori*-assoziierten Gastritis nahe. Zudem ist bekannt, dass verschiedene bakterielle und virale Infektionen eine Chemokinproduktion auch

in Epithelzellen des Urogenital-, Intestinal- und Respirationstraktes anstoßen (Hedges et al. 1992, Becker et al. 1993, Eckmann, Kagnoff et al. 1993, Eckmann, Jung et al. 1993).

Interleukin-8 (CXCL8) gehört zur Gruppe der chemotaktischen Zytokine, sogenannten Chemokinen, deren Hauptaufgabe darin besteht Leukozyten anzulocken (Baggiolini 1998, 2001). Unterteilt werden sie in zwei Hauptgruppen, die CXC- und CC-Chemokine (Einteilungskriterium s. 1.2). Entsprechend dem Verteilungsmuster der Chemokin-Rezeptoren wirken CXC-Chemokine überwiegend auf neutrophile Granulozyten und CC-Chemokine auf Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten, eosinophile und basophile Granulozyten (Baggiolini 2001). Hingewiesen sei in diesem Zusammenhang auch auf die In-vitro-Studien von McCormick et al. (1993, 1995) mit *Salmonella typhimurium*, die zeigten, dass die bakterielle Stimulation auf der apikalen Seite von intestinalen Epithelzellen eine basale Sekretion von IL-8 zur Folge hat, das in vivo, wie auch andere CXC-Chemokine, an Proteoglykane innerhalb der Lamina propria anbindet (Webb et al. 1993). Auf diese Weise kann subepithelial von Chemokinen ein chemotaktisch wirksamer Gradienten aufgebaut werden, der neutrophilen Granulozyten die Migration in Richtung auf das Epithel ermöglicht.

Das Augenmerk dieser Studie richtete sich daher darauf, ob neben IL-8 auch andere Chemokine, wie das CXC-Chemokin ENA-78 (CXCL5) oder die CC-Chemokine MIP-1 α (CCL3), -1 β (CCL4), RANTES (CCL5) und MCP-1 (CCL2) erhöhte Transkriptionsraten in Magenbiopsien bei einer *H.-pylori*-assoziierten Gastritis aufweisen. Hintergrund hierfür war, neben den oben aufgeführten Untersuchungsergebnissen, dass in verschiedenen Studien die Beteiligung der ausgewählten Chemokine an chronisch-entzündlichen Erkrankungen nachgewiesen werden konnte. So fanden beispielsweise Koch et al. erhöhte Konzentrationen von ENA-78 (1994a) und MIP-1 α (1994b) in der Synovia von Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis und von MIP-1 β bei Patienten mit einer Osteoarthritis (1995). Keates et al. (1997a) und Z'Graggen et al. (1997) gelang der Nachweis erhöhter Transkriptions- und Expressionsraten von ENA-78 in intestinalen Epithelzellen bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und Standiford et al. (1993) zeigten eine erhöhte Proteinkonzentration von MIP-1 α in einer bronchoalveolären Lavage von Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen der Lunge.

Um der Zielsetzung dieser Studie nachzukommen, wurde die semiquantitative bzw. für ENA-78 auch quantitative mRNA-Bestimmung der Chemokine mit Hilfe der RT-PCR ausgeführt. Die hierzu verwendeten Magenbiopsien stammten aus dem Magenantrum, da hier im allgemeinen Grad und Ausmaß der Aktivität einer *H.-pylori*-induzierten Gastritis, aufgrund

einer höheren bakteriellen Besiedelung, stärker ausgeprägt ist, als im Magencorpus (Bayerdörffer et al. 1992, Stolte et al. 1990, 1995).

Angemerkt sei zu dieser hier durchgeführten Untersuchung, dass *H. pylori*-Stämme je nach Expression des vakuolisierenden Zytotoxins (VacA) und einem weiteren Virulenzfaktor, dem sog. zytotoxin-assoziierten Antigen (CagA) in Typ-I- oder , bei deren Fehlen, in Typ-II-Stämme eingeteilt werden. Typ-I-Stämme sind bei Patienten in westlichen Industrienationen häufiger mit einer Duodenitis, einem Duodenalulkus und einem Magenkarzinom assoziiert als Typ-II-Stämme, wobei dieser Zusammenhang etwa an japanischen oder chinesischen Populationen nicht nachgewiesen werden konnte (Pan et al. 1997, Shimoyama et al. 1997). Die Expression des CagA-Proteins, das eine variable Molekularmasse von 120-140 kDa besitzt und stark immunogen ist (Covacci et al. 1993, Tummuru et al. 1993), ist an das Vorhandensein der sog. *cag* Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) gekoppelt und wird heutzutage als dessen Marker betrachtet (Censini et al. 1996). Neben dem Gen für das CagA-Protein kodiert die *cag* Pathogenitätsinsel auch ein sog. Typ-IV-Sekretionssystem (T4SS), das, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, einen Pilus bildet (Kwok et al. 2007, Rohde et al. 2003) und die Injektion von CagA (Odenbreit et al. 2000) und den Übertritt von Peptidoglykanen (Viala et al. 2004) in die Wirtszelle ermöglicht. T4SS bindet über das Adhäsion CagL an das Integrin $\alpha_5\beta_1$ und bewirkt, durch dessen Aktivierung, schließlich den Transport von CagA in die Wirtszelle. In der Wirtszelle wird CagA phosphoryliert (Asahi et al. 2000, Stein et al. 2000) und bindet an verschiedene Zellproteine, die eine SH2-Domäne enthalten. Bisher wurden in diesem Zusammenhang die Tyrosin-Phosphatase Shp-2, die Tyrosin-Kinase Csk und das Adapterprotein Crk beschrieben (Higashi et al. 2002, Tsutsumi et al. 2003, Suzuki et al. 2005), die alle drei als Interaktionspartner bei der durch *H. pylori*-induzierten Umgestaltung des Aktinzytoskeletts eine Rolle spielen. Daneben sind auch von der Phosphorylierung von CagA unabhängige Effekte bekannt, wie u.a. das Zerreißen von Tight junctions oder das Anstoßen proliferatorischer und proinflammatorischer Signalkaskaden (Backert et al. 2008). Ausgehend von der Beobachtung, dass neben CagA-positiven Bakterienstämmen auch CagA-negative *H. pylori*-Mutanten in der Lage sind die Bildung von IL-8 in der Wirtszelle zu induzieren (Crabtree, Xiang et al. 1995, Sharma et al. 1995) wurde davon ausgegangen, dass das CagA-Protein keine wesentliche Rolle in der Induktion von Chemokinen spielt und wurde daher in der hier untersuchten Studienpopulation auch nicht bestimmt. Unterstützt wird diese Annahme von den Untersuchungen von Fischer et al. (2001), die einzelnen Gene der *cag* Pathogenitätsinsel der Reihe nach überprüften und zu der Ansicht gelangten, dass die *cag* Pathogenitätsinsel kein Effektorprotein codiert, das über das Typ-IV-

Sekretionssystem in die Wirtszelle gelangt und zur Induktion von IL-8 führt. Auch zeigten Censini et al. (1996) und Selbach et al. (2002) mit Hilfe von gezielt durchgeführten Mutationen in einzelnen Genen der *cag*-PAI, dass die Induktion von IL-8 an ein intaktes T4SS gebunden ist, aber unabhängig vom CagA-Protein erfolgt. Jedoch entdeckte erst kürzlich Brandt et al. (2005), dass, neben der von Viala et al. (2004) beschriebenen Aktivierung von NF- κ B (Nuklearfaktor kappaB) und Induktion von IL-8 durch Peptidoglykane auch CagA in der Lage ist, über eine 2. Signalkaskade NF- κ B zu aktivieren und die IL-8 Produktion zu induzieren.

4.2.1 Transkription der CXC-Chemokine in vivo und in vitro

Für das CXC-Chemokin IL-8 fand sich in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Shimoyama et al. (1998) eine statistisch signifikant gesteigerte mRNA-Rate im untersuchten *H. pylori*-positiven Kollektiv im Vergleich zu den nicht infizierten Personen. Korrespondierend hierzu sind auch die Ergebnisse von Peek et al. (1995) und Yamaoka et al. (1995, 1996, 1998), die bei Personen mit einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis signifikant häufiger eine IL-8 Transkription mittels RT-PCR im Magenantrum nachweisen konnten im Vergleich zur *H. pylori*-negativen Vergleichsgruppe.

Welche Ergebnisse ließen sich diesbezüglich für ENA-78 erheben und welche Bedeutung können ihnen beigemessen werden?

Das CXC-Chemokin ENA-78, das erstmals im Überstand einer mit proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α und IL-1 β) stimulierten alveolären Epithelzelllinie des Menschen (A549) beschrieben wurde (Walz et al. 1991), besteht aus 78 Aminosäuren und besitzt zu IL-8 strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten. Sie stimmen in 22% ihrer Aminosäuresequenz überein, beide besitzen das für die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten notwendige ELR-Motiv und üben eine ähnlich starke chemotaktische Wirkung aus (Walz et al. 1991, 1997). Sie binden beide am CXCR2-Rezeptor an, IL-8 auch am CXCR1-Rezeptor, die ausschließlich auf neutrophilen Granulozyten vorkommen (Baggiolini et al. 2001). Neben den genannten Gemeinsamkeiten bestehen auch zwei wesentliche Unterschiede, nämlich in ihrem Produktionsort und ihrem Induktionsmechanismus. ENA-78 wird überwiegend von den verschiedensten Epithelzellen gebildet, wengleich auch andere Zelltypen wie beispielsweise Monozyten, neutrophile Granulozyten und Endothelzellen das Chemokin infolge Stimulation ebenfalls sezernieren (Walz et al. 1991, 1997). Hingegen wird IL-8 von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen gebildet, wobei als Hauptproduzenten

aktivierte Monozyten/Makrophagen und andere Leukozyten und Endothelzellen gelten (Baggiolini et al. 1994).

Die Ergebnisse sowohl der semi- als auch exakt quantitativen Bestimmung der mRNA von ENA-78 zeigten einen statistisch signifikanten Anstieg bei *H. pylori*-positiven Personen im Vergleich zur *H. pylori*-negativen Gruppe. Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR, die es erlaubt die Anzahl der Transkripte genau zu bestimmen und deren Amplifikation von vielen äußeren Einflussgrößen unabhängig ist (Gilliland et al. 1990), ließ sich eine Zunahme der mRNA-Kopien bei infizierten Personen um den Faktor 46 beziffern. Ein Anstieg der Transkriptionsrate mit dem Aktivitätsgrad der Gastritis, wie er für IL-8 quantitativ auf Transkriptions- (Rieder et al. 1997) und Expressionsebene (Yamaoka et al. 1998) gelang, zeichnete sich jedoch nicht ab. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von Shimoyama et al. (1998), die eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl an neutrophilen Granulozyten und der Anzahl an ENA-78 Transkripten innerhalb der Mukosa des Magenantrums nachweisen konnten. Eine Erklärung bezüglich dieser differierenden Ergebnisse könnte darin begründet sein, dass zwei verschiedene Bestimmungsmethoden zur Anwendung kamen. Bestimmte Shimoyama et al. die Anzahl der mRNA-Transkripte mit Hilfe der RT-PCR lediglich relativ, so erfolgte in dieser Studie mittels quantitativer RT-PCR auch ihre absolute Messung.

