

Aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, Lehrstuhl Bakteriologie

Direktor: Prof. Dr. J. Heesemann

**Charakterisierung phänotypischer und genotypischer
Veränderungen von Virulenzfaktoren
des *Helicobacter pylori*-Stammes B8
nach Passage durch den Magen des Mongolischen Gerbils**

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

vorgelegt von
Katrin Buch Schöllhorn
aus Konstanz

2012

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Gabriele Rieder

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Georg Enders
Prof. Dr. Thomas Demant

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter:

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

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2012

Für meine große und meine kleine Familie

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Katrin Buch Schöllhorn, dass ich diese Arbeit selbst verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

München, den

Zusammenfassung

Das gramnegative Bakterium *Helicobacter pylori* ist ein wichtiges Humanpathogen, das bei etwa 50% der Weltbevölkerung den Magen besiedelt. Es zeichnet sich durch eine hohe genetische Diversität und Variabilität aus.

Um ein besseres Verständnis von den Wechselwirkungen zwischen seiner genetischen Vielfalt, den bedingenden Mechanismen hierfür und den Auswirkungen auf mit ihm assoziierte Erkrankungen zu erlangen, wurde der Mongolische Gerbil als Tiermodell etabliert. Bei einem Langzeitexperiment (Zeitpunkte: 2, 4, 8, 16, 32 und 64 Wochen) wurden Mongolische Gerbils einerseits mit dem *Helicobacter pylori* WT-Stamm B8, der eine intakte *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) exprimiert, und andererseits mit einer HPB8 Δ *cagY*-Mutante, die auf Grund ihrer Mutation das Effektorprotein CagA nicht mehr translozieren kann, infiziert. Die Analyse der infizierten Gerbils ergab einen signifikanten Anstieg der aktiven und chronischen Gastritis im Antrum und Korpus von WT-infizierten Tieren, wohingegen sich bei den Mutante-infizierten Tieren lediglich ein gradueller Anstieg der Entzündung im Antrum zeigte.

Zur Charakterisierung der Genexpression der Virulenzfaktoren CagY, CagA, BabA und OipA im Zeitverlauf wurden Reisolat von infizierten Gerbils isoliert und konserviert. Die Reisolationsrate lag dabei zwischen 66% und 100%. Bei diesen in der vorliegenden Arbeit analysierten WT-Reisolaten (n=330) ergab sich für das Proteine CagY im Western Blot eine hohe Expressionsfrequenz über die Zeit (97,2%). Für CagA zeigte sich ebenfalls eine hohe Expressionshäufigkeit bis 32 Wochen (99,3%), bei 64 Wochen aber nahm sie, bei zugleich stark destruiertes Magenmukosa, im Verhältnis zur Mutante, signifikant ab. Bei der Δ *cagY*-Mutante, mit nur gradueller Entzündung der Magenmukosa, zeigte sich eine sehr stabile Expressionsfrequenz von CagA (100%) über die Zeit und, wie zu erwarten, keine Expression für CagY. Im Gegensatz dazu zeigten die WT-Reisolate für die Adhäsine BabA und OipA eine z.T. sogar signifikante Abnahme der Häufigkeit der Expression über die Zeit bei zunehmender Entzündung der Gerbil-Mukosa. Nach 64 Wochen konnte eine Reduktion um 30% für BabA und um 60% für OipA beobachtet werden. Im Verhältnis zur Mutante war diese Abnahme für BabA signifikant zum Zeitpunkt von 32 Wochen. Bei den Mutante-Reisolaten zeigte sich für BabA eine

kontinuierlich hohe Expressionsfrequenz. Für OipA zeigte sich sowohl beim WT als auch bei der Mutante eine schwankende, über den Zeitverlauf aber abfallende Expressionsfrequenz.

Es stellte sich nun die Frage, ob der jeweils exprimierte Virulenzfaktor CagA in der Wirtszelle noch phosphoryliert werden kann. Die Analyse der Phosphorylierung von CagA zeigte mittels Zellkultur und Phosphotyrosin-Western Blot eine Abnahme der CagA-Phosphorylierung von WT-Reisolaten aus dem Korpus über die Zeit. Bei den Mutante-Reisolaten konnte kein CagA transloziert und phosphoryliertes CagA somit nicht detektiert werden.

Die Immunreaktion, hervorgerufen durch WT-Reisolate, wurde mittels des Parameters IL-8 über Zellkultur und ELISA-Test ermittelt. Es ergab sich eine zunächst sehr hohe Sekretion zum Zeitpunkt von vier Wochen, dann aber eine Abnahme der Sekretionshäufigkeit über den gesamten Zeitverlauf. Von 4 bis 64 Wochen war die Abnahme der IL-8-Sekretion signifikant. Von 32 bis 64 Wochen war die Abnahme ebenfalls signifikant. Die Mutante-Reisolate zeigten kaum messbare IL-8-Antworten über die Zeit.

Um auf genetischer Ebene eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse zu finden, wurde von Reisolaten mit negativem Resultat im Western Blot eine PCR gemacht. Da sich immer ein PCR-Produkt zeigte, wurden diese Proben sequenziert. Dabei zeigte sich für das Gen *babA* in allen Proben eine Insertion eines Adenosins und für das Gen *oipA* eine Insertion oder Deletion eines Cytosin-Thymin-Paares, jeweils an einer repetitiven Gensequenz. Dieses unter dem Namen *slipped strand mispairing* bekannte Phänomen entsteht durch ein Verrutschen der Polymerase bei der Transkription. Die Verschiebung des Leserahmens (sog. *frameshift*) führt zu einer veränderten Aminosäuresequenz sowie meistens auch zu einem frühzeitigen Stop-Codon. Dadurch können translational Proteinfragmente oder sog. *nonsense* Proteine mit veränderten antikörperbindenden Epitopen entstehen, die im Western Blot somit nicht mehr detektierbar sind.

Bei zusammenfassender Betrachtung der Ergebnisse der Expressionsfrequenz von CagA, BabA und OipA zeigte sich, dass ein veränderter Phänotyp der Reisolate, im Vergleich zum Originalstamm HPB8, über die Zeit zunahm (>50%: CagA +, BabA +, OipA -). Im Gegensatz dazu entsprachen im Zeitverlauf fast 70% der Mutante-Reisolate noch dem Originalstamm. Auch hier kamen

Reisolate mit dem Expressionstyp CagA +, BabA + und OipA - gehäuft vor (ca. 75% der veränderten Mutante-Reisolate).

Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass eine Entzündung und Zerstörung der Magenmukosa sowie pathophysiologische und immunologische Veränderungen des Wirtsmagens bestimmte Anpassungsvorgänge in den Bakterien zu bedingen scheinen, z.B. eine sinkende Expression oder eine ON/OFF-Expression von Virulenzfaktoren, und somit können neue und u.U. angepasste Phänotypen von HPB8 entstehen.

Summary

The gram-negative bacterium *Helicobacter pylori* is an important human pathogen which colonizes the stomach in about 50% of the world population. It is characterized by a high rate of genetic diversity and variability.

To better understand this genetic diversity, the mechanisms that generate it, and resulting functional implications on *H. pylori*-associated disease outcomes, we applied the Mongolian gerbil infection model. In a long-term infection experiment (timepoints: 2, 4, 8, 16, 32 and 64 weeks), Mongolian gerbils were infected with either the HPB8-strain (wild type) expressing the *cag*-pathogenicity island (*cag*-PAI) or an isogenic HPB8 Δ *cagY*-mutant. The wild-type (WT) infected gerbils displayed a significant increase of active and chronic gastritis in the antrum and corpus, whereas the mutant-infected gerbils showed only a gradual increase of gastritis in the antrum.

To characterize the gene expression of the virulence factors CagY, CagA, BabA and OipA, reisolates from the infected gerbils were isolated and conserved. The reisolation rates ranged from 66% to 100%. For these analysed reisolates (n=330), the expression frequency detected by immunoblotting was 97.2% for CagY over the entire time. For CagA the expression frequency was 99.3% up to 32 weeks. But, in relation to the mutant, it decreased at 64 weeks, when the mucosa was destroyed (histology from long-term experiment). In mutants with only gradual inflammation of the gastric mucosa, the expression frequency was 100% for CagA over time and CagY was not expressed as expected. In contrast, the WT reisolates showed partly a significant decrease in the adhesins BabA and OipA together with mucosa destruction. After 64 weeks a reduction of

30% for BabA and 60% for OipA could be observed. In relation to the mutant, the decrease was significant for BabA at week 32. The mutant reisolates exhibited a continuously high expression rate for BabA. For OipA the expression frequency was fluctuant but decreasing over time for WT reisolates and mutant reisolates.

Now the question arose, whether the expressed virulence factor CagA could still be phosphorylated in the host cell. The analysis by cell culture and phosphotyrosin immunoblot demonstrated a decrease of CagA phosphorylation in the corpus of WT reisolates over time. The mutant reisolates could not translocate CagA and therefore CagA was not detected there.

WT reisolates induced an immune reaction which was detected in the parameter IL-8 via cell culture and ELISA. The secretion was high at 4 weeks, but decreased up to 64 weeks. The decrease from 4 to 64 weeks was significant for WT reisolates. From 32 to 64 weeks the decrease was significant, too. The mutant reisolates showed a very low IL-8 secretion over time.

To investigate the results, reisolates with a negative result in the immunoblot were analysed by PCR. All samples displayed a positive PCR result; thus we sequenced them for further characterisation. All samples showed an insertion of an adenosine for the gene *babA* and an insertion or deletion of a cytosine-thymine pair for the gene *oipA*. This phenomenon is called *slipped strand mispairing* and leads to polymerase slippage during transcription. This slippage of the readingframe (*frameshift*) leads to changes in the aminoacidsequence as well as often to an early stop-codon. Translational this can result in fragmented proteins or so-called nonsense proteins with a changed antibody epitop, no longer detectable by immunoblotting.

Interpreting the measured expression rates of CagA, BabA and OipA, we observed that the WT reisolates differed from the original strain HPB8 by an increased change of the phenotype (> 50%: CagA +, BabA +, OipA -) over time. In contrast, over 70% of the mutant reisolates were similar to the original strain. But interestingly the expression type CagA +, BabA +, OipA - was accumulated, too (about 75% of the changed).

Therefore we conclude that inflammation and cell destruction as well as pathophysiological and immunological changes in the host storage may induce changes in the bacterium, e.g. decrease of expression or ON/OFF-expression

of virulence factors and thus an increase number of new and, under certain conditions, better adapted phenotypes of HPB8.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	14
1.1	Entdeckung des Bakteriums <i>Helicobacter pylori</i>	14
1.2	Gattung <i>Helicobacter</i> und Diversität von <i>H. pylori</i>	15
1.3	Inzidenz und Übertragung von <i>H. pylori</i>	16
1.4	Virulenzfaktoren.....	17
1.4.1	Motilität.....	17
1.4.2	Urease.....	17
1.4.3	VacA.....	18
1.4.4	<i>cag</i> -Pathogenitätsinsel.....	19
1.4.4.1	CagY.....	19
1.4.4.2	CagA.....	20
1.4.5	Adhäsine.....	22
1.4.5.1	BabA.....	23
1.4.5.2	OipA.....	23
1.4.5.3	Weitere Adhäsine.....	23
1.4.6	Gene.....	24
1.5	Der menschliche Magen als Besiedlungsort.....	24
1.6	Pathogenese <i>H. pylori</i> -assoziierter Krankheiten.....	26
1.6.1	Akute Gastritis.....	27
1.6.2	Chronische Gastritis.....	28
1.6.3	Erosion und Ulkus.....	29
1.6.4	Dysplasie und Karzinom.....	29
1.6.5	Weitere gastrointestinale Erkrankungen.....	30
1.7	Immunmodulation.....	31
1.8	Diagnostik.....	32
1.9	Therapie.....	33
1.10	Das Tiermodell Mongolischer Gerbil.....	34
1.11	Vorergebnisse.....	34

1.12 Zielsetzung meiner Arbeit	37
2 Material und Methoden.....	39
2.1 Material.....	39
2.1.1 <i>Helicobacter pylori</i> -Stämme	39
2.1.2 Zelllinie	39
2.1.3 Tierstamm	39
2.1.4 Nähr- und Selektivmedien für Bakterien	39
2.1.5 Antikörper	40
2.1.5.1 Primäre Antikörper.....	40
2.1.5.2 Sekundäre Antikörper.....	40
2.1.6 Molekulargewichtsmarker	41
2.1.7 Proteine und Enzyme.....	41
2.1.8 Antibiotika und Antimykotika	41
2.1.9 Kits	41
2.1.10 Oligonukleotide.....	42
2.1.11 Zellkulturmedien	42
2.1.12 Puffer und Lösungen.....	42
2.1.13 Sonstige Chemikalien und Reagenzien	44
2.1.14 Verbrauchsmaterialien	44
2.1.15 Geräte und Apparaturen	45
2.2 Methoden	46
2.2.1 Gewinnung von Reisolaten aus Mongolischen Gerbils	46
2.2.2 Arbeiten mit Bakterien.....	46
2.2.2.1 Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien	46
2.2.2.2 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen.....	47
2.2.3 Arbeiten mit Proteinen.....	47
2.2.3.1 Herstellung von Zell-Lysaten.....	47
2.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	47
2.2.3.3 Western Blot	48
2.2.3.4 Phosphotyrosin Western Blot	48
2.2.3.5 CagA-POX Western-Blot.....	49
2.2.3.6 ELISA zur Quantifizierung von IL-8	49

2.2.3.7	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	50
2.2.3.8	Anreicherung in Flüssigkultur für 2D-Gelelektrophorese	50
2.2.4	Arbeiten mit Zellkulturen	51
2.2.4.1	Kultivierung von AGS-Zellen	51
2.2.4.2	Infektionsexperimente mit <i>H. pylori</i>	51
2.2.4.3	Gewinnung von Proben für Phosphotyrosin-Blot	52
2.2.4.4	Gewinnung der Proben für IL-8 ELISA.....	52
2.2.5	Arbeiten mit DNA	52
2.2.5.1	DNA-Isolierung	52
2.2.5.2	PCR	52
2.2.5.3	Gelelektrophorese der DNA	53
2.2.5.4	Sequenzierung der DNA	54
3	Ergebnisse.....	55
3.1	Stabilität der Expression der Proteine CagY und CagA bei Reisolaten	57
3.1.1	Expressionsfrequenz des Proteins CagY von WT-Reisolaten.....	57
3.1.2	Expressionsfrequenz des Proteins CagA von WT-Reisolaten.....	61
3.1.3	Expressionsfrequenz von CagY und CagA: Mutante-Reisolate	64
3.2	Stabilität der Expression der Adhäsine BabA und OipA bei Reisolaten.....	66
3.2.1	Expressionsfrequenz des Proteins BabA bei WT-Reisolaten	66
3.2.2	Expressionsfrequenz des Proteins OipA bei WT-Reisolaten.....	69
3.2.3	Expressionsfrequenz von BabA und OipA: Mutante-Reisolate	72
3.2.4	Statistische Auswertung der Ergebnisse zur Expressionsfrequenz von CagA, BabA und OipA	75
3.3	Funktionsanalyse von CagA und CagY bei Reisolaten	81
3.3.1	Analyse der CagA-Phosphorylierung von Reisolaten <i>in vitro</i>	81
3.3.2	Analyse einer Entzündungsreaktion durch Reisolate mittels IL-8-ELISA	85
3.4	Ergebnisse der PCR und der Sequenzierung	90
3.5	Analyse der Veränderungen der Reisolat-Population pro Tier über die Zeit.....	95
3.6	Vergleichende Betrachtung der Reisolat-Ergebnisse im Vergleich mit den Vorergebnissen aus der Mongolischen Gerbil-Studie	102
3.7	Proteomik-Analyse: Optimierung der 2-D Gelelektrophorese	104
4	Diskussion	106

5	Literaturverzeichnis	115
6	Abkürzungsverzeichnis	127

1 Einleitung

1.1 Entdeckung des Bakteriums *Helicobacter pylori*

Die Besiedelung des menschlichen Magens durch *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), ein gramnegatives, mikroaerophiles, begeißeltes Bakterium (Abb. 1), ist ursächlich beteiligt an der Entstehung von Gastritis, Ulkus und Dysplasie bis hin zum Magenadenokarzinom [17] sowie weiteren gastrointestinalen Erkrankungen.

Der Magen des Menschen, als spezielle ökologische Nische, wird schon seit über 60.000 Jahren von *H. pylori* besiedelt und stellt sein einziges Erregerreservoir dar [5]. Bereits im 19. Jahrhundert hatten immer wieder Forscher vergeblich versucht, von ihnen entdeckte Bakterien aus dem Magenmucus zu kultivieren, unter ihnen waren auch deutsche Anatomen [10]. Als eigentlicher Entdecker des Bakteriums *H. pylori* darf allerdings der australische Pathologe John Robin Warren angesehen werden. Ihm war aufgefallen, dass bei zahlreichen histologischen Magenbiopsien von Patienten mit Gastritis sehr häufig Ansammlungen von bakteriellen Gebilden unter dem Mikroskop zu sehen waren [58]. Das 1. der drei Postulate nach Henle und Koch, welche die Ursache-Wirkungs-Beziehung zwischen Mikroorganismus und Wirt fordern, war somit erfüllt [32]. Warren entwickelte daraufhin die Theorie, dass der bis dahin, auf Grund der Magensäure und starken Peristaltik als steril geltende Magen doch von Bakterien besiedelt sei.



Abbildung 1: EM-Aufnahme: Humane Magenkrebszellen (AGS-Zellen) stimuliert mit *H. pylori* 26695 (nach M. Rohde, J. Püls und Rainer Haas; MvP München).

Die Kultivierung blieb aber, auf Grund des nur langsamen Anwachsens selbst unter mikroaerophilen Bedingungen, auch 1982 schwierig. Erst durch einen Zufall, durch welchen die beimpften Kulturplatten Tage länger im Brutschrank

verblieben, zeigten sich endlich die erhofften *H. pylori*-Kulturen (Erfüllung des 2. Postulats). Die Theorie Warrens wurde jedoch von der Fachwelt erst durch den mutigen Selbstversuch seines Kollegen Barry James Marshall im Jahre 1984 anerkannt: Binnen weniger Tage nach dem Trinken einer Bouillon mit etwa 100.000.000 lebenden *H. pylori*-Bakterien hatte sich bei ihm eine fulminante Gastritis entwickelt. Das 3. Postulat nach Henle und Koch war somit erfüllt.

2005 erhielten John Robin Warren und sein Kollege Barry James Marshall für ihre Entdeckung des Zusammenhanges zwischen einer *H. pylori*-Infektion und einer Gastritis den Nobelpreis für Physiologie und Medizin [1]. Die ganze Tragweite ihrer Entdeckung wurde jedoch erst nach und nach deutlich, als immer weitere Erkrankungen mit *H. pylori* in Zusammenhang gebracht werden konnten, wie präkanzeröse Veränderungen der Mukosa, das Magenadenokarzinom selbst oder das MALT-Lymphom [17], [95].

Die molekularen Aspekte der Interaktion von *H. pylori* mit seinem Wirt stehen seither im Interesse der Forschung.

1.2 Gattung *Helicobacter* und Diversität von *H. pylori*

Inzwischen konnten über 30 verschiedene Arten der Gattung *Helicobacter*, mit zum Teil recht unterschiedlichen Wirtsorganismen, isoliert werden. *Helicobacter felis* beispielsweise besiedelt die Katze, *Helicobacter hepaticus* die Maus und *Helicobacter cinaedi* besiedelt den Hund. *Helicobacter heilmannii* kann neben der Katze auch den Menschen besiedeln [61], [78], [84]. Die Stämme differieren untereinander in bis zu 6% ihres Genoms. Dies ist mehr als es zwischen Schimpansen und Menschen der Fall ist. Auch innerhalb der Art *H. pylori* ist die genetische Diversität der etwa 1,7 Millionen bp großen DNA beträchtlich [47]. Sie ist höher als bei anderen Bakterien und sogar etwa 50-fach höher als beim Menschen [53]. Diese Besonderheit verhilft *H. pylori* zu seiner oftmals lebenslangen Persistenz im Magen seines Wirtes. Als zugrunde liegende Mechanismen der Anpassung gelten eine sehr hohe Rekombinationsrate und Mutationen [92] sowie weitere Mechanismen.

Durch die vergleichende Genanalyse von Stämmen aus unterschiedlichen Kontinenten und Regionen konnten bislang bereits vier Populationen und innerhalb dieser mehrere Subpopulationen identifiziert werden. Ausgehend von

Stämmen aus Afrika, Europa und Ostasien haben sich die Stämme *hpAfrica 1*, *hpEurope*, *hpEastAsia* und *hpAfrica2* entwickelt. *HpEastAsia* splittet sich weiter auf in die Subpopulationen *hspAmerind*, *hspEAsia* und *hspMaori*. *HpAfrica* wird weiter differenziert in *hspWAfrica* und *hspSAfrica*. Es können durch diese Genanalysen sogar historische Rückschlüsse, z.B. auf vergangene Völkerwanderungen, gezogen werden [23]. Eine Korrelation zwischen bestimmten Populationen, mit ihrem jeweils spezifischen genetischen Inventar, und den zu beobachtenden pathologischen Veränderungen des jeweiligen Magens wird untersucht. Dies könnte eine spezifischere Therapie für bestimmte Populationen ermöglichen [33].

1.3 Inzidenz und Übertragung von *H. pylori*

Etwa 50% der Weltbevölkerung sind mit dem Bakterium *H. pylori* infiziert. Dabei variiert die Besiedlungsrate geographisch sowie sozioökonomisch relativ stark [55]. In Entwicklungsländern liegt die Infektionsrate bei der ärmeren Bevölkerung im mittleren Lebensalter sogar um 90%, was auf die schlechteren hygienischen Bedingungen und das z.T. engere Zusammenleben zurückzuführen ist [56]. In Industriestaaten ist die Inzidenz auf Grund der Gabe von Antibiotika und besserer Hygiene von bisher etwa 30% im mittleren Erwachsenenalter nun etwas rückläufig [52], [43]. Die Inzidenz lag bislang in Industriestaaten um etwa 1% pro Lebensjahr.

Es ist davon auszugehen, dass oftmals bereits schon im Kindesalter eine Infektion stattfindet, wahrscheinlich durch eine oral-orale Übertragung von den Eltern oder nahen Verwandten [57]. Auch der fäkal-orale Übertragungsweg wird diskutiert [50].

EI-Zimaity [81] konnte zeigen, dass, insbesondere in Ländern mit einer hohen Magenkarzinomrate, viele Kinder bereits mit *H. pylori* infiziert sind und eine atrophische Gastritis entwickelt haben.

1.4 Virulenzfaktoren

Das Bakterium *H. pylori* besitzt eine große Anzahl von Virulenzfaktoren. Diese haben u. a. im Laufe der Evolution zu einer nahezu perfekten Anpassung an seine ökologische Nische, den Magen, geführt. Sie sichern ihm eine dauerhafte Besiedlung und ein möglichst langes Überleben im Wirt [11], [14].

1.4.1 Motilität

Die große Beweglichkeit des spiralförmigen, mit 2-6 polar gelegenen Flagellen (Geißeln) ausgestatteten Bakteriums ermöglicht es ihm, im peristaltisch aktiven Magen binnen Sekunden seinen Weg zum schützenden viskösen Mukus (Schleim) zu finden. Der pH-Gradient zwischen Magenlumen (pH 3-5) und Mukus (pH 6-7) stellt eine chemotaktische Orientierungshilfe auf diesem Weg dar [112], [21].

Über 70% der Keime befinden sich im Mukus etwa 25 µm vom Epithel entfernt. Einige der Bakterien nisten sich in den Foveolae der Magenmukosa ein. Etwa 20% der *H. pylori* kommen in direkten Kontakt mit den Magenepithelzellen. Fraglich ist jedoch, wie sich die Bakterien bei der Erneuerung der Magenschleimhaut vor dem Ausscheiden schützen. Es gibt hierzu eine Theorie von Thomas Borén, welche besagt, dass es zu einer ständigen Reinfektion über einen Recycling-Mechanismus innerhalb des Magens kommt: Das oberflächliche Magenepithel wird normalerweise etwa alle 3 Tage vollständig erneuert, so dass ein adhäriertes Bakterium zunächst mit ihm abgeschilfert wird. Während der Abschilferung der Epithelzellen in Richtung Magenlumen verändert sich kontinuierlich der pH-Wert in der Umgebung des Bakteriums. Ab einem bestimmten pH-Bereich löst sich das Bakterium von seiner Wirtszelle ab und bewegt sich entgegen des pH-Gradienten zurück in den Mukus hinein, unweit vom Epithel entfernt. Von hier aus kann es bis zu deren Abschilferung an neue Zellen adhären (T. Borén, 2009, persönliche Kommunikation).

1.4.2 Urease

H. pylori besitzt das für ihn charakteristische Enzym Urease, welches ihm ermöglicht, im sauren Milieu des Magens zu überleben. Das Enzym kann

indirekt H⁺-Ionen abpuffern, indem es im Magen vorhandenen Harnstoff (CH₄N₂O) in Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Ammoniak (NH₃) spaltet [97]. Durch einen pH-abhängigen Harnstoffkanal wird der Einstrom von Harnstoff in das Bakterienzytosol reguliert [104]. Bei niedrigem pH-Wert strömt so Harnstoff in die Bakterienzelle ein. Der Ammoniak dient dann der Abpufferung von Protonen (H⁺). So entsteht im Inneren und im periplasmatischen Raum des Bakteriums ein lokales, konstant neutrales pH-Milieu, welches, zumindest für die Passagezeit in den Mukus, einen ausreichenden Schutz vor der Magensäure bietet (sogenannter „Ammoniakmantel“).

Bereits die Urease aktiviert IL-6 und TNF- α und löst somit eine Immunantwort aus. Ferner kann sie Granulozyten deaktivieren und eine Apoptose von Epithelzellen induzieren [44]. Ebenso kann der Ammoniak selbst gewisse Zellschäden verursachen [100].

Zu erwähnen sei noch, dass *H. pylori* über einige sehr effektive Enzyme verfügt, wie z.B. die Superperoxydismutase, welche das Bakterium vor Sauerstoffradikalen schützen.

1.4.3 VacA

Das vakuolisierende Zytotoxin A (VacA) wird von *H. pylori* sezerniert und bindet an die Wirtszellmembran, wo es internalisiert wird und dann Anionenkanäle in Endosomenmembranen bildet. Es kommt zur Bildung von Vakuolen [73]. Im Gegensatz zum *H. pylori* Typ II-Stamm besitzt der virulentere Typ I-Stamm den VacA Typ s1/m1 [4]. Dieses VacA ist ein multifunktionelles Protein, das im sauren Milieu in seine aktivere Form übergeht [19]. VacA begünstigt die Kolonisierung von *H. pylori* im Magen des Wirtes und unterstützt die Persistenz des Bakteriums [85]. Der s1 Typ ist assoziiert mit der Entstehung von Ulkus und Magenadenokarzinom [69]. Durch Inhibition der T-Zell-Proliferation moduliert VacA auch das Immunsystem des Wirtes [29]. VacA induziert über Veränderungen in Mitochondrien und Aktivierung der Caspase3 die Apoptose. Das multifunktionelle VacA ist darüber hinaus noch an vielen weiteren Zellveränderungen beteiligt [19].

1.4.4 *cag*-Pathogenitätsinsel

Der *H. pylori* Typ I-Stamm verfügt über ein sogenanntes Typ IV-Sekretions-systems (T4SS), eine Art Injektionsnadel, welche über das β_1 -Integrin in direkten Kontakt mit der Mukosazelle kommt und sogar Proteine einschleusen kann. Die Gene dieses Kanalsystems sind auf der *cag*-PAI, der sog. *cytotoxin-associated gene*-Pathogenitätsinsel, kodiert. Sie besteht aus bis zu 32 Genen, welche für die Strukturproteine des T4SS und dessen Hilfsfaktoren kodieren. Sie dienen der Translokation des Effektorproteins CagA und vermutlich auch von Glykoproteinen (Abb. 2).

Das T4SS induziert in der Wirtszelle eine IL-8-Sekretion, welche Granulozyten aktiviert und somit eine Entzündung auslöst. Es konnte gezeigt werden, dass ein direkter Kontakt mit der Wirtszelle eine unumgängliche Voraussetzung für diesen Vorgang darstellt [82]. Dieses T4SS diene wohl ursprünglich der Konjugation und ist ähnlich auch bei anderen Bakterienspezies, wie z.B. *Bordetella pertussis* [106] oder bei *Agrobacterium tumefaciens*, zu finden [51]. Bei *H. pylori* ist es aus essentiellen Strukturproteinen, z.B. dem CagY und deren assoziierten Proteinen, aufgebaut (Abb. 2).

1.4.4.1 CagY

Das Gen *cagY* kodiert für ein Strukturprotein mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 220 kDa. Bei Verlust dieses entscheidenden Bausteines des Sekretionsapparates ist die Kanalstruktur verändert und eine Translokation des Effektorproteins CagA und anderer Proteine nicht mehr möglich. Die Virulenz eines solchen Stammes ist stark herabgesetzt.

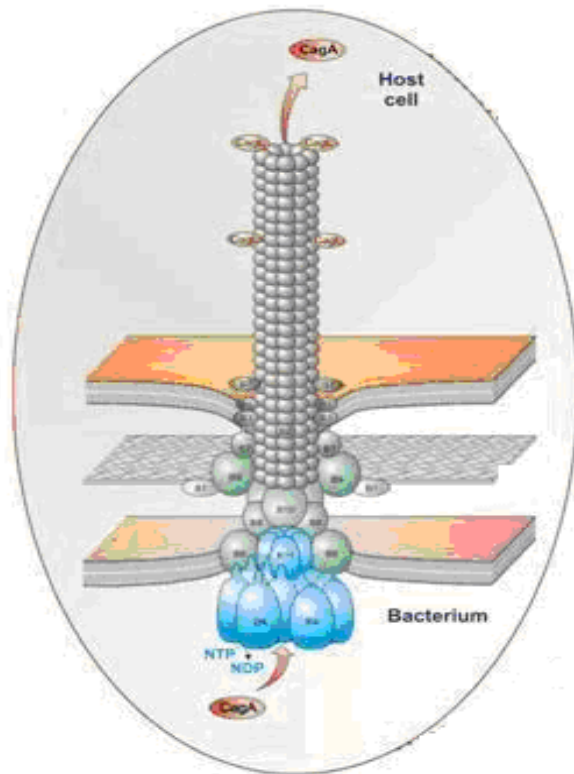


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Typ IV-Sekretionssystems (T4SS) von *H. pylori*.

Der T4SS besteht aus einem Basalkörperkomplex (blau), der Nadel (grau) und weiteren assoziierten Proteinen (grün). Dieses System vermittelt den Transport des Effektorproteins CagA und vermutlich auch anderer Moleküle in die Wirtszelle hinein (nach S. Backert, 2008).

1.4.4.2 CagA

Eines der wichtigsten translozierten Proteine ist das Produkt des Zytotoxin-assoziierten Genes A, das CagA. Sein Gen, *cagA*, ist ebenfalls auf der *cag*-PAI gelegen [89], [66], [7]. Die Größe des Proteins variiert in verschiedenen Bakterienstämmen und hat ein Molekulargewicht zwischen 128 und 145 kDa. Dies beruht auf der Duplikation von internen Gensequenzen [18]. Der von uns verwendete Gerbil-adaptierte Stamm HPB8 kodiert für ein CagA Protein von ca. 140 kDa.

Wird CagA durch das beschriebene Sekretionssystem in die Wirtszelle transloziert (Abb. 2), so wird es im Zytosol umgehend von Tyrosinkinasen der Src-Familie phosphoryliert (Abb. 3). Dies geschieht am sogenannten EPIYA-Motiv, einer Proteinregion bestehend aus den fünf Aminosäuren Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala [6], [90]. Bisher sind die vier EPIYA-Varianten A, B, C, und D bekannt. Dabei sind Stämme, die reich an der Variante D sind, am stärksten mit der Entstehung eines Karzinoms assoziiert [63].

Das phosphorylierte wie auch das nicht phosphorylierte CagA greifen in viele Signalkaskaden der Wirtszelle ein und können eine Reihe von pathophysiologischen Störungen verursachen [90].

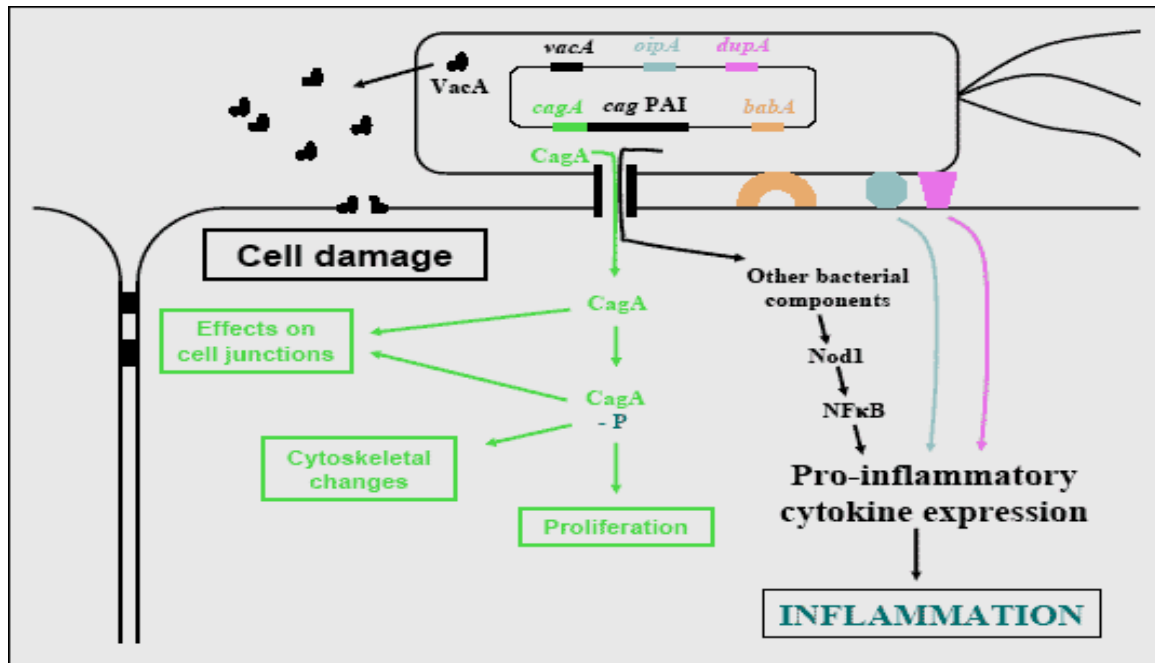


Abbildung 3: *H. pylori* bindet an die Wirtszelle mittels des T4SS und der Adhäsine.

Der T4SS bindet an das β_1 -Integrin und transloziert das Effektorprotein CagA sowie vermutlich auch Proteoglykane in die Wirtszelle. CagA wird z.T. phosphoryliert und führt über Störung verschiedener Signalwege zur Lösung von Zellkontakten, zu Zellskelettveränderungen sowie Proliferation. Über Nod1 und NFκB kommt es zur Aktivierung des Immunsystems. Die Folge ist eine Entzündung der Mukosa [102].

Durch CagA können die für die Zellintegrität essentiellen Zellkontakte, die *tight junctions* und *adherence junctions*, verändert werden, wodurch diese Zellverbindungen durchlässig werden [3], [87]. CagA interagiert auch mit E-Cadherin und dereguliert so das β -Catenin-Signal, das auch an der Induktion von Mitose-Genen beteiligt ist [62], [8]. Diese Störung der Zellintegrität könnte es *H. pylori* ermöglichen, tiefer in die Mukosa vorzudringen. Ein möglicher Zusammenhang mit Metastasierung durch solche losgelösten und in Einzelfällen vielleicht bereits entarteten Zellen, in Zusammenhang auch mit dem Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1), wird diskutiert [41].

Das phosphorylierte CagA bindet weiterhin an die SHP-2-Tyrosin-Phosphatase, wodurch diese aktiviert und dereguliert wird. Dadurch kommt es zu zytoskeletalen Umbauprozessen am Aktinfilament motiler Epithelzellen. Über eine Signalkaskade kann es zum Auseinanderdriften, dem *cell scattering*, der Zellen und zum Entstehen von langen Zellausläufern, dem sog. *hummingbird*-Phänotyp, kommen [87], [89] (Abb. 4).

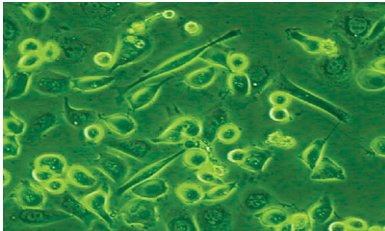


Abbildung 4: Der *hummingbird*-Phänotyp, eine morphologische Veränderung von Epithelzellen nach Infektion mit *H. pylori* *in vitro*. (M. Hatakeyama, 2001).

Cortactin, ein bekanntes Onkogen, das eine zentrale Rolle beim invasiven Wachstum von Tumorzellen spielt, wird von CagA dephosphoryliert. Es ist möglicherweise bei der Entstehung eines Magenadenokarzinoms von Bedeutung [91]. Außerdem kann über die Dysregulation der ERK (extrazellulär regulative Kinase) das Protoonkogen *c-fos* aktiviert werden, was ebenfalls zur Tumorentstehung beitragen könnte [60]. CagA aktiviert auch das anti-apoptotische Protein Mcl-1, das den physiologischen Abbau von entarteten Zellen verhindern könnte [59].

In Bezug auf das T4SS wird ferner vermutet, dass auch Proteoglykane in die Wirtszelle transloziert werden. Dies aktiviert über Nod1 den Transkriptionsfaktor NF κ B und führt zur Induktion von IL-8 [102]. Daraufhin wandern ebenfalls Granulozyten in die Mukosa ein und lösen eine Entzündungsreaktion aus.

Durch die zahlreichen Interaktionen im Zellgeschehen verursacht CagA letztendlich Zellschäden, die zu Atrophie [48], Proliferation [24], Ulkus [18], Dysplasie [30] und nicht zuletzt, im Zusammenspiel verschiedener Komponenten, auch zum Magenadenokarzinom führen können [12]. Es wird deshalb auch als Onkoprotein bezeichnet [70].

1.4.5 Adhäsine

Weiterhin kodieren über 4% der Gene des Genoms von *H. pylori* für Adhäsine. Dies ist weit mehr, als es bei den meisten anderen Bakterien der Fall ist. Es handelt sich um eine Gruppe von etwa 32 Genen, deren membranständige

Proteine, sog. *outer membran proteins* (OMPs), an spezifische Rezeptoren der Wirtszelle binden können und so zu einer sehr guten Adhäsion an die Wirtszelle führen [67]. Bis zu 20% der Bakterien kommen dadurch in direkten Kontakt mit den Epithelzellen der Magenschleimhaut.

1.4.5.1 BabA

Ein sehr relevantes Adhäsion ist das *blood antigen binding protein A* (BabA). Es bindet an das Lewis^b-Blutgruppen-Antigen, das von Magenepithelzellen exprimiert wird. Dies stellt ein sog. molekulares Mimikry dar [37], was auch die Vermutung nahe legt, dass zwischen *H. pylori* und seinem Wirt eine sehr lange evolutionäre Koexistenz besteht. Bei Anwesenheit von BabA ist die Kolonisierungsrate von *H. pylori* und die Ausschüttung von Interleukin 8 erhöht sowie die Entstehung von Ulzera und Karzinomen häufiger [15], [31], [37], [76]. Beim *H. pylori* Typ I-Stamm, welcher CagA, VacA und BabA exprimiert, sind intestinale Metaplasie, atrophische Gastritis und die Karzinomrate erhöht. Ein Impfstoff gegen BabA hatte bisher leider nur im Tierversuch Erfolg [77].

1.4.5.2 OipA

Ein ebenfalls sehr wichtiges Adhäsion ist das *outer inflammatory protein A* (OipA), dessen Rezeptor an der Wirtsmukosa bisher noch nicht identifiziert werden konnte. Es trägt ebenfalls zur Bindung an die Wirtszelle bei und erhöht somit die Kolonisierungsrate. Es ist vermutlich auch an der IL-8-Induktion und somit der Entzündungsreaktion [108], sowie an der Entstehung eines Ulkus beteiligt [111].

1.4.5.3 Weitere Adhäsine

Weitere Adhäsine sind das SabA, AlpA und AlpB sowie Sulfat-, Lipid- und Laminin-bindende Adhäsine, das Lipopolysaccharid (LPS) und andere mehr.

1.4.6 Gene

Die große genetische Variabilität von *H. pylori* ist bedingt durch eine hohe Mutationsrate und Rekombinationsrate [103]. Ein Phänomen ist das in bestimmten Genen vorkommende sog. *slipped strand mispairing*. Es beschreibt eine Punktmutation, welche im Gen während der Transkription zu einer Leserasterverschiebung, dem sog. *frameshift*, führt. Nach der Translation werden dadurch defekte Proteine gebildet, welche nicht mehr funktionsfähig sind. Ein ON/OFF-Status ist möglich [38]. Diese Mutation mit Anpassungspotential wurde bisher bereits für die Adhäsine BabA, OipA und FutC gezeigt [109], [65]. Neuere Studien besagen sogar, dass noch viele weitere Proteinexpressionen so moduliert werden könnten. Dadurch könnte sich ein Selektionsvorteil für solche Bakterien ergeben, welche befähigt sind, sich z.B. einer bestimmten Immunantwort des Wirtes zu entziehen [68]. Dies könnte auch zur Chronifizierung der Besiedlung mit *H. pylori* beitragen.

1.5 Der menschliche Magen als Besiedlungsort

Zum besseren Verständnis der Pathogenese durch *H. pylori* erscheint es sinnvoll, den zwischen Ösophagus (Speiseröhre) und Duodenum (Zwölffingerdarm) gelegenen Magen genauer zu betrachten.

Makroskopisch besteht der Magen aus den fünf Abschnitten: Kardia als Eingangsbereich, Korpus mit Fundus als Hauptteil, Antrum als Ausgangsbereich und Pylorus mit Sphinkter, welcher den Magen vom Duodenum trennt. Der histologische Aufbau ist, wie für den Verdauungstrakt charakteristisch, gegliedert in die Schichten, von außen in Richtung Lumen: Serosa, Muskularis (mit Quer-, Ring- und Längsmuskelschicht), Submucosa (Bindegewebsschicht mit Nerven und Blutgefäßen) und der Mukosa, also der Magenschleimhaut mit Epithelzellen und Drüsenzellen. Die Mukosa gliedert sich noch in die drei Schichten: Lamina muscularis mucosae (Ulcus reicht bis hier), Lamina propria mucosae (Grenze für Erosion) und Lamina epithelialis mucosae (Magendrüsen) (Abb. 5). Der sie überziehende Mukus ist ein essentieller Schutz vor der Magensäure und vor vielen eindringenden Keimen.

Die Lamina epithelialis, als Kontaktbereich zum Lumen, besteht aus einem hochprismatischen Zylinderepithel, in dessen tiefen Krypten sich die Magendrüsen befinden. Diese Drüsenzellen übernehmen wichtige Funktionen. Die Belegzellen, insbesondere im Korpus und Fundus gelegen, produzieren auf bestimmte Reize hin (Histamin, Acetylcholin, Gastrin) die Salzsäure (HCl), einen Hauptbestandteil der Magensäure, sowie den Intrinsic factor (essentiell für die Vitamin B12-Resorption). Eine luminal gelegene H⁺-K⁺-ATPase in den Belegzellen ist der Hauptmechanismus der H⁺-Sekretion. Hier setzen die sog. Protonenpumpeninhibitoren (PPI) an, welche auch bei der Therapie von *H. pylori* Verwendung finden. Die PPI blocken die ATPase und senken so die H⁺-Sekretion ins Lumen, der pH-Wert steigt an. Die Hauptzellen sind in der gesamten Magenmukosa zu finden. Sie bilden Pepsinogen, das in seiner aktiven Form Proteine spalten kann. Die Nebenzellen sind ebenfalls auf das gesamte Epithel verteilt und produzieren Muzin, den Hauptbestandteil des vor HCl und Pepsin schützenden Magenschleimes. Im Antrum befinden sich die Gastrin-produzierenden Zellen. Bei steigendem pH-Wert im Lumen (H⁺-Abnahme) sezernieren sie Gastrin, welches in lokale Blutgefäße abgegeben wird, auf diesem Wege zügig die Zellen des Korpus erreicht und diese wiederum zur HCl Produktion anregt (H⁺-Anstieg). Der pH-Wert dient als negativer Rückkopplungsmechanismus. Sinkt der pH-Wert, so sinkt auch die Gastrinproduktion [39].

Das ausgewogene Wechselspiel aller beteiligten Hormone des Magens ist sehr entscheidend für das Mikroklima des Magens. Manche *H. pylori*-Stämme sind in der Lage dieses empfindlich zu stören [105].

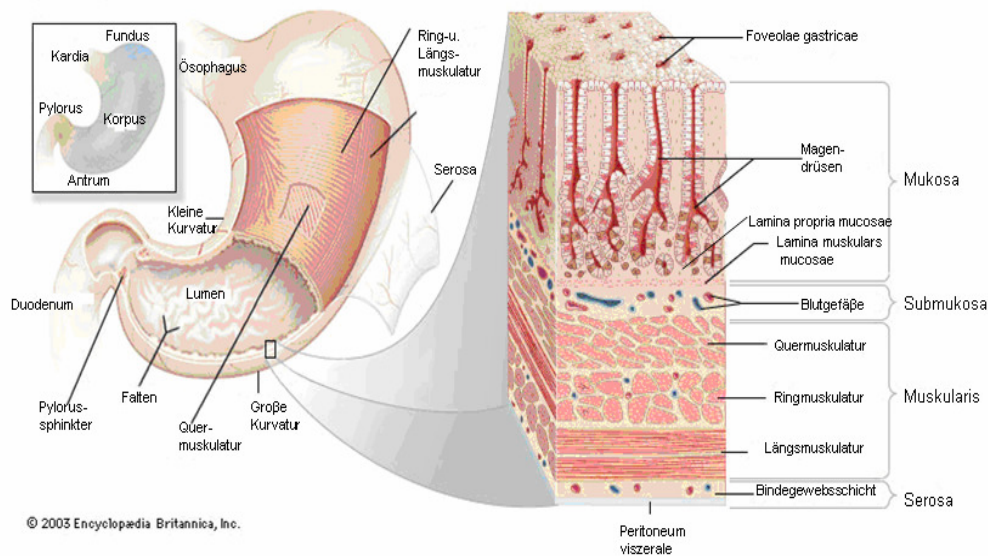


Abbildung 5: Schematischer makroskopischer Aufbau des menschlichen Magens sowie Aufbau der Magenwand mit allen Wandschichten im Querschnitt (Encyclopedia Britannica, 2003).

1.6 Pathogenese *H. pylori*-assoziierter Krankheiten

Nachdem Warren und Marshall den Zusammenhang zwischen einer *H. pylori*-Infektion und einer Gastritis entdeckt hatten, wurde durch weitere Forschungen zunehmend die ganze Tragweite der Auswirkungen einer Infektion mit *H. pylori* deutlich. Der Pathologe P. Correa entwickelte bereits 1988 ein plausibles Konzept der Pathogenese von *H. pylori* in Form einer Kaskade, welche von der Besiedlung bis hin zur Karzinomentstehung reicht (Abb. 6) [17].

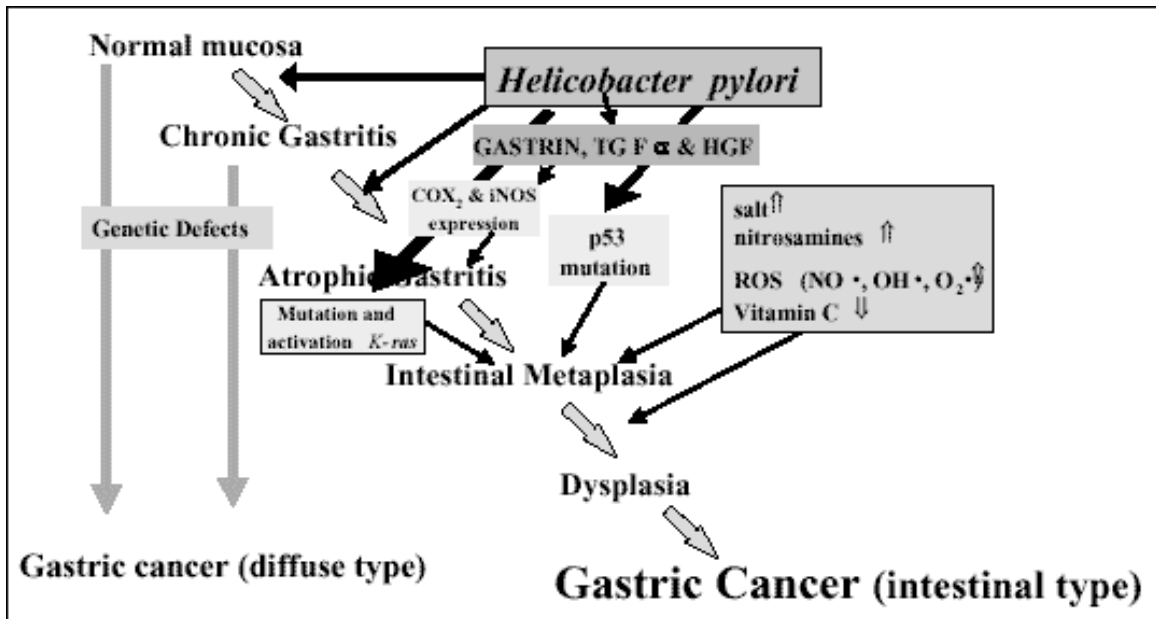


Abbildung 6: Correa Kaskade. Durch die Infektion mit *H. pylori* entsteht eine chronische Gastritis. In der Folge kann sich insbesondere bei der Korpus-dominierten Gastritis eine atrophische Gastritis entwickeln, welche sich metaplastisch, bis hin zur Dysplasie, verändern kann. Kommen weitere Faktoren der Umwelt, des Wirtes oder des Bakterienstammes hinzu, so kann sich ein Magenadenokarzinom vom intestinalen Typ bilden. Ein Magenkarzinom vom diffusen Typ ist nicht signifikant assoziiert mit einer *H. pylori*-Infektion (nach Correa, 1992).

1.6.1 Akute Gastritis

Wenn *H. pylori* seinen Weg ins Lumen des Magens findet, sich im Mukus ansiedelt und durch Adhäsine in direkten Kontakt mit der Epithelzelle kommt, löst dies bereits eine Immunantwort aus. Durch die Adhärenz des T4SS kommt es in der Wirtszelle über NF κ B zur Sezernierung des Zytokins IL-8. Bei dieser schnellen, aber noch unspezifischen Immunantwort, sog. innate immune response, werden polymorphkernige Granulozyten aus dem Blut sowie Makrophagen chemotaktisch angezogen. Diese phagozytieren und lysieren Bakterien mittels Wasserstoffperoxid und geben proinflammatorische Zytokine ab, welche auch das spezifische Immunsystem aktivieren. Eine akute Gastritis ist die Folge. Zu diesem Zeitpunkt bemerkt der Infizierte meist wenig von der Infektion. Eine leichte Dyspepsie oder postprandiale Schmerzen im epigastrischen Bereich sind, wenn überhaupt, zumeist die einzigen Symptome.

1.6.2 Chronische Gastritis

Antigenpräsentierende Zellen aktivieren immer mehr T-Lymphozyten. Sie sezernieren zahlreiche Zytokine und aktivieren weitere Teile des Immunsystems. B-Lymphozyten bilden die Antikörper Anti-*Hp*-IgG und Anti-*Hp*-IgA [75] gegen *H. pylori*, die aber ebenfalls nicht zur Eliminierung der Keime führen. Die Entzündung chronifiziert. Das lymphatische Gewebe in der Submukosa zeigt vermehrt Lymphozyten. Von TH1-Zellen wird Interferon- γ (IFN) ausgeschüttet, das u.a. eine Apoptose von infizierten Wirtszellen bewirken kann. Die Aktivierung des Immunsystems bewirkt eine Eindämmung der Keime. Der Versuch, *H. pylori* vollständig zu eliminieren, führt aber vor allem zu einer immer stärkeren Gewebeschädigung – als nicht zu vermeidende Konsequenz.

Je nach Hauptbesiedlungsort der Keime können drei Formen der *H. pylori*-Gastritis, mit jeweils unterschiedlichen Langzeitfolgen, gefunden werden.

Im Falle einer Pangastritis, bei welcher das gesamte Magenepithel entzündet ist, bleibt der Mukosachaden meist auf die Oberfläche begrenzt [88].

Wenn sich die chronische Gastritis im Antrum manifestiert, was bei Patienten mit einer starken Magensäureproduktion vorkommt, führt dies mit der Zeit auch zum Anstieg der Magensäure im proximalen Teil des Magens. Mit dem Speisebrei gelangt dann Säure ins Duodenum, das dortige Epithel wird durch die Magensäure stark gereizt, und es kann hier bei anhaltender Übersäuerung zur gastralen Metaplasie kommen. Hierbei wird duodenales Epithel durch gastrales ersetzt, was ein Ulcus duodeni zur Folge haben kann [45].

Bei einer Korpus-dominierten Gastritis steht eine Atrophie der Belegzellen mit Abnahme der Magensäure (Hypochlorhydrie) im Vordergrund. Der negative Rückkopplungsmechanismus zu den Gastrin-produzierenden Zellen fehlt, was eine Hypergastrinämie zur Folge hat. Es kommt auch zu einem Schwund der Nebenzellen, was zu einer Abnahme des schützenden Mukus führt. Das wichtige Gleichgewicht der Magenmukosa zwischen protektiven Faktoren, wie Schleimproduktion, ausgewogene Zellerneuerung, Schleimhautdurchblutung und Bicarbonatpuffer auf der einen Seite, und aggressiven Faktoren, wie H⁺-Ionen, Pepsin und HCl auf der anderen Seite, verlagert sich durch *H. pylori* hin zu schädigenden Faktoren [34].

1.6.3 Erosion und Ulkus

Insbesondere bei der Korpus-dominierenden Gastritis kommt es im weiteren Verlauf der Infektion stellenweise zu einer zunehmenden Zerstörung der Mukosa. Bei einem Ulkus ventriculi oder duodeni reicht der Mukosaschaden definitionsgemäß bis in die Lamina muscularis mucosae hinein. Dies geschieht insgesamt bei etwa 10% der *H. pylori*-infizierten Patienten.

CagA, VacA und weitere Virulenzfaktoren von *H. pylori* treffen auf eine zunehmend geschädigte Mukosa. Substanzdefekte bis hin zur Lamina propria der Mukosa, sog. Erosionen, können entstehen. Längerfristig kann sich sogar ein Ulcus ventriculi auf dessen Boden entwickeln. Die Symptome der chronischen Gastritis sind in diesem Stadium der Infektion weiterhin unspezifisch und reichen von Völlegefühl über epigastrische Schmerzen bis hin zu Anämie. Ein Ulkus macht sich z.T. erst bemerkbar, wenn es rupturiert und blutet. Die Blutung muss dann umgehend chirurgisch koaguliert werden, da der mögliche Blutverlust beträchtlich sein kann.

1.6.4 Dysplasie und Karzinom

Über einen längeren Zeitverlauf von Jahren bis Jahrzehnten kann es durch die kontinuierliche Schädigung der Mukosa, mit hoher Zellerneuerungsrate, zu einer intestinalen Metaplasie mit Ersatz der Magenepithelzellen bis hin zu Jejunum-artigen Zellen und sogar zu einer Dysplasie von Magenzellen kommen. Eine Heilung des Mukosaschadens ist ab einer Dysplasie 2. Grades nicht mehr möglich. Der Zellzyklus ist dann dauerhaft gestört. Kommen weitere Faktoren, wie gewisse genetische Prädispositionen des Wirts, virulentere *H. pylori*- Stämme oder auch exogene Faktoren wie Rauchen, nitrosaminhaltige Ernährung oder Alkohol hinzu, so kann ein Magenadenokarzinom entstehen [113]. Die Inzidenz unterliegt gewissen regionalen Schwankungen und beträgt für Deutschland etwa 1-2%. In Japan und Russland sowie Korea und auch in Südamerika ist sie höher, was auf dort verbreitete virulentere Stämme sowie Lebensgewohnheiten zurückzuführen sein könnte. Zumeist handelt es sich beim *H. pylori*-assoziierten Karzinom um ein Adenokarzinom vom intestinalen Typ. Es ist makroskopisch zur Umgebung klarer abgrenzbar (z.B. polypenform)

als der diffuse Typ. Zwei Phänotypen sind bei der Magenkarzinomentstehung beschrieben worden: der Mikrosatelliten Mutator-Phänotyp (MSI-H) und ein mit chromosomaler und intrachromosomater Instabilität assoziierter Phänotyp [64]. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei der Infiltration der Mukosa und Submukosa (Stadium I u. II nach Borrmann) etwa 35%, für das Frühkarzinom sogar um 80%, bei tiefer in die Mukosa infiltrierenden Tumoren (Stadium III u. IV) jedoch nur etwa 15%. *H. pylori* wurde von der WHO als „Karzinogen der Klasse I“ eingestuft [99].

Die Therapie des Karzinoms ist die möglichst vollständige operative Resektion, wobei die Lymphknoten großzügig mit entfernt werden müssen. Leider verursacht der Tumor kaum Symptome. Von Völlegefühl mit Gewichtsverlust, einer neu auftretenden starken Abneigung gegenüber dem Verzehr von Fleisch oder einem Druckschmerz im epigastrischen Bereich wird z.T. berichtet. Durch den häufigen Einsatz der Endoskopie wird er heute aber oft früher entdeckt, wodurch die Inzidenz etwas rückläufig ist.

1.6.5 Weitere gastrointestinale Erkrankungen

Auch ein MALT-Lymphom kann sich bei etwa 1% der mit *H. pylori*-infizierten Patienten entwickeln [74]. Dabei geht die Entartung zumeist von monoklonalen B-Zell-Lymphozytennestern aus. Die Symptome sind unspezifisch, und die Diagnose erfolgt deshalb zumeist erst spät.

Von einem Zusammenhang zwischen einer *H. pylori*-Infektion und der Entstehung der Riesenfaltengastritis M. Ménézier wird zunehmend ausgegangen [107].

Es gibt auch eine immer besser erforschte extragastrale Manifestation einer *H. pylori*-Infektion. Die EHS (European Helicobacter Study Group) fasste für 2007 zusammen, dass die idiopathische Eisenmangelanämie und die idiopathische thrombozytopenische Purpura (ITP) in Zusammenhang mit einer *H. pylori*-Infektion stehen könnten. Eine eventuelle Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen wird ebenfalls diskutiert.

Es sei hier noch angemerkt, dass auch positive Effekte der *H. pylori*-Besiedlung beschrieben wurden. Man geht davon aus, dass die durch den Keim bedingte Hypochlorhydrie einen gewissen Schutz vor der Refluxösophagitis und deren

Folgeerkrankungen bieten kann [13]. Bei der weit verbreiteten Refluxösophagitis schließt der untere Ösophagusphinkter, welcher den Magen von der Speiseröhre anatomisch trennt, nicht ausreichend. So kann Magensäure die empfindliche Mukosa des Ösophagus auf Dauer schädigen. Eine Barret-Ösophagitis und ein Ösophaguskarzinom können die Folge sein [79]. Auch eine Abnahme des allergischen Asthmas unter einer Infektion mit *H. pylori* konnte bereits mehrfach gezeigt werden [16]. Dies zeigt erneut die Komplexität des schon Jahrtausende währenden Zusammenspiels von Mikroorganismen und dem Menschen.

Genannt seien hier noch die A-Gastritis mit autoimmuner Genese sowie die C-Gastritis mit zumeist medikamentöser Genese, mitbedingt etwa durch die Einnahme nicht-steroidale Antirheumatika (NSAID).

1.7 Immunmodulation

Die Immunantwort des Wirtes erfolgt adäquat, sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene. Leider hat das Bakterium der Immunantwort erhebliche Abwehrmechanismen entgegenzusetzen, so dass eine komplette Remission der Keime durch den Wirt eher selten ist. Dies könnte mehrere Ursachen zugleich haben.

Ein Grund könnte sein, dass nur etwa 20% der Keime an die Wirtszelle gebunden und somit einer Immunantwort überhaupt zugänglich sind.

Auch dass die Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Membran von *H. pylori* das Immunsystem des Wirtes kaum stimulieren, könnte eine Rolle für die Persistenz von *H. pylori* spielen [42].

Ein weiterer wichtiger Mechanismus könnte sein, dass die Th1-Immunantwort überwiegt, obwohl *H. pylori* ein extrazellulärer Keim ist und somit die Th2-Antwort vermehrt vorkommen müsste. Die Th1-Immunantwort ist eher für die Bekämpfung intrazellulärer Erreger zuständig. VacA zerstört darüber hinaus Th1-Lymphozyten [29].

Desweiteren schütten die angelockten Granulozyten zwar Sauerstoffradikale aus (sog. oxidative burst) und versuchen die Keime zu phagozytieren, mittels der Enzyme Superoxiddismutase und Katalase schützt sich *H. pylori* aber auch vor diesem Abwehrmechanismus [96], [35].

Der beschriebene ON-OFF-Mechanismus könnte dazu führen, dass das Immunsystem bestimmte Virulenzfaktoren zu bestimmten Zeitpunkten nicht mehr erkennt.

Auch das Anbinden von BabA an das Blutgruppenantigen Lewis^b könnte dem Immunsystem vortäuschen, dass der gebundene Keim körpereigen ist und somit eine Immunantwort verhindern.

H. pylori bedient sich also dieser und womöglich vieler anderer Mechanismen, um einer effektiven Immunantwort seines Wirtes zu entgehen. So persistiert das Bakterium oftmals ein Leben lang im Wirt und bedingt dadurch die Schädigung der Magenschleimhaut bis hin zur Zerstörung der Magenmukosa und in 1-2% sogar zur Entstehung eines Magenkarzinoms.

1.8 Diagnostik

Um eine *H. pylori*-Infektion nachweisen zu können, gibt es viele invasive und nicht invasive diagnostische Methoden. Dabei weist eine direkte Methode den Keim als solches nach (Histologie, Kultur). Indirekte Verfahren weisen Antikörper, Antigene oder Stoffwechselprodukte des Keimes nach.

Bei den invasiven Methoden stellt die Endoskopie als direkte Methode, mit der Entnahme von je zwei Biopsien aus dem Magenantrum und dem Magenkorpus, die wichtigste und beweisendste Methode dar. Histologische Schnitte werden von den Biopsien angefertigt und auf eine aktuelle Besiedlung mit *H. pylori* untersucht. Ebenfalls eine invasive direkte Methode ist die Kultivierung von *H. pylori*. Sie wird jedoch eher für Forschungszwecke genutzt.

Der Urease-Schnelltest (HUT) ist ein invasiver indirekter Test und gibt Aufschluss über eine mögliche Infektion, selbst bei makroskopisch unbedenklicher Mukosa. Bei diesem Verfahren wird eine Biopsie in ein Testmedium auf einem Kärtchen gegeben, welches eine Nährlösung für Bakterien, Harnstoff und einen Indikator enthält. Ist das Bakterium in der Probe enthalten, verstoffwechselt es den enthaltenen Harnstoff zu Ammoniak und CO₂. Der Ammoniak verändert den pH-Wert des Mediums, und es kommt zu einem Farbumschlag von gelb nach rosa [101].

Zu den häufig angewendeten nicht-invasiven indirekten Methoden gehört der Harnstoff-Atemtest, bei welchem der Patient eine Kapsel oder Lösung mit C¹³

isotopenmarkiertem Harnstoff einnimmt. Dieser wird von der *H. pylori*-Urease u.a. zu Kohlenstoffdioxid (CO₂) gespalten. Der Gehalt des Kohlenstoffdioxids, welches nun C¹³-Moleküle enthält, kann nach etwa 20 Minuten in der Ausatemluft mit einem geeigneten Gerät gemessen werden. So kann auf den Keim rückgeschlossen werden.

Auch im Stuhl lässt sich *H. pylori* indirekt und nicht-invasiv nachweisen (Antigentest), ein Verfahren, das insbesondere bei Kindern sowie als Kontrolle nach einer Eradikationstherapie Anwendung findet. Die indirekte, nicht-invasive Bestimmung des anti-*H. pylori*-Antikörpertiters mittels ELISA oder Immunoblot ist möglich, leider aber zu ungenau für eine routinemäßige Anwendung [26].

1.9 Therapie

Die Leitlinien für Gastroenterologie fordern eine gezielte Indikationsstellung für eine Therapie der Infektion mit *H. pylori*. Dies hat auch eine neue Relevanz auf Grund der zunehmenden Resistenz gegen die verwendeten Antibiotika. Besonders gegen Metronidazol besteht bereits eine Resistenz von ca. 30% [80]. „Muss“-Indikationen sind: erosive Gastritis, Ulkus ventriculi und duodeni, Magenkarzinom in der Familie sowie ein MALT-Lymphom. „Kann“-Indikationen sind eine voruntersuchte funktionelle Dyspepsie mit Beschwerden über mehr als vier Wochen, Wunsch des Patienten bei asymptomatischer chronischer Gastritis, Eisenmangelanämie unklarer Ursache und Magen-teilresektion in der Vorgeschichte.

Die klassische Therapie ist nach wie vor die sog. Tripeltherapie. Der Patient nimmt jeweils einen Protonenpumpenhemmer sowie Clarithromycin (500 mg) und Amoxicillin (1000 mg) morgens und abends über 7 Tage hinweg ein (Französische Tripletherapie). Bei Vorliegen einer Allergie gegen Penicilline kann Amoxicillin durch Metronidazol (500 mg) ersetzt werden (Italienische Tripletherapie). Die Eradikationsrate ist sehr hoch und liegt um 97%. Eine Nachkontrolle nach 6 Wochen wird allerdings empfohlen.

Als Alternative steht eine Quadrupletherapie zur Verfügung, bestehend aus einem PPI, Metronidazol, Tetrazyklin und Wismutsalz.

An einem Impfstoff gegen *H. pylori* wird geforscht. Versuche, gegen BabA zu impfen, wurden wieder verlassen. Relativ viel versprechend erscheint der

Ansatz von DNA-Impfstoffen. Allerdings ist in naher Zukunft noch nicht mit einem eindeutigen Erfolg zu rechnen.

1.10 Das Tiermodell Mongolischer Gerbil

Geeignete Tiermodelle sind Voraussetzung für aussagekräftige Forschungsergebnisse. Der Mongolische Gerbil wurde bereits vor über 10 Jahren als solches ausgewählt, weil er einige wichtige Kriterien erfüllt [71]:

1. Der histopathologische Aufbau des Magens des Mongolischen Gerbils ist sehr ähnlich zu dem des menschlichen Magens. Durch die Infektion mit *H. pylori* entwickelt er ebenfalls Gastritis, Ulkus und auch vereinzelt ein Magenadenokarzinom.

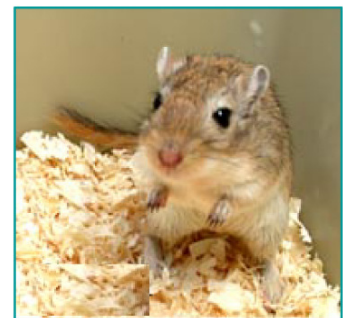


Abb. 7: Mongolischer Gerbil
(Lat.: *Meriones unguiculatus*)

2. Die Maus als bewährtes Tiermodell mit zahlreichen *knock-out*-Stämmen hingegen zeigt nach der Infektion mit *H. pylori* nur eine milde Gastritis, was an ihrer Fähigkeit liegen könnte, die *cag*-PAI abschalten zu können.

3. Menschliche Biopsien stellen zwar ein aussagekräftiges Material dar, sind jedoch, um komplexere Abläufe mit zeitlicher Abfolge nachvollziehbar zu machen, selten verfügbar und u.U. ethisch nicht vertretbar.

1.11 Vorergebnisse

Bisher konnte gezeigt werden, dass bei einem Zeitexperiment, bei welchem Mongolische Gerbils mit dem *H. pylori*-Stamm B8 infiziert wurden, bereits nach acht Wochen eine hochgradige Entzündung bei WT-infizierten Tieren nachweisbar war [83], [105].

Zum Versuchsaufbau:

Bei einem umfassenden Zeitverlauf-Experiment wurden Gerbils für 2 bis 64 Wochen mit dem Gerbil-adaptierten Typ I-Stamm HPB8 infiziert. Die histopathologischen und pathophysiologischen Veränderungen im Mongolischen Gerbil wurden anschließend analysiert. Dabei wurden die Tiere entweder mit dem Stamm HPB8 WT oder mit der isogenen Mutante HPB8 Δ *cagY* infiziert. Die

Gruppenzuordnung der Tiere erfolgte rein zufällig. Es war für jedes Tier die gleiche Wahrscheinlichkeit, in eine der beiden Gruppen separiert zu werden.

Im Gegensatz zum HPB8-Stamm hat die Mutante kein *cagY*-Gen mehr. Daraus resultiert ein defektes T4SS mit der Folge, dass CagA bei dieser Mutante nicht mehr in die Wirtszelle transloziert werden kann. Durch diese Veränderung ist davon auszugehen, dass die Mutante wahrscheinlich deutlich avirulenter ist als der WT-Stamm HPB8.

Untersucht wurden in dem Zeitverlauf-Experiment:

- 1) die Kolonisierungsrate jeweils im Antrum und Korpus sowie der Durchmesser der Mukosa.
- 2) Physiologische Parameter wie der pH-Wert der Korpusmukosa und die Plasma-Gastrinkonzentration. Letztere wurde mittels *radio-immuno-assay* (RIA) gemessen.
- 3) Immunologisch relevante Zytokine, wie IL-6, IL-10, IL-1 β , IFN- γ , KC und TNF- α , wurden mittels der real-time-PCR bestimmt.
- 4) Es wurden histologische Schnitte sowohl vom Antrum als auch vom Korpus angefertigt. Diese wurden klassifiziert nach dem updated Sydney System, in Bezug auf Grad und Aktivität der Gastritis sowie nach der Garhart-Graduierung in Bezug auf Entzündung in Zusammenhang mit histopathologischen Veränderungen.
- 5) Desweiteren wurde zur Gewinnung von Reisolaten, d.h. von Bakterien nach Passage durch den Gerbil Magen, eine Gewebeprobe vom Antrum und eine vom Korpus entnommen, homogenisiert und auf Agarplatten kultiviert. Von den erhaltenen Kolonien wurden dann, wenn vorhanden, je zwei vermehrt und als Dauerkultur eingefroren.

In Tabelle 1 ist in Zeile eins die Woche der Probenahme und in Zeile zwei die Tieranzahl je Zeitpunkt aufgelistet. Darunter stehen die Anzahl der gewonnenen Reisolate je Tier. Sie wurden nach Antrum und Korpus getrennt aufgelistet.

Zum Zeitpunkt meiner Dissertation lagen mir folgende Proben vor:

Tabelle 1: Anzahl der gewonnenen Reisolatproben je Tier zu den fünf Zeitpunkten.