Um den Einfluss von *H. pylori* und einzelner Bakterienbestandteile auf die Transkriptionsrate der beiden CXC-Chemokine zu untersuchen, wurden Epithelzellen einer humanen Magenkarzinomzelllinie (AGS) mit dem löslichen Protein (WSP), dem Gesamtprotein, der Gesamtmembran, der äußeren Membran (OMP) und dem lebenden Bakterium stimuliert. Es zeigte sich, dass der lebende Keim, der, im Gegensatz zum metabolisch inaktivierten Erreger, als Induktor von IL-8 in AGS-Zellen bekannt ist (Huang et al. 1995, Sharma et al. 1995, Rieder et al. 1997), die Transkription von ENA-78 in gleicher Weise zu steigern vermag wie von IL-8. Hingegen keinen Einfluß auf die Transkriptionsrate beider Chemokine fand sich beim wasserlöslichen Protein (WSP) und dem Gesamtprotein, wogegen die Gesamtmembran und die äußere Membran die Chemokinrate gleichermaßen gering erhöhten. Bezüglich dieses steigernden Effekts der Gesamtmembran und der äußeren Membran (OMP) wäre das von Yamaoka et al. (2000) identifizierte Genprodukt von *oipA*, nämlich das sogenannte Protein A der äußeren Membran, mit seinem Vermögen IL-8 in verschiedenen Epithelzelllinien, wie u.a. auch in AGS-Zellen, zu induzieren, eine denkbare Erklärung. Grundsätzlich sei jedoch zu den Ergebnissen dieser In-vitro-Stimulierungsversuchen angemerkt, dass das Ansprechen von der jeweils verwendeten Zelllinie abhängig ist und Kassai et al. (1999) mit Hilfe eines

Wasserextrakts von *H. pylori* die Transkription von IL-8 in einer anderen Epithelzelllinie eines Magenkarzinoms (MKN28) nachweisen konnte. In diesem Zusammenhang sei auch auf die nachfolgenden Ausführungen unter 4.2.2 hingewiesen, in denen ausführlich über die verwendeten Epithelzelllinien und ihre Ausstattung mit Toll-Like-Rezeptoren (TLR) eingegangen wird.

Als wesentlichen Befund dieser In-vitro-Versuche zeigte sich, dass das lebende Bakterium in der Lage ist die Transkription von ENA-78, ebenso wie es für IL-8 bekannt ist (siehe 4.2), zu induzieren. Die in vivo nachgewiesene gesteigerte mRNA-Transkription von ENA-78 bei der *H.-pylori*-assoziierten Gastritis legt daher als mögliche Ursprungsorte neben aktivierten Monozyten (Bliss et al. 1998), neutrophile Granulozyten und Endothelzellen (Walz et al. 1991, 1997) auch das Magenepithel durch seinen unmittelbaren Kontakt mit dem Erreger nahe.

Die beiden untersuchten CXC-Chemokine unterscheiden sich auch im Hinblick auf ihren Induktionsmechanismus, wie die Messung der mRNA-Rate im Zeitverlauf von AGS-Zellen, die mit dem lebenden Keim stimuliert wurden, zeigte. Fand sich für IL-8 eine schnellere Induktion mit einem Höhepunkt nach 40 Minuten und einem vergleichsweise rascheren Abfall über die Zeit, ließ sich für ENA-78 eine verzögerte mRNA-Produktion mit einem Maximum nach 90 Minuten und einem langsameren Rückgang finden. Auch in anderen Zelltypen, wie beispielsweise in Monozyten, die mit Lipopolysacchariden (LPS) (Schnyder et al. 1997) oder in Zellen der intestinalen Epithelzelllinie Caco-2, die mit IL-1 β stimuliert wurden (Keates et al. 1997a), zeigte sich bezüglich ENA-78 ein verzögerter Beginn verbunden mit einem längeren Anhalten der Transkription. So fand sich bei LPS-stimulierten Monozyten eine maximale mRNA-Rate für ENA-78 nach 20-28 Stunden und eine unverändert hohe Produktion nach 42 Stunden, wohingegen IL-8 nach 4-12 Stunden seine maximale Transkriptionsrate erreichte und nach 42 Stunden auf das Ausgangsniveau zurückging (Schnyder et al. 1997). In IL-1 β -stimulierten Caco-2-Zellen setzte die Transkription von IL-8 nach ca. 3 Stunden ein, um nach 12 Stunden eine Plateauphase zu erreichen, wohingegen ENA-78 nach ca. 6 Stunden gebildet wurde und nach 24 Stunden sein Maximum erreichte (Keates et al. 1997a). Diese aufgezeigte Differenz könnte durch eine verschiedentliche Induktion von Transkriptionsfaktoren bzw. Unterschiede in der Struktur der Promotorregion des jeweiligen Genes liegen. Während beide Promotorgene u.a. eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF- κ B haben, besitzt nur das Promotorgen von ENA-78 drei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor AP-2 (Walz et al. 1991, 1993,

Corbett et al. 1994), wohingegen die Promotorregion von IL-8 eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-1 aufweist (Matsusaka et al. 1993, Mukaida et al. 1994).

Neben der beschriebenen Regulation auf der Ebene ihrer Transkription kann eine solche auch auf der Proteinebene stattfinden. So besitzt IL-8 an seinem N-terminalen Ende Modifikationsstellen für extrazelluläre Proteasen wie Elastase, Cathepsin G und Proteinase-3, die u.a. von aktivierten neutrophilen Granulozyten und Monozyten sezerniert werden. Dadurch wird die Fähigkeit von IL-8, neutrophile Granulozyten zu aktivieren, um das 5-10fache gesteigert (Baggiolini et al. 1994, Padrines et al. 1994). IL-8, das von Gewebezellen überwiegend in einer Form bestehend aus 77 Aminosäuren sezerniert wird (Baggiolini et al. 1994), wird in eine aktivere Form aus 72 Aminosäuren überführt, die zudem auch gegenüber einer Proteolyse resistenter ist (Padrines et al. 1994). Für ENA-78 ist in vivo ebenfalls eine derartige Regulierung seiner biologischen Aktivität denkbar. In diesem Zusammenhang konnten Nufer et al. (1999) das von Epithel- und Endothelzellen produzierte ENA-Protein aus 78 Aminosäuren, mit Hilfe von Proteasen wie Cathepsin G und Chymotrypsin, durch Veränderung am N-terminalen Ende in aktivere Formen umgestalten.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass ENA-78, ebenso wie IL-8, einen wichtigen Beitrag als Mediator am Entzündungsprozess einer *H.-pylori*-assoziierten Gastritis leistet. Auf mRNA-Ebene erfolgt sowohl in vivo als auch in vitro eine Induktion von ENA-78 in Epithelzellen des Magens, das durch seine verzögerte Bildung und länger anhaltende Produktion nicht nur in der akuten, sondern auch in der chronischen Phase für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten eine wichtige Rolle innerhalb der Pathogenese spielt.

4.2.2 Transkription der CC-Chemokine in vivo und in vitro

Wie die histologische Untersuchung von Magenmukosa einer *H.-pylori*-assoziierten, chronisch-aktiven Gastritis zeigte, fand sich neben neutrophilen Granulozyten auch eine deutliche Zunahme der Infiltration mit mononukleären Leukozyten, wie CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten (Dixon et al. 1994). Als lokales Signal für die Attraktion dieser Zellen kommen deshalb weitere Chemokine in Frage, so dass in dieser Studie auch die Transkriptionsraten der CC-Chemokine MIP-1 α , -1 β , RANTES und MCP-1 bestimmt wurden.

MIP-1 α und -1 β wurden erstmals im Überstand von Makrophagen, die mit Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert wurden, beschrieben und stimmen in 68% ihrer Aminosäuresequenz überein. Als Hauptproduzenten gelten Monozyten/Makrophagen und B-

und T- Lymphozyten (Baggiolini et al. 1994). MIP-1 α übt über seine beiden Rezeptoren CCR1 und CCR5 chemotaktische und stimulierende Effekte auf Monozyten/Makrophagen, eosinophile und basophile Granulozyten und verschiedene Subpopulationen von Lymphozyten wie B-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen aus (Schall et al. 1993, Baggiolini et al. 1994, 2001). MIP-1 β wirkt über seinen Rezeptor CCR5 neben Monozyten/Makrophagen auch auf CD4⁺ T-Lymphozyten (Schall et al. 1993, Baggiolini 2001). Beide CC-Chemokine zeigten in dieser Untersuchung bei *H.-pylori*-positiven Personen einen statistisch signifikanten Anstieg ihrer mRNA-Transkription im Vergleich zum *H.-pylori*-negativen Kollektiv. Ein merklicher Unterschied bestand jedoch darin, dass MIP-1 α in der *H.-pylori*-negativen Gruppe keine oder eine vergleichsweise nur minimale basale Transkriptionsrate im Vergleich zu MIP-1 β aufwies. Dieser positive Transkriptionsnachweis für MIP-1 α steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Yamaoka et al. (1998), die bei *H.-pylori*-positiven in 71,8% und bei *H.-pylori*-negativen Studienteilnehmern in nur 12,5% eine mRNA-Transkription im Magenantrum nachweisen konnten. Keinen Unterschied zeigte dagegen die Transkriptionsrate von MIP-1 β , die in beiden Gruppen mit ca. 80% ähnlich häufig aufgefunden wurde. Auch Kusugami et al. (1999) entdeckten in ihren Untersuchungen im Überstand kultivierter antraler Magenbiopsien bei Keimträgern in 88% und der nicht infizierten Vergleichsgruppe in 60% eine Expression von MIP-1 α , wobei ein signifikanter Unterschied in den gemessenen Proteinkonzentrationen bestand. Außerdem fand sich in antralen Magenbiopsien in 54% der untersuchten *H.-pylori*-positiven Probanden eine Transkription von MIP-1 α im Vergleich zu keinem Transkriptionsnachweis innerhalb der *H.-pylori*-negativen Kontrollgruppe. Dieser auf mRNA-Ebene nachgewiesene Unterschied war auch auf Proteinebene signifikant. Um den Produktionsort von MIP-1 α zu identifizieren, haben Kusugami et al. die Konzentration von MIP-1 α in Zellkulturen von gastralen Epithelzellen, Makrophagen und Lymphozyten, die sie aus chirurgisch gewonnenen Proben antraler Magenmukosa isolierten, gemessen. Hierbei wiesen die Überstände der Makrophagenkultur die höchsten Konzentrationen von MIP-1 α auf. Deutlich geringere MIP-1 α Konzentrationen fanden sich im Überstand der Lymphozytenkultur, wogegen sich im demjenigen der Epithelzellen kein MIP-1 α nachweisen ließ. Auch in einer Immunfluoreszenzuntersuchung an antralen Magenbiopsien präsentierten sich innerhalb der *H.-pylori*-positiven Gruppe in die Lamina propria eingewanderte CD68⁺ Makrophagen als wesentliche Produktionsquelle (>90%). Eine Expression von MIP-1 α ließ sich in diesem Zusammenhang in den Epithelzellen der Magenmukosa nicht aufdecken. Dieser Befund steht im Gegensatz zum Ergebnis der in dieser Studie durchgeführten In-vitro-