Wildtyp

Wochen	4	8	16	32	64
Anzahl Tiere	9	5	9	18	7
Antrumproben	15	9	18	36	14
Korpusproben	8	9	15	32	14

Mutante

Wochen	4	8	16	32	64
Anzahl Tiere	6	6	9	15	8
Antrumproben	8	9	9	29	8
Korpusproben	8	7	8	23	8

Zusammenfassung der Vorergebnisse zu den Untersuchungen der WT-infizierten Gerbils im Zeitverlauf:

- Zu 1) Die Kolonisierungsdichte nahm im Korpus stärker zu als im Antrum. Der Durchmesser der Mukosa nahm bei den WT-infizierten Tieren um etwa 40% zu.
- Zu 2) In Bezug auf physiologische Parameter im Gerbil kam es nach 16 Wochen zu einem signifikanten Anstieg des pH-Wertes (Hypochlorhydrie) im Magen sowie zu einer Hypergastrinämie nach 32 Wochen.
- Zu 3) Die proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , sowie KC (IL-8-Homolog) wurden auf mRNA-Ebene quantifiziert. Sie zeigten einen signifikanten Anstieg im Antrum nach acht Wochen der Infektion und einen kontinuierlichen Anstieg im Korpus über die Zeit.
- Zu 4) Eine hochgradige Gastritis konnte in WT-infizierten Tieren bereits nach acht Wochen sowohl im Antrum als auch im Korpus beschrieben werden. Über den weiteren Zeitverlauf manifestierten sich eine Atrophie, Schleimdrüsenmetaplasie sowie fokale Dysplasie und sonstige Veränderungen der Zellarchitektur (Abb. 8).

Im Gegensatz dazu zeigten die Mutante-infizierten Gerbils eine moderate antrale Entzündung auch bereits nach acht Wochen, jedoch nur eine milde Entzündung im Korpus über die Zeit.

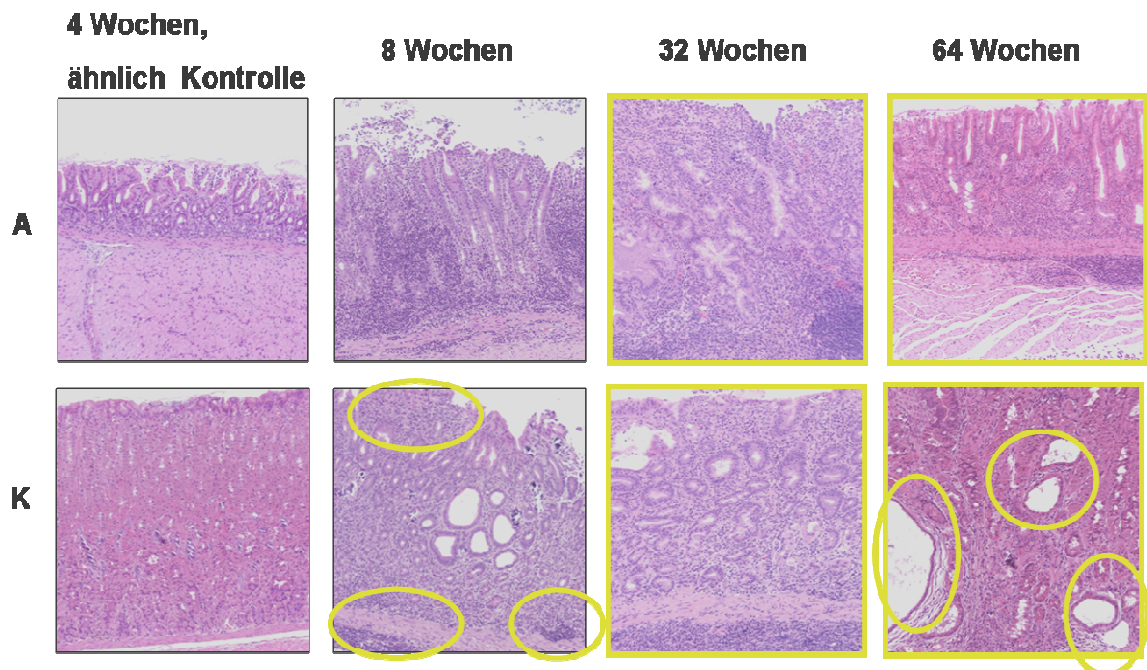


Abbildung 8: Histologische Schnitte von Mongolischen Gerbils infiziert mit dem WT HPB8 im Zeitverlauf von 4 bis 64 Wochen.

Zu erkennen ist die gestörte Zellarchitektur sowie Zelldifferenzierung über den Zeitverlauf hinweg. A steht dabei für Antrum und K für Korpus. Die gelben Ringe bei 8 Wochen Korpus zeigen Ansammlungen von Entzündungszellen (Lymphaggregate), bei 64 Wochen Korpus markieren sie zystische Erweiterungen (Gastritis cystica profunda) (T. Wiedemann, G. Rieder, Plos One, 2009) [105].

Anhand der Zeitverlaufsstudie am Tiermodell der Mongolischen Gerbils kommt man zu dem Schluss, dass eine *cagPAI*-abhängige frühe Entzündung im Korpus, eine sog. Korpus-dominante atrophische Gastritis, später in präkanzerösen Veränderungen der Magenmukosa übergehen kann.

1.12 Zielsetzung meiner Arbeit

Das Ziel meiner Arbeit war die Analyse möglicher Veränderungen (Anpassungen) von Reisolaten des *H. pylori*-Stammes HPB8 nach der Passage durch den Gerbil Magen über den Zeitverlauf von 4 bis 64 Wochen.

H. pylori adaptiert sich, wie alle Bakterien, an seine Umgebung. Die durch ihn ausgelöste Entzündung verändert die Bedingungen im Magen, erfordert andererseits aber auch eine Anpassung des Bakteriums selbst. Reisolate

eignen sich gut, um diese Veränderungen untersuchen zu können. Sie wurden zu frühen (4 u. 8 Wochen), mittleren (16 Wochen) und späten Zeitpunkten (32 u. 64 Wochen) aus dem Gerbilsmagen infizierter Tiere isoliert. Diese Reisolatate wurden auf mögliche Veränderungen über den Zeitverlauf einer Infektion untersucht. Ausgewählt wurden exemplarisch vier Proteine. Diese sind relevante Virulenzfaktoren, welche maßgeblich an der Pathogenität von *H. pylori* beteiligt sind: das CagY, ein essentielles Strukturprotein des T4SS, CagA, ein Hauptvirulenzfaktor von *H. pylori*, das als Effektorprotein mit Hilfe des T4SS in die Wirtszellen transloziert wird, sowie die beiden Adhäsine BabA und OipA. Mittels Western Blots wurden alle Reisolatate auf die Expression dieser vier Virulenzfaktoren hin untersucht. Anschließend wurden die Phosphorylierbarkeit des exprimierten CagA-Proteins unter Verwendung einer Magenkarzinomzelllinie (AGS) analysiert und die Phosphorylierungshäufigkeit dieses Effektorproteins über die Zeit dargestellt. Danach interessierte die Phosphorylierung der Reisolatate über die Zeit. Um einen Einblick in die Fähigkeit der Reisolatate zur Induktion einer Immunantwort zu erhalten, wurden ebenfalls *in vitro*-Stimulierungsexperimente mit AGS-Zellen durchgeführt und die IL-8-Sekretion mit Hilfe eines ELISA quantifiziert. Die Ursachen für eine fehlende oder veränderte Proteinexpression, die womöglich eine Anpassungen an eine sich verändernde Umgebung darstellt, sollten durch PCR-Analysen der entsprechenden Gene untersucht werden. Eine Sequenzierung der PCR-Produkte sollte die genaue Veränderung auf genetischer Ebene aufzeigen. Auf Grund der Vorergebnisse wurden drei Hypothesen bezüglich des erwarteten Unterschiedes zwischen den WT- und den Mutante-Reisolataten und auch bezüglich des erwarteten Unterschiedes innerhalb der WT-Antrum-Reisolatate und WT-Korpus-Reisolatate formuliert, und es sollte statistisch überprüft werden, ob diese Hypothesen zutreffen. Um eine umfassende Betrachtung der Interaktion von Bakterium und Wirt zu erlangen, sollten die Ergebnisse von der Charakterisierung der Reisolatate zu den histopathologischen Vorergebnissen aus der Zeitverlaufsstudie am Tiermodell der Mongolischen Gerbils in Bezug gesetzt werden [105].

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 *Helicobacter pylori*-Stämme

HPB8	Gerbil-adaptiertes Isolat 4WP1, Klon # 8 (CagA, VacA: s1/m2), Streptomycin-Resistenz
HPB8 Δ cagY	HPB8 mit Deletion des <i>cagY</i> -Genes

2.1.2 Zelllinie

AGS	humane Magenadenokarzinom-Zelllinie (ATCC CRL-1739)
-----	---

2.1.3 Tierstamm

Die untersuchten *H. pylori*-Reisolate wurden aus *H. pylori*-infiziertem Magengewebe von Mongolischen Gerbils (Lat.: *Meriones unguiculatus*) kultiviert.

Allgemeine Anmerkung:

Die im Folgenden aufgeführten Lösungen wurden ordnungsgemäß sterilisiert. Dabei wurden hitzestabile Lösungen für 20 min bei 121°C und 1 bar Überdrucks autoklaviert und hitzelabile Lösungen, wie z.B. Antibiotika, sterilfiltriert.

2.1.4 Nähr- und Selektivmedien für Bakterien

Serumplatten:	36 g/l GC-Agar-Base, autoklaviert; sterilfiltriert zugegeben: 80 ml/l Pferdeserum; 10 ml/l Vitaminmix (s.u.); 10 mg/l Vancomycin; 5 mg/l Trimethoprim; 1 mg/l Nystatin
Strep.-Platten:	Serumplatte mit 250 µg/ml Streptomycin
LB-Platten:	32 g/l Lennox-L-Agar (Invitrogen), autoklaviert
Brucella-Medium:	28 g/l Brucella Broth (Invitrogen), autoklaviert
Vitaminmix:	100 g/l α -D-Glucose; 10 g/l L-Glutamin; 26 g/l Cystein;

0,1 g/l Cocarboxylase; 20 mg/l Fe(III)-Nitrat; 3 mg/l Thiamin;
 13 mg/l p-Aminobenzoesäure; 10 mg/l Vitamin B12;
 1 g/l Adenin; 0,25 g/l Nicotinamidadeninucleotid (NAD);
 1,1 g/l L-Cystein; 30 mg/l Guanin; 0,15 g/l L-Arginin;
 0,5 g/l Uracil, sterilfiltriert
 Einfriermedium: 70 % Brucella-Broth-Medium (BB); 20 % Glycerin; 10 %
 Fötale Kälberserum (FCS)

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primäre Antikörper

α -CagY (AK 273) Polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen das Protein HP527 (AA 351-1311), Verdünnung 1:2000
 α -CagA (AK 257) polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen die C-terminale CagA-Region (AS 185-44), Verdünnung 1:1000 für CagA-POX-WB: 1:5000
 α -BabA (AK 277) Antikörper gegen BabA, Verdünnung 1:1000
 α -OipA (AK 282) Antikörper gegen OipA, Verdünnung 1:1000
 α -P-Tyr (PY 99) Monoklonaler Maus-Antikörper (IgG_{2b}) gegen tyrosinphosphorylierte Proteine, Verdünnung 1:1000
 α -IL-8 (AK1) Monoklonaler Maus-Antikörper (IgG_{2b}) gegen humanes Interleukin-8, AK 554716, Pharmingen

2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

α -Kaninchen-AP Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppeltes Protein A, (1:2000)
 α -Maus-POX Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG, (1:2000)
 α -Kaninchen-POX Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Ziege), (1:10.000)
 α -IL-8 (AK2) Biotinylierter monoklonaler Antikörper gegen humanes IL-8, AK 554718, Pharmingen

2.1.6 Molekulargewichtsmarker

Proteinstandard	Prestained Plus Protein Standard (Bio Rad) Prestained Low Range Proteinmarker (Fermentas)
DNA-Standard	Prestained Low Range (Bio Rad)

2.1.7 Proteine und Enzyme

Proteine	Rinderserum (BSA) Fötales Kälberserum (FCS) Pferdeserum (PAA) Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppeltes Protein A
IL-8 Standard	800 pg/ml, aliquotiert
Enzyme	TaKaRa LA® <i>Taq</i> -Polymerase

2.1.8 Antibiotika und Antimykotika

Streptomycin	250 mg/l (Serum-Platten)
Vancomycin	10 mg/l (Serum-Platten)
Trimethoprim	5 mg/l (Serum-Platten)
Nystatin	1 mg/l (Serum-Platten)

2.1.9 Kits

DNA-Isolation	QIAamp DNA Mini, Quiagen
DNA Extraction	QIAquick Gel Extraction Kit, Quiagen

2.1.10 Oligonukleotide

Primer für die Polymerase-Kettenreaktion und Sequenzierung:

Name	Gen	Sequenz (5' → 3')
GR 172 (F)	<i>oipA</i>	TAG AAA GAT GAG CGG ACT GG
GR 173 (R)	<i>oipA</i>	GTC ATC AAA GAA ACG CAC ACC
GR 174 (F)	<i>babA</i>	ACG CTT TAT GCT ATA ATA CTC C
GR 175 (R)	<i>babA</i>	AGA AAT CTC TCA ATA AGA AGC C

2.1.11 Zellkulturmedien

RPMI	1640 Medium mit L-Glutamin und 10% FCS
DPBS	Dulbecco`s phosphate buffered saline
TE	Trypsin/EDTA (10x)
Zusätze	Penicillin/Streptomycin (PS), (1:100); 10% Fötales Kälberserum (FCS)

2.1.12 Puffer und Lösungen

Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurde VE-Wasser verwendet.

Die pH-Werte wurden mit NaOH bzw. HCl eingestellt.

Allgemeine Puffer und Lösungen:

PBS (10x)	2 g/l KCl; 80 g/l NaCl; 2 g/l KH ₂ PO ₄ ; 14,4 g/l Na ₂ HPO ₄
PBS (1 x)	10% (v/v) 10x PBS in H ₂ O dest.
TBS	200 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5
SDS-EP-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,3; 0,1% (w/v) SDS; 250 mM Glycin
2x SDS-Proben-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 6,8; 2% SDS; 0,1% Bromphenolblau; 10% Glycin + 10% β-Mercaptoethanol

Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese:

Trenngel	H ₂ O; 30% Acrylamidmix; 1,5 M Tris pH 8,8; 10% SDS; 1% TEMED; 10% APS
----------	--

Sammelgel H₂O; 30% Acrylamidmix; 1,0 M Tris pH 6,8; 10% SDS;
1% TEMED; 10% APS

Puffer und Lösungen für Western Blot:

Western-Transfer 25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS
Puffer 20% (v/v) Methanol; pH 8,3
Blockingpuffer TBS (1x) + 3% BSA
Waschpuffer TBS (1x) + 0,5% Tween20
Detektionslösung 0,1 M Tris-HCL pH 9,6; 1 M MgCl₂-Lsg.; 5 mg/ml BCIP;
1 mg/ml NBT-Lösung

Von Western Blot abweichende Puffer und Lösungen für Phosphotyrosin-Blot:

P-Tyr-Detektions- je 2,5 ml ECL Western Blotting Detection Reagents von
lösung G+E Healthcare (Amersham)

Von Western Blot abweichende Puffer und Lösungen für CagA-POX-Blot:

Absättigungspuffer 50 mM Tris-HCl; 200 mM NaCl; 5% Magermilchpulver;
0,1% Tween; pH 7,4
Verdünnungspuffer 10 mM Tris; 0,9% NaCl; 1% Milchpulver; 0,2% Tween20;
pH 7,4
Detektionslösung je 2,5 ml ECL Western Blotting Detection Reagents von
G+E Healthcare (Amersham)

Puffer und Lösungen für Zellkulturexperimente:

PBS* (10 ml) 9,78 ml PBS-Puffer; 100 µl Vanadat; 10 µl Leupeptin;
10 µl Pepstatin; 100 µl Phenylmethansulfonylfluorid (PMS)
Lysispuffer 14 g/l K₂HPO₄; 2,67 g/l KH₂PO₄; 0,74 g/l EDTA;
1g/l TritonX; pH 7,8

Puffer und Lösungen für ELISA:

Coating-Puffer 100 mM Na₂HPO₄ (pH 9, 0)
Waschpuffer PBS + 0,05 % Tween-20
Blocking-Puffer 1.: PBS + 10 % FCS bzw. 2.: wie 1, + 0,05% Tween20
Konjugatlösung je 5 ml Streptavidin-Biotin-POX, in 50mM Tris/HCl, pH 7,6

Substratlösung	TMB Substrat Reagent Set 555214 v. BD/Pharmingen
Stopplösung	1 M H ₂ SO ₄

Lösung zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford:

Bradford-Reagenz 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250; 5% (v/v);
10% (v/v) Phosphorsäure (85%ig)

Puffer und Lösungen zur DNA-Analyse:

TAE-Puffer 4,84 g/l Tris; 1,14 ml/l Eisessig; 1 mM EDTA
Ethidiumbromidbad 1 mg/l Ethidiumbromid in Wasser
GEBS 20% Glycerin; 0,05% Bromphenolblau; 50 mM EDTA;
0,5% N-Laurylsarkosin
10x PCR-Probenpuffer

2.1.13 Sonstige Chemikalien und Reagenzien

Ethanol (Merck), Glycerin, GC-Agar (Oxoid), Agarose (Sigma), Natronlauge (Merck), Ammoniumpersulfat (APS) (Roth), 5-Brom-3-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz (BCIP), Nitrotetrazoliumblausulfat (NBT) (Roth), N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (sog. TEMED) (Sigma).

Für PCR: Reinstwasser, 25 mM MgCl₂, Desoxyribonucleinsäure-(dNTP)-Mix.

2.1.14 Verbrauchsmaterialien

Desinfektion: Desdermann, Bacilol® AF (Bode Chem.), WashCare (esemtan®);
Pipetten: 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl, 1000 µl; Glaspipetten und sterile Plastikpipetten: 1 µl, 2 µl, 5 µl, 10 µl, 25 µl (Costar®); Erlenmeyerkolben, Messbecher, Messzylinder, Petrischalen (Greiner Bio-one), Eppendorf-Tubes, Falcons 15 ml, 50 ml (Falcon BD), Küvetten, Einfrierröhrchen (Nalgene), sterile Spritzen Omnifix (Braun), Zellkulturflaschen 75 cm², Zellkultur-Multiwell-Platten: 6 wells, 12 wells; ELISA- oder Maxisorp-Platten, Platten für Protein nach Bradford: 96 wells; Zellschaber, sterile Holzstäbchen, Parafilm, Autoklavierband, Impföse, Filterpapiere, PVDF-Membran (Bio Rad), Filmkassetten, Filmpapier (Fuji).

2.1.15 Geräte und Apparaturen

Inkubatoren: Anaerobierbrutschrank Microincubator MI22W (Scholzen, Microbiology Systems AG); Brutschränke (Binder); Schüttelinkubator (Braun Biotech); Anaerobiertöpfe (Fritz Gössner GmbH); Rollschüttler RM5 Assistent; Vortexer: REAXtop (Heidolph); Zentrifugen: Tischzentrifuge (GMC-060), Megafuge 3.0R (Thermo Scientific), Centrifuge 5402, 5301, 5417 C (Eppendorf), Mikro 200 (Hettich Zentrifugen); Gelelektrophoreseapparatur mit Kammern, Kämmen, Glasplatten (Bio Rad); Semi-dry-Blot Apperatur (Biotec Fisher); Thermocycler (Biometra®); Thermoblock 120 (Hartenstein); Thermomixer compact (Eppendorf); Heizbad (GFL); Kühlschrank (Liebherr); Gefrierschrank Comfort (Liebherr); Gefriertruhe (Kendro LP); Nano Drop ND-1000 Spektrophotometer (Peqlab Biotechnologie GmbH); Sterilbank Hera safe Typ KS18 (Kendro); Abzug (Waldner); Filmentwicklungsapparatur; Mikroskop (Leika); Photometer (biochrom libra) S12; pH-Messgerät; Feinwaage BL1500S (Sartorius); Software: Gel-Dokumentationssystem Quantity One 4.4.0, SigmaPlot 8.0 (SPSS), ELISA-Reader für IL-8 ELISA und Proteinbestimmung nach Bradford (Tecan Reader).

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von Reisolaten aus Mongolischen Gerbils

Für diese Arbeit wurden Reisolat aus Mongolischen Gerbils verwendet, welche aus einem großen Zeitverlaufsexperiment mit einer Gesamtzahl von 167 Tieren stammen. Dabei wurde eine Anzahl von Tieren (n=90) für 2 bis 64 Wochen mit jeweils 400 µl des *H. pylori*-Stammes B8 (10^9 Bakterien) infiziert. Die Infektion erfolgte an drei aufeinander folgenden Tagen orogastral. Eine zweite Gruppe von Tieren (n=56) wurde mit ebenfalls 400 µl der *H. pylori*-Mutante B8 Δ cagY auf gleiche Weise infiziert. Kontrolltieren (n=41) wurde entsprechend 400 µl steriles BB-Medium eingegeben. Zu den Zeitpunkten 4, 8, 16, 32 und 64 Wochen wurden die Tiere mittels CO₂ getötet und die Magenmukosa getrennt nach Antrum und Korpus auf immunologischer, histologischer und physiologischer Ebene untersucht (siehe Einleitung: Vorergebnisse).

Zur Gewinnung der Reisolat wurde die Antrum- und Korpusmukosa des jeweiligen Gerbil-Magens homogenisiert und die Suspension auf Streptomycinplatten ausgestrichen. Es wurden pro Tier jeweils zwei *H. pylori*-Kolonien aus Antrum- und Korpusmukosa auf Vermehrung kultiviert, dann in Einfriermedium resuspendiert und bei -70 °C gelagert.

2.2.2 Arbeiten mit Bakterien

2.2.2.1 Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien

Die *H. pylori*-Reisolat wurden durch Ausstreichen aus der Dauerkultur auf jeweils einer 1/2 Streptomycin-Serumplatte kultiviert. Im Brutschrank wurden sie bei 37 °C unter mikroaerophilen Bedingungen für 2-3 Tage inkubiert (Begasung mit 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂). Anschließend wurden die Kulturen zur Erhöhung der Koloniedichte täglich auf eine ganze Serumplatte weitergestrichen. Zur Stammerhaltung wurden dicht auf Serumplatten gewachsene *H. pylori*-Kulturen in Einfriermedium resuspendiert und bei -70 °C eingefroren.

2.2.2.2 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen

Zur Bestimmung der optischen Dichte (OD) einer Bakteriensuspension wurden die Bakterien mit einem sterilen Wattestäbchen von der jeweiligen Platte abgenommen, im gewünschten Medium resuspendiert und anschließend im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda=550$ nm gemessen (OD_{550}). Dabei diente eine Kunststoffküvette, befüllt nur mit Flüssigmedium, zum Abgleichen.

2.2.3 Arbeiten mit Proteinen

2.2.3.1 Herstellung von Zell-Lysaten

Zur Gewinnung von geeigneten Bakterienlysaten für die Gelelektrophorese wurden Bakterien von einer $\frac{1}{2}$ Serumplatte in H_2O resuspendiert und im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer (2x) versetzt. Anschließend wurden die Proben im Heizblock bei $96^\circ C$ 10 Minuten erhitzt, wodurch die Denaturierung der Proteine bis hin zur Primärstruktur erreicht wurde.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung der bakteriellen Proteine wurde mit dem Gelelektrophorese-System von Bio Rad durchgeführt. Dabei wurde das Trenngel je nach Größe des zu untersuchenden Proteins in geeigneten Konzentrationen gegossen. Für das 220 kDa große Protein CagY wurde ein 6%-iges Gel verwendet, für die Proteine CagA (140 kDa) und BabA (75 kDa) ein 8%-iges und für das 34 kDa große Protein OipA ein 12%-iges Gel. Die Konzentration des Sammelgels betrug stets 5%. Nach Polymerisation der Gele wurden jeweils 10 μl Probenvolumen in die Kammtaschen aufgetragen sowie mindestens ein Proteinstandard. Nach Einsetzen der Gele in die Laufapparatur wurden 500 ml SDS-EP-Laufpuffer zugegeben und die Gele für ca. eine Stunde einer Spannung von 120 V ausgesetzt.

2.2.3.3 Western Blot

Allgemeiner Western Blot

Die geelektrisch aufgetrennten Proteine (siehe 2.2.3.2) wurden vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde ein Stapel, bestehend aus zwei dicken und zwei dünnen Filterpapieren, aus der PVDF-Membran sowie dem SDS-Gel luftblasenfrei auf die Graphitanode gelegt. Darauf folgte ein Stapel aus wiederum zwei dünnen und zwei dicken Filterpapieren. Die Filterpapiere wurden jeweils zuvor mit Western-Transferpuffer getränkt, die PVDF-Membran mit Methanol benetzt. Auf das Blot-"Sandwich" wurde die Graphitkathode aufgebracht. Der Proteintransfer erfolgte anschließend für ca. 100 min bei 60 mA. Nach dem Blotvorgang wurden die Membranen in 50 ml Falcons überführt und mit TBS und 3% BSA für eine Stunde geblockt. Danach erfolgte die Zugabe des entsprechenden primären Antikörpers (für CagY: AK 273; für CagA: AK 257; für BabA: AK 277 und für OipA: AK 282). Die Membranen wurden anschließend über Nacht auf dem Rollschüttler bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach dem 8-maligen Waschen der Membranen mit 5 ml TBS (1x) + 0,5% Tween20 jeweils der sekundäre Antikörper Anti-Kaninchen-Protein-A-Alkalische Phosphatase für eine Stunde zugegeben und die Membranen wiederum auf dem Rollschüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion mittels 10 ml der Detektionslösung (0,1 M Tris-HCl; pH 9,6; 5 mg/ml BCIP; 1 M MgCl₂ und 1 mg/ml NBT). Nach Sichtbarwerden der Banden wurde die Reaktion im Wasserbad gestoppt.

2.2.3.4 Phosphotyrosin Western Blot

Mit den entsprechenden Proben, welche mittels Zellkultur gewonnen worden waren (siehe 2.2.4.2), wurde die Gelelektrophorese und der Western Blot wie unter 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die Membranen in Falcons (50 ml) überführt und über Nacht mit 5 ml TBS + 3% BSA-Puffer geblockt.

Am nächsten Tag wurden die Membranen gewaschen und der primäre Antikörper PY99 (1:1000) in 5 ml TBS + 3% BSA für zwei Stunden zugegeben.

Nach dem Waschen wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper Anti-Maus-POX (1:2000) in 5 ml TBS + 3% BSA für eine Stunde versetzt. Nach dem erneuten Waschen wurde den Membranen das Western Blotting Detection Reagens (ECL) zugefügt und die Membranen in der Photokammer entwickelt. Die Belichtungszeit betrug 5-20 Minuten.

2.2.3.5 CagA-POX Western-Blot

Das Vorgehen erfolgte wie beim allgemeinen Western Blot (siehe 2.2.3.3), das Blocken erfolgte jedoch über Nacht mit 5 ml Absättigungspuffer je Membran. Nach dem Waschen wurde der AK 257 in 5 ml Verdünnungspuffer zugegeben und für eine Stunde auf dem Rollschüttler inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers Anti-Kaninchen-POX in 5 ml VP-Puffer für 45 min. Die Detektion erfolgte analog zum Phosphotyrosin-Blot mittels ECL und anschließender Entwicklung im Photolabor.

2.2.3.6 ELISA zur Quantifizierung von IL-8

Der Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA) dient dem Nachweis von Proteinen, Hormonen oder Toxinen mittels spezifischer Antikörperbindung. Hier sollte das Zytokin IL-8 quantifiziert werden, das als Marker für eine durch *H. pylori* induzierte Immunantwort von AGS-Zellen angesehen werden kann. Die Gewinnung der Proben erfolgte durch Abpipettieren des Überstandes von AGS-Zellen nach vierstündiger Infektion mit *H. pylori*-Reisolaten (wie nach 2.2.4.2 beschrieben). Die ELISA-Platten wurden zunächst mit 50 µl in Coating-Puffer verdünntem humanen anti-IL-8-Antikörper beschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten 4x mit Waschpuffer gewaschen. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurden diese für 2-4 Stunden bei Raumtemperatur mit Blocking-Puffer 1 inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde dann je 100 µl der zu untersuchenden Probe doppelt aufgetragen. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe von 800/400/200/100/50/25/12,5/0 pg/ml IL-8 in RPMI-Medium + 10% FCS hergestellt und Doppelproben aufgetragen. Die Platten wurden über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Platten 4x gewaschen. Der anti-IL-8-Detektionsantikörper wurde in Blocking-Puffer 2 gelöst und anschließend je 100 µl pro Well aufgetragen. Bei Raumtemperatur wurde 1 bis 2 Stunden inkubiert und die Platten wurden anschließend erneut 4x gewaschen. Von der vorbereiteten Konjugatlösung wurden 100 µl pro Well zugegeben und die Platten für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Platten 6x gewaschen. Die Substratlösung wurde pipettiert und zur Detektion jedes Well mit 100 µl TMB im Dunkeln inkubiert. Bei gewünschter Blaufärbung wurde die Reaktion mit je 50 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt und anschließend mittels des ELISA-Readers bei 450 nm gelesen (Referenzwellenlänge 570 nm).

2.2.3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der IL-8-Proben nach Bradford wurden pro Well einer 96-Well-Platte 10 µl der Probe pipettiert, mit Bradford-Reagenz versetzt und 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Eine Eichkurve wurde jeweils mittels bekannten BSA-Konzentrationen vorgelegt. Die Messung erfolgte bei 595 nm am Fluoreszenz-Reader unter Verwendung des Computerprogramms Magelan.

2.2.3.8 Anreicherung in Flüssigkultur für 2D-Gelelektrophorese

Auf Serumplatten gut angewachsene Kulturen von *H. pylori*-Reisolaten wurden in BB + FCS (10%) suspendiert, die OD gemessen und die entsprechende Menge Bakteriensuspension (OD=0,1) in Erlenmeyerkolben, vorbefüllt mit 20 ml BB + FCS (10%), pipettiert. Die Gefäße wurden über Nacht in Anaerobiertöpfen bei 37°C und 90 rpm inkubiert. Zur Kontrolle auf Kontaminationsfreiheit wurden LB-Platten beimpft. Nach 12 Stunden wurde die OD erneut gemessen und die Proben in Falcons überführt. Nach Abzentrifugieren und Absaugen des Überstandes wurden die Pellets in PBS gelöst und in Eppendorf-Tubes dann bei -20°C eingefroren. Die 2D-Gelelektrophorese wurde von der Dienstleistungseinheit Biotechnologie des MvP-Institutes durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels des Computerprogramms Densitometer GS-800 von BioRad.

2.2.4 Arbeiten mit Zellkulturen

2.2.4.1 Kultivierung von AGS-Zellen

Es wurde die humane Magenkarzinomzelllinie AGS verwendet. Diese Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Als Nährmedium diente RPMI, angereichert mit 10% FCS. Da die Zelldichte sich im Durchschnitt über Nacht um etwa 30% vermehrt, wurden die Zellen zur Weiterführung regelmäßig gesplittet. Hierbei wurde der Zellrasen mit DPBS gewaschen, das Waschmedium abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 2 ml Trypsinlösung (TE) vom Flaschenboden gelöst. Die möglichst vollständige Ablösung wurde mikroskopisch kontrolliert und das TE durch Zugabe von 8 ml RPMI + FCS inaktiviert. Nach Überführen in ein 50 ml Falcon wurde 4 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Nach Resuspendierung des Pellets in 10 ml RPMI + FCS wurde eine errechnete Menge (bei einer Konfluenz von 100% z.B. 3,33 ml) in eine vorbereitete Zellkulturflasche (hier z.B. 16,66 ml RPMI mit FCS + Penicillin/Streptomycin) überführt und anschließend im Brutschrank kultiviert.

2.2.4.2 Infektionsexperimente mit *H. pylori*

Zur Analyse der Phosphorylierung von CagA in der Wirtszelle sowie zur Bestimmung der durch die Reisolat hervorgerufenen IL-8-Konzentrationen wurden AGS-Zellen für vier Stunden mit Bakterien-Reisolaten infiziert. Hierzu wurden am Vortag der Infektion 6 Well-Platten (für CagA⁺-Proben) bzw. 12 Well-Platten (für IL-8-Proben) mit AGS-Zellen inkubiert. Zur Infektion war eine Konfluenz der AGS-Zellen von 70% erwünscht. Die so angewachsenen 6-/12-Well-Platten wurden am Infektionstag mit DPBS gewaschen und mit neuem RPMI-FCS-Medium befüllt. Die Reisolat-Bakterien wurden so vorbereitet, dass sie am Infektionstag gut angewachsen waren. Die Bakterien wurden in RPMI + FCS resuspendiert, die OD₅₅₀ gemessen und dann das entsprechende Volumen zur Stimulierung (OD=0,1) AGS-Zellen zugegeben. Die Infektion erfolgte vier Stunden im Brutschrank.

2.2.4.3 Gewinnung von Proben für Phosphotyrosin-Blot

Nach vier Stunden wurde jede 6-Well-Platte mit kaltem PBS-Puffer gewaschen, der Waschpuffer wieder abgesaugt und anschließend in jedes Well 500 µl PBS*-Puffer pipettiert. Mit dem Zellschaber wurde der AGS-Reisolat-Rasen gelöst und in Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach Abzentrifugieren und Resuspendieren der Pellets in PBS*-Puffer wurde gleiches Volumen SDS-Probenpuffer (2x) zugegeben. Die Proben wurden anschließend zur Renaturierung 10 min bei 96°C erhitzt. Sie wurden bis zur Verwendung im Tiefkühlschrank bei -20 °C gelagert.

2.2.4.4 Gewinnung der Proben für IL-8 ELISA

Nach einer Infektionszeit von vier Stunden (wie in 2.2.4.2. beschrieben) wurde von jeder 12-Well-Vertiefung 1 ml des Überstandes abpipettiert. Bis zur Verwendung der Proben wurden diese bei -20 °C gelagert.

2.2.5 Arbeiten mit DNA

2.2.5.1 DNA-Isolierung

Zur DNA-Isolierung der Bakterien-Reisolate von *H. pylori* wurde das QIAquick DNA Gel Extraction Mini Kit nach Herstelleranleitung verwendet.

Die Konzentration der gewonnenen DNA-Proben wurde anschließend mit dem Nano Drop Spektrophotometer gemessen.

2.2.5.2 PCR

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) ist eine quantitative Methode zur Vervielfältigung geringer DNA Mengen. Zwei Oligonukleotidprimer binden gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge. Das hitzestabile Enzym *Taq*-Polymerase katalysiert nach Zugabe der vier Desoxyribonukleotiden die Verlängerung der Einzelstränge vom 3'-Ende der Primer aus. Durch erneutes Erhitzen denaturieren die entstandenen DNA-Doppelstränge, und die Primer können erneut an alle vier nun freien DNA-Stränge binden. Durch mehrfache

Wiederholung dieses Vorgangs kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der ursprünglich vorhandenen DNA.

PCR-Ansatz für eine DNA-Probe von 3 µl:

Reinstwasser:	13,35 µl
10x Puffer:	2,50 µl
MgCl ₂ (2, 5 mM):	2,00 µl
dNTP-Mix (2,5 mM):	2,00 µl
Primer A (10 µM):	1,00 µl
Primer B (10 µM):	1,00 µl
Taq-Polymerase	
TaKaRa (5 units/µl):	0,15 µl
DNA-Probe:	<u>3,00 µl</u>
Gesamtmenge:	25,00 µl

Anschließend wurde das PCR-Gerät wie folgt programmiert:

- 1) Prädenaturierung: 95 °C für 5 min
- 2) Denaturierung: 95 °C für 30 sec
- 3) Annealing: 52 °C für 60 sec
- 4) Extension: 72 °C für 90 sec (*oipA*), bzw. 150 sec (*babA*)
- 5) Postextension: 72 °C für 5 min

Die Schritte 2-4 wurden 35x durchlaufen.

Die amplifizierten Proben wurden bis zur Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.2.5.3 Gelelektrophorese der DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung verschieden langer DNA-Fragmente.

Es wurde jeweils ein 1%-iges Agarosegel gegossen und nach Abkühlung und Festwerden in die mit TAE-Puffer gefüllte Gel-Laufkammer gelegt. Die Kämme wurden vorsichtig im Puffer gezogen. Das PCR-Produkt (3 µl) wurde mit gleichem Volumen GEBS (3 µl) versetzt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Der DNA-Standard wurde in die äußeren beiden Taschen aufgetragen. Die PCR-Fragmente wurden im elektrischen Feld bei einer Spannung

von 100 V für etwa eine Stunde aufgetrennt. Danach wurde das Gel für 10-15 min in einem Ethidiumbromidbad angefärbt. Die DNA-Banden wurden durch UV-Licht (260 nm) im Gel-Detektionsgerät sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurden Computerausdrucke der Gele verwendet.

2.2.5.4 Sequenzierung der DNA

Zur Sequenzierung der DNA wurde die DNA der Reisolat nach 2.2.5.1 isoliert. Dazu wurde die DNA-Konzentration am Nano Drop Spektrophotometer gemessen. Die errechnete Menge DNA wurde mit Wasser auf 15 µl Gesamtvolumen aufgefüllt, die Röhren mit Barcodes versehen sowie die spezifischen Primer beigefügt. Die Sequenzierung erfolgte mittels der Sanger-Methode durch die Firma Eurofins Medigenomix.

3 Ergebnisse

Das Bakterium *H. pylori* zeigt eine hohe genetische Diversität und löst durch seine Besiedlung und die Wirkung seiner Virulenzfaktoren Veränderungen im Magen des Wirtes aus. Die resultierende Immunantwort des Wirtes dient in erster Linie der Abwehr des Krankheitserregers, führt aber ebenfalls zu Veränderungen der Mukosa sowie des Mikroklimas im Magen. Eine Gastritis kann die Folge beider Ereignisse sein. Bei Fortbestehen können neben der Gastritis auch Ulzera entstehen. Kommen weitere Faktoren hinzu, so kann sich auf dem Boden dieser Veränderungen sogar ein Adenokarzinom entwickeln.

Das Bakterium *H. pylori* kann sich den ständig verändernden Umgebungsbedingungen und sogar der Immunreaktion des Wirtes so anpassen, dass es zumeist ein Leben lang in seiner ökologischen Nische Magen überleben kann.

Zur Analyse der Pathomechanismen von *H. pylori* wurde der Mongolische Gerbil als Tiermodell verwendet. In einem Zeitexperiment wurden Tiere mit HPB8 (WT) oder HPB8 Δ cagY (Mutante) infiziert. Reisolat wurden zu den Zeitpunkten 4, 8, 16, 32 und 64 Wochen isoliert. Die *H. pylori*-Reisolutionsrate der Reisolat aus WT- bzw. Mutante-infizierten Gerbils wurde nach Homogenisierung des Gewebes durch Kultivierung auf Serumplatten bestimmt. Die Reisolutionsrate lag beim WT im Durchschnitt bei 81,4 % und bei der Mutante immer bei 100 % (Tab.2).

Tabelle 2: Reisolutionsraten von *H. pylori* bei Reisolaten von HPB8 (WT) und HPB8 Δ cagY (Mutante), gewonnen aus Mongolischen Gerbils.

WT

Wochen	4	8	16	32	64
%	75 %	86 %	91 %	89 %	66 %

Mutante

Wochen	4	8	16	32	64
%	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Reisolate bieten auf besondere Weise die Möglichkeit, Veränderungen von Bakterien durch den längerfristigen Kontakt mit dem Wirt und die Interaktion zwischen beiden analysieren zu können.

Es interessierte nun zunächst die Frage, inwiefern ausgewählte Virulenzfaktoren über den Zeitverlauf kontinuierlich exprimiert worden waren. Es wurden die für die Pathogenität des Bakteriums als essentiell geltenden Proteine CagY und CagA des *cag*-PAI-Systems sowie zwei wichtige Adhäsine, welche der Besiedlung des Magens dienen, das *blood-group-antigen A* (BabA) und das *outer inflammatory protein A* (OipA), ausgewählt. Dabei wurden die vier Proteine sowohl von Reisolaten aus WT-infizierten als auch aus Δ *cagY*-Mutante-infizierten Tieren mittels Western Blot analysiert.

Im nachfolgenden Teil der Arbeit wird der Begriff "Wildtyp-Reisolat" abgekürzt mit WT-Reisolat und steht für Reisolate, welche aus Mongolischen Gerbils isoliert wurden, die mit dem Originalstamm HPB8 (Wildtyp) infiziert worden waren. Hingegen bedeutet "Mutante-Reisolate", dass es sich um Reisolate handelt, welche aus Mongolischen Gerbils isoliert wurden, die mit der HPB8 Δ *cagY*-Mutante infiziert worden waren.

Die Ergebnisse der fünf Zeitpunkte: 4, 8, 16, 32 und 64 Wochen wurden vergleichend ausgewertet und so die Stabilität der Proteinexpression über den Zeitverlauf für jeden der vier untersuchten Virulenzfaktoren ermittelt. Antrum und Korpus wurden ebenfalls getrennt ausgewertet. Dabei wurde eine deutliche Bande auf der zu erwartenden Höhe auf der PVDF-Membran als positives Ergebnis gewertet. Wenn keine Bande an der entscheidenden Stelle zu erkennen war oder nur sehr schwach, bei sonst deutlichen Banden des restlichen Protein-Profiles (selten!), so wurde das Ergebnis als negativ gewertet. Es wurden je Western Blot-Tasche immer exakt 10 μ l Probe eines standardisierten Experiments aufgetragen.

Das Markerprotein Urease wurde in einem Vorexperiment für alle zur Verfügung stehenden 32 Wochen-Proben durchgeführt (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Die Western Blot-Ergebnisse lassen auf die Qualität der Proben insofern rückschließen, als jede Probe mindestens viermal auf ein jeweils unterschiedliches Protein hin untersucht wurde und dabei mindestens eines der Kontrollproteine ein positives Ergebnis aufzeigte. Die Qualität der aus den Gerbils gewonnenen Reisolate wurde somit indirekt gezeigt. War beispielsweise

kein OipA exprimiert worden (z.B. Probe 277 A1, 64 Wo), so zeigte dasselbe Reisolat aber eine Expression z.B. für CagA, CagY und BabA. Es existierte keine Probe bei der alle vier Proteine nicht nachweisbar waren.

Bei der graphischen Darstellung diente der Originalstamm HPB8 mit einer konstanten Expression des zu untersuchenden Proteins von 100% als Positivkontrolle.

3.1 Stabilität der Expression der Proteine CagY und CagA bei Reisolaten

Das Protein CagY ist als ein Strukturprotein entscheidend am Aufbau eines funktionsfähigen T4SS beteiligt. Dieser Apparat ermöglicht bei Kontakt mit dem Transmembranprotein β_1 -Integrin der Wirtszelloberfläche u.a. die Translokation von CagA in die Wirtszelle. Die Mutante enthält im Gegensatz zum WT eine Insertion des *cagY*-Gens und kann somit auch kein CagA translozieren. Das Protein CagA ist an zahlreichen Interaktionen mit der Wirtszelle und an Anpassungsvorgängen beteiligt und somit einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *H. pylori*.

3.1.1 Expressionsfrequenz des Proteins CagY von WT-Reisolaten

Die Stabilität der CagY-Expression wurde mittels der Western Blot-Methode über den Zeitverlauf von 4 bis 64 Wochen ermittelt. Dargestellt sind hier exemplarisch 13 der über 170 analysierten Reisolate (siehe Abb. 9). Von der Mutante wurden 117 Proben analysiert. Das Molekulargewicht von CagY beträgt 220 kDa.

Die erste Bande zeigt den Originalstamm HPB8 mit CagY und entspricht der Positivkontrolle. Die CagY-Banden sind auf entsprechender Höhe deutlich zu erkennen. Als primärer Antikörper wurde für CagY stets der AK273 (polyklonal) in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet, als sekundärer Antikörper stets das Kaninchen-alkalische Phosphatase-gekoppelte Protein A (AP-A) in der Verdünnung 1:2000. Für die Gelelektrophorese wurden 6%-ige Gele eingesetzt. Erfahrungsgemäß zeigt sich bei Western Blot-Gelen meist noch ein schwacher, unspezifischer Hintergrund. Besonders bei der Verwendung von polyklonalen

Antikörpern tritt dieser Effekt auf. Dieser unspezifische Hintergrund sowie mögliche Abbauprodukte wurden bei der Auswertung vom eigentlichen Signal getrennt und nicht als positives Signal gewertet.

In drei der über 170 getesteten WT-Proben zeigte sich eine um etwa 80-100 kDa verkürzte Bande, die als verändert und somit negativ gedeutet wurde. Aufgrund dieser drei verkürzten CagY-Proteine (203 K1, 203 K2, 14 K2) im Korpus bei 8 und 32 Wochen ergaben sich Werte unter 100%. Die bisher noch ausstehende Sequenzierung dieser Proben wird kausale Erklärungen über die Ursache geben können. Wir vermuten, es liegt auf Grund von möglichen Punktmutationen ein vorzeitiges Stop-Codon vor.

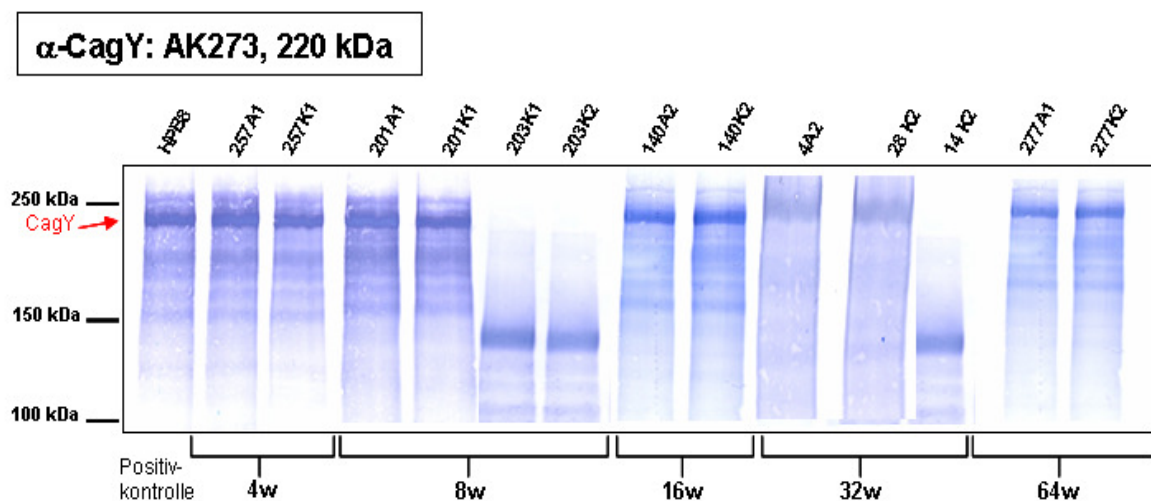


Abbildung 9: Repräsentative Western Blots mit Lysaten von WT-Reisolaten nach Detektion des Proteins CagY.

Nach Auftrennung der Bakterienlysate mittels der SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot auf eine PVDF-Membran wurde CagY mittels der Antikörper AK273 und AP-A und anschließender Farbreaktion identifiziert. Die deutlichen Banden bei jeweils 220 kDa entsprechen dem Protein CagY. Bis auf drei Ausnahmen zeigten alle Proben ein einheitliches und eindeutig dem Protein CagY zuzuordnendes Bandenmuster. Dargestellt sind die drei einzelnen Proben, welche ein verändertes Bandenmuster zeigten (Position 6, 7 und 12). Die unterhalb der gesuchten CagY-Bande zu sehenden Banden sind Abbauprodukte. Diese wurden nicht gewertet.

Die Ergebnisse aller Western Blot-Membranen der WT-Reisolate wurden für jedes Protein separat jeweils in einem Balkendiagramm dargestellt. Jeder Zeitpunkt wurde getrennt ausgewertet. Dadurch wurden eventuelle

Veränderungen über die Zeit veranschaulicht. Die Gesamtanzahl der zur Verfügung stehenden Proben aus dem Antrum bzw. Korpus je Zeitpunkt wurden als 100% gesetzt.

Tabelle 3 zeigt die Anzahl positiver Ergebnisse für das Protein CagY im Western Blot und die insgesamt zur Verfügung stehenden Reisolatproben je Zeitpunkt. Für das Protein CagY zeigte sich beim WT eine hohe Stabilität der Expression von CagY über den gesamten Zeitverlauf, sowohl im Antrum (Abb. 10: rote Diagrammbalken) als auch im Korpus (Abb. 10: blaue Diagrammbalken). Der Originalstamm HPB8 zeigte stets positive Ergebnissen für CagY und diente als Positivkontrolle.

Tabelle 3: WT-Reisolate detektiert auf CagY:

Wochen	4	8	16	32	64
Anzahl Tiere	9	5	9	18	7
Antrumproben positive/gesamt	15 / 15	9 / 9	18 / 18	36 / 36	14 / 14
Korpusproben positive/gesamt	8 / 8	7 / 9	15 / 15	30 / 32	14 / 14

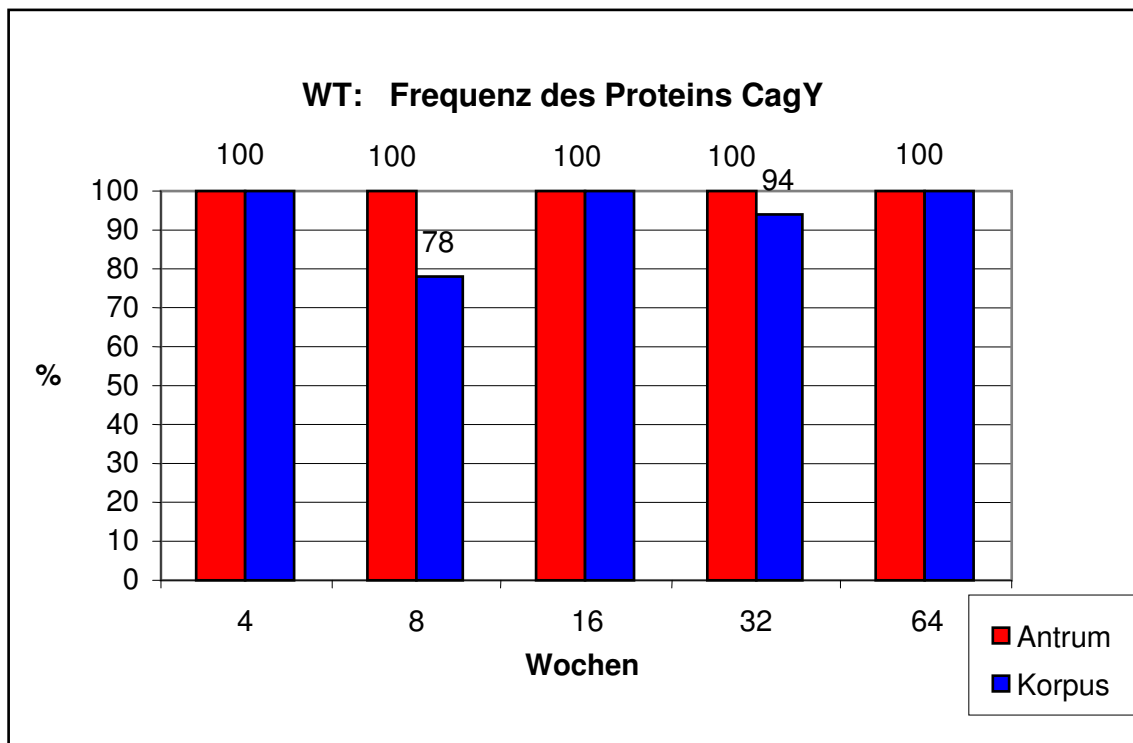


Abbildung 10: Prozentuale Darstellung aller Western Blot-Ergebnisse aus WT-Reisolaten für das Protein CagY von 4 bis 64 Wochen.

Bakterienlysate von HPB8 wurden dazu mittels eines 6%-igen SDS-Gels aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Zur Identifizierung des Proteins CagY wurden der polyklonale AK 273 und der Detektions-AK AP-A verwendet. Rote Diagrammbalken: Antrum, blaue Diagrammbalken: Korpus.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, waren zum Zeitpunkt von 4 Wochen alle der 15 zur Verfügung stehenden Antrumproben sowie alle der 8 zur Verfügung stehenden Korpusproben positiv.

Nach 8 Wochen waren 9 von 9 Antrumproben und 7 von 9 Korpusproben positiv. Zum Zeitpunkt von 16 Wochen waren wiederum alle Antrum- und Korpusproben positiv. Bei 32 Wochen waren 36 von 36 Antrumproben positiv und 30 von 32 Korpusproben positiv. Zum Zeitpunkt von 64 Wochen waren wiederum alle Antrum- und Korpusproben positiv (Tabelle 3).

Es zeigte sich eine hohe Stabilität der CagY-Expression über den gesamten Zeitverlauf im Antrum (rote Diagrammbalken) und im Korpus (blaue Diagrammbalken).

3.1.2 Expressionsfrequenz des Proteins CagA von WT-Reisolaten

Das Protein CagA ist ein Hauptvirulenzfaktor von *H. pylori*, das mit Hilfe des T4SS in die Wirtszelle transloziert wird. Es hat ein Molekulargewicht von 140 kDa und zeigt auf Höhe der Positivkontrolle klar zuzuordnende Banden. Zum späten Zeitpunkt von 64 Wochen fehlen zum Teil diese Banden, was einem negativen Ergebnis entspricht. Es wurden 13 der 170 Western Blot-Ergebnisse des Proteins CagA der WT-Reisolate exemplarisch dargestellt (Abb. 11). Als primärer Antikörper wurde AK257 (polyklonal) in der Verdünnung 1:1000 verwendet, als sekundärer Antikörper (Detektions-AK) diente AP-A (1:2000). Es wurden stets 8%-ige Gele verwendet.

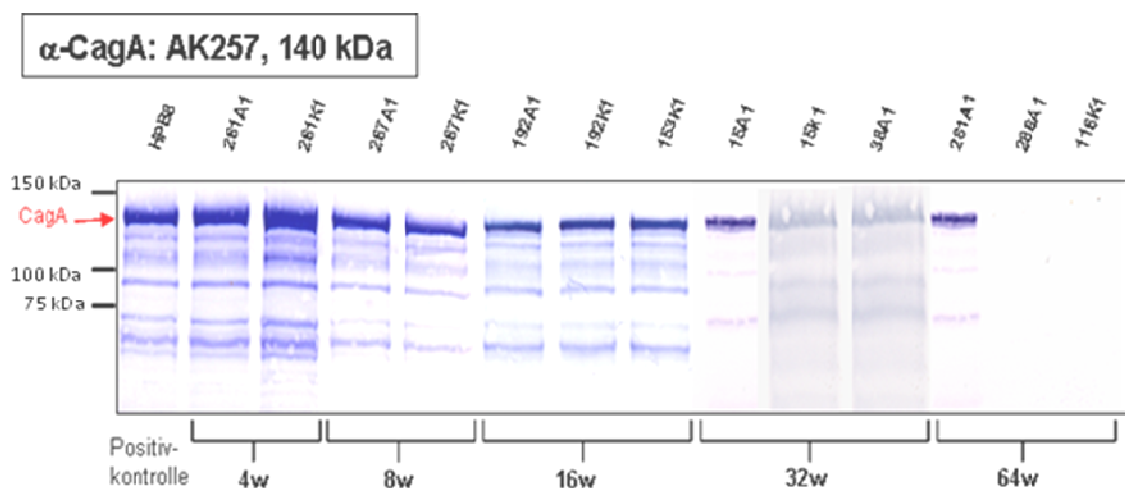


Abbildung 11: Repräsentative Western Blots mit Lysaten von WT-Reisolaten nach Detektion des Proteins CagA.

Bakterienlysate von HPB8 wurden dazu mittels eines 8 %-igen SDS-Gels aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Zur Identifizierung des Proteins CagA wurden der polyklonale AK257 und der Detektions-AK AP-A verwendet.

Die polyklonalen Antikörper zum Nachweis von CagA stammen aus dem Kaninchen und wurden in unserem Labor selbst ausgetestet. Der Einsatz dieser AK führt erfahrungsgemäß auch zur Detektion von CagA-Abbauprodukten. Das Bandenmuster zeigt eine deutliche Bande bei 140 kDa, was dem Protein CagA entspricht. Zwischen 4 und 32 Wochen zeigten sich fast durchgehend positive Ergebnisse, was einer sehr hohen CagA-Expressionsfrequenz entspricht. Negative Ergebnisse traten erst vermehrt beim späten Zeitpunkt von

64 Wochen auf. Die unterhalb der gesuchten CagA-Bande zu sehenden Banden entsprechen oben erwähnten Abbauprodukten.

Tabelle 4 zeigt die Anzahl der positiven Ergebnisse für das Protein CagA im Western Blot und die insgesamt zur Verfügung stehenden Reisolatproben pro Zeitpunkt.

Tabelle 4: WT-Reisolate detektiert auf CagA:

Wochen	4	8	16	32	64
Anzahl Tiere	9	5	9	18	7
Antrumproben positive/gesamt	15 / 15	9 / 9	18 / 18	34 / 36	8 / 14
Korpusproben positive/gesamt	8 / 8	9 / 9	15 / 15	32 / 32	10 / 14

Die Übersicht der Ergebnisse der WT-Reisolate des Proteins CagA (Abb. 12) zeigte eine zunächst hohe Stabilität der Expression des Proteins CagA über die Zeit, einschließlich dem Zeitpunkt von 32 Wochen, und eine Abnahme der Reisolate mit CagA-Expression zum späten Zeitpunkt von 64 Wochen. In den Vorergebnissen zeigte sich zu diesem Zeitpunkt bei den WT-infizierten Mongolischen Gerbils eine bereits stark geschädigte Mukosa und ab 32 Wochen im Magen der Tiere ein erhöhter pH-Wert sowie ein erhöhter Gastrin-Spiegel. Bei der Mutante hingegen fiel der pH-Wert bei 64 Wochen nach Infektion wieder ab, der Gastrin-Spiegel stieg nur minimal an. Die Expression von CagA war bei der Mutante stets bei allen untersuchten Proben gegeben. Hieraus könnte sich ein Zusammenhang zwischen den pathophysiologischen Bedingungen im Magen und den Veränderungen in der Expressionsfrequenz der *H. pylori*-Proteine ergeben.

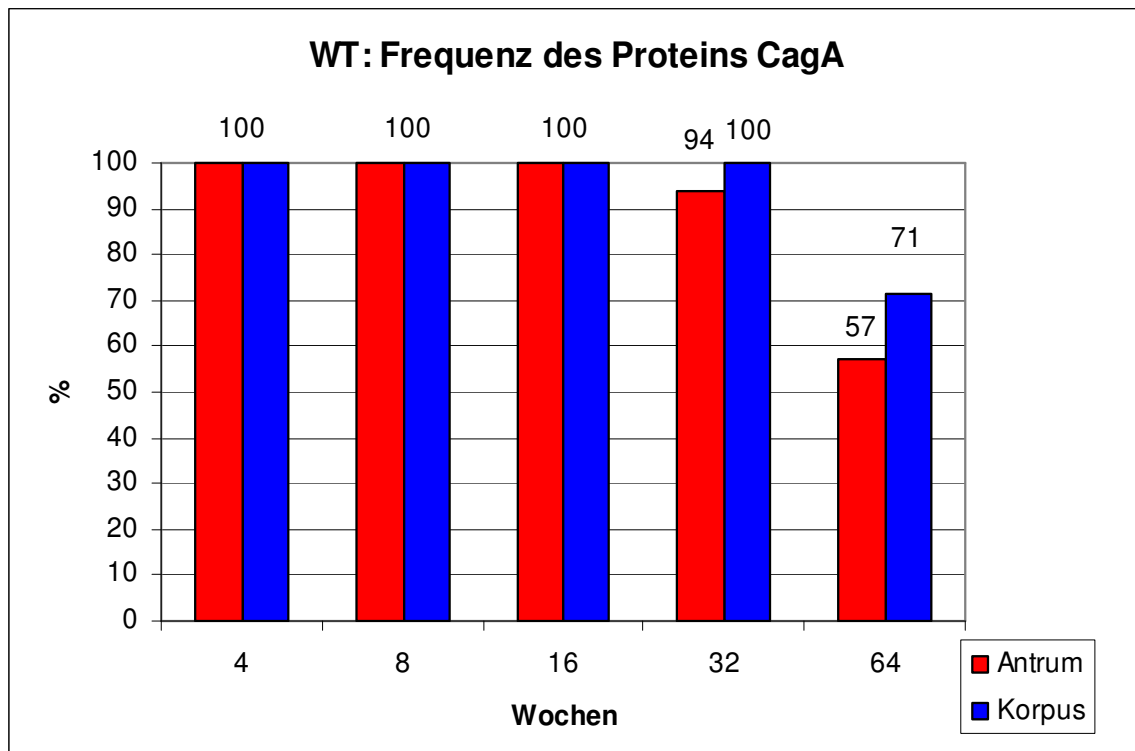


Abbildung 12: Prozentuale Darstellung aller Ergebnisse der Expression des Proteins CagA von WT-Reisolaten im Zeitverlauf von 4 bis 64 Wochen.

Nach Auftrennung der Bakterienlysate mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese wurde das Protein CagA im Western Blot mittels des Antikörpers AK 257 und Detektions-AK AP-A identifiziert.

Zu den Zeitpunkten von 4, 8 und 16 Wochen waren alle der Antrum- und Korpusproben im Western Blot positiv. Nach 32 Wochen waren 34 der 36 Antrumproben und 32 der 32 Korpusproben positiv. Zum Zeitpunkt von 64 Wochen waren 8 der 14 Antrumproben und 10 der 14 Korpusproben positiv (Tabelle 4). Der Originalstamm HPB8 zeigte stets positive Ergebnissen für CagA und diente als Positivkontrolle.

Deutlich zeigt sich die zunächst sehr hohe Stabilität der CagA-Expression im Korpus (blaue Diagrammbalken) und im Antrum (rote Diagrammbalken) bis zum Zeitpunkt von 32 Wochen. Erst nach 64 Wochen der Infektion sank die Expression von CagA in den WT-Reisolaten deutlich ab.

3.1.3 Expressionsfrequenz von CagY und CagA: Mutante-Reisolate

Für jene 117 Reisolate, isoliert aus Mongolischen Gerbils infiziert mit der HPB8 Δ *cagY*-Mutante, die eine Deletion des *cagY*-Gens trägt, zeigten sich, wie zu erwarten, keine CagY-Proteinbanden im Western Blot.

Diese Ergebnisse veranschaulichen die erfolgreiche Mutation des Genes *cagY*. Die tabellarische Übersicht (Tabelle 5) zeigt die Probenzahlen der untersuchten Mutante-Reisolatproben detektiert auf das Protein CagY. Es zeigten sich zu keinem Zeitpunkt CagY-spezifische Banden im Western Blot, deshalb wurde auf eine graphische Darstellung verzichtet.

Tabelle 5: Mutante-Reisolate detektiert auf CagY:

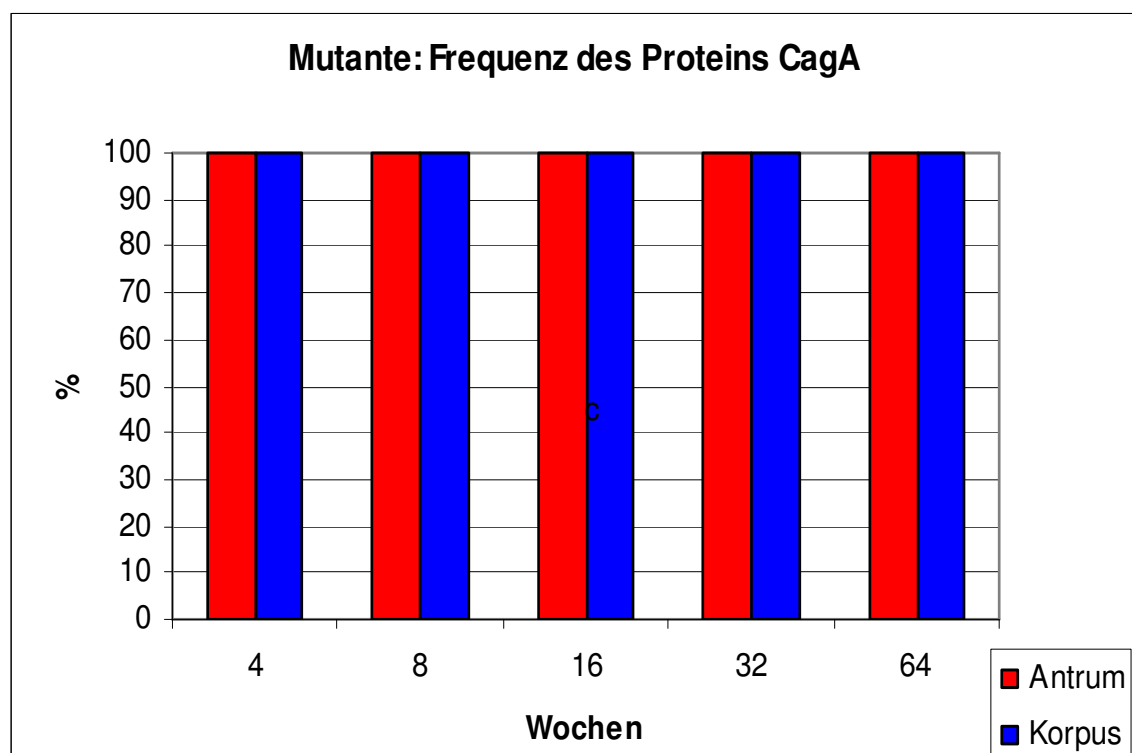
Wochen	4	8	16	32	64
Anzahl Tiere	9	5	9	18	7
Antrumproben positive/gesamt	0 / 8	0 / 9	0 / 9	0 / 29	0 / 8
Korpusproben positive/gesamt	0 / 8	0 / 7	0 / 8	0 / 23	0 / 8

Für das Protein CagA der Mutante-Reisolate zeigten sich stets positive Banden im Western Blot über den gesamten Zeitverlauf. Die infizierten Gerbilmägen zeigten histologisch eine kaum veränderte Mukosa. Der pH-Wert nahm nur leicht über die Zeit zu, und der Gastrin-Spiegel blieb bei diesen Tieren niedrig. Bei den untersuchten Mutante-Reisolaten war zwar der T4SS defekt, die Expression von CagA jedoch nicht beeinflusst.

Die Proben der Mutante-Reisolate (Tabelle 6) zeigten bei der Detektion des CagA Proteins im Western Blot hingegen eine CagA-Expressionsfrequenz von 100% über den gesamten untersuchten Zeitraum hinweg. Es waren also immer alle zur Verfügung stehenden Proben positiv. Die Tabelle 6 zeigt die Gesamtprobenanzahl je Zeitpunkt und die davon jeweils immer positiven Ergebnisse im Western Blot. Die graphische Darstellung in Abb. 13 verdeutlicht diesen Sachverhalt.

Tabelle 6: Mutante-Reisolate detektiert auf CagA:

Wochen	4	8	16	32	64
Anzahl Tiere	9	5	9	18	7
Antrumproben positive/gesamt	8 / 8	9 / 9	9 / 9	29 / 29	8 / 8
Korpusproben positive/gesamt	8 / 8	7 / 7	8 / 8	23 / 23	8 / 8

**Abbildung 13: Prozentuale Darstellung aller Ergebnisse der Expression des Proteins CagA von Mutante-Reisolaten im Zeitverlauf von 4 bis 64 Wochen.**

Bakterienlysate wurden mittels der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit dem polyklonalen Antikörper AK 257 und dem Detektions-AK AP-A analysiert. Die Expression von CagA war bei der Mutante HPB8 Δ cagY über den gesamten Zeitverlauf, sowohl in Reisolaten aus dem Antrum (rote Diagrammbalken) als auch in denen aus dem Korpus (blaue Diagrammbalken), maximal stabil.

3.2 Stabilität der Expression der Adhäsine BabA und OipA bei Reisolaten

Die Adhäsine BabA und OipA sind entscheidend an einer erfolgreichen Besiedlung des Wirtes mit *H. pylori* beteiligt. Sie gehören einer Gruppe von etwa 32 Bindungsproteinen an, den sogenannten *outer membran proteins* (OMP's). Sie binden an Oberflächenstrukturen der Wirtszelle und ermöglichen so ein Anhaften des Bakteriums an die Mukosazelle. Dieser Mechanismus schützt *H. pylori* vermutlich vor der Ausscheidung in den Verdauungstrakt durch die peristaltische Bewegung des Magens.

3.2.1 Expressionsfrequenz des Proteins BabA bei WT-Reisolaten

Das Adhäsin *blood group antigen binding adhesin A* (BabA) bindet an das Blutgruppenantigen Lewis^b. BabA wurde ebenso analysiert wie zuvor die Proteine CagY und CagA. Das Molekulargewicht des Proteins BabA beträgt 74 kDa.

Als Positivkontrolle wurde der Originalstamm HPB8, mit konstitutiver Expression von BabA, eingesetzt. Die untersuchten Reisolat-Proben zeigten entweder eine deutliche Bande auf selber Höhe wie die Positivkontrolle (74 kDa; positives Ergebnis) oder keine Bande (negatives Ergebnis).

Von den über 170 auf BabA untersuchten WT-Reisolatproben wurden wiederum exemplarisch einige Western Blots ausgewählt (Abb. 14). Als erster Antikörper wurde stets der AK277 in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt, als zweiter Antikörper diente der Detektions-AK AP-A in der Verdünnung 1:2000. Es wurden 8%-ige Gele verwendet.

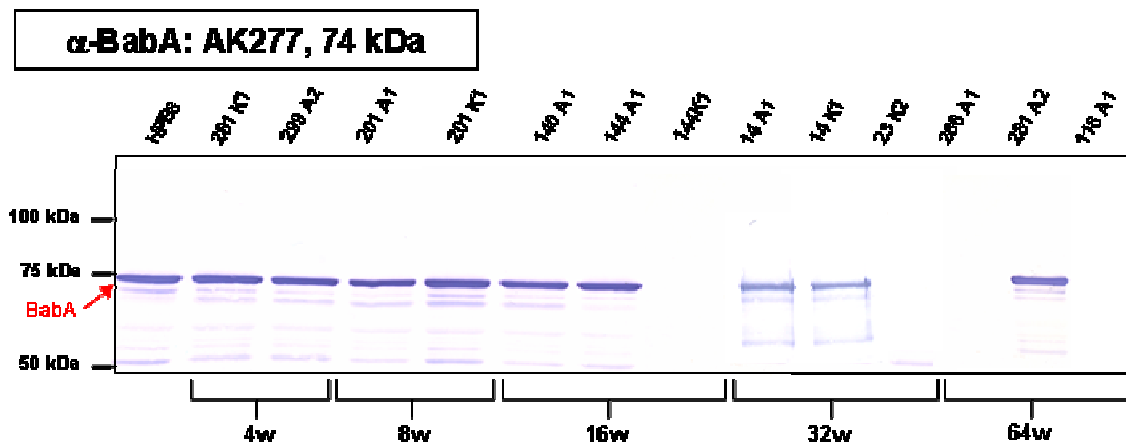


Abbildung 14: Repräsentative Western Blots mit Lysaten von WT-Reisolaten nach Detektion auf das Proteins BabA.

Die Bakterienlysate wurden mittels der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Westen Blot mit den polyklonalen Antikörpern AK 277 und Detektions-AK AP-A analysiert. Das Bandenmuster zeigte eine deutliche Bande bei 74 kDa, welche dem Protein BabA entspricht. Unterhalb der gesuchten Bande für BabA angedeutet sichtbare Banden stellen mögliche Abbauprodukte des Proteins BabA dar.

Die Tabelle 7 zeigt die Verteilung der 170 untersuchten Reisolat-Proben. Es wurden insgesamt 92 Antrum- und 78 Korpusproben, über den Zeitraum von 4 bis 64 Wochen, auf die Expressionsfrequenz von BabA untersucht.