Stimulierungsversuche. Diese wiesen nach, dass sich die Transkriptionsrate sowohl von MIP-1 α als auch in geringerem Ausmaß von MIP-1 β in AGS-Zellen durch das lebende Bakterium und seine Gesamtmembran induzieren ließ und hinsichtlich MIP-1 α in einem ähnlichen Ausprägungsgrad wie für die beiden untersuchten CXC-Chemokine. Somit ist denkbar, dass die an antralen Magenbiopsien erhöht gemessene mRNA-Rate der beiden CC-Chemokine sowohl infolge einer direkten Stimulation des Magenepithels als auch durch aktivierte CD68+ Makrophagen (Kusugami et al. 1999) generiert wird. Diese Folgerung stützt sich auf die nachstehenden Befunde. Die Regulation der CC-, wie auch der CXC-Chemokine, erfolgt u.a. über den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Grove et al. 1993, Baeuerle et al. 1994, Baggiolini et al. 1994, Roebuck et al. 1999), der, wie in mehreren Studien belegt, bei einer *Helicobacter-pylori*-assoziierten Gastritis aktiviert ist. Beispielsweise zeigten Sharma et al. (1998) in AGS-Zellen und Keates et al. (1997b) in AGS- und Kato III Zellen, dass *H. pylori* in vitro NF- κ B aktivierte und eine Steigerung der Transkriptions- und Expressionsrate von IL-8 zur Folge hatte. Isomoto et al. (2000) haben nun in einer immunhistochemischen Untersuchung in Magenbiopsien von Patienten mit einer *Helicobacter-pylori*-assoziierten Gastritis versucht, die verschiedenen Zelltypen in denen NF- κ B aktiviert wird, aufzudecken. Sie fanden bei Keimträgern im Vergleich zur nicht infizierten Gruppe signifikant häufiger aktiviertes NF- κ B sowohl in Zellen des Magenepitheliums als auch in Zellen innerhalb der Lamina propria, wie vaskulären Endothelzellen, Makrophagen und B-Zellen. Für die Aktivierung von NF- κ B sind nun zahlreiche stimulierende Faktoren bekannt. Einerseits kann sie in Epithelzellen des Magens durch den direkten Kontakt mit dem Mikroorganismus, andererseits durch Stimulation mit bakteriellen Produkten erfolgen. Beswick et al. (2005a) konstatierten, dass *H. pylori* direkt oder die Untereinheit B der bakteriellen Urease (Beswick et al. 2006) an CD74 auf Epithelzellen, das im Rahmen des Entzündungsprozesses vermehrt exprimiert wird (Beswick et al. 2005b), interagiert. Diese Bindung an CD74 führte über die Stimulation der Signalkaskade von NF- κ B schließlich zur Produktion von IL-8 (Beswick et al. 2005a). Außerdem findet die Aktivierung von NF- κ B auch über proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 und TNF α statt (Yasumoto et al. 1992, Keates et al. 1997b). Diese zeigten in vivo in der Mukosa einer *Helicobacter-pylori*-assoziierten Gastritis gesteigerte Transkriptionsraten auf (Crabtree et al. 1991, Noach et al. 1994, Peek et al. 1995, Yamaoka et al. 1995, 1996) und werden, wie aus In-vitro-Versuchen bekannt ist, von Monozyten/Makrophagen, die von LPS des Bakteriums (Mai et al. 1991, Innocenti et al. 2001) oder anderer löslicher Bakterienbestandteile, wie der Urease (Harris et al. 1996), stimuliert werden, sezerniert. Bekannt ist zudem, dass auch Epithelzelllinien eines Magenkarzinoms, wie Kato III, infolge

einer Stimulation mit dem Erreger zur Produktion von $IL-1\alpha$ und -1β angeregt werden (Jung et al. 1997). Diese auf vielfältigste Weise freigesetzten proinflammatorischen Zytokine können nun ihrerseits Monozyten/Makrophagen (Baggiolini et al. 1994) innerhalb des subepithelialen Raums oder auch das Magenepithel (Yasumoto et al. 1992, Huang et al. 1995, Keates et al. 1997b) zur Produktion von Chemokinen, wie $MIP-1\alpha$ und -1β , anregen und zur in vivo erhöht gemessenen mRNA-Rate beitragen.

Zusammengefasst kann für $MIP-1\alpha$ und -1β festgehalten werden, dass die hier durchgeführten Stimulierungsversuche zeigten, dass das lebende Bakterium und seine Gesamtmembran in vitro die Transkriptionsrate dieser beiden CC-Chemokine in AGS-Zellen steigerten. Isomoto et al. (2000) haben durch den Nachweis von aktiviertem $NF-\kappa B$ potentielle Produktionsorte von Chemokinen, wie das Magenepithel und Zellen im subepithelialen Raum wie Makrophagen, vaskuläre Endothelzellen und B-Zellen aufgedeckt. Diese Aktivierung von $NF-\kappa B$, der für alle hier untersuchten Chemokine als wesentlicher Transkriptionsfaktor gilt, wird über zahlreiche Faktoren, wie durch den Kontakt des Bakteriums mit dem Magenepithel, durch die Aktivierung des Magenepithels durch bakterielle Bestandteile oder infolge auf unterschiedlichste Weise induzierte proinflammatorische Zytokine, angestoßen. Das bedeutet, dass die erhöhte Transkriptionsrate von $MIP-1\alpha$ und -1β in vivo einerseits durch $CD68+$ Makrophagen (Kusugami et al. 1999), andererseits aber auch, wie die Ergebnisse der hier durchgeführten Stimulierungsversuche aufzeigten, durch das Magenepithel zustande kommt.

Für RANTES, das von Epithelzellen, $CD8+$ T-Lymphozyten, Fibroblasten und Thrombozyten gebildet wird und das über seine Rezeptoren $CCR1$, -3 und -5 eine Vielzahl an Zellen, wie Monozyten, T-Lymphozyten, eosinophile und basophile Granulozyten aktiviert (Schall et al. 1990, Baggiolini et al. 1994, 2001), fand sich in vivo eine signifikant gesteigerte mRNA-Transkription in Magenbiopsien bei der *H.-pylori*-positiven im Vergleich zur -negativen Gruppe. Dieser Befund steht in Übereinstimmung zu den Untersuchungen von Shimoyama et al. (1998), die ebenfalls in Biopsien aus dem Magenantrum gesteigerte mRNA-Raten bei *H.-pylori*-positiven im Vergleich zu *H.-pylori*-negativen Probanden fanden und von Yamaoka et al. (1998), die in ihrem *H.-pylori*-positiven in 57,3% und in ihrem -negativen Patientengut in nur 25% eine Transkription von RANTES in antralen Magenbiopsien nachweisen konnten. Die in der hier vorliegenden Studie durchgeführten Stimulierungsversuche mit AGS-Zellen hatten zum Ergebnis, dass der lebende Keim die Transkriptionsrate von RANTES nicht zu steigern vermag und lediglich die äußere Membran (OMP) eine Vermehrung der Transkripte bedingte. Im Gegensatz dazu gelang Mori et al. (2003) der Nachweis, dass das lebende Bakterium in MKN45-Zellen, einer weiteren Epithelzelllinie eines Magenkarzinoms, die

Transkription und Expression von RANTES über die Aktivierung von NF- κ B anregte. Außerdem konnten diese Arbeitsgruppe aufzeigen, dass die Induktion von RANTES, wie es mittlerweile auch für IL-8 bekannt ist (Tummuru et al 1995, Censini et al. 1996, Li et al. 1999), an Genprodukte der *cag*-Pathogenitätsinsel gebunden ist. Auch Kudo et al. (2005) fanden heraus, dass *H. pylori* in MKN45-Zellen die mRNA-Rate von RANTES vervielfacht und die Höhe des Ertrags sowohl von einer intakten *cag*-Pathogenitätsinsel als auch vom Vorhandensein von OipA, dem Protein A der äußeren Membran, abhängig ist. Warum sich nun im Rahmen der Stimulierungsversuche mit MKN45-Zellen im Gegensatz zu in dieser Studie verwendeten AGS-Zellen eine Vermehrung der mRNA-Moleküle von RANTES beobachten ließ, könnte in der unterschiedlichen Ausstattung mit Toll-Like-Rezeptoren (TLR) begründet sein. Toll-Like-Rezeptoren sind Transmembranproteine, die einer Gruppe von Oberflächenmolekülen auf Zellen angehören und krankheitsassoziierte molekulare Muster von Mikroorganismen erkennen (Medzhitov et al. 2000). Zum Beispiel erkennt TLR2 Peptidoglykane, bakterielle Lipoproteine und verschiedene Lipopolysaccharide (Takeuchi et al. 1999, Underhill et al. 1999), TLR4 LPS der meisten gramnegativen Bakterien (Poltorak et al. 1998) und TLR5 Flagellin (Hayashi et al. 2001). In diesem Zusammenhang zeigten Smith et al. (2003), dass *H. pylori* in MKN45-Zellen über TLR2 und -5 NF- κ B aktivierte und die Produktion von Chemokinen, wie etwa IL-8, angestoßen wurde. Zudem konnten sie LPS als TLR2- und Flagellin als TLR5-Agonisten aufdecken. Ishihara et al. (2004) fanden heraus, dass TLR4, der als Hauptrezeptor von LPS gilt (Beutler et al. 2000a und b) und MD-2, das TLR4 benötigt um LPS zu erkennen (Shimazu et al. 1999), in vivo in gastralen Epithelzellen bei einer *H.-pylori*-assoziierten Gastritis hochreguliert werden. Ergänzend hierzu konnten sie in AGS-Zellen, die sie mit MD-2 transfizierten, eine gesteigerte Oberflächenexpression von TLR4 beobachten und eine vermehrte Aktivierung von NF- κ B und IL-8 Bildung infolge einer Stimulierung mit dem lebenden Mikroorganismus bzw. mit LPS messen. Smith et al. (2003) untersuchten nun auch die TLR-Ausstattung von AGS- und MKN45-Zellen und fanden heraus, dass MKN45-Zellen TLR2, -3 und -5, AGS-Zellen jedoch nur TLR4 und -5 exprimierten. Aus diesem Befund und den aufgeführten Vorergebnissen kann gefolgert werden, dass für die Transkription von RANTES eine Interaktion zwischen bakteriellem Ligand und TLR2 notwendig ist, und dass seine Absenz als eine denkbare Erklärung für die fehlende Transkription in AGS-Zellen, die mit dem lebenden Bakterium stimuliert werden, herangezogen werden kann. Außerdem kann angenommen werden, dass die beobachtete leichtgradige Zunahme der mRNA-Rate in AGS-Zellen durch die äußere Membran (OMP) über TLR4 und/oder -5 erfolgt.

Als Ergebnis kann für RANTES zusammengefasst werden, dass *in vitro* die Transkriptionsrate in AGS-Zellen durch die äußere Membran, nicht aber durch das lebende Bakterium induziert wird und dieser Befund durch die fehlende Expression von TLR2 erklärt werden kann. Wie *In-vitro*-Versuche mit MKN45-Zellen, die mit *H. pylori* oder mit proinflammatorischen Zytokinen aktiviert wurden und als Resultat die Produktion von RANTES zur Folge hatten (Mori et al. 2003), zeigten, kann angenommen werden, dass neben eosinophilen Granulozyten (Kim et al. 2007) auch das Magenepithelium als Produktionsort zu einer gesteigerten Transkription von RANTES *in vivo* beiträgt.