Tabelle 7: WT-Reisolate detektiert auf BabA:

Wochen	4	8	16	32	64
Anzahl Tiere	9	5	9	18	7
Antrumproben positive/gesamt	15 / 15	8 / 9	15 / 18	27 / 36	10 / 14
Korpusproben positive/gesamt	8 / 8	9 / 9	11 / 15	22 / 32	10 / 14

Über den Zeitverlauf von 4 bis 64 Wochen fiel eine zunehmende Anzahl von negativen Ergebnissen im Western Blot auf. Alle Ergebnisse wurden zur Veranschaulichung prozentual zur getesteten Probengröße graphisch dargestellt (Abb. 15). Dabei gilt als Positivkontrolle der Originalstamm HPB8 mit einem im Western Blot stets detektierbaren BabA-Protein von 74 kDa.

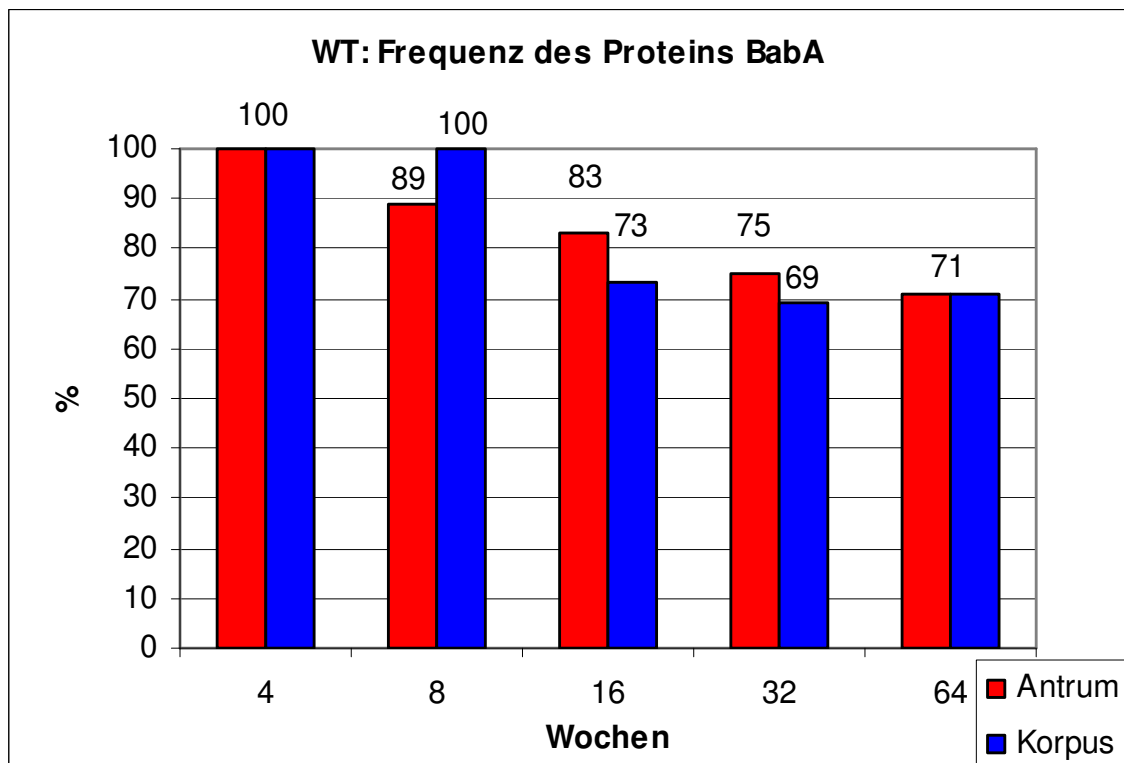


Abbildung 15: Prozentuale Darstellung aller Western Blot-Ergebnisse der Expression des Proteins BabA von WT-Reisolaten im Zeitverlauf von 4 bis 64 Wochen.

Bakterienlysate von HPB8 (WT) wurden mittels der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit dem polyklonalen Antikörper AK 277 und dem Detektions-AK AP-A analysiert.

Zum Zeitpunkt von 4 Wochen waren 15 der 15 Antrumproben im Western Blot positiv und 8 der 8 Korpusproben. Bei 8 Wochen waren 8 der 9 Antrumproben positiv und 9 der 9 Korpusproben. Nach 16 Wochen waren 15 der 18 Antrum- und 11 der 15 Korpusproben positiv. Bei 32 Wochen waren 27 der 36 Antrumproben und 22 der 32 Korpusproben positiv. Zum Zeitpunkt von 64 Wochen waren 10 der 14 Antrumproben und ebenfalls 10 der Korpusproben positiv. Es zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der Expressionshäufigkeit des Proteins BabA sowohl im Antrum (rote Diagrammbalken) als auch im Korpus (blaue Diagrammbalken).

In Abb. 15 ist deutlich zu erkennen, dass die Expressionshäufigkeit von BabA kontinuierlich über den untersuchten Zeitverlauf hinweg abnahm. Zu Beginn der Besiedlung des Magens lag die Expressionsfrequenz des Adhäsins BabA bei 100%, was eine Besiedlung mit *H. pylori* insofern begünstigen könnte, als dass

BabA ein wichtiges Protein zur Anheftung an die Magenzelle ist und zunächst ein Persistieren des Bakteriums im Magen ermöglicht. Das Antrum wird zumeist zuerst und umgehend von *H. pylori* besiedelt, da hier lokal die Magensäure kaum produziert wird. Die Reduktion der Expressionsfrequenz von BabA trat bereits 8 Wochen nach der Infektion mit dem WT HPB8 auf. Die WT-Reisolate aus der Korpus-Mukosa zeigten ab 16 Wochen eine deutliche Reduktion der BabA-Expressionshäufigkeit (ca. 30%). Insgesamt nahm sowohl in der Antrum- als auch in der Korpus-Mukosa die Expressionsfrequenz von BabA über die Zeit ab.

3.2.2 Expressionsfrequenz des Proteins OipA bei WT-Reisolaten

Das *outer membran inflammatory protein A* (OipA) bindet an die Wirtszellmembran über einen bisher noch nicht identifizierten Rezeptor. OipA wurde mittels Western Blots auf die Stabilität seiner Expression über die Zeit untersucht. Das Molekulargewicht von OipA beträgt 34 kDa. Als Positivkontrolle wurde der Originalstamm HPB8, mit stets positivem Ergebnis für OipA, eingesetzt. Als erster Antikörper diente der AK282 in der Verdünnung 1:1000, als sekundärer Antikörper der AP-A (1:2000). Es wurden durchgängig 12%-ige Gele verwendet. Exemplarisch wurden 12 der 170 Western Blot-Ergebnisse der WT-Reisolate in Abb. 16 dargestellt.

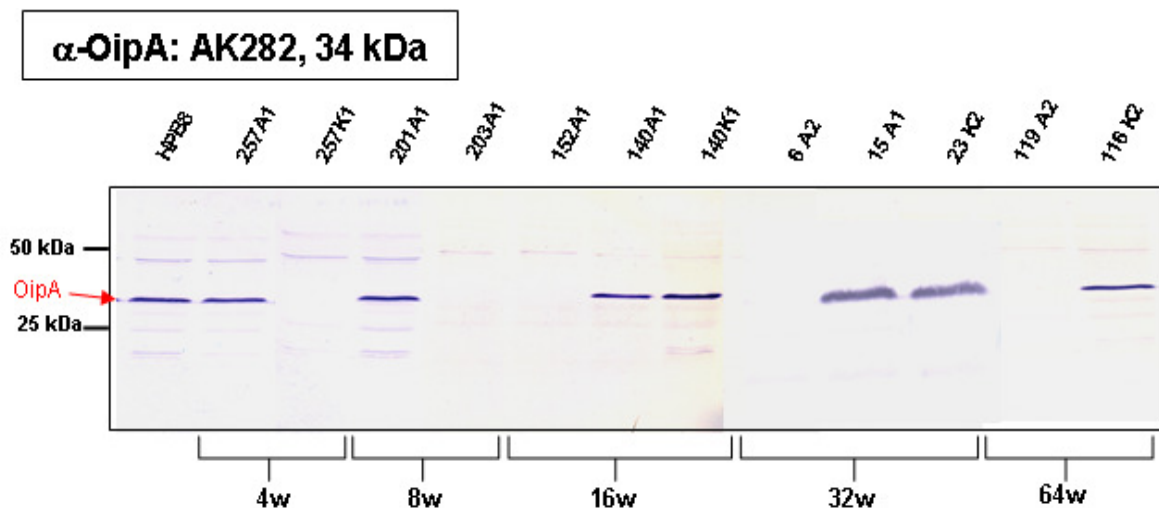


Abbildung 16: Repräsentative Western Blots mit Lysaten von WT-Reisolaten nach Detektion des Proteins OipA.

Nach Auftrennung der Bakterienlysate in der SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot wurde OipA mittels des polyklonalen Antikörpers AK 282 und des Detektionsantikörpers AP-A identifiziert.

Das Bandenmuster in Abb. 16 zeigt eine deutliche Bande bei 34 kDa, was dem Protein OipA entspricht. Über den gesamten Zeitverlauf von 4 bis 64 Wochen zeigten sich wiederholt negative Ergebnisse im Western Blot (keine erkennbare Bande bei 34 kDa).

In Tabelle 8 wurde die Anzahl der positiven Ergebnisse beim Nachweis des OipA-Proteins der WT-Reisolate über den Zeitverlauf, aufgetrennt nach Antrumproben und Korpusproben, aufgelistet.

Tabelle 8: WT-Reisolate detektiert auf OipA:

Wochen	4	8	16	32	64
Anzahl Tiere	9	5	9	18	7
Antrumproben positive/gesamt	15 / 15	7 / 9	14 / 18	25 / 36	6 / 14
Korpusproben positive/gesamt	6 / 8	9 / 9	13 / 15	25 / 32	5 / 14

Die gesamten Ergebnisse der WT-Reisolate mit Detektion auf das Protein OipA wurden in Abbildung 17 zusammenfassend dargestellt. Der Originalstamm HPB8 zeigte stets positive Ergebnissen für OipA und diente als Positivkontrolle.

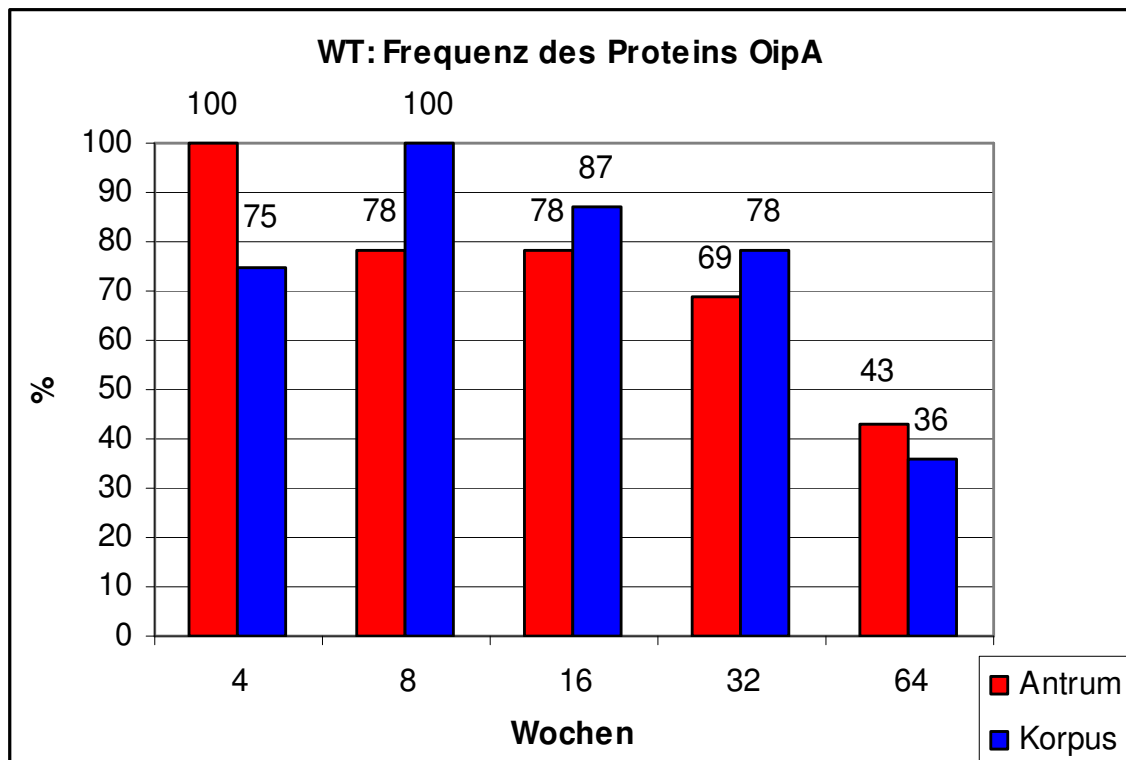


Abbildung 17: Prozentuale Darstellung aller Western Blot-Ergebnisse der Expression des Proteins OipA von WT-Reisolaten im Zeitverlauf von 4 bis 64 Wochen.

Bakterienlysate wurden nach Auftrennung mittels der SDS-Gelelektrophorese im Western Blot mit dem polyklonalen Antikörpern AK 282 und dem Detektions-AK AP-A analysiert.

Zum Zeitpunkt von 4 Wochen waren 15 der insgesamt 15 Antrumproben im Western Blot positiv und 6 der insgesamt 8 Korpusproben. Bei 8 Wochen waren 7 der 9 Antrumproben positiv und 9 der 9 Korpusproben. Nach 16 Wochen waren 14 der 18 Antrum- und 13 der 15 Korpusproben positiv. Bei 32 Wochen waren sowohl 25 der 36 Antrumproben als auch 25 der 32 zur Verfügung stehenden Korpusproben positiv. Zum Zeitpunkt von 64 Wochen waren noch 6 der 14 Antrumproben und 5 der insgesamt 14 Korpusproben positiv.

Sowohl bei Reisolaten aus dem Antrum (rote Diagrammbalken) als auch aus dem Korpus (blaue Diagrammbalken) zeigte sich eine Abnahme der Expressionsfrequenz von OipA über den Zeitverlauf. Die Abb. 17 macht

deutlich, dass die Expressionshäufigkeit von OipA bei den WT-Reisolaten über den gesamten Zeitverlauf bereits reduziert war, mit insgesamt abnehmender Tendenz. Während OipA im Antrum zu Beginn der Besiedlungszeit in 100% der WT-Reisolate exprimiert wurde, was sich auf die Besiedlungsdichte der Magenmukosa fördernd auswirken könnte, sank die Expressionsfrequenz des Proteins nach 8 Wochen um über 20%, nach 64 Wochen Infektion sogar um nahezu 60% ab. Im Korpus konnte durchschnittlich bei 80% der WT-Reisolate eine OipA-Expression nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt von 64 Wochen nach Infektion sank die OipA-Expressionsrate sowohl im Antrum als auch im Korpus um ca. 60%. Dies könnte einem ON/OFF-Mechanismus entsprechen, wie er von Kudo *et al.* [46], Salaün *et al.* [86] und weiteren Autoren beschrieben wird.

3.2.3 Expressionsfrequenz von BabA und OipA: Mutante-Reisolate

Die graphische Darstellung der 82 Western Blot-Ergebnisse der Mutante-Reisolate (Abb. 18) zeigte, im Gegensatz zu den WT-Reisolaten (Abb. 15), eine sehr stabile Expressionsfrequenz von BabA über den Zeitverlauf, bei kaum veränderter Magenmukosa des Wirtes.

Für OipA war die Expressionsfrequenz bei den 94 analysierten Mutante-Proben (Abb. 19) verglichen mit den WT-Reisolaten (Abb. 17) reduziert, sank insgesamt aber nur um 30-40% ab. Hier war wiederum die Häufigkeit der OipA-Expression im Korpus, bis auf den Zeitpunkt 4 Wochen und 64 Wochen, etwas höher als im Antrum. Dies könnte auf eine Rolle des Proteins OipA bei der Besiedlung des Korpus hindeuten.

Die Auflistung der insgesamt zur Verfügung stehenden Mutante-Reisolatproben und die hiervon im Western Blot positiven Ergebnisse sind in Tabelle 9 für BabA und in Tabelle 10 für OipA dargestellt. Die graphische Darstellung dieser Ergebnisse sind für BabA in Abb. 18 und für OipA in Abb. 19 gezeigt. Der Originalstamm HPB8, mit immer positiver Bande im Western Blot, galt jeweils als Positivkontrolle.

Tabelle 9: Mutante-Reisolate detektiert auf BabA:

Wochen	4	8	16	32	64
Anzahl Tiere	9	5	9	18	7
Antrumproben positive/gesamt	8 / 8	9 / 9	9 / 9	11 / 11	7 / 8
Korpusproben positive/gesamt	8 / 8	7 / 7	8 / 8	6 / 6	8 / 8

Nur zum späten Zeitpunkt von 64 Wochen hatte sich ein negatives Ergebnis bei den Mutante-Reisolaten im Western Blot zur Detektion von BabA gezeigt.

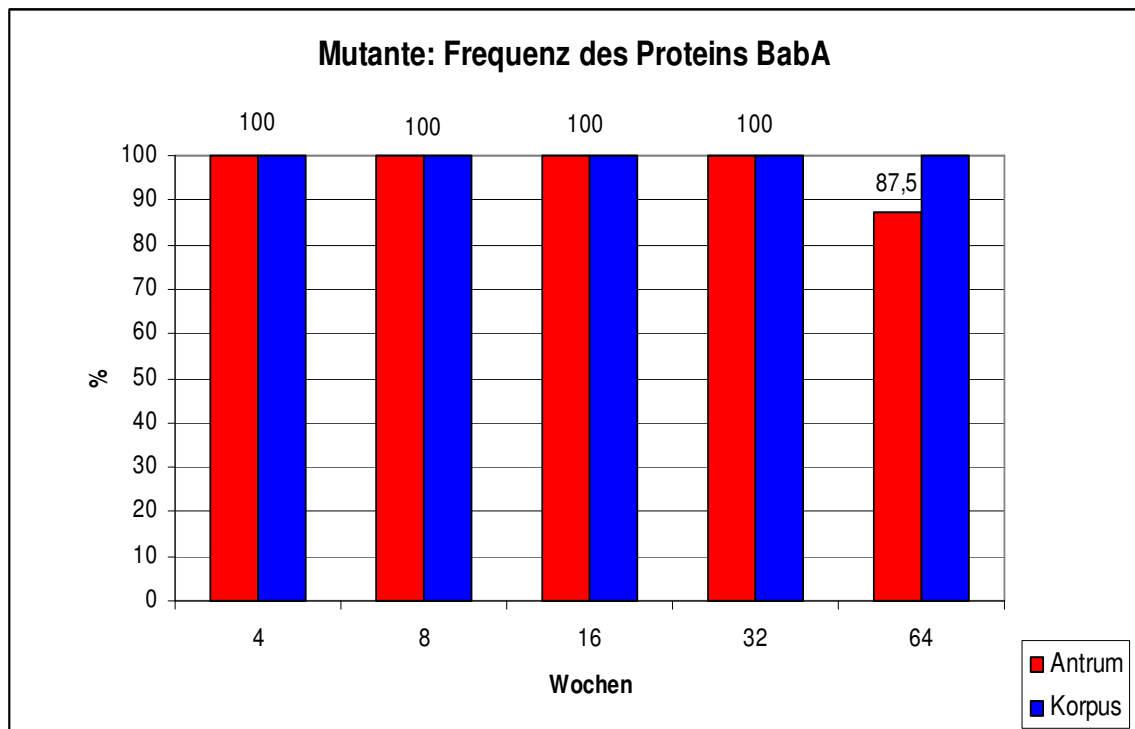


Abbildung 18: Prozentuale Darstellung aller Ergebnisse der Expression des Proteins BabA von Mutante-Reisolaten im Zeitverlauf von 4 bis 64 Wochen.

Bakterienlysate des HPB8 Δ *cagY* wurden mittels der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend im Western Blot mit dem polyklonalen Antikörper AK 277 und dem Detektions-AK AP-A analysiert.

Die Expression von BabA war bei der Mutante HPB8 Δ *cagY* über den gesamten Zeitverlauf, sowohl in Reisolaten aus dem Antrum (rote Diagrammbalken) als auch in denen aus dem Korpus (blaue Diagrammbalken), sehr stabil.

Tabelle 10: Mutante-Reisolate detektiert auf OipA:

Wochen	4	8	16	32	64
Anzahl Tiere	9	5	9	18	7
Antrumproben Positive/gesamt	7 / 8	7 / 9	6 / 9	11 / 16	6 / 8
Korpusproben Positive/gesamt	7 / 8	7 / 7	6 / 8	10 / 12	5 / 8

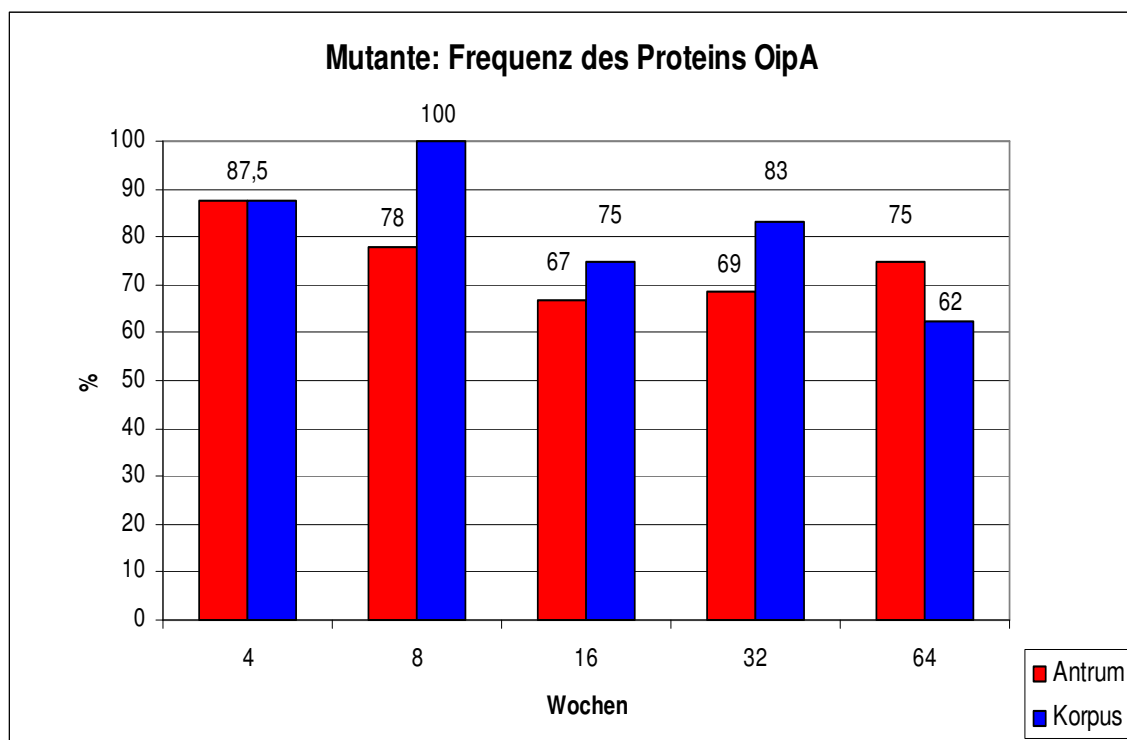


Abbildung 19: Prozentuale Darstellung aller Ergebnisse der Expression des Adhäsins OipA von Mutante-Reisolaten im Zeitverlauf von 4 bis 64 Wochen.

Nach Auftrennung der Bakterienlysate von HPB8 Δ *cagY* mittels der SDS-Gelelektrophorese wurden diese im Western Blot mit den polyklonalen Antikörpern AK 282 und Detektionsantikörper AP-A analysiert.

Die Anzahl der Reisolatproben insgesamt und die Anzahl der hiervon positiven Ergebnisse im Western Blot zeigt Tabelle 10. Die Expressionsfrequenz von OipA war bei der Mutante HPB8 Δ *cagY* über den gesamten Zeitverlauf, sowohl in Reisolaten aus dem Antrum (rote Diagrammbalken) als auch in denen aus dem Korpus (blaue Diagrammbalken), reduziert.

Zusammenfassung der Ergebnisse zur Expressionsfrequenz:

Insgesamt wurden die Proteine CagY und, bis einschließlich 32 Wochen, auch CagA bei WT-Reisolaten über die gesamte Zeit sehr stabil exprimiert. Die Bedingungen in der Magennukosa der Mongolischen Gerbils hatten sich im Gegensatz hierzu stark verändert.

Die Expression des Adhäsins BabA der WT-Reisolate nahm im Antrum ab 8 Wochen kontinuierlich ab, im Korpus ab 16 Wochen, parallel zu einer sich stetig verändernden Mukosa. Für OipA schwankte die Expressionsfrequenz etwas stärker über den Zeitverlauf hinweg und war nach 4 Wochen bereits vermindert. Im Antrum sank die Expression bis 16 Wochen, nahm ab 32 Wochen aber wieder leicht zu. Im Korpus schwankte die Expression je Zeitpunkt, war nach 64 Wochen aber um ca. 25% gegenüber dem Wert bei 4 Wochen gesunken.

Bei relativ konstanten physiologischen und histologischen Bedingungen im Wirt, wie es bei den mit der Mutante infizierten Gerbils der Fall war, zeigte sich eine sehr hohe Stabilität in der Expressionsfrequenz der Proteine CagA und BabA. OipA zeigte hingegen, ähnlich wie bei den WT Reisolaten, eine deutlich geringere Stabilität der Expressionshäufigkeit. CagY war bei der Mutante HPB8 Δ cagY erwartungsgemäß nicht exprimiert worden, da das entsprechende Gen fehlte.

3.2.4 Statistische Auswertung der Ergebnisse zur Expressionsfrequenz von CagA, BabA und OipA

Unter Berücksichtigung der Vorergebnisse aus der Infektionsstudie von Mongolischen Gerbils, die deutliche pathophysiologische Veränderungen über die Zeit erbrachte (u.a. frühe und hochgradige Gastritis in WT- im Vergleich zur Mutante-infizierten Tieren, Unterschiede in der Besiedlung und Pathogenese zwischen Antrum und Korpus), wurden für die vorliegende Arbeit drei Hypothesen formuliert:

1. Die Expressionsfrequenz der untersuchten Proteine CagA, BabA und OipA ist bei WT-Reisolaten je Zeitpunkt stärker verändert als bei Mutante-Reisolaten.

2. Beim WT sind die Veränderungen je Zeitpunkt in den Korpus-Reisolaten größer als in den Antrum-Reisolaten.
3. Die IL-8-Sekretion ist bei AGS-Zellen infiziert mit WT-Reisolaten höher als bei Infektion mit Mutante-Reisolaten (s. Punkt 3.3.2, Seite 86 ff).

Zu Hypothese 1: Die Expressionsfrequenz der untersuchten Proteine CagA, BabA und OipA ist bei WT-Reisolaten je Zeitpunkt stärker verändert als bei Mutante-Reisolaten.

Die im Ergebnisteil dargestellten Expressionsfrequenzen von CagA, BabA und OipA wurden einer statistischen Analyse unterzogen. Zunächst wurde untersucht, ob sich die Expressionsfrequenzen der drei Proteine über die Zeit signifikant verändern. Dabei wurden die Ergebnisse von Antrum und Korpus, je Protein und Zeitpunkt, zunächst zusammengefasst. Die Anzahl positiver und negativer Proben im Western Blot wurden für jedes Protein jeweils in einer 2 x 5 Matrix angeordnet (5 Zeitpunkte). Die Anwendung des Fisher-Exakt-Tests ergab, dass die Expression jedes der drei Proteine im WT über die Zeit signifikanten Änderungen unterlag (CagA: 1,53E-06, BabA: 7,62E-03, OipA: 1,72E-04), während die entsprechenden p-Werte für die Mutante (CagA: 1,00, BabA: 0,59, OipA: 0,55) auf eine eher gleichbleibende Expression hindeuteten. Es wurde dann untersucht, wie stark diese Veränderungen der Expressionsfrequenz jedes Proteins zwischen WT und Mutante zu den einzelnen Zeitpunkten voneinander abwichen. Dazu wurde das Verhältnis je Zeitpunkt und Protein von WT-Reisolaten zu Mutante-Reisolaten ermittelt. Zum Zeitpunkt x je Protein bedeutete das: relativer Anteil positiver Proben WT zu relativer Anteil positiver Proben Mutante.

In Abb. 20 wird das Verhältnis der Expressionsfrequenz im WT zur Expressionsfrequenz in der Mutante für CagA, BabA und OipA über die Zeit dargestellt. Wegen der relativen Streuung der Werte wurden die Ergebnisse zur Verbesserung der Übersichtlichkeit logarithmisch aufgezeigt.

Mit dem Fisher-Exakt-Test konnten folgende signifikante Veränderungen zwischen Wildtyp und Mutante zu jeweils einem Zeitpunkt festgestellt werden: für CagA zum Zeitpunkt von 64 Wochen (CagA: $p=7,38e-03$) und für BabA zum Zeitpunkt von 32 Wochen ($p=9,79e-03$).

Verhältnis Expressionsfrequenzen WT zu Mutante

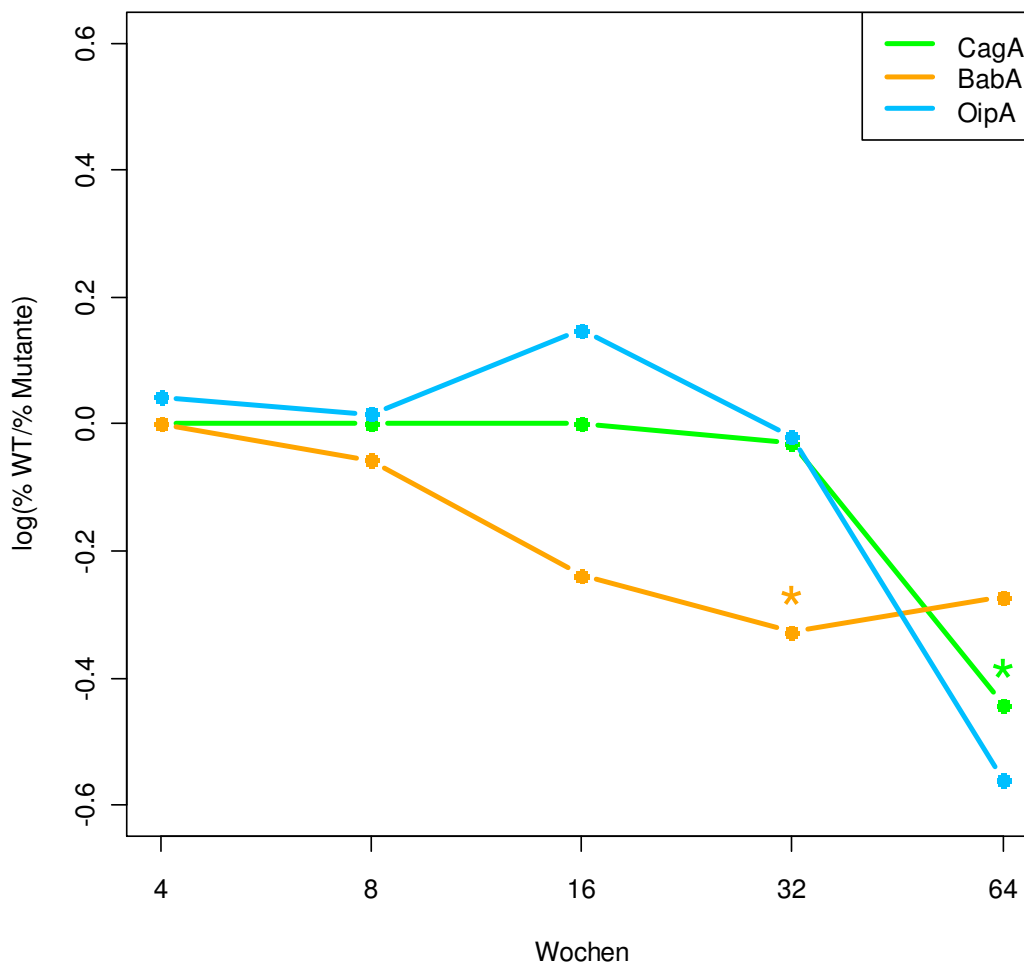


Abbildung 20: Verhältnis der Expressionsfrequenz von WT-Reisolaten zu Mutante-Reisolaten. Die Kurven stellen jeweils für CagA, BabA und OipA den relativen Anteil positiver Proben aus dem Western Blot beim WT zum relativen Anteil positiver Proben bei der Mutante über die Zeit dar. Die Zeitpunkte mit signifikanter Veränderung in der Expressionsfrequenz zwischen WT und Mutante können über die Farbe des Sterns dem Protein zugeordnet werden. Anmerkung: Der Wert 0 bedeutet: Anteil positiver Proben in WT = Anteil positiver Proben in Mutante; > 0 bedeutet: Anteil größer bei WT; < 0 Anteil größer bei Mutante.

Es wird deutlich, dass das Verhältnis positiver Ergebnisse WT zu Mutante für CagA bis zur Woche 32 stabil war und erst bei 64 Wochen eine signifikante

Veränderung zu beobachten war. Für OipA war der Verlauf ähnlich, jedoch ohne signifikanten Unterschied nach 64 Wochen der Infektion. Bei BabA hingegen nahm die Expression im WT im Gegensatz zur Mutante ab Zeitpunkt 4 Wochen konstant ab (bei 32 Wochen sogar signifikant). Der kleine Anstieg nach 64 Wochen deutete auf eine leichte Abnahme der Expression in der Mutante hin.

Für CagA zeigte sich bis zum Zeitpunkt von 32 Wochen eine gleich hohe Expressionsfrequenz bei den WT-Reisolaten und bei den Mutante-Reisolaten. Danach sank die Expressionsfrequenz im WT deutlich mehr ab, als bei der Mutante.

Für OipA zeigte sich ein sehr ähnlicher Verlauf im Vergleich zu CagA, bis auf die Zunahme in der WT-Expression zum Zeitpunkt von 16 Wochen. Hier war die Expressionsfrequenz von OipA beim WT um ca. 10% höher als bei der Mutante. Dass dieser Anstieg sowohl im Antrum als auch Korpus beobachtet werden konnte, spricht eher gegen eine rein zufällige Beobachtung. Nach einer erneut vergleichbar hohen Expressionsfrequenz von WT zu Mutante bei 32 Wochen, fiel sie bei Woche 64 ab.

Für BabA zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme bei der Betrachtung des Verhältnisses WT zu Mutante über die Zeit (signifikant bei 32 Wochen).

Die Expression der WT-Reisolate veränderte sich für BabA ab 4 Wochen im WT deutlicher als in der Mutante, für CagA und OipA ab 32 Wochen.

Wie sich nun die einzelnen Verläufe der Kurven zueinander verhalten, wurde ebenfalls statistisch analysiert. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen CagA und OipA (Pearson Korrelationskoeffizient $r = 0,97$; p -Wert = $7,61e-03$). Im Vergleich dazu zeigte BabA eine nur sehr schwache und nicht signifikante Korrelation zu OipA und CagA.

In diesem Zusammenhang muss erklärt werden, dass für CagY ein Vergleich zwischen WT-Reisolaten und Mutante-Reisolaten nicht sinnvoll war, da bei der Mutante CagY nicht mehr exprimiert wird.

Für das phosphorylierte CagA war ein Vergleich zwischen WT und Mutante ebenfalls nicht sinnvoll, da die Phosphorylierung von CagA abhängig ist von einem funktionsfähigen T4SS, welches die Mutante nicht mehr besitzt.

Insgesamt zeigt der Graph, dass beim WT im Vergleich zur Mutante, die hier als Kontrolle dient, über die Zeit die Expression der Proteine CagA, BabA und OipA deutlich abnimmt.

Die erste Hypothese konnte, bis auf 16 Wochen OipA, bestätigt werden.

Zu Hypothese 2: Beim WT sind die Veränderungen je Zeitpunkt in den Korpus-Reisolaten größer als in den Antrum-Reisolaten.

Die drei Proteine CagA, BabA und OipA wurden jeweils auf Unterschiede in der Expressionsfrequenz bei den WT-Reisolaten, differenziert nach Antrum und Korpus, untersucht.

Dabei zeigte sich für WT-Reisolate bezüglich der Expressionsfrequenz von CagA bis 32 Wochen ein stabiles Verhältnis zwischen Antrum und Korpus. Die Expressionsfrequenz war zum Zeitpunkt von 64 Wochen im Korpus höher, d. h. weniger verändert als im Antrum, jedoch nicht signifikant.

Für BabA zeigten die WT-Reisolate eine schwankende Expressionshäufigkeit zwischen Antrum und Korpus. Im Korpus sank die Expressionsfrequenz ab 16 Wochen etwas stärker ab als im Antrum, glich sich nach 64 Wochen aber wieder an. Der Unterschied zwischen Antrum und Korpus war jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant. Der Ort der Besiedlung scheint für den Selektionsdruck von *H. pylori* bezüglich der Expression von BabA über den Zeitverlauf und für CagA nur bei 64 Wochen eine, wenn auch untergeordnete Relevanz zu haben.

Für OipA zeigte sich bei den WT-Reisolaten bereits nach 4 Wochen eine Abnahme der Expressionsfrequenz im Korpus. Bei 8 Wochen kehrte sich dieses Verhältnis annähernd um. Ab Woche 16 nahm die Expressionsfrequenz im Antrum und im Korpus ab. Bei 64 Wochen war die Expression im Korpus wieder geringer als im Antrum. OipA zeigte die größten Schwankungen in der Expressionsfrequenz zwischen Korpus und Antrum. Hier könnte der Ort der Besiedlung eine, wenn auch nicht signifikante, Rolle spielen.

Insgesamt waren also die Veränderungen der Expressionsfrequenzen im Korpus nicht signifikant größer als im Antrum. Somit konnte die zweite Hypothese nicht verifiziert werden.

WT: Verhältnis Expressionsfrequenzen Korpus zu Antrum

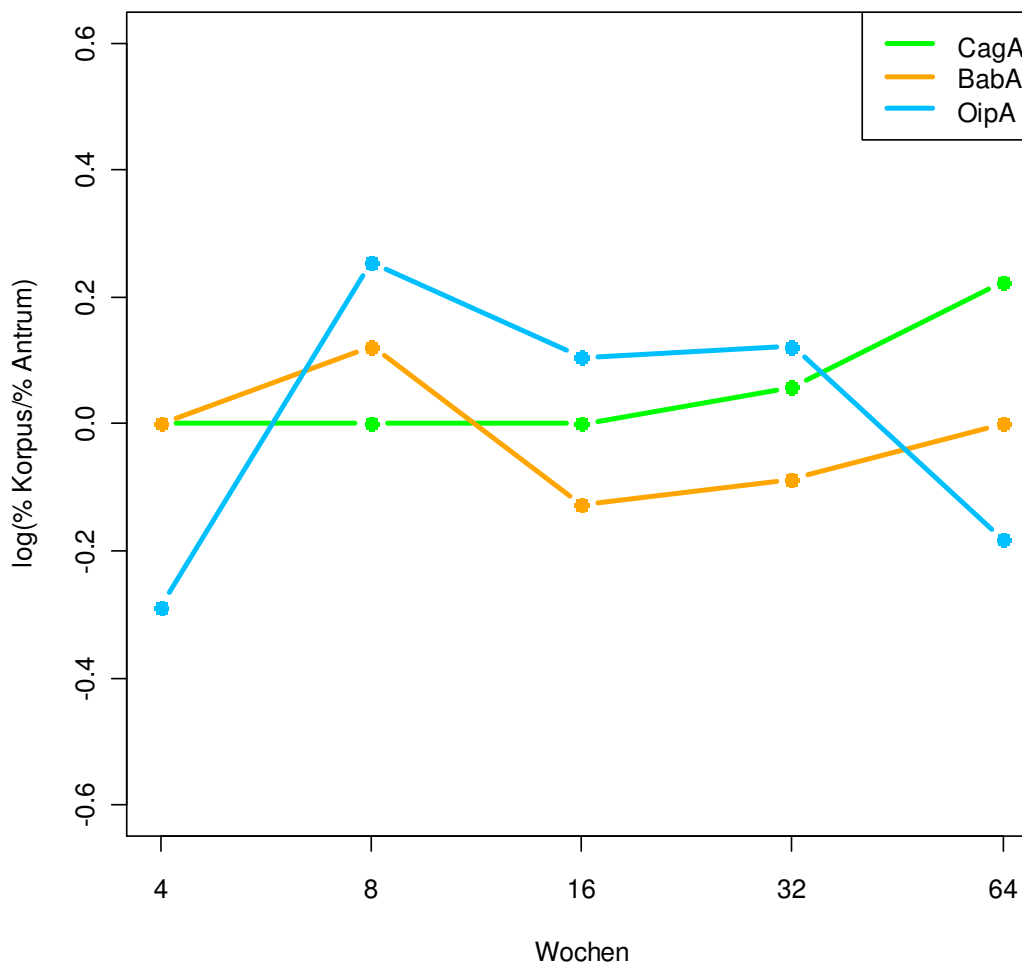


Abbildung 21: Verhältnis der Expressionsfrequenz von WT-Reisolaten aus dem Korpus zu denen aus dem Antrum.

Die Kurven stellen für WT-Reisolate untersucht auf CagA, BabA und OipA jeweils das Verhältnis der Expressionsfrequenz der Korpus-WT-Reisolate zu den Antrum-WT-Reisolaten dar. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsfrequenz je Protein und Zeitpunkt zwischen Antrum und Korpus.

Anmerkung: Der Wert 0 bedeutet: Anteil positiver Proben in Korpus = Anteil positiver Proben im Antrum; > 0 bedeutet: Anteil größer im Korpus; < 0 Anteil größer im Antrum.

Zu Hypothese 3: Die IL-8-Sekretion ist bei AGS-Zellen infiziert mit WT-Reisolaten höher als bei Infektion mit Mutante-Reisolaten
Siehe hierzu die Ausführungen bei Punkt 3.3.2 Seite 86 ff.

3.3 Funktionsanalyse von CagA und CagY bei Reisolaten

Nach der Auswertung der Expressionsfrequenz der Virulenzfaktoren von den Reisolaten interessierte nun die Frage, inwiefern die Funktion der exprimierten Proteine CagA und CagY über den Zeitverlauf bei den Reisolaten noch gegeben war.

3.3.1 Analyse der CagA-Phosphorylierung von Reisolaten *in vitro*

H. pylori kommt mittels der Adhäsine und des T4SS in direkten Kontakt mit der Wirtszelle. Das Strukturprotein CagY ist ein wichtiges Kanalprotein des T4SS. Fehlt CagY, so ist dieser Apparat defekt und es kann keine Translokation des Proteins CagA mehr stattfinden. Ist das T4SS aber funktionsfähig, so dient es als Schleuse für CagA in das Zytosol der Wirtszelle. Dort wird CagA dann von Tyrosinkinasen am sog. EPIYA-Motiv phosphoryliert. Gerade durch diese Phosphorylierung wird es dem Protein erst möglich in zahlreiche Zellsignalwege einzugreifen. Die Pathogenität von CagA und phosphoryliertem CagA (P-CagA) trägt über die Zeit entscheidend zur Verschlechterung des Krankheitsgeschehens in der Magenmukosa bei. Dieser Vorgang findet beim Menschen und vergleichbar auch beim Mongolischen Gerbil statt.

Die in der Wirtszelle erfolgte Phosphorylierung von CagA bietet also eine gute Möglichkeit, die Funktion des T4SS, hier also den Transport des wichtigen Effektorproteins CagA, zu überprüfen. Durch eine vierstündige Infektion von AGS-Zellen (Magenadenokarzinom-Zellen) mit *H. pylori*-Reisolaten (alle verfügbaren WT-Reisolate und zur Kontrolle auch einige Mutante-Reisolate) wurden geeignete Lysat-Proben gewonnen. Diese Proben wurden dann mittels des Phosphotyrosin-Blots sichtbar gemacht und anschließend ausgewertet.

Von den insgesamt 170 analysierten WT-Proben sind in Abbildung 22 einige exemplarisch dargestellt. Dabei diente der Originalstamm HPB8 als Positivkontrolle und die Mutante-Reisolate als Negativkontrolle. Als erster Antikörper wurde der PY99 in der Verdünnung 1:1000, als sekundärer Antikörper der α -Maus-POX (1:2000) verwendet. Es wurde auf sehr ausführliches Waschen der Membranen geachtet, um die Hintergrundschattierung möglichst gering zu halten.

Die 27 stichprobenartig untersuchten Mutante-Reisolate mit defektem T4SS zeigten, wie zu erwarten, immer negative Ergebnisse und wurden hier nicht dargestellt.

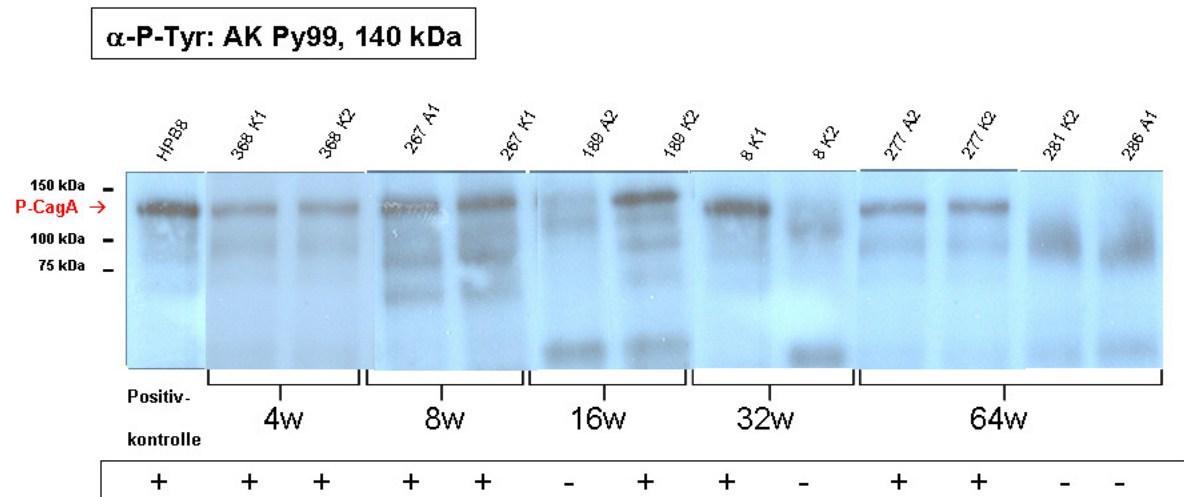


Abbildung 22: Repräsentative Phosphotyrosin-Blots mit Lysaten von WT-Reisolaten nach Detektion des Proteins CagA.

Bakterienlysate von HPB8 wurden in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels des Antikörpers AK PY99 und des Detektions-AK α -Maus-POX analysiert. Es zeigten sich bei 140 kDa deutliche Banden des Proteins CagA (positive Ergebnisse). Zwischen 4 und 32 Wochen zeigten sich fast durchgehend positive Ergebnisse, was einer sehr hohen Frequenz von CagA-Phosphorylierung entspricht. Negative Banden (keine Proteinbande bei 140 kDa) traten erst beim späten Zeitpunkt von 64 Wochen vermehrt auf. Hier war CagA offensichtlich nicht phosphoryliert worden.

Die Tabelle 11 zeigt die verfügbaren Reisolatproben, welche identisch zu denen von CagA (WT) sind (Tabelle 4). Darunter sind die positiven Ergebnisse der Phosphotyrosin-Western Blots aufgeführt. Hier hatten die AGS-Zellen das translozierte CagA phosphoryliert. Proben, die ein deutlich verkürztes CagA gezeigt hatten, wurden hier nicht weiter untersucht, da ihnen das EPIYA-Motiv fehlt und diese somit nicht mehr phosphoryliert werden können.

Tabelle 11: WT-Reisolate: CagA und CagA-phosphoryliert

Wochen	4	8	16	32	64
Anzahl Tiere	9	5	9	18	7
Antrumproben Positive/gesamt	15 / 15	9 / 9	17 / 18	32 / 36	8 / 14
Korpusproben Positive/gesamt	8 / 8	7 / 9	12 / 15	30 / 32	8 / 14

Bei der Auswertung des Phosphotyrosin-Blots wurden scharf erkennbare Banden als positiv gewertet, deutlich verschwommen wirkende Banden als negativ. Die Gesamtanzahl verfügbarer Proben wurde als 100% gesetzt. Als Positivkontrolle diente der HPB8. Zusammengefasst ergab sich aus den 170 analysierten WT-Proben der Graph in Abb. 23.

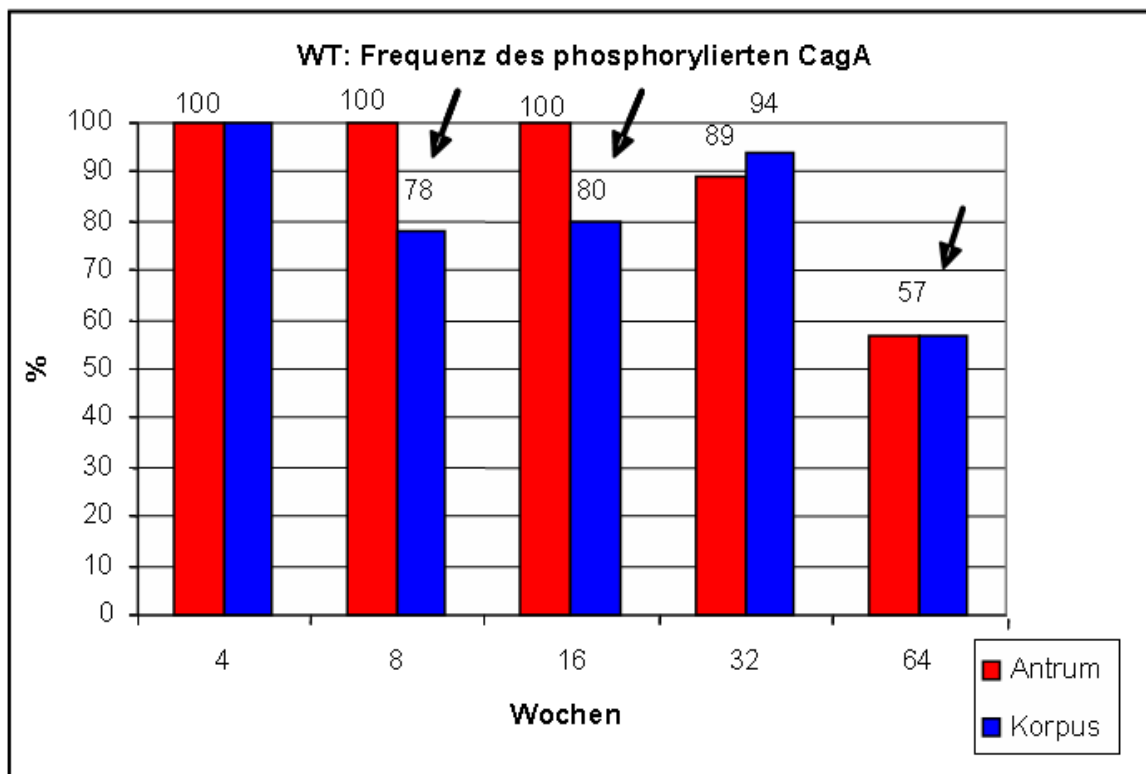


Abbildung 23: Prozentuale Darstellung aller Ergebnisse der Phosphorylierung von CagA bei WT-Reisolaten im Zeitverlauf von 4 bis 64 Wochen.

Die Bakterienlysate von HPB8 wurden mittels der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit dem polyklonalen Antikörper PY99 und dem Detektions-AK α -Maus-POX analysiert. Die Infektion von AGS-Zellen mit WT-Reisolaten erfolgte über vier Stunden hinweg. Die Phosphorylierung von CagA verlief bei den aus dem Antrum entnommenen Reisolaten (rote Diagrammbalken) parallel zur Expressionsfrequenz von CagA. Bei den aus dem Korpus entnommenen Reisolaten (blaue Diagrammbalken) folgte die Phosphorylierungshäufigkeit nicht der Expression von CagA, sondern lag bei 8, 16 und 64 Wochen deutlich darunter (schwarze Pfeile im Diagramm).

Bei Gegenüberstellung dieser Ergebnisse mit denen der Expressionsfrequenz von CagA bei WT-Reisolaten (jeweils entsprechende Probe) zeigte sich für das Antrum eine annähernd identische Ausprägung zwischen der Expression der CagA Western Blot-Analyse der Bakterienlysate und der Phosphorylierung der entsprechenden CagA-Proteine (Analyse der *H. pylori*-stimulierten Zellkulturlysate mittels Phosphotyrosin-Blot). Dies legt die Vermutung nahe, dass das T4SS und somit auch CagY hier jeweils intakt waren. Auffällig war hierbei, dass die Reisolate, entnommen aus dem Korpus der WT-infizierten Gerbils, eine Abnahme der Phosphorylierung über die Zeit um etwa 20% zeigten. Da es sich um identische Proben zu denen auf CagA Western Blots handelt, lässt dies den

Schluss zu, dass entweder die entsprechenden CagA-Proteine nicht mehr in die Zelle transloziert und somit auch nicht phosphoryliert werden konnten oder dass das EPIYA-Motiv so verändert wurde, dass eine Phosphorylierung nicht mehr möglich war. Der Ort der Besiedlung scheint hier eine Rolle zu spielen.

3.3.2 Analyse einer Entzündungsreaktion durch Reisolat mittels IL-8-ELISA

Als weitere wichtige Funktionsanalyse der Reisolat war nun von besonderem Interesse, inwiefern diese auch in der Lage waren, eine *in vitro*-Immunreaktion hervorzurufen.

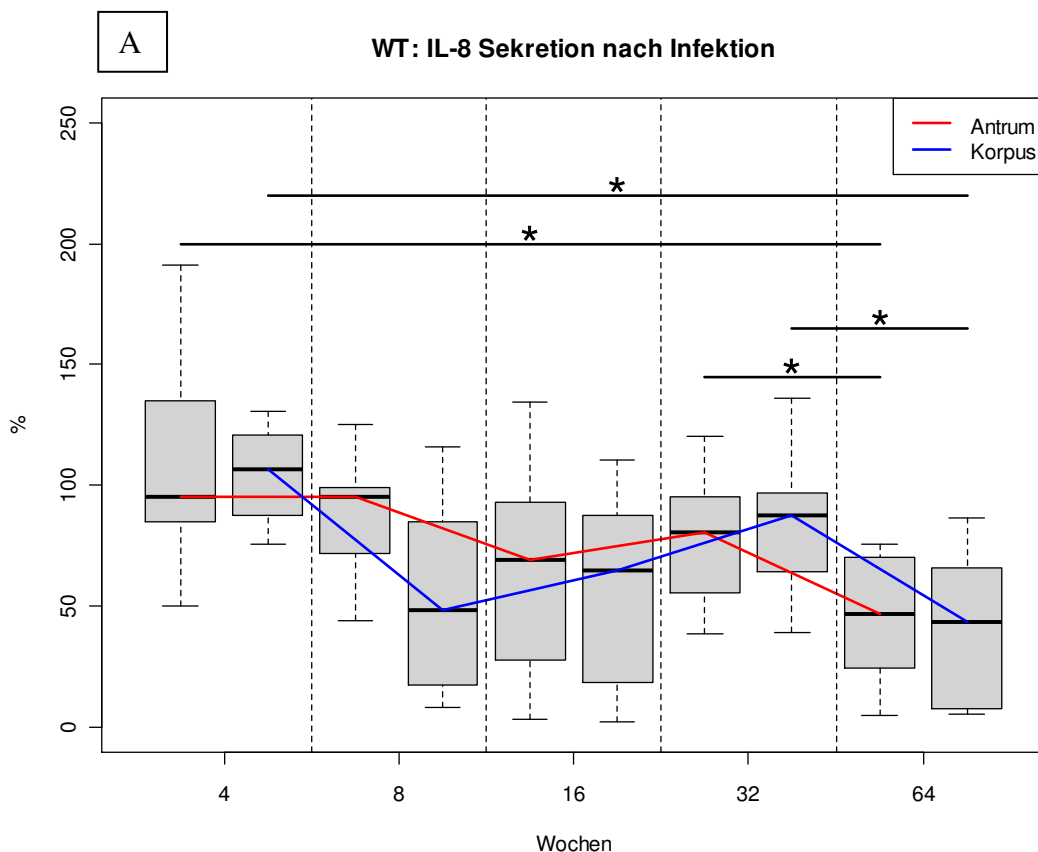
Die durch die Virulenzfaktoren des Bakteriums *H. pylori* ausgelöste Immunreaktion in der Wirtszelle ist messbar anhand von Zytokinen, die von der Wirtszelle sezerniert werden. Das Interleukin 8 (IL-8) ist ein chemotaktisches Zytokin und wird sowohl von Mukosazellen als auch von den hier verwendeten AGS-Zellen als Reaktion auf eine Immunstimulation sezerniert. Es aktiviert Lymphozyten und neutrophile Granulozyten und kann quantitativ über den ELISA-Test gemessen werden. Es stellt einen guten Marker für die Intensität der Immunreaktion und der Entzündung dar.

Mittels einer vierstündigen Infektion von AGS-Zellen, sowohl mit WT-Reisolaten als auch mit Reisolaten aus Mutante-infizierten Gerbils, wurde die induzierte IL-8-Sekretion im Überstand quantitativ mittels des ELISA-Tests gemessen. Um die unterschiedliche Dichte der ausgesäten AGS-Zellen je Napf zu erfassen, wurde zusätzlich die Proteinbestimmung nach Bradford angewendet. Zur Standardisierung der Proben wurden die ermittelten IL-8-Ergebnisse mit denen der ermittelten Proteinkonzentrationen (nach Bradford, siehe 2.2.3.7.) in Relation gesetzt.

Da hier zwei biologische Systeme zusammengebracht werden mußten (AGS-Zellkultur mit schwankender Konfluenz und Bakterien kultiviert auf Agarplatten mit z.T. unterschiedlicher Dichte), kam es bei den Wiederholungen zu relativ großen Schwankungen bezüglich der sekretierten IL-8-Menge. Die gemessenen HPB8-Referenzwerte für IL8 schwankten zwischen 400 und 800 pg/ml. Deshalb wurden die jeweiligen pg/ml-Werte der WT-Referenzprobe als Bezugsgröße verwendet und gleich 100% gesetzt.

Hypothese 3: Die IL-8-Sekretion ist bei AGS-Zellen, infiziert mit WT-Reisolaten, höher als bei Infektion mit Mutante-Reisolaten.

Um die 3. Hypothese zu analysieren, wurde die über die Zeit gemessene IL8-Abnahme statistisch ausgewertet. Mittels des Wilcoxon-Tests wurde der Anstieg bzw. Abfall zwischen benachbarten Zeitpunkten auf eine eventuell vorhandene Signifikanz hin untersucht. Es zeigte sich, dass die IL-8-Abnahme bei den WT-Reisolaten von 4 nach 64 Wochen im Antrum sowie im Korpus eine Signifikanz aufweist (Antrum: $p = 0,0004$; Korpus: $p = 0,00075$). Von 32 zu 64 Wochen ist diese Abnahme für Antrum ($p = 0,007$) und für Korpus ($p = 0,003$) ebenfalls signifikant. Bei der Mutante war zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Zunahme oder Abnahme festzustellen (Abb. 24 A und B).



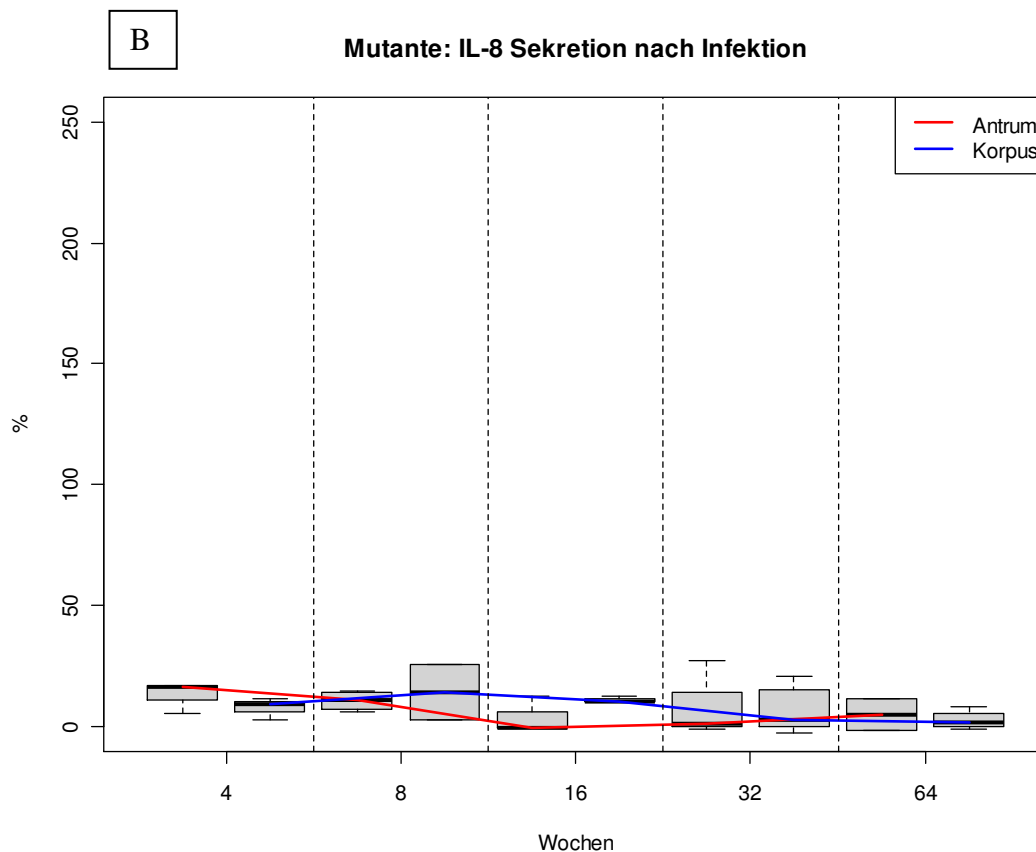


Abbildung 24 A und B: IL-8-Sekretion der AGS-Zellen nach Stimulierung mit Reisolaten

AGS-Zellen wurden mit HPB8-WT Reisolaten A) und Mutante-Reisolaten B) infiziert und nach vier Stunden die IL-8-Konzentration im Überstand mittels ELISA gemessen. Die Reisolate wurden getrennt nach Antrum (rote Kurve) und Korpus (blaue Kurve) im Zeitverlauf dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Tests ermittelt ($p < 0,05$).

Die Immunantwort der mit WT-Reisolaten infizierten AGS-Zellen, gemessen anhand der Ausschüttung des Zytokins IL-8, zeigte eine zunächst deutliche Immunreaktion zum frühen Zeitpunkt von 4 Wochen. Zu dieser Zeit kam es in der Magenmukosa zur Etablierung der Kolonisierung mit *H. pylori* und dem Beginn einer aktiven Gastritis. Jedoch nahm die Induktion der IL-8-Sekretion durch die WT-Reisolate über die Zeit kontinuierlich ab. Es könnte hier ein Zusammenhang mit der sog. Immunevasion von *H. pylori* bestehen. Das Bakterium könnte Mechanismen nutzen, welche die Immunreaktion des Wirtes reduzieren könnten und somit ein längeres Überleben im Wirt fördern könnten.

Unter denselben Bedingungen, wie für WT-Reisolate beschrieben, lösten die Mutante-Reisolate jeweils nur eine minimale Immunreaktion aus, gemessen anhand der niedrige bzw. fehlende IL-8-Zytokinausschüttung. Dies bestätigen *in vivo*-Studien, nach welchen ein intaktes T4SS, das der Mutante fehlt, entscheidend an der Immunreaktion des Wirtes beteiligt ist [82].

Die Hypothese 3, welche besagt, dass die IL-8-Sekretion bei AGS-Zellen, infiziert mit WT-Reisolaten, höher ist als bei Infektion mit Mutante-Reisolaten, konnte somit verifiziert werden.

Um die Ergebnisse der WT-Reisolate genauer bewerten zu können, wurde die relative IL-8-Konzentration anschließend in vier gleichmäßig abgestufte Gruppen zusammengefasst. Die Einteilung der Gruppen erfolgte in mathematisch genauen Abständen von jeweils 35%. Dabei wurden Ergebnisse zwischen 0% und 35% als geringe IL-8-Sekretion (grüne Gruppe), Werte zwischen 36% und 70% als mittelgradige (gelbe Gruppe) und Werte zwischen 71% und 105% als starke IL-8-Sekretion (orange Gruppe) definiert. Erst IL-8-Werte größer 105% wurden als überschießende IL-8-Sekretion (rote Gruppe) bezeichnet. Bei dieser graphischen Darstellung wurde deutlich, dass sich die Abnahme der IL8-Ausschüttung in zwei Stufen vollzogen hat (Abb. 25). Als Bezugsgröße diente der HPB8-Referenzstamm, dessen IL-8-Sekretion mit 100% gleichgesetzt wurde.

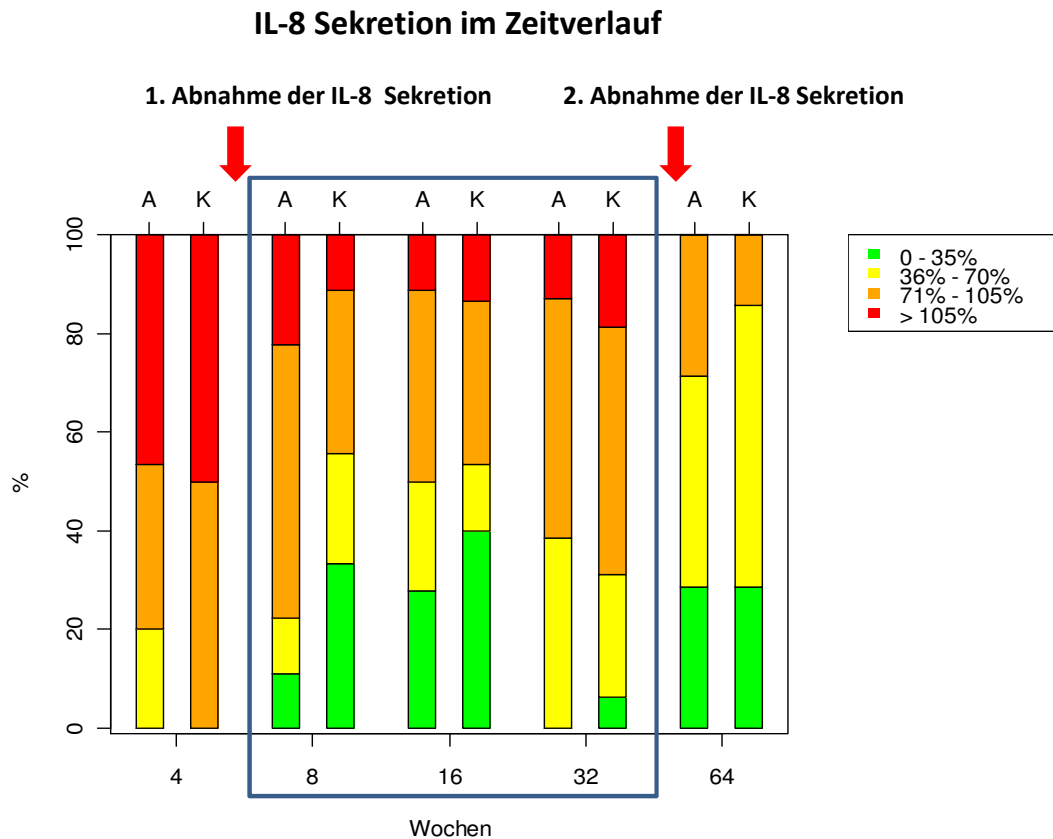


Abbildung 25: Darstellung der zweistufigen Abnahme der IL-8-Sekretion über die Zeit, ausgelöst durch WT-Reisolate.

Kategorisierung der IL-8-Sekretionswerte in überschüssende (rot), starke (orange), mittelgradige (gelb) und geringe (grün) Sekretionsgruppen. Die Werte stammen aus obigen Infektionsstudien mit AGS-Zellen vierstündig stimuliert mit WT-Reisolaten. Dabei diente der Referenzstamm HBP8 als Bezugsgröße (\triangleq 100%).

Durch diese deskriptive Analyse der IL8-Sekretion wurde deutlich, dass eine überschießende Reaktion (rote Balken), gemessen anhand der IL-8-Ausschüttung, zunächst sehr häufig war, dann jedoch um ca. 20% absank (1. Abnahme). Über den gesamten mittleren Zeitverlauf entsprach diese einer gemäßigeren Antwort (orange Balken und gelb Balken). Zum späten Zeitpunkt von 64 Wochen wurde eine überschießende IL-8-Sekretion durch WT-Reisolate praktisch nicht mehr erreicht (2. Abnahme). Hingegen war eine geringe (grüne Balken) oder mäßige (gelbe Balken) Immunantwort über die Zeit hinweg immer häufiger zu beobachten.

Die Messung der IL-8-Konzentration, induziert durch WT-Reisolate, war auch insofern von großem Interesse, als sich durch diese Analyse bisherige Ergebnisse besser deuten ließen. Zum Beispiel konnte für Reisolate der Gruppe mit einer mittelgradigen IL-8-Sekretion, die eine positive CagA-Expression bei gleichzeitig fehlender CagA-Phosphorylierung aufweisen, rückgeschlossen werden, dass in diesen Proben die IL-8-Sekretion unabhängig von der CagA-Translokation, d.h. allein durch ein intaktes T4SS gesteuert wird.

3.4 Ergebnisse der PCR und der Sequenzierung

Im nächsten Schritt wurden die gezeigten Expressionsveränderungen der Proteine von *H. pylori*-Reisolaten sowie deren teilweise Funktionsverluste auf genetischer Ebene analysiert. Dies konnte eine Aussage darüber zulassen, ob die Ursache für die gefundenen Veränderungen auf einen regulatorischen Prozess zurückzuführen waren oder auf genetischer Ebene, z.B. auf Mutation oder Deletion des Gens, zu finden waren. Dazu wurden diejenigen WT-Reisolate ausgewählt, die im Western Blot negative Ergebnisse gezeigt hatten. Zunächst wurde von diesen WT-Reisolaten die DNA mit Hilfe des QiaAmp-Kits isoliert und diese dann für eine spezifische PCR eingesetzt. Als Positivkontrolle diente der zur Infektion der Mongolischen Gerbils verwendete Originalstamm HPB8. Die Ergebnisse in Abbildungen 26 A und B zeigen repräsentative Resultate für die Gene *babA* und *oipA*.