MCP-1, das als potenter Stimulus von Monozyten und basophilen Granulozyten über seinen Rezeptor CCR2 wirkt und von einer Vielzahl an Zellen, wie Makrophagen, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen produziert wird (Baggiolini et al. 1994, 2001), zeigte in dieser Studie innerhalb des untersuchten Patientenguts eine konstitutive Transkriptionsrate und ließ sich zudem in AGS-Zellen, wie es auch aus Stimulierungsversuchen mit Kato III Zellen bekannt ist (Jung et al. 1997), nicht induzieren. Daher wird davon ausgegangen, dass MCP-1 innerhalb der Pathogenese einer *H.-pylori*-induzierten Gastritis keine wesentliche bzw. eine nur untergeordnete Rolle spielt. Dies steht im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen von Shimoyama et al. (1998), die in antralen Magenbiopsien eine signifikant gesteigerte mRNA im *H.-pylori*-positiven Kollektiv nachweisen konnten und zu den *In-vitro*-Stimulierungsversuchen von Watanabe et al. (1997), die unter Verwendung der Epithelzelllinie MKN28 eine Induktion durch *H. pylori* bzw. die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α aufzeigten.

Abschließend sei angemerkt, dass zu den unterschiedlichen Ergebnissen zwischen dem lebenden Bakterium und den einzelnen Membranbestandteilen natürlich auch die Faltung des Proteins, die Interferenz mit anderen Oberflächenrezeptoren oder aber die Induktion von Signalwegen durch den vitalen Keim beitragen. So gelangen über ein intaktes bakterielles Typ IV Sekretionssystem Peptidoglykane in die Wirtszelle, die NF-kB aktivieren und schließlich zu einer Stimulation einer IL8 Antwort führen (Viala et al. 2004).

4.3 Bedeutung der Studienergebnisse für die Pathophysiologie einer *Helicobacter-pylori*-induzierten Gastritis

Die Zielsetzung dieser Studie setzte sich u.a. mit der Fragestellung auseinander wie der Mikroorganismus *H. pylori*, der die Magenmukosa nicht infiltrierte, eine Signalkaskade in Gang setzt, in deren Folge es zunächst zu einer akuten Gastritis mit Infiltration der L. propria mit vorwiegend neutrophilen Granulozyten kommt und im weiteren Krankheitsprozess sich das Bild einer chronisch-aktiven Gastritis mit mononukleären Leukozyten entwickelt. Ausgehend von einer Vielzahl an Voruntersuchungen, die die Rolle von Chemokinen und insbesondere von IL-8 in der Pathogenese einer *H.-pylori*-induzierten Gastritis beschrieben, wurde das Augenmerk auf weitere CXC- und CC-Chemokine gerichtet. Diese hier durchgeführte Untersuchung zeigte auf, dass neben IL-8 auch das CXC-Chemokin ENA-78 in vivo bei der *H.-pylori*-assoziierten Gastritis erhöhte Transkriptionsraten aufwies. Ergänzend kam hinzu, dass die Stimulierungsversuche mit Epithelzellen der Magenkarzinomzelllinie AGS darlegten, dass das lebende Bakterium die Transkriptionsrate von ENA-78 in ähnlichem Ausmaß wie für IL-8 zu steigern vermag und somit das Magenepithel als wesentliche Produktionsquelle in Betracht kommt.

Da das histologische Bild einer chronisch-aktiven Gastritis auch durch die Infiltration mit mononukleären Zellen, wie CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten (Dixon et al. 1994), geprägt ist, wurden in dieser Untersuchung auch die Transkriptionsraten verschiedener CC-Chemokine bestimmt. Hierbei schien, nach vorliegenden Ergebnissen, MCP-1 keinen wesentlichen Beitrag am Krankheitsgeschehen zu spielen. Dagegen wiesen RANTES, MIP-1 α und -1 β in vivo erhöhte mRNA-Raten im Vergleich zur *H.-pylori*-negativen Gruppe auf. Auch die In-vitro-Versuche mit AGS-Zellen legten für MIP-1 α und -1 β ihre Induzierbarkeit durch das Bakterium dar, wenn auch für MIP-1 β in einem geringeren Ausmaß als für MIP-1 α und die beiden CXC-Chemokine. Für RANTES konnte in vitro keine Zunahme der Transkription durch den lebenden Keim gemessen werden, jedoch ist dies, wie aus Untersuchungen einer anderen Epithelzelllinie eines Magenkarzinoms (MKN45) bekannt ist, auf die unterschiedliche Ausstattung der beiden Zelllinie mit Toll-Like-Rezeptoren (TLR) zurückzuführen.

Die Resultate der In-vivo- und In-vitro-Versuche lassen sich bezüglich des Ablaufs einer *H.-pylori*-assoziierten Gastritis wie folgt einordnen: *H. pylori* induziert durch seinen unmittelbaren Kontakt mit dem Magenepithel in einer ersten Phase vor allem die CXC-

Chemokine IL-8 und ENA-78, in deren Folge es zur Infiltration mit neutrophilen Granulozyten kommt und eine akute Gastritis ausgelöst wird. Insbesondere ist anzunehmen, dass ENA-78 durch seine verzögerte, aber länger anhaltende Bildung im Vergleich zu IL-8 auch in der chronischen Phase eine wichtige Rolle spielt, indem es zu einer anhaltenden Infiltration mit neutrophilen Granulozyten beiträgt. Zu einem geringeren Grad bildet das Magenepithel aber auch CC-Chemokine, wie RANTES, MIP-1 α und -1 β , so dass es zusätzlich nach und nach zu einer Infiltration mit mononukleären Leukozyten kommt. Im weiteren Krankheitsverlauf der Gastritis gewinnen nun auch andere Einflussgrößen an Bedeutung. So ist anzunehmen, dass im Rahmen des Entzündungsprozesses die Schrankenfunktion des Magenepithels weiter geschädigt wird und zunehmend lösliche bakterielle Produkte die Magenmukosa infiltrieren, um verschiedenste Leukozyten anzulocken oder vorhandene zur Produktion von Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen anzuregen. Dies führt zu einer weiteren Vermehrung an mononukleären Leukozyten, die schließlich das Bild einer chronisch-aktiven Gastritis prägen. Inwiefern dieses Zellbild im weiteren Verlauf zu einer atrophischen Gastritis beiträgt, wäre in weiteren Forschungsprojekten nachzugehen, um auch den Prozess der Krankheitsprogression und der damit verbunden Folgeerkrankungen weiter aufzuklären.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Zielsetzung dieser Arbeit richtete sich auf die Pathophysiologie und insbesondere auf den Ablauf einer *H. pylori*-induzierten Gastritis. Da *H. pylori* als ein nicht-invasives Pathogen gilt, wurde insbesondere der Frage nachgegangen, wie die lokale Entzündung durch die Interaktion des Epithels mit dem Keim vermittelt werden kann und vor allem welche Chemokine während der akuten und chronischen Phase einer Gastritis als Mediatoren eine Rolle spielen könnten. Hierzu wurde eine Auswahl an CXC- und CC-Chemokinen in vivo und in vitro mit folgenden Ergebnissen untersucht:

Die beiden CXC-Chemokine IL-8 (CXCL8) und ENA-78 (CXCL5) zeigten in Magenbiopsien des untersuchten *H. pylori*-positiven Kollektivs eine statistisch signifikant gesteigerte Transkriptionsrate im Vergleich zur *H. pylori*-negativen Gruppe. Die quantitative RT-PCR von ENA-78 verzeichnete in der Gruppe der *H. pylori*-infizierten Personen einen Anstieg der Transkripte um den Faktor 46 im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe. Ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der mRNA-Kopien und dem Aktivitätsgrad der Gastritis konnte weder in der semi- noch der quantitativen Bestimmung nachgewiesen werden.

Ausgehend von diesen in vivo Untersuchungen wurde dann in einer Zellkultur versucht, diesen Effekt weiter zu erklären.

Die an einer Epithelzelllinie eines Magenkarzinoms (AGS) durchgeführten In-vitro-Stimulierungsversuche wiesen in gleichem Ausmaß sowohl für IL-8 als auch für ENA-78 ihre Induzierbarkeit durch das lebende Bakterium nach. Die in diesem Rahmen durchgeführten Messungen ihrer mRNA-Raten über die Zeit, präsentierten für IL-8 eine schnellere Induktion mit einem Höhepunkt nach 40 Minuten und einen rascheren Abfall im Vergleich zu ENA-78. Hingegen ließ sich für ENA-78 eine verzögerte mRNA-Produktion mit einem Maximum nach 90 Minuten und ein langsamerer Rückgang beobachten.

Für die CC-Chemokine RANTES (CCL5), MIP-1 α und -1 β (CCL3 und -4) fand sich bei *H. pylori*-positiven im Vergleich zum *H. pylori*-negativen Personen ein statistisch signifikanter Anstieg ihrer mRNA-Transkriptionsrate. Auch die In-vitro-Stimulierungsversuche zeigten für MIP-1 α in ähnlichem Ausmaß wie für IL-8 und ENA-78 und in geringerem Maße für MIP-1 β ihre Induzierbarkeit in AGS-Zellen durch das lebende Bakterium und einer Aufbereitung der Bakterienmembran. Dadurch ist anzunehmen, dass neben CD68+ Makrophagen auch das Magenepithel durch seinen direkten Kontakt mit dem lebenden Keim zu der in vivo erhöht nachgewiesenen mRNA-Rate beiträgt. Im Gegensatz dazu ließ sich in vitro die Anzahl an

RANTES Molekülen nur durch die äußere Membran (OMP), aber nicht durch den lebenden Keim induzieren. Diese Diskrepanz lässt sich aber dadurch erklären, dass TLR2 auf AGS-Zellen nicht exprimiert wird. Somit kann davon ausgegangen werden, dass neben den in der Literatur erwähnten eosinophilen Granulozyten auch das Mageneithel als Produktionsort zu einer gesteigerten Transkription von RANTES *in vivo* beisteuert.

Das CCL Chemokin MCP-1 (CCL2) wurde dagegen konstitutiv in Biopsien der untersuchten Studienteilnehmer gefunden und ließ sich auch in AGS-Zellen nicht induzieren, so dass gemäß diesem Ergebnis davon ausgegangen wird, dass MCP-1 innerhalb der Pathogenese einer *H. pylori*-induzierten Gastritis keine bzw. eine nur untergeordnete Rolle spielt.

Die Resultate der In-vivo- und In-vitro-Versuche lassen sich bezüglich des Ablaufs einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis wie folgt einordnen: *H. pylori* induziert durch seinen unmittelbaren Kontakt mit dem Mageneithel in einer ersten Phase vor allem die CXC-Chemokine IL-8 (CXCL8) und ENA-78 (CXCL5). Als deren Folge kommt es zur Infiltration mit neutrophilen Granulozyten, welche eine akute Gastritis auslösen. Die verzögerte Freisetzung von ENA-78 kann dann im Anschluss zu einer Chronifizierung beitragen, indem es zu einer anhaltenden Infiltration mit neutrophilen Granulozyten führt. Daneben bildet das Mageneithel aber auch in einem geringeren Ausmaß CC-Chemokine wie RANTES (CCL5), MIP-1 α und -1 β (CCL3 und -4), so dass es zusätzlich nach und nach zu einer Infiltration mit mononukleären Leukozyten kommt. Im weiteren Krankheitsverlauf der Gastritis werden nun auch andere Einflussgrößen an Bedeutung gewinnen. So ist davon auszugehen, dass im Rahmen des Entzündungsprozesses die Schrankenfunktion des Mageneithels weiter geschädigt wird und zunehmend lösliche bakterielle Produkte die Magenmukosa infiltrieren, um verschiedenste Leukozyten anzulocken oder vorhandene zur Produktion von Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen anzuregen. Dies wird zu einer weiteren Vermehrung an mononukleären Leukozyten führen, die schließlich das Bild einer chronisch-aktiven Gastritis prägen.