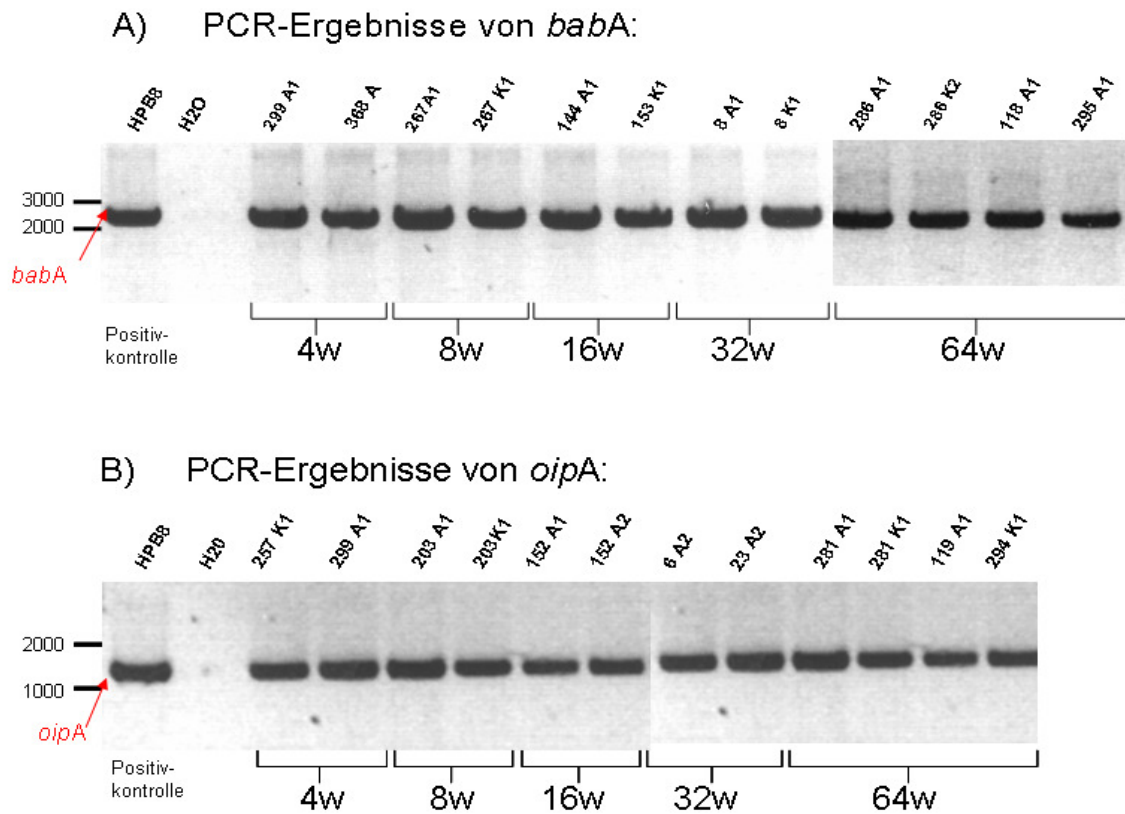


Abbildung 26 A und B: PCR-Ergebnisse von *babA* und *oipA*. Es konnten bei allen untersuchten Reisolat-Proben PCR-Produkte detektiert werden. Von den Reisolaten wurden geeignete DNA-Proben hergestellt und mittels der PCR vervielfältigt. Anschließend wurden die gewonnenen PCR-Produkte in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Positivkontrolle diente das PCR-Produkt von HPB8, und als Negativkontrolle wurde Reinstwasser (H₂O) eingesetzt.

Es zeigten sich bei allen untersuchten Proben positive Ergebnisse bei der Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion mit der sich anschließenden Agarose-Gelelektrophorese. Die Ergebnisse aller Amplifikationen wurden als Graph prozentual für die Gene *babA* (Abb.27 A) und *oipA* (Abb. 27 B) dargestellt. Dabei entsprach die Gesamtzahl der verfügbaren Proben 100%. Die tatsächlich positiven PCR-Resultate wurden prozentual davon ermittelt. Der Originalstamm HPB8 zeigte bei jeder durchgeführten PCR ein positives Ergebnis. Wasser als Negativkontrolle erbrachte kein PCR-Produkt.

A) *babA*; n = 47
 Primer 174 + 175
 Größe des PCR-Produkts: 2559 bp

B) *oipA*; n = 66
 Primer 172 + 173
 Größe des PCR-Produkts: 1329 bp

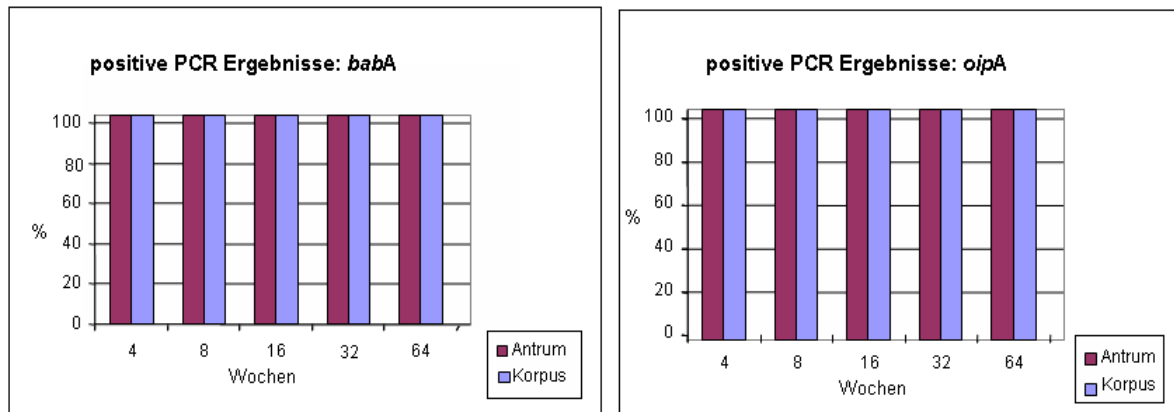


Abbildung 27 A und B: Graphische Darstellung aller bisherigen PCR-Ergebnisse von WT-Reisolaten, welche ein negatives Ergebnis für A) die BabA-Expression bzw. B) die OipA-Expression im Western Blot gezeigt hatten.

Sowohl die Antrum-Reisolate (weinrot) als auch die Korpus-Reisolate (blau) zeigten für *babA* wie auch für *oipA* ein positives Ergebnis in jeder durchgeführten PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese.

Trotz der teilweise fehlenden Proteinexpression konnte in allen untersuchten Proben ein PCR-Produkt, spezifisch für das jeweils zu detektierende Gen, mit erwarteter Größe (*babA*: 2559 bp; *oipA*: 1329 bp) nachgewiesen werden.

Damit konnte eine komplette oder partielle Deletion des Gens, aber kein *frameshift* ausgeschlossen werden. Im Weiteren war nun zu klären, ob tatsächlich eine regulatorische Veränderung vorlag oder es sich um eine Punktmutation im Gen handelte, welche aufgrund eines *frameshifts* mit vorzeitigem Stop-Codon eine korrekte Proteinexpression nicht mehr zugelassen hatte. Um eine potentielle Mutation identifizieren zu können, wurde eine Sequenzierung einzelner PCR-Produkte von WT-Reisolaten vorgenommen. Dazu wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des PCR Purification-Kits von Qiagen aufgereinigt, die DNA-Konzentration bestimmt und ein entsprechendes Aliquot zur Sequenzierung eingeschickt. Die erhaltene DNA-Sequenz beider Orientierungen wurde dann mit der Sequenz des Originalstammes HPB8 verglichen.

Das erhaltene Alignment zeigte für das Gen *babA* in allen 8 untersuchten Proben eine Insertion eines Adenosins direkt nach dem Start-Codon. Diese

Mutation führte jeweils zu einem Verrutschen der Polymerase mit der Folge einer Leserasterverschiebung, sog. *frameshift* im Gen. Dieses Phänomen wird als *slipped strand mispairing* (SSM) bezeichnet (Abb.28). Die Folge war eine fehlerhafte Translation der Proteine wodurch es bereits nach 20 Aminosäuren zu einem Stop-Codon (TGA) kam, das zu einem vorzeitigen Beenden der Aminosäurekette führte. Somit lag nur ein sehr kurzes, nicht funktionsfähiges und mittels des Western Blots nicht detektierbares Proteinfragment von BabA vor.

***babA*:**

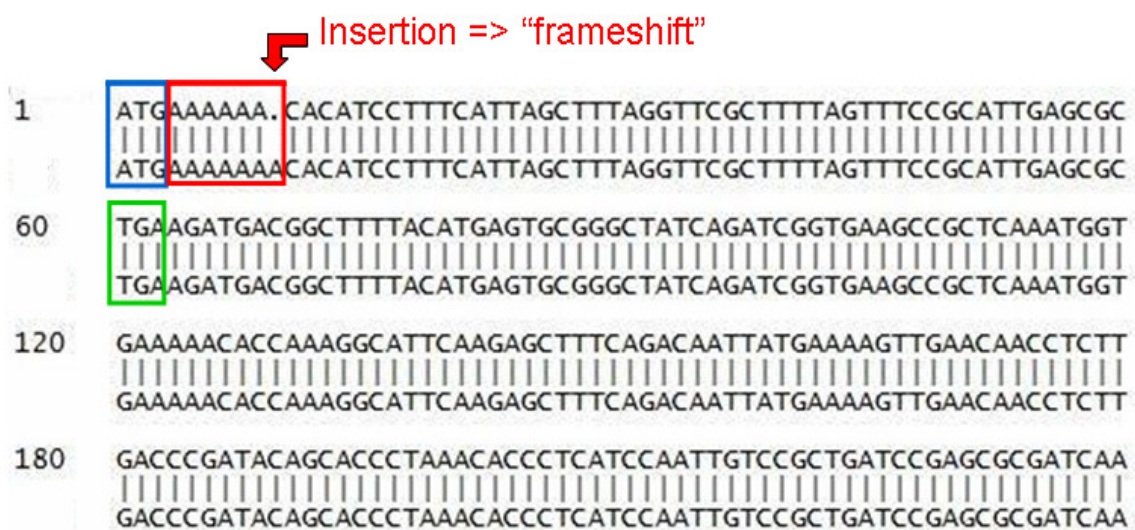


Abbildung 28: Alignment der *babA* Gensequenz von HPB8 und der Gensequenz eines Reisolates.

Eine Insertion (unterer Sequenzstang, rotes Kästchen) führte im *babA* Gen zum Verschieben des Leserasters und somit zum Auftreten eines vorzeitigen Stop-Codons (grünes Kästchen) mit resultierendem defektem Protein BabA. Das deutlich verkürzte, fragmenthafte Protein konnte im Western Blot nicht mehr detektiert werden. Dieses *frameshift* wird als *slipped strand mispairing* bezeichnet. Das Start-Codon (ATG) ist mit blauem Kästchen markiert.

Für *oipA* zeigte sich im Alignment bei allen 13 untersuchten Proben eine Insertion oder Deletion eines Cytosin-Thymin-Paares, 6 Triplets vom Start-Codon entfernt (Abb. 29). Bei der Translation kam es somit auf Grund eines vorzeitigen Stop-Codons zu einer fehlerhaften und sehr verkürzten Primärstruktur des Proteins, das dadurch nicht mehr detektierbar war. Diese Mutationen führten ebenfalls zu einem *frameshift*, also einer

Leserasterverschiebung. Dieses Phänomen wird, wie auch bei *babA*, als *slipped strand mispairing* (SSM) bezeichnet.

Die beiden Beispiele für das Alignment der *oipA*-Gensequenz je Reisolat mit der des Originalstammes HPB8 zeigen die zwei Mutationsvarianten an der Position 23 mit der Folge der Leserasterverschiebung und dadurch entstehendem Stop-Codon an Position 79 bzw. 57. Das Protein entsteht dadurch als verkürztes Fragment und ist deshalb im Western Blot nicht mehr detektierbar. *oipA*:



Abbildung 29: Alignment zwischen gleichen Abschnitten des *oipA*-Gens zweier Reisolate und der entsprechenden *oipA*-Gensequenz des Originalstammes HPB8.

Eine Insertion oder Deletion (roter Kasten) führte im *oipA*-Gen zum Verschieben des Leserasters und Auftreten eines vorzeitigen Stop-Codons (grünes Kästchen) mit daraus resultierendem deutlich verkürztem Protein OipA, welches so im Western Blot nicht mehr detektierbar ist. Diese *frameshift*-Mutation wird als *slipped strand mispairing* bezeichnet. Das Start-Codon ist mit blauem Kästchen markiert.

3.5 Analyse der Veränderungen der Reisolat-Population pro Tier über die Zeit

Nun wurde die Expression bzw. Nicht-Expression der Proteine CagA, BabA und OipA, für WT-Reisolate und für Mutante-Reisolate je Mongolischem Gerbil separat, betrachtet. Je Tier wurden die 4 Proben A1, A2, K1 und K2 ausgewertet. Dabei gab es sowohl beim WT als auch bei der Mutante eine Gruppe von Reisolaten, bei denen die Proben in sich gleichartig verändert waren, z.B. A1, A2, K1, K2: OipA negativ, BabA u CagA aber positiv. Es fiel auf, dass es bei den WT-Reisolaten bis zum Zeitpunkt von 32 Wochen eine steigende Anzahl von Proben gab, die gemischt verändert waren, z.B. von Woche 16, WT-Reisolate Nr. 144: A1: CagA +, BabA +, OipA +; aber A2: CagA +, BabA -, OipA -; K1 und K2: CagA +, BabA -, OipA +. Zum späteren Zeitpunkt von 64 Wochen zeigte sich eine reduzierte Anzahl von solchen gemischt-veränderten WT-Reisolat-Populationen. Dies bedeutet jedoch nicht, dass die Reisolate wieder dem Original entsprechen, sondern ein verändertes Expressionsmuster in allen vier untersuchten Reisolaten je Tier besitzen. Es wurden wiederum lediglich Veränderungen von BabA, OipA und von CagA berücksichtigt, da bei der Mutante das CagY fehlt und somit kein IL-8 produziert und CagA auch nicht phosphoryliert werden kann.

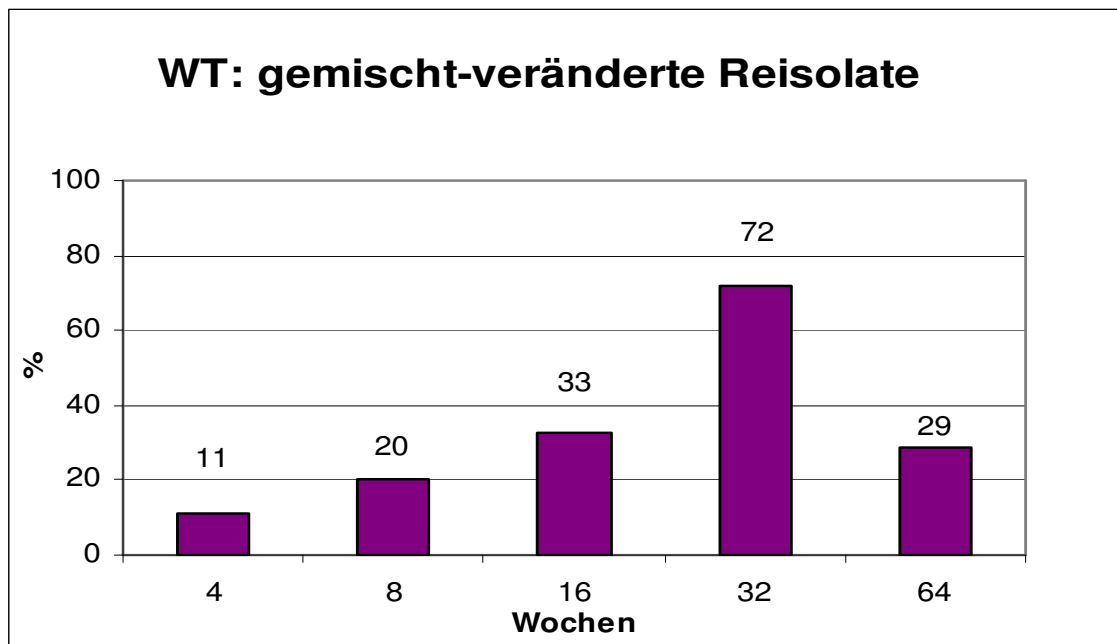


Abbildung 30: Häufigkeit der gemischt-veränderten Populationen von HPB8-Reisolaten (WT) im Vergleich zum Originalstamm HPB8 über den Zeitverlauf von 4 bis 64 Wochen.

Ausgezählt wurden Veränderungen bei der Expression von CagA, BabA und OipA je Zeitpunkt und Tier (je A1, A2, K1, K2). Dabei wurden in sich veränderte Proben je Tier als gemischt-verändert bezeichnet. Die Gesamtzahl der verfügbaren Proben entsprach 100%. Die gemischt-veränderten Proben je Tier wurden prozentual davon ermittelt.

Die gemischten Expressionsprofile nahmen bei den WT-Reisolaten bis zum Zeitpunkt von 32 Wochen kontinuierlich zu. Nach 64 Wochen war die Tendenz jedoch wieder rückläufig. Bei den Mutante-Reisolaten waren die gemischten Populationen im Vergleich zu den WT-Reisolaten insgesamt seltener und ohne bestimmte Tendenz.

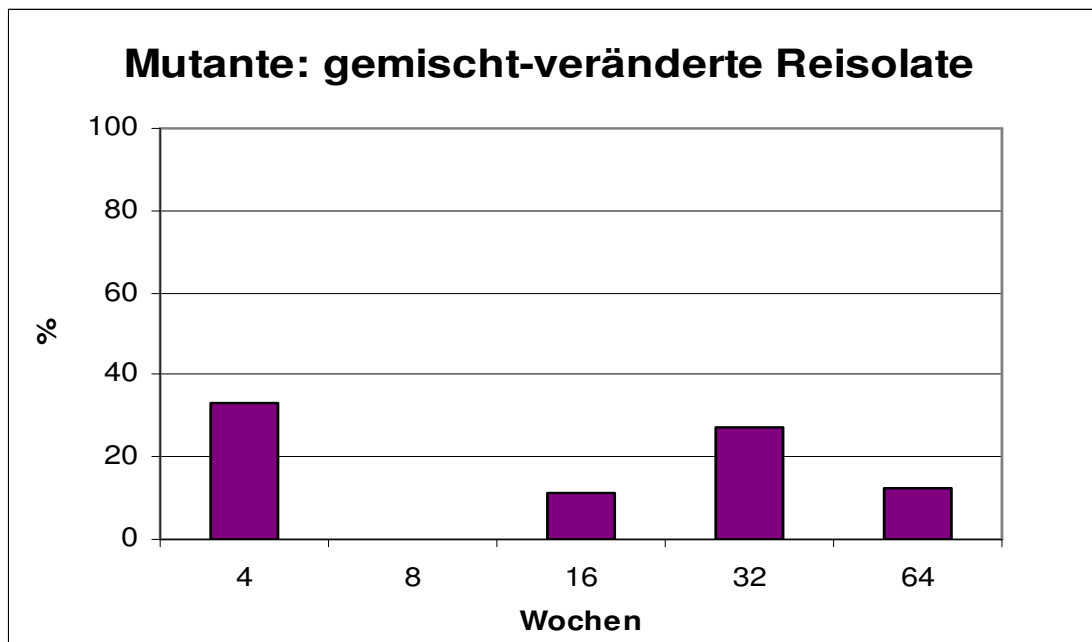


Abbildung 31: Häufigkeit der gemischt-veränderten Populationen von HPB8 Δ *cagY*-Reisolaten (Mutante) im Vergleich zum Originalstamm HPB8 im Zeitverlauf von 4 bis 64 Wochen. Ausgezählt wurden Veränderungen bei der Expression von CagA, BabA und OipA je Zeitpunkt und Tier (je A1, A2, K1, K2). Dabei wurden in sich veränderte Proben je Tier als gemischt-verändert bezeichnet. Die Gesamtanzahl der verfügbaren Proben je Tier und Zeitpunkt entsprach 100%. Die gemischt-veränderten Proben je Tier wurden prozentual davon ermittelt.

Um diese Beobachtung genauer differenzieren zu können, wurden die Reisolat, in Abhängigkeit von ihrem Expressionsprofil, in drei Gruppen eingeteilt. Dabei wurden in Gruppe 1 die nicht veränderten Reisolat-Populationen, die also identisch zum Originalstamm HPB8 in allen vier Reisolaten je Tier (A1, A2, K1 u. K2) die Proteine CagA +, BabA +, OipA + exprimierten, zusammengefasst (grüne Diagrammbalken). Die zweite Gruppe bildeten die gemischt-veränderten Populationen, wie auf S. 95 beschrieben (violette Diagrammbalken). Die dritte Gruppe bildeten die identisch veränderten Reisolat-Populationen eines Tieres, bei denen alle vier Proben ein gleichgerichtet verändertes Proteilmuster gezeigt hatten (gelbe Diagrammbalken).

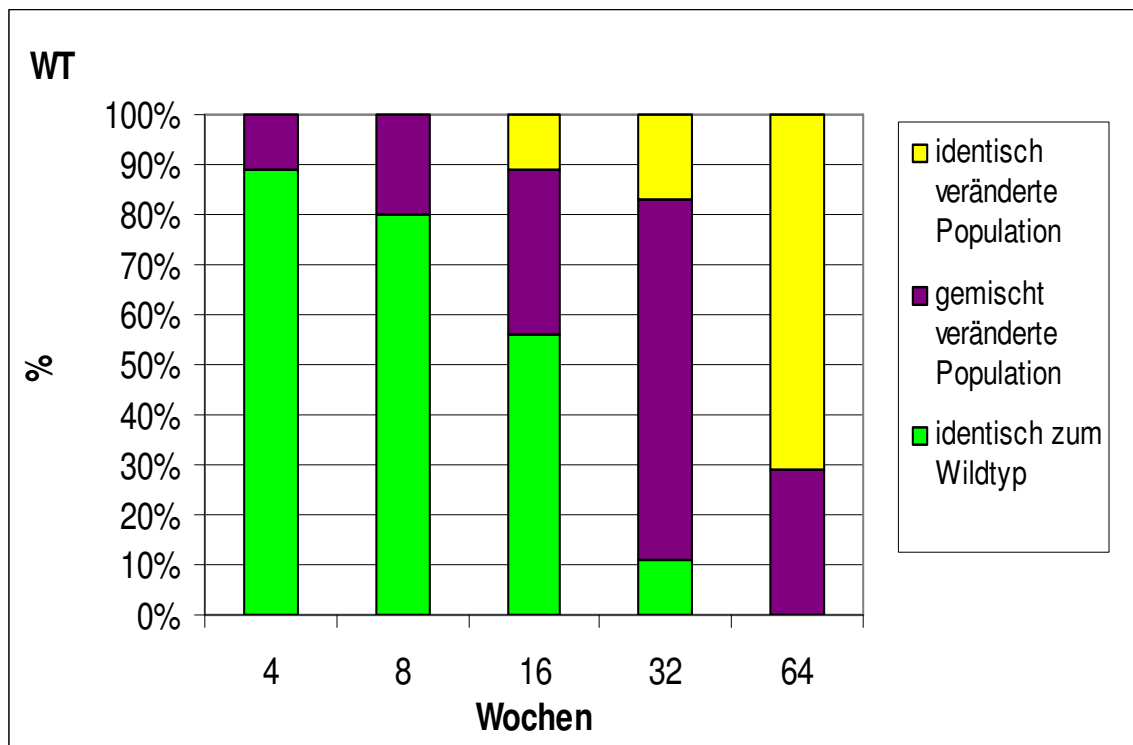


Abbildung 32: Häufigkeit verschiedener Populationen von HPB8-Reisolaten (WT), eingeteilt nach ihrem Expressionsmuster.

Expression wie Originalstamm HPB8 (grün), gemischt-verändert (violett) und identisch verändert (gelb). Die Gesamtanzahl der verfügbaren Proben je Tier und Zeitpunkt entsprach 100%. Die gemischt-veränderten Proben je Tier wurden prozentual davon ermittelt.

Die Reisolat-Populationen identisch zum Originalstamm HPB8 nahmen über die Zeit ab. Zum Zeitpunkt von 64 Wochen waren mehr als 70% der Reisolat-Populationen verändert, bei zunehmend destrukturierter Magenmukosa. Betrachtet wurden die Parameter CagA, BabA und OipA je Tier (A1, A2, K1, K2).

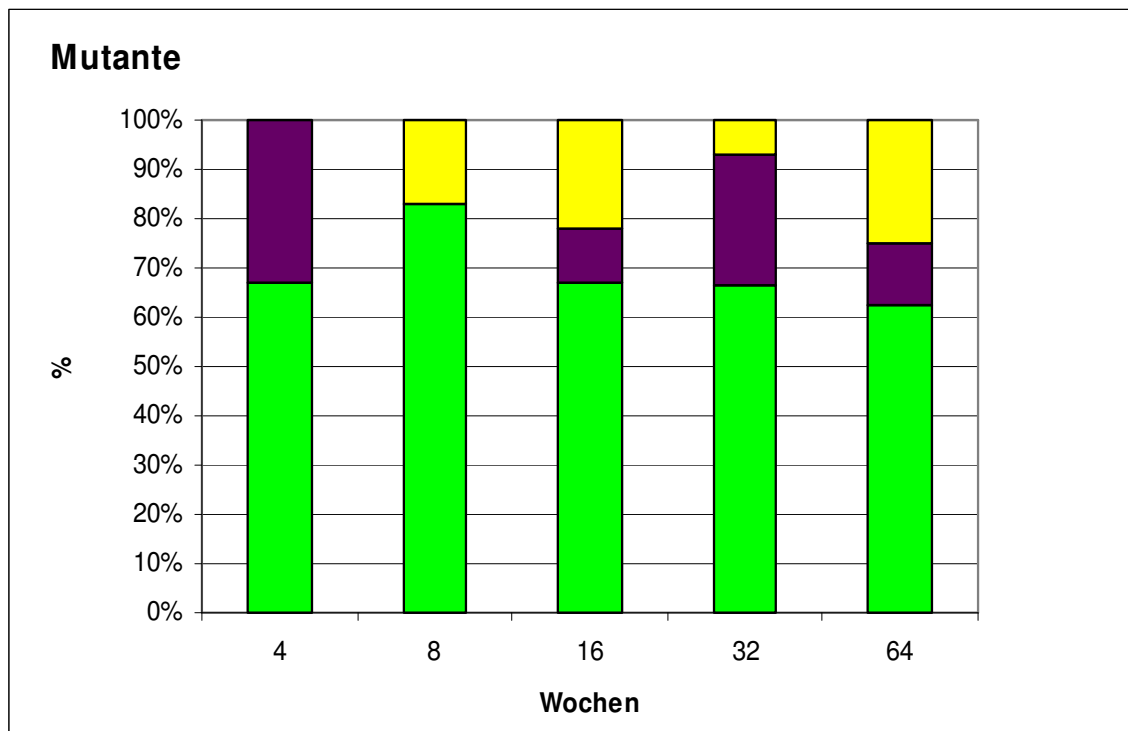


Abbildung 33: Häufigkeit verschiedener Populationen von Reisolaten, eingeteilt nach ihrem Expressionsmuster.

Expressionsprofil wie Originalstamm HPB8 (grün), gemischt-verändert (violett) und in sich (A1 bis K2) identisch verändert (gelb). Die Anzahl der vorhandenen Reisolate je Zeitpunkt und Tier entsprachen 100%.

Über den Zeitverlauf wurde bei den WT-Reisolaten deutlich, dass immer mehr Populationen der gemischt-veränderten Gruppe zuzuordnen waren und somit immer weniger WT-Reisolate noch dem Expressionsprofil des Originalstammes entsprachen. Die Abbildung 32 zeigt, dass bei den WT-Reisolaten nach 64 Wochen Infektion die Gruppe „identisch zum WT“ völlig verschwunden war und sich die identisch veränderte Population gut etabliert hatte.

Bei der Mutante blieben die Reisolat-Populationen in über 60% der Fälle pro Zeitpunkt identisch zum WT und zeigten somit keine Veränderungen in den analysierten Parametern (CagA, BabA und OipA). CagY wurde hier ebenfalls, aus oben genannten Gründen, nicht zum Vergleich herangezogen.

Um nun die Gruppe der veränderten Reisolatate noch genauer identifizieren zu können, wurden die beiden Reisolat-Populationen (WT und Mutante) unabhängig vom Tier betrachtet. Dabei gab es für die Virulenzfaktoren CagA, BabA und OipA insgesamt 8 mögliche Subtypen von Reisolaten sowohl für WT-Reisolatate als auch für Mutante-Reisolatate.

Tabelle 12: Häufigkeit der Subtypen von WT-Reisolatate bezogen auf CagA, BabA und OipA über die Zeit in Prozent.

Subtypen				Häufigkeit (%)				
				4 W	8 W	16 W	32 W	64 W
ST1	CagA +	BabA +	OipA +	91,3	88,8	72,7	45	3,5
ST2	CagA +	BabA +	OipA -	8,6	5,5	6	24	53,6
ST3	CagA +	BabA -	OipA +	0	5,5	18,2	24	0
ST4	CagA +	BabA -	OipA -	0	0	3	2,8	7,1
ST5	CagA -	BabA +	OipA +	0	0	0	4,2	14,2
ST6	CagA -	BabA -	OipA +	0	0	0	0	21,4
ST7	CagA -	BabA +	OipA -	0	0	0	0	0
ST8	CagA -	BabA -	OipA -	0	0	0	0	0

W = Wochen; ST = Subtyp

Aus Tabelle 12 ist ersichtlich, dass der WT mit positiver Expression von CagA, BabA und auch OipA sich immer weniger durchsetzen konnte. Sowohl bei WT-Reisolaten als auch bei Mutante-Reisolaten kam der Subtyp ST2: CagA +, BabA +, OipA - zunehmend häufiger vor. Nach 64 Wochen entsprach die größte Gruppe der WT-Reisolatate (ca. 60%) dem Subtyp ST2 und ca. 30% der Mutante-Bakterien (Daten nicht aufgelistet). Bei den WT-Reisolaten setzte sich auch der Subtyp ST3: CagA +, BabA -, OipA + bis 32 Wochen durch. Ab 64 Wochen war das Spektrum an Subtypen bei den WT-Reisolaten relativ inhomogen. Der Subtyp ST7 mit CagA -, BabA +, OipA - und der Subtyp ST8 mit CagA -, BabA - und OipA - kamen weder bei den WT-Reisolaten noch bei den Mutante-Reisolaten vor. Bei den Mutante-Reisolaten entsprachen auch nach 64 Wochen noch ca. 70% der Bakterien genetisch dem Originalstamm HPB8 (Aussage nur bezogen auf die Expression der drei Virulenzfaktoren CagA, BabA und OipA).

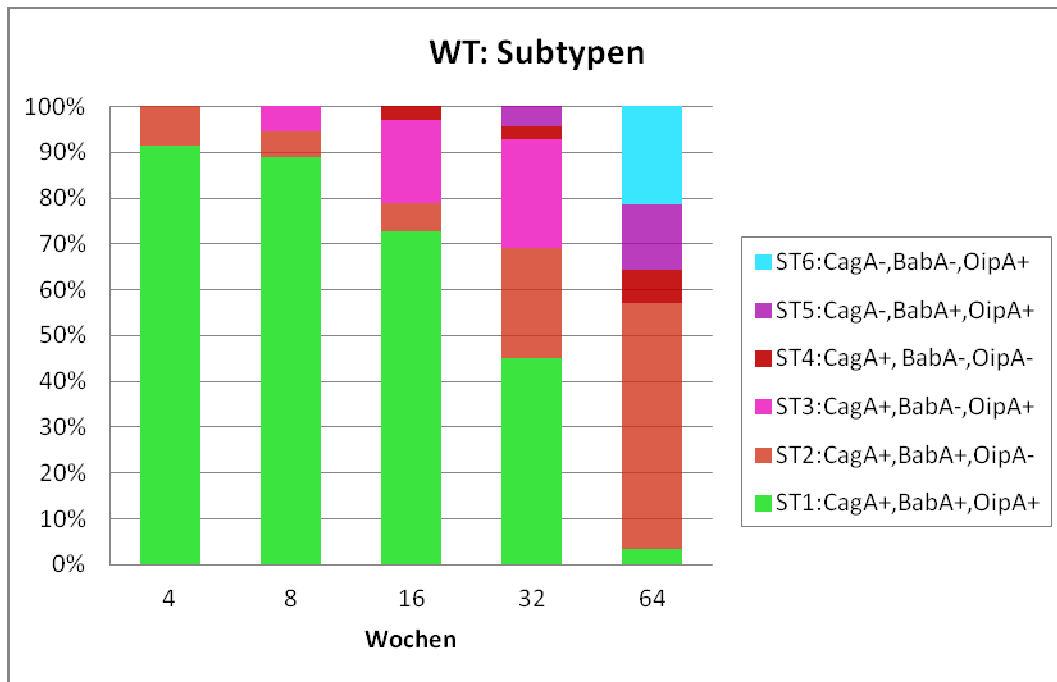


Abbildung 34: Veränderungen der Expression von CagA, BabA und OipA in den WT-Reisolate über die Zeit. Es wurden die Subtypen (ST) aller vorhandenen WT-Proben je Zeitpunkt unabhängig vom Tier betrachtet und prozentual in Bezug zur Gesamtzahl der Proben dargestellt.

Von 8 möglichen Subtypen setzte sich der Typ2 mit CagA +, BabA +, OipA - (orangerot) am stärksten durch. Der Typ 3 mit CagA +, BabA - und OipA + konnte sich nicht durchsetzen. Nach 64 Wochen gab es, alleine bezogen auf die drei untersuchten Proteine, bereits 5 Subtypen. Der Selektionsdruck auf *H. pylori* war bei WT-infizierten Gerbils größer als bei Mutante-infizierten Tieren.

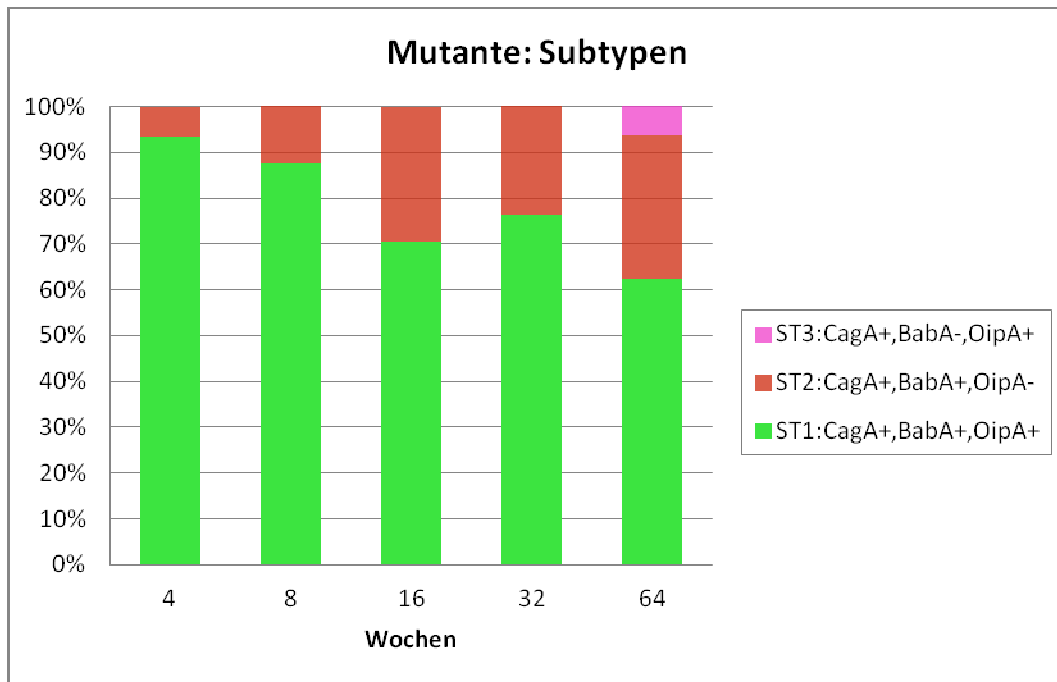


Abbildung 35: Veränderungen der Expression von CagA, BabA und OipA in den Mutante-Reisolaten über die Zeit. Es wurden die Subtypen (ST) aller vorhandenen Mutanten-Proben je Zeitpunkt unabhängig vom Tier betrachtet und prozentual in Bezug zur Gesamtzahl der Proben dargestellt.

Im Vergleich zu den WT-Reisolaten nahm bei den Mutante-Reisolaten der Subtyp 1 über die Zeit nur um ca. 25% ab, im Gegensatz dazu nahm der Subtyp 2 zu. Die Bandbreite an vorhandenen Subtypen war aber über die Zeit, unter den wenig veränderten Bedingungen im Magen, nur halb so groß wie bei den WT-Reisolaten.