6 TABELLENVERZEICHNIS

Seite

Tab. 1:	Auswahl an CXC- und CC-Chemokinen	10
Tab. 2:	Auswahl an Chemokin-produzierenden Zellen	11
Tab. 3:	Übersicht über Chemokine und ihre Beteiligung an einzelnen Krankheitsbildern beim Menschen	13
Tab. 4:	Amplikongröße und Primersequenzen	19
Tab. 5:	Amplifizierungsbedingungen der semiquantitativen RT-PCR	21
Tab. 6:	Negativ- und Positivkontrollen	22
Tab. 7:	Zusammensetzung der TAE-Pufferlösung (50-fach)	22
Tab. 8:	Amplifizierungsbedingungen der kompetitiven PCR	26
Tab. 9:	Wilkins-Chalgren-Agar (WC)	27
Tab. 10:	<i>H.-pylori</i> -Selektiv-Supplement (Dent)	27
Tab. 11:	WC-Dent-Nährboden	28
Tab. 12:	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS, 10-fach)	28
Tab. 13:	Studienteilnehmer	31
Tab. 14:	Histologische Befunde der Studienteilnehmer	32
Tab. 15:	Ergebnisse der quantitativen RT-PCR von <i>H.-pylori</i> -negativen Studienteilnehmern	46
Tab. 16:	Ergebnisse der quantitativen RT-PCR von <i>H.-pylori</i> -positiven Studienteilnehmern mit einer geringgradig aktiven Gastritis	47
Tab. 17:	Ergebnisse der quantitativen RT-PCR von <i>H.-pylori</i> -positiven Studienteilnehmern mit einer mittelgradig aktiven Gastritis	48
Tab. 18:	Ergebnisse der quantitativen RT-PCR von <i>H.-pylori</i> -positiven Studienteilnehmern mit einer hochgradig aktiven Gastritis	49

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	Seite
Abb. 1: Agarosegel (1,5%) der RT-PCR-Produkte von GAPDH mRNA aus Magenbiopsien	33
Abb. 2: Agarosegel (1,5%) der RT-PCR-Produkte von IL-8 mRNA aus Magenbiopsien	34
Abb. 3: Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von IL-8 mRNA (obere Bandenreihe von Abb. 2) aus Magenbiopsien	34
Abb. 4: Agarosegel (1,5%) der RT-PCR-Produkte von ENA-78 mRNA aus Magenbiopsien	35
Abb. 5: Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von ENA-78 mRNA (obere Bandenreihe von Abb. 4) aus Magenbiopsien	35
Abb. 6: Box-Plot der densitometrischen Messwerte von IL-8 mRNA (Abb. 3) für <i>H.-pyl.</i> -neg. und <i>H.-pyl.</i> -pos. Personen (* $U < U_{crit}$: siehe Text)	36
Abb. 7: Box-Plot der densitometrischen Messwerte von ENA-78 mRNA (Abb. 5) für <i>H.-pyl.</i> -neg. und <i>H.-pyl.</i> -pos. Personen (* $U < U_{crit}$: siehe Text)	36
Abb. 8: Agarosegel (1,2%) der RT-PCR-Produkte von MIP-1 α mRNA aus Magenbiopsien	38
Abb. 9: Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von MIP-1 α (Abb. 8) aus Magenbiopsien	38
Abb. 10: Agarosegel (1,2%) der RT-PCR-Produkte von MIP-1 β mRNA aus Magenbiopsien	39
Abb. 11: Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von MIP-1 β mRNA (Abb. 10) aus Magenbiopsien	39
Abb. 12: Agarosegel (1,0%) der RT-PCR-Produkte von RANTES mRNA aus Magenbiopsien	40
Abb. 13: Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von RANTES mRNA (Abb. 12) aus Magenbiopsien	40
Abb. 14: Agarosegelbild (1,0%) der RT-PCR-Produkte von MCP-1 mRNA aus Magenbiopsien	41
Abb. 15: Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von MCP-1 mRNA (Abb. 14) aus Magenbiopsien	41

Abb. 16:	Box-Plot der densitometrischen Messwerte von MIP-1 α mRNA (Abb. 9) für <i>H.-pyl.-neg.</i> und <i>H.-pyl.-pos.</i> Personen (*U<U _{crit} : siehe Text)	42
Abb. 17:	Box-Plot der densitometrischen Messwerte von MIP-1 β mRNA (Abb. 11) für <i>H.-pyl.-neg.</i> und <i>H.-pyl.-pos.</i> Personen (*U<U _{crit} : siehe Text)	42
Abb. 18:	Box-Plot der densitometrischen Messwerte von RANTES mRNA (Abb. 13) für <i>H.-pylori-neg.</i> und <i>H.-pylori-pos.</i> Personen (*U<U _{crit} : siehe Text)	43
Abb. 19:	Box-Plot der densitometrischen Messwerte von MCP-1 mRNA (Abb. 15) für <i>H.-pylori-negative</i> und <i>H.-pylori-positive</i> Personen	43
Abb. 20:	Agarosegelbild (1,0%) der RT-PCR-Produkte von GAPDH mRNA aus Magenbiopsien	44
Abb. 21:	Anzahl an ENA-78 mRNA Transkripten von <i>H.-pylori-negativen</i> und -positiven Personen	50
Abb. 22:	Box-Plot der Anzahl an ENA-78 mRNA Transkripten für <i>H.-pylori-neg.</i> und <i>H.-pylori-pos.</i> Personen (*P < 0,05: siehe Text)	51
Abb. 23:	Agarosegelbild (1,0%) der RT-PCR-Produkte von GAPDH mRNA aus AGS-Zellen	52
Abb. 24:	Agarosegelbild (1,5%) der RT-PCR-Produkte von IL-8 mRNA aus AGS-Zellen	53
Abb. 25:	Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von IL-8 mRNA (obere Bandenreihe von Abb. 24) aus AGS-Zellen	53
Abb. 26:	Agarosegelbild (1,5%) der RT-PCR-Produkte von ENA-78 mRNA aus AGS-Zellen	54
Abb. 27:	Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von ENA-78 mRNA (Abb. 26) aus AGS-Zellen	54
Abb. 28:	Agarosegelbild (1,0%) der RT-PCR-Produkte von MIP-1 α mRNA aus AGS-Zellen	55
Abb. 29:	Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von MIP-1 α mRNA (Abb. 28) aus AGS-Zellen	55
Abb. 30:	Agarosegelbild (1,2%) der RT-PCR-Produkte von MIP-1 β mRNA aus AGS-Zellen	56

Abb. 31:	Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von MIP-1 β mRNA (Abb. 30) aus AGS-Zellen	56
Abb. 32:	Agarosegelbild (1,5%) der RT-PCR-Produkte von RANTES mRNA aus AGS-Zellen	57
Abb. 33:	Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte von RANTES mRNA (obere Bandenreihe von Abb. 32) aus AGS-Zellen	57
Abb. 34:	Agarosegelbild (1,35%) der RT-PCR-Produkte von MCP-1 mRNA aus AGS-Zellen	58
Abb. 35:	Agarosegelbild (1%) der RT-PCR-Produkte von GAPDH mRNA aus AGS-Zellen	59
Abb. 36:	Agarosegelbild (1%) der RT-PCR-Produkte von IL-8 mRNA aus AGS-Zellen	60
Abb. 37:	Densitometrische Messwerte der RT-PCR-Produkte von IL-8 mRNA (Abb. 36) aus AGS-Zellen	60
Abb. 38:	Agarosegelbild der RT-PCR-Produkte von ENA-78 mRNA aus AGS-Zellen	61
Abb. 39:	Densitometrische Messwerte der RT-PCR-Produkte von ENA-78 mRNA (Abb. 38) aus AGS-Zellen	61

8 LITERATURVERZEICHNIS

Asahi, M., T. Azuma, S. Ito, Y. Ito, H. Suto, Y. Nagi, M. Tsubokawa, Y. Tohyama, S. Maeda, M. Omata, T. Suzuki, C. Sasakawa (2000)

Helicobacter pylori Cag A protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells.
J. Exp. Med. 191:593-602

Atherton, J. C., P. Cao, R. M. Peek Jr., M. K. Tummuru, M. J. Blaser, T. L. Cover (1995)

Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration.

J. Biol. Chem. 270:17771-7777

Backert St., M. Selbach (2008)

Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis.

Cell Microbiol. 10(8):1573-81

Baggiolini, M., B. Dewald, B. Moser (1994)

Interleukin-8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines

Adv. Immunol. 55:97-179

Baggiolini, M. (1998)

Chemokines and leukocyte traffic.

Nature 392:565-568

Baggiolini, M. (2001)

Chemokines in pathology and medicine

Journal of Internal Medicine 250:91-104

Bamford, K. B., J. Bickley, J. S. A. Collins, B. T. Johnson, S. Potts, V. Boston, R. J. Owen, J. M. Sloan (1993)

Helicobacter pylori: comparison of DNA fingerprints provides evidence for intrafamilial infection.

Gut 34:1348-1350

Banatvala, N., K. Mayo, F. Mégraud, R. Jennings, J. J. Deeks, R. A. Feldman (1993)

The cohort effect and *Helicobacter pylori*.

J. Infect. Dis. 168:219-21

Bayerdörffer E., N. Lehn, R. Hatz, G. A. Mannes, H. Oertel, T. Sauerbruch, M. Stolte (1992)

Difference in expression of *Helicobacter pylori* gastritis in antrum and body.

Gastroenterology 102(5):1575-82

Becker, S., H. S. Koren, D. C. Henke (1993)

Interleukin-8 expression in normal nasal epithelium and its modulation by infection with respiratory syncytial virus and cytokines tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6.

Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:20-27

- Beswick, E. J., D. A. Bland, G. Suarez, C. A. Barrera, X. Fan, V. E. Reyes (2005a)**
Helicobacter pylori binds to CD74 on gastric epithelial cells and stimulates interleukin-8 production.
Infect. Immun. 73:2736-43
- Beswick, E. J., S. Das, I. V. Pinchuk et al. (2005b)**
Helicobacter pylori-induced IL-8 production by gastric epithelial cells up-regulates CD74 expression.
J. Immunol. 175:171-176
- Beswick, E. J., I. V. Pinchuk, K. Minch, G. Suarez, J. C. Sierra, Y. Yamaoka, V. E. Reyes (2006)**
The *Helicobacter pylori* urease B subunit binds to CD74 on gastric epithelial cells and induces NF- κ B activation and interleukin-8 production.
Infect. Immun. 74:1148-55
- Beutler B. (2000a)**
Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity.
Curr. Opin. Microbiol. 3:23
- Beutler B. (2000b)**
Tlr4:central component of the sole mammalian LPS sensor.
Curr. Opin. Immunol. 12:20
- Bliss, C. M., Jr., D. T. Golenbock, S. Keates, J. K. Linevsky, C. P. Kelly (1998)**
Helicobacter pylori lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78 and monocyte chemotactic protein 1 by human monocytes.
Infect. Immun. 66:5357-5363
- Boltshauser, S., D. Herzog (1999)**
Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic 5-7 year old children in St. Gallen canton.
Schweiz. Med. Wochenschr. 129:579-584
- Bortz, J., G. A. Lienert (1998)**
Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung
1. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- Braford, M. M. (1976)**
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Anal. Biochem. 72:248-254
- Brandt, S., T. Kwok, R. Harting, W. König, St. Backert (2005)**
NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein.
Pros. Natl. Acad. Sci. USA 102:9300-9305

- Brenner, H., D. Rothenbacher, G. Bode, R. Gommel, G. Berg, G. Adler (1998)**
Parental smoking and infection with *Helicobacter pylori* among pre-school children in Southern Germany.
Epidemiology 9:545-549
- Brenner, H., G. Bode, G. Adler, D. Rothenbacher (2000)**
Does maternal smoking hinder mother-child transmission of *Helicobacter pylori*?
Epidemiology 11:71-75
- Censini, S., C. Lange, Z. Xiang, J. E. Crabtree, P. Ghiara, M. Borodovsky, R. Rappuoli, A. Covacci (1996)**
Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14648-653
- Corbett, M. S., I. Schmitt, O. Riess, A. Walz (1994)**
Characterization of the gene for human neutrophil-activating peptide 78 (ENA-78)
Biophys. Res. Commun. 205 :612-617
- Covacci, A., S. Censini, M. Bugnoli, R. Petracca, D. Burroni, G. Macchia, A. Massone, E. Papini, Z. Xiang, F. Figura, R. Rappuoli (1993)**
Molecular characterisation of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5791-5795
- Covacci, A., A. Rappuoli (2000)**
Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: trojan horses for the host cell.
J. Exp. Med. 191:587-592
- Cover, T. L., M. J. Blaser (1992)**
Purification and characterisation of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*.
J. Biol. Chem. 267:10570-575
- Cover, T. L., L. Y. Reddy, M. J. Blaser (1993)**
Effects of ATPase inhibitors on the response of HeLa cells to *Helicobacter pylori* vacuolating toxin.
Infect. Immun. 61:1427-1431
- Cover, T. L., P. I. Hanson, J. E. Heuser (1997)**
Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin, reveals its pattern of assembly.
J. Cell Biol. 138:759-769
- Crabtree, J. E., T. M. Shallcross, R. V. Heatly, J. I. Wyatt (1991)**
Mucosal tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis.
Gut 44:768-71
- Crabtree, J. E., P. Peichl, J. I. Wyatt, U. Stachl, I. J. Lindley (1993)**
Gastric interleukin-8 and IgA IL-8 autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection.
Scand. J. Immunol. 37:65-70

Crabtree, J. E., J. I. Wyatt, L. K. Tredjosiewicz, P. Peichl, P. H. Nichols, N. Ramsay, J. N. Pimrose, I. J. D. Lindley (1994)

Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal and neoplastic gastroduodenal mucosa.

J. Clin. Pathol. 47:61-66

Crabtree, J. E., A. Covacci, S. M. Farmery, Z. Xiang, D. S. Tompkins, S. Perry, I. J. Lindley, R. Rappuoli (1995)

Helicobacter pylori induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with Cag A positive phenotype.

J. Clin. Pathol. 48:41-45

Crabtree, J. E., Z. Xiang, I. J. D. Lindley, D. S. Tompkins, R. Rappuoli, A. Covacci (1995)

Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by Cag A negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*.

J. Clin. Pathol. 48:967-969

Crabtree, J. E., D. Kersulyte, S. D. Li, I. J. Lindley, D. E. Berg (1999)

Modulation of *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 synthesis in gastric epithelial cells mediated by PAI encode VirD4 homologue.

J. Clin. Path. 52:653-657

Craig, P. M., M. C. Territo, W. E. Karnes, J. H. Walsh (1992)

Helicobacter pylori secretes a chemotactic factor for monocytes and neutrophils.

Gut 33:1020-1023

Crowe, S. E. L., Alvarez, M. Dytoc, R. H. Hunt, M. Muller, P. Sherman, J. Patel, Y. Jin, P. B. Ernst (1995)

Expression of interleukin-8 and CD54 by human gastric epithelium after *Helicobacter pylori* infection in vitro.

Gastroenterology 108:65-74

Cullen, D. J., B. J. Collins, K. J. Christiansen et al. (1994)

When is *Helicobacter pylori* infection acquired ?

Gut 34:1681-82

Dixon, M. F., R. M. Genta, J. H. Yardley, P. Correa (1996)

Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994.

Am. J. Surg. Pathol. 20:1161-1181

Doig, P., T. J. Trust (1994)

Identification of surface-exposed outer membran proteins.

Infect. Immun. 62:4526-4533

Dytoc, M., B. Gold, M. Louie, M. Heusca, L. Fedorko, S. E. Crowe, et al. (1992)

Comparison of *Helicobacter pylori* and attaching-effacing *Escherichia coli* adhesion to eukaryotic cells.

Infect. Immun. 61:448-456

Eckmann, L., M. F. Kagnoff, J. Fierer (1993)

Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry.
Infect. Immun. 61:4569-4574

Eckmann, L. H. C. Jung, C. Schurer-Maly, A. Panja, E. Morzycka-Wroblewska, M. F. Kagnoff (1993)

Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8.
Gastroenterology 105:1689-1697

Enders, G., W. Brooks, N. von Jan, N. Lehn, E. Bayerdorffer, R. Hatz (1995)

Expression of adhesion molecules on human granulocytes after stimulation with *Helicobacter pylori* membrane proteins: comparison with membrane proteins from other bacteria.
Infect. Immun. 63:2473-2477

Ernst, P.B., G.B. Gold (2000)

The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer.
Annu. Rev. Microbiol. 54:615-40

The EUROGAST Study Group (1993)

Epidemiology of, and risk factors for, *Helicobacter pylori* infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations.
Gut 34: 1672-1676

Evans, D. J., D. G. Evans, T. Takemura, H. Nakano, H. C. Lampert, D. Y. Graham, D. N. Granger, P. R. Kviety (1995)

Characterisation of *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein.
Infect. Immun. 63:2213-2220

Fan, X. G., A. Chua, X. J. Fan, P. W. Keeling (1995)

Increased gastric production of interleukin-8 and tumor necrosis factor in patients with *Helicobacter pylori* infection.
J. Clin. Pathol. 48:133-136

Feldman, R. A., J. J. Deeks, J. J. W. Evans (1995)

The *Helicobacter pylori* serology study group. Multi laboratory comparison of eight commercially available *Helicobacter pylori* serology kits.
Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis. 14:428-433

Fischer, W., J. Püls, R. Buhrdorf, B. Gebert, S. Odenbreit, R. Haas (2001)

Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8.
Mol. Microbiol. 42:1337-1348

Ford, A., B. Delaney, D. Forman, P. Moayyedi (2004)

Eradication therapy for peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori* positive patients.
Cochrane Database Syst. Rev. CD003840

Galmiche, A., J. Rassow, A. Doye, et al. (2000)

The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release.
EMBO J. 19:6361-70

Gerad, C., B. J. Rollins (2001)

Chemokines and disease
Nature immunology 2:108-15

Ghiara P., M. Marchetti, M. J. Blaser, M. K. Tummuru, et al. (1995)

Role of *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, CagA, and urease in a mouse model of disease.
Infect. Immun. 63:4154

Gilliland, G., S. Perrin, H. F. Bunn (1990)

Competitive PCR for quantitation of mRNA
In: PCR protocols. Herausgegeben von Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White
Academic Press, Inc., San Diego, Calif.:60-69

Grimm, W., W. Fischbach (2003)

Helicobacter pylori infection in children and juveniles: an epidemiological study on prevalence socio-economic factors and symptoms.
Dtsch. Med. Wochenschr. 128:1878-1883

Gurunge, J. L., P. G. Falk, R. G. Lorenz, M. Dans, H. P. Wirth, M. J. Blaser et al. (1998)

Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3925-3930

Hatz, R. A., W. P. Brooks, H. J. Krämling, G. Enders (1992)

Stomach immunology and *Helicobacter pylori* infection.
Curr. Opin. Gastroenterol. 8:993-1001

Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. c. Yi et al. (2001)

The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by toll-like receptor 5.
Nature 410(6832):1099-103

Hedges, S., M. Svensson, C. Svanborg (1992)

Interleukin-6 response of epithelial cell lines to bacterial stimulation in vitro.
Infect Immun 60:1295-1301

Hemalatha, S. G., B. Drumm, P. M. Sherman (1991)

Adherence of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelial cells in vitro.
J. Med. Microbiol. 35:197-202

Higashi, H., R. Tsutsumi, S. Muto, T. Sugiyama, T. Azuma, et al. (2002)

SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein.
Science 295:683-686

Huang, J., P. W. O'Toole, P. Doig, T. J. Trust (1995)

Stimulation of interleukin-8 production in epithelial cell lines by *Helicobacter pylori*.
Infect. Immun. 63:1732-1738

Ilver D., A. Arnquist, J. Ogren, M Frick, D. Kersulyte, et al. (1998)

Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging.

Science 279: 373-377

Innocenti, M., A.-M. Svennerholm, M. Quiding-Järbrink (2001)

Helicobacter pylori lipopolysaccharides preferentially induce CXC chemokine production in human monocytes.

Infect. Immun. 69:3800-08

International Agency for Research on Cancer, World Health Organisation (1994)

Infection with *Helicobacter pylori*, Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori* Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 60: 177-240

Ishihara, S., M. A. K. Rumi, Y. Kadowaki, C. F. Ortega-Cava et al. (2004)

Essential role of MD-2 in TLR4-dependent signaling during *Helicobacter pylori*-associated gastritis.

J. Immunol. 173:1406-16

Josenhans, J., S. Suerbaum (1997)

Flagella and motility of *Helicobacter pylori*

In: Pathogenesis and Host Response in *Helicobacter pylori* Infections. Herausgegeben von Moran, A. P., C. A. O'Morain, Normed Verlag GmbH, Bad Homburg:6-15

Jung, H. C., J. M. Kim, I. S. Song, C. Y. Kim (1997)

Helicobacter pylori induces an array of pro-inflammatory cytokines in human gastric epithelial cells: quantification of mRNA for interleukin-8, -1 alpha/beta, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha.

J. Gastroenterol. Hepatol. 12(7):473-80

Kamiya, S., H. Yamaguchi (2002)

Adherence properties of *Helicobacter pylori* to gastric cell

In: *Helicobacter pylori* Infection and Immunity, Herausgegeben von Yamamoto, Y., H. Friedman, P. Hoffman, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York:121-134

Kasai, K., T. Yoshikawa, N. Yoshida, A. Hashiramoto, M. Kondo, H. Murase (1999)

Helicobacter pylori water extract induces interleukin-8 production by gastric epithelial cells.

Dig. Dis. Sci. 44:237-242

Keates, S., A. C. Keates, E. Mizoguchi, A. Bhan, C.P. Kelly (1997a)

Enterocytes are the primary source of the chemokine ENA-78 in normal colon and ulcerative colitis.

Am. J. Physiol. 273:G75-G82

Keates, S., Y. S. Hitti, M. Upton, C. P. Kelly (1997b)

Helicobacter pylori infection activates NF-κB in gastric epithelial cells.

Gastroenterology 113:1099-1109

Kim, J. K., J. S. Kim, J. Y. Lee, Y.-J. Kim, H.-J. Youn, I. Y. Kim, Y. J. Chee et al. (2007)
 Vacuolating cytotoxin in *Helicobacter pylori* water-soluble proteins upregulates chemokine expression in human eosinophils via Ca^{2+} influx, mitochondrial reactive oxygen intermediates and NF- κ B activation.
 Infect. Immun. 75:3373-81

Kivi, M., Y. Tindberg, M. Sörberg, T. H. Casswall, R. Befrits et al. (2003)
 Concordance of *Helicobacter pylori* strains within families.
 J. Clin. Microbiol. 41:5604-5608

Kivi, M., A. L. Johansson, M. Reilly, Y. Tindberg (2005)
Helicobacter pylori status in family members as risk factors for infection in children.
 Epidemiol. Infect. 133:645-52

Kivi, M., Y. Tindberg (2006)
Helicobacter pylori occurrence and transmission: A family affair?
 Scand. J. Infect. Dis. 38:407-17

Koch, A. E., S. L. Kunkel, L. A. Harlow, D. D. Mazarakis, G. K. Haines, M. D. Burdick, R. M. Pope, A. Walz, R. M. Strieter (1994a)
 Epithelial neutrophil activating peptide-78: a novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis.
 J. Clin. Investig. 94:1012-1018

Koch, A. E., S. L. Kunkel, L. A. Harlow, D. D. Mazarakis, G. K. Haines, M. D. Burdick, R. M. Pope, R. M. Strieter (1994b)
 Macrophage inflammatory protein-1 alpha. A novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis.
 J. Clin. Invest. 93(3):921-8

Koch, A. E., S. L. Kunkel, M. R. Shah, D. D. Mazarakis, G. K. Haines, M. D. Burdick, R. M. Pope, R. M. Strieter (1995)
 Macrophage inflammatory protein-1 beta: a C-C chemokine in osteoarthritis.
 Clin. Immunol. Immunopathol. 77(3):307-14

Konno, M., N. Fujii, S. Yokata, K. Sato, M. Takahashi, E. Mino, T. Sugiyama (2005)
 Five-year follow-up study of mother-to-child-transmission of *Helicobacter pylori* infection detected by a random amplified polymorphic DNA fingerprinting method.
 J. Clin. Microbiol. 43:2246-50

Krientz, U. (1906)
 Über das Auftreten von Spirochaeten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi.
 Dt. Med. Wschr. 22: 872-882

Kudo, T., L. Hong, J. Y. Wu, D. Y. Graham, A. Casola, Y. Yamaoka (2005)
 Regulation of RANTES promoter activation in gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*.
 Infect. Immun. 73:7602-12

Kuipers, E. J., J. C. Thijs, H. P. Festen (1995a)

The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease.
Aliment. Pharmacol. Ther. 9(Suppl. 2): 59-69

Kuipers, E. J., A. M. Uytterlinde, A. S. Pena, H. J. Hazenberg, E. Bloemena, et al. (1995b)

Increase of *Helicobacter-pylori*-associated corpus gastritis during acid suppressive therapy: implications for long-term safety.
Am. J. Gastroenterol. 90:1401-1406

Kuipers, E. J., A. M. Uytterlinde, A. S. Pena, R. Roosendaal, G. Pals, et al. (1995c)

Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis.
Lancet 345:1525-28

Kuipers, E. J. (1999)

Review article : exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer.
Aliment. Pharmacol. Ther. 13:3-12

Kusters, J. G., A. H. M. van Vliet, E. J. Kuipers (2006)

Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection.
Clin. Microbiol. Rev. 19(3):449-90

Kusugami, K., T. Ando, A. Imada, K. Ina, M. Ohsuga, et al. (1999)

Mucosal macrophage inflammatory protein- α activity in *Helicobacter pylori* infection.
J. Gastro. Hepatol. 14:20-26

Kwok, T., D. Zabler, S. Urman, M. Rohde, R. Hartig, S. Wessler, et al. (2007)

Helicobacter exploits integrin for type IV secretion and kinase activation.
Nature 449:862-866

Lee, N., T. T. Lee, K. M. Fang (1994)

Assessment of four rapid urease test systems for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens.
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 18:69-74

Leunk, R. D., P. T. Johnson, B.C. David, W. G. Kraft, D.R. Morgan (1988)

Cytotoxin activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*
J. Med. Microbiol. 26:93-99

Leung, W. K., K. L. Siu, C. K. Kwok, Y. Chan, R. Sung, J. J. Sung (1999)

Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission.
Am. J. Gastroenterol. 94:2881-84

Li, S. D., D. Kersulyte, I. J. D. Lindley, B. Neelam, D. E. Berg, J. E. Creabtree (1999)

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 gastritis epithelial cells.
Infect. Immun.67:3893-99

Lupetti, P., J. E. Heuser, R. Manetti, S. Lanzavecchia, P. L. Bellon, R. Dalai, Rappuoli, J. L. Telford (1996)

Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin.
J. Cell. Biol. 133:801-807

Mai, U. E., G. I. Perez-Perez, L. M. Wahl, S. M. Wahl, M. J. Blaser, P. D. Smith (1991)

Soluble surface proteins from *Helicobacter pylori* activate monocytes/macrophages by lipopolysaccharide-independent mechanism.
J. Clin. Invest. 87:894-900

Mai, U. E., G. I. Perez-Perez, J. B. Allen, S. M. Wahl, M. J. Blaser, P. D. Smith (1992)

Surface proteins from *Helicobacter pylori* exhibit chemotactic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa.
J. Exp. Med. 175:517-525

Matsusaka, T., K. Fujikawa, Y. Nishio, N. Mukaida, et al. (1993)

Transcription factors NF-IL6 and NF- κ B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10193-97

McCormick, B. A., S. P. Cogle, C. Delp-Archer, S. I. Miller, J. L. Madara (1993)

Salmonella typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils.
J. Cell. Biol. 123:895-907

McCormick, B. A., P. M. Hofmann, J. Kim, D. K. Carnes, S. I. Miller, J. L. Madara (1995)

Surface attachment of *Salmonella typhimurium* to intestinal epithelia imprints the subepithelial matrix with gradients chemotactic for neutrophils.
J. Cell. Biol. 131:1599-1608

Medzhitov, R., C. Janeway (2000)

The toll receptor family and microbial recognition (2000)
Trends Microbiol. 8:452-6

Mégraud, F., T. Matysiak (2002)

Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection

In: *Helicobacter pylori* Infection and Immunity, Herausgegeben von Yamamoto, Y., H. Friedman, P. Hoffman, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York:19-34

Mobley, H. L. T., J. Fulkerson Jr., J. K. Hendricks (1997)

Expression of catalytically active urease by *Helicobacter pylori*.

In: Pathogenesis and Host Response in *Helicobacter pylori* Infections. Herausgegeben von Moran, A. P., C. A. O'Morain, Normed Verlag GmbH, Bad Homburg:58-66

Mori, N., A. M. Krensky, R. Geleziunas, A. Wada, T. Hirayama, C. Sasakawa, N. Yamamoto (2003)

Helicobacter pylori induces RANTES through activation of NF- κ B.
Infect. Immun. 71:3748-55

Mueller, S., E. Seifert, M. Stolte (1999)

Simultaneous MALT-type lymphoma and early adenocarcinoma of the stomach.
Z. Gastroenterol. 37:153-157

Mukaida, N., S. Okamoto, Y. Ishikawa, K. Matsushima (1994)

Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression.
J. Leukoc. Biol. 56:554-558

Nilius, M., A. Leodolter, P. Malferheiner (2000)

Diagnostische Verfahren bei *Helicobacter pylori* Infektion
In: *Helicobacter pylori* - Von der Grundlage zur Therapie. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag
Stuttgart:147-156

Noach, L. A., N. B. Bosma, J. Jansen, F. J. Hoek, S. J. H. van Deventer, G. Tytgat (1994)

Mucosal tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection.
Scand. J. Gastroenterol. 29:425-9

Nomura, A., G. N. Stemmermann, P. H. Chyou, I. Kato, G. I. Perez-Perez, M. J. Blaser (1991)

Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii.
N. Engl. J. Med. 325:1132-1136

Nufer, O., M. Corbett, A. Walz (1999)

Amino-terminal processing of chemokine ENA-78 regulates biological activity.
Biochemistry 38:636-642

Odenbreit, S., J. Püls, B. Sedlmaier, E. Berland, W. Fischer, R. Haas (2000)

Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion.
Science 287:1497-1500

Padrines, M., M. Wolf, A. Walz, M. Baggiolini (1994)

Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3.
FEBS Lett. 352:231-235

Pagliaccia, C., M. de Bernard, P. Lupetti, X. Ji., D. Burrone, T. L. Cover, E. Papini, R. Rappuoli, J. L. Telford, J. M. Reytrat (1998)

The m2 form of *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell-type specific vacuolating activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995:10212-10217

Pan, Z. J., R. W. M. van der Hulst, M. Feller, S.-D. Xiao, G. N. J. Tygat, J. Dankert, A. van der Ende (1997)

Equally high prevalences of infection with *cagA*-positive *Helicobacter pylori* in Chinese with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis-associated dyspepsia.
J. Clin. Microbiol. 35:1344-1347

Papini, E., M. Bugnoli, M. de Bernard, N. Figura, R. Rappuoli, C. Montecucco (1993)

Bafomycin A1 inhibits *Helicobacter pylori*-induced vacuolization of HeLa cells.
Mol. Microbiol. 7:323-327

Parsonnet, J., G. D. Friedmann, D. P. Vandersteen, Y. Chang, J. H. Vogelman, N. Orentreich, R. K. Sibley (1991)

Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma.

N. Engl. J. Med. 325: 1127-1131

Parsonnet, J., H. Shmuely, T. Haggerty (1999)

Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults.

JAMA 282:2240-45

Peek, R. M., Jr., G. G. Miller, K. T. Tham, G. I. Perez-Perez, X. Zhao, J. C. Atherton, J. M. Blaser (1995)

Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains.

Lab. Investig. 73:760-770

Perez-Perez, G. I., D. Rothenbacher, H. Brenner (2004)

Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection.

Helicobacter 9 (Suppl. 1):1-6

Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu et al. (1998)

Detective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene.

Science 282(5396):2085-8

Porsch-Ozcurumez, M., W. Doppl, P. D. Hardt, et al. (2003)

Impact of migration on *Helicobacter pylori* seroprevalence in offspring of turkish immigrants in germany.

Turk. J. Pediatr. 45:203-208

Rauws, E. A., W. Langenberg, H. J. Houthoff, H. C. Zanen, G. N. Tytgat (1988)

Campylobacter pyloridis-associated chronic active antral gastritis. A prospective study of its prevalence and the effects of antibacterial and anti-ulcer treatment.

Gastroenterology 94:33-40

Rieder, G., R. A. Hatz, A. P. Morgan, A. Walz, M. Stolte, G. Enders (1997)

Role of adherence in interleukin-8 induction in *Helicobacter pylori*-associated gastritis.

Infect. Immun. 65:3622-3630

Rohde, M., J. Püls, R. Buhrdorf, W. Fischer, R. Haas (2003)

A novel sheathed-surface organelle of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system.

Mol Microbiol 49:219-234

Roosendaal, R., E. J. Kuipers, J. Buitenwerf, C. van Uffelen, S. G. Meuwisen, et al. (1997)

Helicobacter pylori and the cohort effect: evidence of a continuous decrease of infection rates in childhood.

Am. J. Gastroenterol. 92:1480-82

Rothenbacher, D., G. Bode, G. Berg, U. Knayer, T. Gonser, G. Adler, H. Brenner (1999)

Helicobacter pylori among pre-school children and their parents: evidence for parents-children transmission.

J. Infect. Dis. 179:398-402

Rothenbacher, D., J. Inceoglu, G. Bode, H. Brenner (2000)

Acquisition of *Helicobacter pylori* infection in high risk population occurs within the first two years of life.

J. Pediatrics 136:744-748

Rothenbacher, D., M. Winkler, T. Gonser, G. Adler, H. Brenner (2002)

Role of infected parents in transmission of *Helicobacter pylori* to their children.

Pediatr. Infect. Dis. J. 21:674-679

Rothenbacher, D., H. Brenner (2003)

Burden of *Helicobacter pylori* and *H. pylori*-related diseases in developed countries: recent developments and future implications.

Microbes Infect. 5:693-703

Salama, N. R., G. Otto, L. Tompkins, S. Falkow (2001)

Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection.

Infect. Immun. 69:730-6

Satin, B., G. Del Giudice, V. Della Bianca, S. Dusi, C. Laudanna, F. Tonello, D. Kelleher, R. Rappuoli, C. Montecucco, F. Rissi (2000)

The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor.

J. Exp. Med. 191:1467-1476

Schall, T. J., K. Bacon, K. J. Toy, D. V. Goeddel (1990)

Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES.

Nature 347(6294):669-71

Schall, T. J., K. Bacon, R. D. R. Camp, J. W. Kaspari, D. V. Goeddel (1993)

Human macrophage inflammatory protein α (MIP-1 α) and MIP-1 β chemokines attract distinct populations of lymphocytes.

J. Exp. Med. 177:1821-5

Schnyder-Candrian, S., A. Walz (1997)

Neutrophil-activating protein ENA-78 and IL-8 exhibit different patterns of expression in lipopolysaccharide- and cytokine-stimulated human monocytes.

J. Immunol. 158:3888-3894.

Seher, C., Thierfelder, W., Dortschy R. (2000)

Helicobacter pylori - Prävalenz in der deutschen Bevölkerung

Gesundheitswesen 62:598-603

Selbach, M., St. Moese, Th. F. Meyer, St. Backert (2002)

Functional analysis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island reveals both VirD-CagA-dependent and VirD-CagA-independent mechanisms.

Infect. Immun. 70(2):665-71

Sharma, S. A., M. K. R. Tummuru, G. G. Miller, M. J. Blaser (1995)

Interleukin-8 reponse of gastric epithelial cells lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro.

Infect. Immun. 63:1681-1687

Sharma, S. A., M. K. R. Tummuru, M. J. Blaser et al.(1998)

Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor- κ B in gastric epithelial cells.

J. Immunol. 160:2401-7

Shimoyama, T. S. Fukada, M. Tanaka, T. Mikami, Y. Saito, A. Munakata (1997)

High prevalence of CagA-positive *Helicobacter pylori* strains in Japanese asymptomatic patients and gastric cancer patients.

Scand. J. Gastroenterol. 32:465-468

Shimoyama, T., S. M. Everett, M. F. Dixon, A. T. R. Axon, J. E. Crabtree (1998)

Chemokine mRNA expression in gastric mucosa is associated with *Helicobacter pylori* cagA positivity and severity of gastritis.

J. Clin. Pathol. 51:765-770

Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome et al. (1999)

MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on toll-like receptor 4.

J. Exp. Med. 189:1777

Sipponen, P., K. Varis, O. Fräki, U. M. Korri, K. Seppälä, M. Siurala (1990)

Cumulative 10-year risk of symptomatic duodenal and gastric ulcer in patients with or without chronic gastritis.

Scand. J. Gastroenterol. 25:966-973

Smith, M. F. Jr., A. Mitchell, G. Li et al. (2003)

Toll-like receptor (TLR)2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF- κ B activation and chemokine expression by epithelial cells.

J. Biol. Chem. 278:32552-60

Springer, T. A. (1994)

Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.

Cell 76:301-14

Standiford, T. J., M. W. Rolfe, S. L. Kunkel, J. P. 3rd Lynch, M. D. Burdick, et al. (1993)

Macrophage inflammatory protein-1 alpha expression in interstitial lung disease.

J. Immunol. 151(5):2852-63

Stein, M., R. Rappuoli, A. Covacci (2000)

Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* Cag A antigen after cag driven host cell translocation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:1263-1268

Stolte M., S. Eidt, A. Ohnsmann (1990)

Differences in *Helicobacter pylori* associated gastritis in antrum and body of the stomach.
Z. Gastroenterol. 28(5):229-33

Stolte M., O. Stadelmann, B. Bethke, G. Burkard (1995)

Relationships between the degree of *Helicobacter pylori* colonisation and the degree and activity of gastritis, surface epithelial degeneration and mucus secretion.
Z. Gastroenterol. 33(2):89-2

Suerbaum, S. (2000)

Bakterielle Physiologie und Virulenzfaktoren

In: *Helicobacter pylori* - Von der Grundlage zur Therapie. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag
Stuttgart:11-12

Suerbaum, S., P. Michetti (2002)

Helicobacter pylori infection

N. Engl. J. Med. 347:1175-1186

Suzuki, M., H. Mimuro, T. Suzuki, M. Park, T. Yamamoto, C. Sasakawa (2005)

Interaction of CagA-Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion.

J. Exp. Med. 202:1235-47

Szabo, I., S. Brutsche, F. Tombola, et al. (1999)

Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity.

EMBO J. 18:5517-5527

Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai et al. (1999)

Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components.

Immunity 11:433-51

Tsutsumi, R., H. Higashi, M. Higuchi, M. Okada, M. Hatakeyama (2003)

Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA SHP-2 signalling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase.

J. Biol. Chem. 278:3664-70

Tummuru, M. K., T. L. Cover, M. J. Blaser (1993)

Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production.

Infect. Immun. 61:1799-1809

Tummuru, M. K. R., S. A. Sharma, M. J. Blaser (1995)

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. 18:867-876

Uemura, N., S. Okamoto, S. Yamamoto, N. Matsumura, et al. (2001)

Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer.

N. Engl. J. Med. 345:784-9

Underhill, D. M., A. Ozinsky, K. D. Smith, A. Aderem (1999)

Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:14459-63

Vaira, D., P. Malfertheiner, F. Mégraud, et al. (1999)

Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay.

Lancet 354:30-33

Viala, J., C. Chaput, I. G. Boneca et al. (2004)

Nod1 response to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island.

Nat. Immunol. 5:1166-1174

Wandersmann, C. (1992)

Secretion across the bacterial outer membrane

Trends Genet. 8:317-322

Walz, A., R. Burgener, B. Car, M. Baggiolini, S. L. Kunkel, R. M. Strieter (1991)

Structure and neutrophil-activating properties of a novel inflammatory peptide (ENA-78) with homology to interleukin-8.

J. Exp. Med. 174:1355-1362

Walz, A., R. M. Strieter, S. Schneyder (1993)

Neutrophil-activating peptide ENA-78

The Chemokines, Edited by I. J. D. Lindley et al., Plenum Press, New York

Walz, A., P. Schmutz, C. Mueller, S. Schnyder-Candrian (1997)

Regulation and function of the CXC chemokine ENA-78 in monocytes and its role in disease.

J. Leukoc. Biol. 62:604-611

Warren, J. R., B. Marshall (1983)

Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis.

Lancet 1:1273-1275

Watanabe, N., T. Shimada, Y. Ohtsuka, H. Hiraishi, A. Terano (1997)

Proinflammatory cytokines and *Helicobacter pylori* stimulate CC-chemokine expression in gastric epithelial cells.

J. Physiol. Pharmacol. 48(3):405-13

Webb, P. M., S. Knight, S. Greaves, A. Wilson, D. G. Newell, J. Elder, D. Forman (1994)

Relationship between infection with *Helicobacter pylori* and living conditions in childhood: evidence for person to person transmission in early life.

Br. Med. J. 308:750-753

Weeks, D. L., S. Eskandari, D. R. Scott, G. Sachs (2000)

A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonisation.

Science 287:482-485

Wood, D. W., K. P. Block (1998)

Helicobacter pylori: a review.

Am. J. Ther. 5:253-261

Yamaoka, Y., M. Kita, T. Kodama, N. Sawai, K. Kashima, J. Imanishi (1995)

Expression of cytokine mRNA in gastric mucosa with *Helicobacter pylori* infection.

Scand. J. Gastroenterol. 30:1153-1159

Yamaoka, Y., M. Kita, T. Kodama, N. Sawai, J. Imanishi (1996)

Helicobacter pylori *cagA* gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa.

Gastroenterology 110:1744-1752

Yamaoka, Y., M. Kita, T. Kodama, N. Sawai, T. Tanahashi, K. Kashima, J. Imanishi (1998)

Chemokines in the gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection.

Gut 42:609-617

Yamaoka, Y., D. H. Kwon, D. Y. Graham (2000)

A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (*oipA*) of *Helicobacter pylori*.

Proc. Natl. Acad., Sci. USA, 97:7533-38

Yasumoto, K., S. Okamoto, N. Mukaida, S. Murakami, M. Mai, K. Matsushima (1992)

Tumor-necrosis factor- α and interferon- γ induce interleukin-8 production in human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF- κ B-like binding sites of the IL-8 gene.

J. Biol. Chem.. 267:22506-11

Yoshida, N., D. N. Granger, D. J. Evans, Jr., D. G. Evans, D. Y. Graham, D. C. Anderson, R. E. Wolf, P. R. Kviety (1993)

Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation.

Gastroenterology 105:1431-1440

Z`Graggen, K., A. Walz, L. Mazzucchelli, R. M. Strieter, C. Mueller (1997)

The C-X-C chemokine ENA-78 is preferentially expressed in intestinal epithelium in inflammatory bowel disease.

Gastroenterology 113:808-816

Zheng, P. Y., N. L. Jones (2003)

Helicobacter pylori strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein.

Cell. Microbiol. 5:25-40

9 DANKSAGUNG

Zum erfolgreichen Abschluss meiner Dissertation haben eine Vielzahl an Personen beigetragen. Hierfür möchte ich mich bei allen Beteiligten für ihre engagierte Unterstützung und Hilfestellung herzlich bedanken. Einige Wenige möchte ich im Folgenden erwähnen:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. G. Enders. Er hat mir das interessante aber auch anspruchsvolle und komplexe Thema anvertraut und mich in das Institut für Chirurgische Forschung aufgenommen. Herr Professor Dr. G. Enders war immer geduldiger Ansprechpartner, reagierte prompt auf alle sich stellenden Probleme und war als Ideen- und Ratgeber richtungsweisend.

Ebenso möchte ich mich bei Frau PD Dr. G. Rieder bedanken, die mich in allen theoretischen und praktischen Fragen wirkungsvoll unterstützte. Sie trug durch ihre große Kenntnis wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Professor Dr. R. Hatz möchte ich für die Diskussionen und die fachliche Begleitung danken.

Auch möchte ich mich sehr herzlich bei Frau B. Lorenz für ihre Unterstützung bei allen Labortätigkeiten und das angenehme Arbeitsklima im Labor bedanken. Ihre große praktische Erfahrung half sehr, die Experimente abzuschließen.