3.6 Vergleichende Betrachtung der Reisolat-Ergebnisse im Vergleich mit den Vorergebnissen aus der Mongolischen Gerbil-Studie

Beim Mongolischen Gerbil konnte gezeigt werden, dass eine frühe Immunantwort später präkanzeröse Veränderungen im Gerbilmagen triggert. Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse der Reisolate mit den Vorergebnissen über die sich verändernden Bedingungen im Magen der entsprechenden Mongolischen Gerbils (Abb.36) zeigte sich, dass ein frühes

Absinken der Expression von BabA und der IL-8-Sekretion in Relation zu einer Entzündung des Magens zu stehen scheint. Ein spätes Absinken der Expression von CagA und der IL-8-Sekretion scheint in Zusammenhang mit physiologischen Veränderungen wie der Hypochlorhydrie und der Hypergastrinämie sowie präkanzerösen Prozessen (z.B. fokale Dysplasie) beim Wirt zu stehen.

Die histopathologischen Veränderungen der WT-infizierten Gerbils wurden in Abb. 36 im Zeitverlauf dargestellt. Das Auftreten der hochgradigen Entzündung, der Atrophie und der Metaplasie ab Woche 8 nach WT-Infektion ist statistisch signifikant.

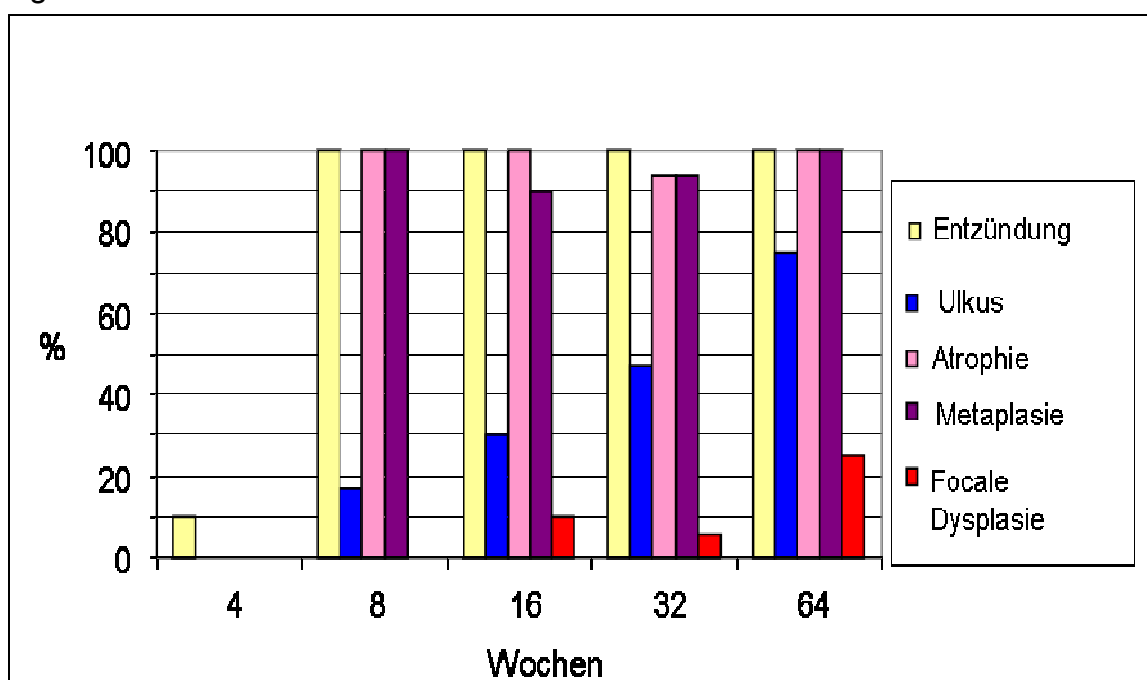


Abbildung 36: Prozentuale Darstellung der histopathologischen Veränderungen der Magenmukosa der Mongolischen Gerbils über die Zeit von 4 bis 64 Wochen der WT-Infektion.

Das Auftreten der hochgradigen Entzündung, der Atrophie und Metaplasie ab der 8. Woche nach WT-Infektion ist statistisch signifikant gegenüber dem Zeitpunkt von 4 Wochen mit nahezu unveränderter Magenmukosa [105].

Vergleicht man diese Ergebnisse mit dem Expressionsprofil der WT-Reisolate, insbesondere mit den Diagrammen zur Expressionsfrequenz von CagA und BabA sowie der IL-8-Sekretion (Abb.12, 15 und 24), so wird dieser Sachverhalt bestätigt. Die Zunahme von Ulkus und Dysplasie bei den Mongolischen Gerbils zu den späten Zeitpunkten von 32 und 64 Wochen wird ebenso in Abb. 36 verdeutlicht.

3.7 Proteomik-Analyse: Optimierung der 2-D Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese stellt eine gute Methode dar, um bei einer Probe eine größere Anzahl von Proteinen im Überblick darstellen zu können (Proteomik). Damit lassen sich die Unterschiede im Proteinprofil bei verschiedenen Proben besser miteinander vergleichen. Dies stellt eine Möglichkeit der Erweiterung der Analyse von Reisolaten dar.

Bei dieser Methode werden die Proteine in der 1. Dimension nach dem `Isoelektrischen Punkt` (IEP) zwischen pH3 und pH10 und anschließend in der 2. Dimension nach dem Molekulargewicht (MG) aufgetrennt. Wichtig ist bei dieser Methode, dass mit hochreinen Substanzen gearbeitet wird (Vermeidung von Kontamination) und dass die Proteine immer gut in Lösung gehalten werden (Vermeidung von Proteinschweifbildung). Zunächst werden pH-Gradienten in einer Gelmatrix erzeugt. Nach Ende der Fokussierung werden die IPG-Gelstreifen (Bio Rad) equilibriert, um störende Wechselwirkungen zu vermeiden. Bei der anschließenden SDS-PAGE ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des jeweiligen Molekulargewichtes und der relativen Wanderungsstrecke der Proteine. Mittels einer Eichkurve lässt sich das MG der Proteine bestimmen. Die Proteine in den Gelen werden durch die Comassie-Färbung sichtbar gemacht. Nach Digitalisierung erfolgt die Analyse der Gele mittels der Software PDQuest (BioRad). Die einzelnen Spots werden zur Analysierung ausgeschnitten und für die nachfolgende Protein-Sequenzanalyse gezielt fragmentiert. Die massenspektroskopische Analyse von zuvor mittels Laser ionisierten Peptiden erfolgt mit MALDI-TOF MS ("matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry"). Der Quotient aus Masse zu Ladung (m/z) wird bestimmt, und es entstehen charakteristische Spektren der Proteine, welche mit bereits bekannten Spektren verglichen werden können.

Ein Beispiel zur Veranschaulichung zeigt die Abb.37. Dabei steht die Abkürzung UreA für Urease, FlaA für FlagellinA, GroEL für ein Chaperon, DnaK für *heatshock protein 70* und TufB für einen Elongationsfaktor. Es gelang, den Spot für das Protein CagA zu identifizieren und mit Hilfe der MALDI-TOF MS zu

verifizieren (grüner Ring linkes Bild, Abb.37). So konnte das negative Ergebnis von CagA für die Reisolatprobe 118 K1 im Western Blot mittels dieser umfassenderen Methode bestätigt werden. Weitere Analysen sind geplant.

HPB8: Flüssigkultur, 15% SDS-PAGE

Reisolat 118 K1: CagA negativ im WB

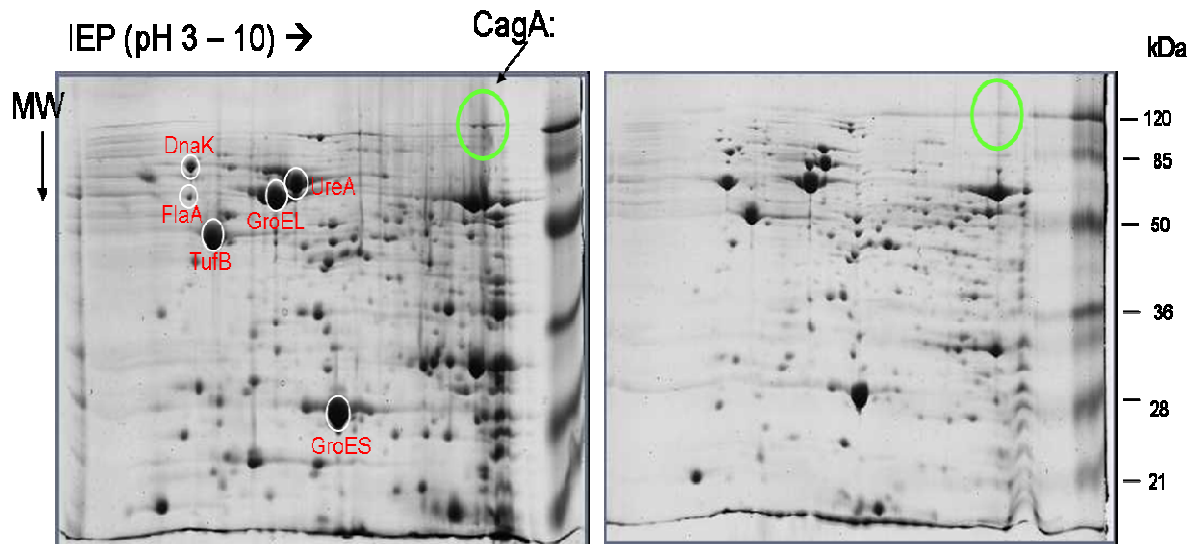


Abbildung 37: Darstellung der 2-D-Gelelektrophorese von Referenzstamm HPB8 verglichen mit dem WT-Reisolat 118 K1.

Die Proteine wurden zunächst nach dem isoelektrischen Punkt und anschließend nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Erläuterungen: siehe Text).

Die beiden Gele lassen sich gut vergleichen und so können weitere Ergebnisse meiner Arbeit mit Hilfe der Proteomik-Analyse bestätigt sowie neue Erkenntnisse daraus gewonnen werden.

Viele weitere Virulenzfaktoren können so verglichen und die Anpassung von *H. pylori* an eine sich verändernde Umgebung schnell und umfangreich untersucht werden.

4 Diskussion

Das Bakterium *H. pylori* besiedelt meist chronisch den menschlichen Magen. Etwa 50% der Weltbevölkerung sind infiziert, von denen ca. 90% eine Gastritis und etwa 20% zusätzlich ein Ulkus entwickeln. Kommen weitere Faktoren hinzu, so entsteht im Laufe der Jahrzehnte in 1-2% der Fälle sogar ein Magenadenokarzinom. Drei Faktoren sind für die oft lebenslange Persistenz im Wirt entscheidend: eine möglichst hohe Kolonisierungsrate im Magen, die Evasion vom Immunsystem des Wirtes und das Eindringen in die Magenmukosazelle selbst [93]. Das Bakterium *H. pylori* hat eine für ihn charakteristische hohe genetische Diversität [103]. Auf mehreren Ebenen verhilft diese dem Bakterium zu einer meist lebenslangen Persistenz in seinem Wirt.

Um nähere Einblicke in die Anpassungsmechanismen von *H. pylori* an seinen Wirt, Mongolischer Gerbil, zu erhalten, wurden in dieser Arbeit die Interaktionen von zwei *H. pylori*-Stämmen (WT und Mutante) mit seinem Wirt über einen Zeitverlauf von 64 Wochen *in vivo* untersucht. Dazu wurde zu definierten Zeitpunkten zwischen 4 und 64 Wochen das Pathogen aus dem Gerbilmagen reisoliert und analysiert. Es wurde exemplarisch die Expressionsfrequenz der Virulenzfaktoren CagY, CagA, BabA und OipA über die Zeit bestimmt.

Der Stamm HPB8 ist an den Mongolischen Gerbil adaptiert. Wie von Farnbacher *et al.* beschrieben, ist der HPB8-Stamm durch eine relativ große Anzahl von stammspezifischen Genen, sog. *singletons*, von längenvariablen Genen und von einer großen Plastizitätszone (PZ) charakterisiert. Diese stellen möglicherweise bereits Adaptationsprozesse an den Gerbilmagen dar [25].

Beim Mongolischen Gerbil vollzieht sich der Prozess der Mukosaveränderungen in ähnlicher Weise, wenn auch in beschleunigter Form, wie beim Menschen. Auf eine akute Gastritis folgt hier, z.B. bereits schon nach wenigen Wochen, eine chronische Entzündung und nach wenigen Monaten entstehen bereits Erosionen und Ulzera. Einzig ein Karzinom ließ sich in unserem Experiment mit n=12 Tieren nach 64 Wochen (noch) nicht feststellen, obwohl teilweise in diesen Tieren bereits eine fokale Dysplasie auftrat. Beim Menschen liegt die Magenkarzinomrate um 1-2%. Statistisch gesehen müsste

man also zur Herbeiführung eines Karzinoms bei einer ähnlich hohen Karzinomrate etwa 8x so viele Tiere in das Experiment einschließen ($n \approx 100$). Die histopathologischen und auch pathophysiologischen Veränderungen des Gerbilmagens scheinen jene im menschlichen Magen insgesamt sehr gut zu simulieren. Es ist anzunehmen, dass sich auf der anderen Seite auch die Veränderungen im Bakterium selbst über die Zeit mit den Veränderungen im menschlichen Magen vergleichen lassen. Vor dem Hintergrund dieser wahrscheinlichen Annahme sind die Beobachtungen in den Reisolaten zu deuten.

Die Kolonisierung von *H. pylori* gelingt durch die spiralförmige Form des Bakteriums, durch die Flagellen, die Urease (pH-Gradient) und das Anheften der Adhäsine an Rezeptoren auf der Mukosazelloberfläche.

Zu Beginn der Kolonisierung wurde das Adhäsin BabA bei WT- und bei Mutante-Reisolaten im Antrum und Korpus mit einer Frequenz von 100% exprimiert. OipA wurde beim WT im Antrum ebenfalls mit einer Frequenz von 100% exprimiert, im Korpus etwas vermindert (75%). Diese Abnahme im Korpus könnte zufällig erfolgt sein. Die Stabilität der Frequenz der Proteinexpression von BabA bei WT-Reisolaten nahm, bei zugleich zunehmender Entzündung der Mukosa, beginnend bei 8 Wochen, kontinuierlich um bis zu 30% ab. Diese Abnahme war bei 32 Wochen, im Vergleich zur Mutante, sogar signifikant. Hier scheint ein Zusammenhang mit dem Grad der Entzündung im Gerbil zu bestehen. Jedoch blieb auf der anderen Seite BabA insgesamt auch bei 64 Wochen mit einer Expressionsfrequenz von ca. 70% noch vorhanden, was seine Wichtigkeit als Virulenzfaktor vermuten lässt. In Mutante-Reisolaten war die Expressionsfrequenz des Proteins BabA sehr stabil. Die Mutante-infizierten Gerbils zeigten kaum histopathologische Veränderungen und auch kaum Veränderungen in Bezug auf die Expressionsfrequenz von BabA über die Zeit. Eventuell könnte die Abnahme der Expressionsfrequenz bei der Mutante zum Zeitpunkt von 64 Wochen als beginnende Anpassung an eine sich verändernde Mukosa interpretiert werden. Die Häufigkeit der OipA-Expression nahm bei den WT-infizierten Reisolaten kontinuierlich über die untersuchte Zeit ab. Auffällig war jedoch, dass auch die Häufigkeit der OipA-Expression der Mutante-Reisolate in vergleichbarer Intensität stetig abnahm. Dies könnte darauf hindeuten, dass, im Gegensatz zu

BabA, die mehr oder weniger pathologischen Gegebenheiten in der Mukosa zunächst keinen so großen Einfluss auf die Expression von OipA haben. Es könnte aber auch einen Vorteil bei der Immunevasion darstellen, indem das Bakterium, z.B. durch die fehlende Expression von OipA, nicht mehr vom Immunsystem wahrgenommen und somit selbst keine Immunantwort mehr auslösen kann, wie von Jones *et al.* bereits 1999 erwähnt [38]. Eine erfolgreiche Eliminierung von *H. pylori* könnte so erschwert und eine Chronifizierung der Infektion unterstützt werden. Erst zum Zeitpunkt von 64 Wochen nahm die Frequenz der OipA-Expression bei den WT-Reisolaten im Antrum um 15% und im Korpus um 35% stärker ab als bei den Mutante-Reisolaten. Zu diesem Zeitpunkt könnten die zunehmenden pathophysiologischen Veränderungen der Mukosa negativ auf die Expressionsfrequenz von OipA wirken. Es ist von einer erhöhten Mutationsrate auszugehen, die je nach Stabilität der Gene zu mehr oder weniger vielen Mutationen bei der DNA-Replikation führt. Anscheinend ist das Gen *babA* gegenüber dem Gen *oipA* weniger anfällig für Mutationen. Die variable Expressionsfrequenz der Virulenzfaktoren könnte insgesamt einen Selektionsvorteil für *H. pylori* darstellen. Es kam bei BabA und OipA insgesamt zu einer stärkeren Selektion von Bakterien mit verändertem Genom. Dies bestätigen Studien von Yamaoko *et al.*, in denen sie ebenfalls Veränderungen der Expressionsfrequenz von OMP's über die Zeit zeigen [109].

An dieser Stelle könnte man mutmaßen, dass OipA nach der initialen Kolonisierung der Magenmukosa durch *H. pylori* nicht mehr für die Anpassung an sich verändernde Wirtsbedingungen von Bedeutung ist.

Das Phänomen des *slipped strand mispairing* mit ON/OFF Status konnte bereits für *sabA* [110], *futC* [65], *babA* [94] und *oipA* [20] gezeigt werden. Es ist anzunehmen, dass es noch für weitere Proteine der OMP-Familie als möglicher Mechanismus der genetischen Diversität für *H. pylori* dient. Darüber hinaus könnten so auch weitere Virulenzfaktoren reguliert sein, wie Ge *et al.* und Khamri *et al.* vermuten [28], [42]. Interessanterweise konnten Mutationen, die ein *slippage* und *mispairing* auslösen, auch bei dem Bakterium *N. meningitidis* gefunden werden. Dieses Phänomen, das nur bei einem Teil der Gene vorkommt, wird als *switch region* bezeichnet und wird inzwischen als grundlegender Anpassungsmechanismus von Bakterien diskutiert (Trivedi, GNN, 2000).

Als wichtiges Strukturprotein des T4SS wurde das Protein CagY ebenfalls mittels Western Blot auf die Häufigkeit seiner Expression hin analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Expressionsfrequenz des Proteins über die Zeit sehr stabil war. Dass das T4SS essentiell ist für die chronische Besiedlung des Magens, konnte bereits 1997 von Rieder *et al.* gezeigt werden [82]. Auch bei den untersuchten Reisolaten wurde CagY sehr zuverlässig exprimiert, insbesondere zu dem späten Zeitpunkt von 64 Wochen, wo sich bereits deutliche Veränderungen in der Mukosa der Gerbils gezeigt hatten. Dies weist darauf hin, dass das Gen besonders stabil, d.h. weniger anfällig für Mutationen, sein könnte. Bei insgesamt nur drei von 170 WT-Reisolaten zeigte sich ein auf etwa 100 kDa verkürztes CagY. Die Sequenzierung wird Rückschlüsse darüber geben, ob eine Deletion im Gen oder eine Punktmutation mit vorzeitigem Stop-Codon die Ursache dieser Verkürzung ist.

Weiterhin interessierte das Onkoprotein CagA, welches über das T4SS in die Wirtszelle transloziert werden kann. Es wird dort mit Hilfe von Wirtskinasen (Src, Abl) am Tyrosin des sog. EPIYA-Motivs phosphoryliert. CagA ist entscheidend an Veränderungen von Signalkaskaden in der Wirtszelle beteiligt. Es bindet beispielsweise an die SHP-2-Tyrosin-Phosphatase, wodurch diese aktiviert und dereguliert wird, was zytoskelettale Umbauprozesse bedingen kann, oder es interagiert mit E-Cadherin und dereguliert das β -Catenin-Signal, das an der Induktion von Mitose-Genen mitbeteiligt ist. Es wurde in den WT-Reisolaten bis zum Zeitpunkt von 32 Wochen mit einer stabilen Frequenz exprimiert. Zum fortgeschrittenen Zeitpunkt von 64 Wochen der Infektion wurde CagA allerdings nur noch in 57% der Fälle im Antrum und in 71% der Fälle im Korpus mittels Western Blot nachgewiesen. Diese Abnahme der Expressionsfrequenz erreichte bei den WT-Reisolaten, im Gegensatz zu den Mutante-Reisolaten, eine statistische Signifikanz. Dies deutet darauf hin, dass die starken pathophysiologischen Veränderungen der Wirtsmukosa zum späten Zeitpunkt einen Einfluss auf die Expressionsfrequenz von CagA zu haben scheinen. Diese Vermutung liegt umso näher, als die Expressionsfrequenz von CagA bei den Mutante-Reisolaten über den gesamten Zeitraum hinweg sehr stabil war. Hier war die Histologie der Wirtsmukosa nicht wesentlich verändert. Da ein phosphoryliertes CagA in viele weitere Signalwege eingreifen kann, stellte sich die Frage, inwiefern der jeweils exprimierte Virulenzfaktor CagA in

die Wirtszelle transloziert werden kann. Um dies nachweisen zu können, wurden gastrale Karzinomzellen (AGS) mit den *H. pylori* Reisolaten infiziert und nach vier Stunden die Phosphorylierung des CagA-Proteins mit Hilfe eines spezifischen α -Phosphotyrosin-Antikörpers detektiert.

Das Protein CagA wurde zunächst bereits nach 8 Wochen im Korpus um 20% weniger häufig phosphoryliert, als es im Vergleich zu CagA im Western Blot zu erwarten gewesen wäre. Nach 16 Wochen und zum späten Zeitpunkt von 64 Wochen zeigte sich diese Beobachtung erneut. Die histopathologischen Veränderungen in der Mukosa scheinen hier ursächlich beteiligt zu sein. Bei aus dem Antrum stammenden Reisolaten wurden annähernd alle CagA-Proteine phosphoryliert, welche auch exprimiert worden waren. Ob diese reduzierte Phosphorylierungshäufigkeit für IL-8 positive Reisolate im Korpus sich auf eine Mutation im EPIYA-Motiv des CagA-Proteins zurückführen lässt, wird sich durch eine Sequenzierung aufklären lassen. Diese reduzierte Phosphorylierungsrate wurde von Higashi *et al.* ebenfalls beobachtet und als Anpassungsmechanismus postuliert [36].

Um einen Eindruck von der Reaktion der Reisolate auf das Immunsystem zu erhalten, wurden wiederum AGS-Zellen mit Reisolaten infiziert. Der Überstand wurde mittels ELISA auf die Sekretion des Zytokins IL-8 untersucht. Dabei zeigten die WT-Reisolate mit intaktem T4SS eine im Vergleich zum Referenzstamm HPB8 deutlich erhöhte IL-8-Sekretion, wohingegen die Mutante-Reisolate eine kaum messbare IL-8-Sekretion aufwiesen. Dies kann auf das beim WT intakte T4SS zurückgeführt werden, welches eine Immunantwort induziert. Die WT-Reisolate sind also vergleichbar mit dem verwendeten Originalstamm in der Lage, eine IL-8-Sekretion hervorzurufen. Die IL-8-Sekretion nahm sowohl über den Gesamtzeitverlauf von 4 nach 64 Wochen als auch von 32 zu 64 Wochen signifikant ab. Hier war CagA vermindert, jedoch CagY noch stabil exprimiert worden. Es sind insgesamt ca. 30 Proteine, die das T4SS ausmachen, evtl. sind andere für die IL-8-Sekretion essentielle Gene mutiert. Diese essentiellen Gene wurden von Püls *et al.* in einer umfassenden Mutationsstudie erarbeitet (Fischer et al 2001[27]. Aktuelle Veröffentlichungen zeigen auch, dass CagL wichtig für die CagA-Translokation ist [49] und dass CagL über die Bindung an den Rezeptor TLR5 die IL-8-Sekretion beeinflusst [72].

Bei den Vorergebnissen zeigte sich bei WT-infizierten Mongolischen Gerbils eine im Antrum und Korpus nach 8 Wochen signifikant zunehmende Sekretion der untersuchten Zytokine mit proinflammatorischer Funktion (IL-1 β , IFN- γ , IL-6, TNF- α u.a.). In der *in vivo* Studie mit Mongolischen Gerbils wurde die zum Zytokin IL-8 äquivalente KC herangezogen. Beim Vergleich der *in vivo* über die Zeit gemessenen KC-Werte mit den Vorergebnissen aus der *in vitro*-Studie fällt auf, dass die KC-Sekretion über die Zeit weniger abnimmt als die IL-8-Sekretion der AGS-Zellen. Dieser Sachverhalt zeigt gut den Unterschied zwischen *in vitro*-Studien unter Laborbedingungen und den *in vivo*-Studien mit vielen unbekanntem, aber realitätsnäheren Einflüssen. Deshalb ist es stets sinnvoll die erarbeiteten *in vitro*-Daten, wenn möglich, *in vivo* zu überprüfen.

Bei detaillierter Analyse von CagA, BabA und OipA je Reisolat zeigte sich, dass die Expression in immer mehr WT-Reisolaten verloren ging. Es setzten sich also eher solche Reisolate im Gerbil durch, die Veränderungen gegenüber dem Originalstamm HPB8 aufwiesen. Dies war besonders der Subtyp 2 (CagA +, BabA + und OipA -), der bei den WT-Reisolaten nach 64 Wochen Infektion auf ca. 60% anstieg. Aber auch der Subtyp 4 (CagA +, BabA -, OipA -) und weitere 3 Subtypen traten bei 64 Wochen auf. Die genetische Diversität von *H. pylori* wurde hier also zum Anpassungsmechanismus an eine sich stark verändernde Umgebung. Mit dieser Varianz an Subtypen war ein Überleben bei sich stark verändernden Bedingungen im Wirt offensichtlich besser, als unter Beibehaltung des Original-Expressionsprofils. Die Wirtsbedingungen bei der Mutante förderten diese genetische Vielfalt nur in einem viel geringeren Maße. Ähnlich vollzieht sich der Selektionsdruck von Bakterien bei Antibiotikagabe [2]. Resistenterer Bakterien überleben länger und können sogar direkt gegen das gegebene Antibiotikum Resistenzen entwickeln. *H. pylori* gehört längst zu den Bakterien, bei denen sich die Resistenzlage gegenüber Antibiotika zunehmend verschärft hat. Seine genetische Diversität verhilft ihm also unter vielen Bedingungen zu überleben.

Schlussfolgernd kann man sagen, dass die genetische Diversität von *H. pylori* eine optimale Anpassung des Bakteriums an eine sich verändernde Umgebung im Laufe der Zeit ermöglichte. Unter den Bedingungen, wie sie im Magen der WT-infizierten Gerbils anzutreffen waren, wurden die genetischen Veränderungen von *H. pylori* zum Überlebensvorteil für das Bakterium.

Die konkreten histopathologischen Veränderungen je Tier bei 64 Wochen (Vorergebnisse) wurden mit den dort vorkommenden Subtypen verglichen, um einen möglichen Zusammenhang aufzudecken. Bei 4 der 7 untersuchten 64-Wochen-Gerbils zeigte sich ein Ulkus. Hier kam der Subtyp 2 immerhin bei 3 dieser Tiere vor, bei einem Tier war jedoch trotz des Vorliegens des Subtyps 2 kein Ulkus entstanden. Ein Tier mit *H. pylori* Subtyp 4 im Antrum und Subtyp 6 im Korpus zeigte ein Ulkus. Fehlte CagA, so war in 2 von 3 Fällen kein Ulkus entstanden. Ein fehlendes CagA könnte ein Indikator für weitere Mutationen (z.B. Deletionen) in der *cagPAI* sein, wodurch möglicherweise weniger virulente *H. pylori*-Stämme resultieren. Bei diesen könnte es im Wirt zu einer geringeren Hypergastrinämie und somit in der Folge u.a. auch zu einer geringeren Destruktion der Mukosa kommen.

Es müssten mehr Tiere untersucht werden, um eine statistisch gesicherte Aussage bezüglich des Zusammenhangs der *H. pylori*-Subtypen in einem Tier mit den gefundenen pathologischen Veränderungen treffen zu können.

Insgesamt ist eine erhöhte Mutationsrate sowohl bei den Bakterien als auch in den Mukosazellen anzunehmen. Während sich für die Bakterien hierdurch längerfristig eher ein Vorteil zu ergeben scheint, sind die Folgen für die Mukosazelle unter Umständen verheerend.

Die Tumorentstehung in einer Zelle, so auch der Mukosazelle, wird mit fehlerhaften oder mangelnden Reparaturmechanismen der DNA und somit erhöhten Mutationsraten in Verbindung gebracht. So könnte *H. pylori*, durch seine ständige Interaktion mit dem Wirt, die Mukosazellen in eine Art Stresszustand versetzen. Durch die oft über Jahrzehnte andauernde chronische Gastritis könnte man sich vorstellen, dass der Reparaturmechanismus überfordert wird, was Mutationen wahrscheinlicher macht. Langfristig würde so die Wahrscheinlichkeit für eine Dysplasie, und nicht zuletzt die Tumorentstehung, ansteigen. Eine Infektion mit *H. pylori* reguliert das DNA-*mismatch*-Reparatur-System (MMR) herunter, und das Risiko für eine gehäufte Anzahl von Mutationen steigt. Außerdem konnte eine erhöhte oxidative DNA-Schädigung durch die Besiedlung mit *H. pylori* nachgewiesen werden [54].

Die auf genetischer Ebene gefundenen Ursachen für die im Western Blot z.T. nicht-detektierbaren Proteine BabA und OipA liegen im *frameshift* bei der

Translation durch das Verrutschen der Polymerase (*slipped strand mispairing*) begründet. Dieses genetische Erscheinungsbild erinnert an eine Erkrankung beim Menschen, die als Huntington-Erkrankung bezeichnet wird. Bei dieser neurodegenerativen Erkrankung kommt es zu einer zunehmenden Anzahl von CAG-Sequenzen (normalerweise 9-35 Wiederholungen). Die zugrundeliegende Mutation ist ein Verrutschen der DNA-Polymerase bei der Replikation, was zu einem Anstieg der CAG-Sequenz auf über 40 Wiederholungen führt. Dies resultiert in einer umso ausgeprägteren Nervenerkrankung, je mehr zusätzliche Wiederholungen vorliegen.

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse der Langzeitstudie mit den Ergebnissen der Reisolatstudie aus der vorliegenden Arbeit wird deutlich, dass zum frühen Zeitpunkt der Infektion, bei dem die Bedingungen im Magen noch physiologisch sind und die Magenmukosa noch intakt ist, die Expressionsfrequenz von CagA und BabA sehr hoch und die IL-8-Sekretion deutlich ausgeprägt ist. Mit Zunahme der Mukosadestruktion und Zunahme von pH-Wert und Gastrinspiegel über die Zeit sinkt die Expressionsrate von BabA, die Phosphorylierung von CagA im Korpus sowie die IL-8-Sekretion. Zum späten Zeitpunkt von 64 Wochen, mit stark destrukturierter Mukosa, nimmt die Expressionshäufigkeit von CagA ab und die IL-8-Sekretion sinkt ebenso weiter. Deutliche histopathologische (Gastritis, Mukosadestruktion) und pathophysiologische (Hypochlorhydrie, Hypergastrinämie) Veränderungen der Gerbil-Mukosa korrelieren also mit den phänotypischen Veränderungen der *H. pylori*-Reisolate, bezogen auf die untersuchten Parameter OipA, BabA, CagA und CagY.

Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden gezielt einzelne Faktoren, im Besonderen Virulenzfaktoren, von dem Humanpathogen *H. pylori* ausgewählt, um die Veränderungen des Phänotyps der *H. pylori*-Reisolate auf Grund ihrer Magenpassage im Zeitverlauf von 4 bis 64 Wochen zu untersuchen. Im Rahmen der Dissertation gelang es, die 2D-Gelelektrophorese-Technik für eine umfassendere Analyse der Reisolate auf Proteinebene zu etablieren sowie zu standardisieren. Mit Hilfe dieser Proteomik-Analyse könnten sich tiefere Einblicke in Gemeinsamkeiten des Proteinspektrums von *H. pylori* bei

bestimmen klinischen Bildern ergeben. Auch die Sequenzierung ganzer Reisolat-Genome, sog. Genomik, weist in eine viel versprechende Richtung. Die Pyro-454-Sequenzierung kann dabei viele hilfreiche Informationen im Genomvergleich von Reisolaten zum Parentalstamm HPB8 bieten. Bei dieser neuartigen Methode zur DNA-Sequenzierung können viele *reads* in kurzer Zeit erzeugt und, bei Kombination mit der herkömmlichen Sanger-Methode, relativ komplikationslos zu großen DNA-Abschnitten zusammengefügt werden.

Das HPB8-Genom wurde in einer umfassenden Arbeit sequenziert [25] und steht nun für eine viel versprechende Analyse der Reisolate als Referenzgenom zur Verfügung. Damit könnten die in dieser Arbeit ansatzweise beleuchteten genetischen Veränderungen der Reisolate, die im Rahmen ihrer Anpassung an die sich verändernde Magenmukosa entstanden sind, grundlegend erarbeitet werden.

5 Literaturverzeichnis

- [1] The nobel prize. Internet, 2005.
- [2] Thomas J Albert, Daiva Dailidiene, Giedrius Dailide, Jason E Norton, Awdhesh Kalia, Todd A Richmond, Michael Molla, Jaz Singh, Roland D Green, and Douglas E Berg. Mutation discovery in bacterial genomes: metronidazole resistance in *H. pylori*. *Nat Methods*, 2(12):951– 953, Dec 2005.
- [3] Manuel R Amieva, Roger Vogelmann, Antonello Covacci, Lucy S Tompkins, W. James Nelson, and Stanley Falkow. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *H. pylori*. CagA. *Science*, 300(5624):1430– 1434, May 2003.
- [4] J. C. Atherton, P. Cao, R. M. Peek, M. K. Tummuru, M. J. Blaser, and T. L. Cover. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *H. pylori*. association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*, 270(30):17771– 17777, Jul 1995.
- [5] John C Atherton and Martin J Blaser. Coadaptation of *H. pylori*. and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest*, 119(9):2475– 2487, Sep 2009.
- [6] S. Backert, S. Moese, M. Selbach, V. Brinkmann, and T. F. Meyer. Phosphorylation of tyrosine 972 of the *H. pylori*. CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol*, 42(3):631– 644, Nov 2001.
- [7] S. Backert, E. Ziska, V. Brinkmann, U. Zimny-Arndt, A. Fauconnier, P. R. Jungblut, M. Naumann, and T. F. Meyer. Translocation of the *H. pylori*. CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol*, 2(2):155– 164, Apr 2000.
- [8] Steffen Backert and Matthias Selbach. Role of type IV secretion in *H. pylori*. pathogenesis. *Cell Microbiol*, 10(8):1573– 1581, Aug 2008.
- [9] D. A. Baltrus, M. J. Blaser, and K. Guillemin. *Helicobacter pylori* genome plasticity. *Genome Dyn*, 6:75– 90, 2009.
- [10] Blaser. Eine bedrohte Art im Magen. *Spektrum der Wissenschaft*, 09:82 – 89, 2005.

- [11] M. J. Blaser and D. E. Berg. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest*, 107(7):767– 773, Apr 2001.
- [12] M. J. Blaser, G. I. Perez-Perez, H. Kleanthous, T. L. Cover, R. M. Peek, P. H. Chyou, G. N. Stemmermann, and A. Nomura. Infection with *H. pylori* strains possessing CagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*, 55(10):2111– 2115, May 1995.
- [13] Martin J Blaser. Theodore e. woodward award: Global warming and the human stomach: microecology follows macroecology. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 116:65– 75; discussion 75– 6, 2005.
- [14] Martin J Blaser and John C Atherton. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest*, 113(3):321– 333, Feb 2004.
- [15] T. Borén, P. Falk, K. A. Roth, G. Larson, and S. Normark. Attachment of *H. pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*, 262(5141):1892– 1895, Dec 1993.
- [16] Yu Chen and Martin J Blaser. Inverse associations of *H. pylori* with asthma and allergy. *Arch Intern Med*, 167(8):821– 827, Apr 2007.
- [17] P. Correa. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res*, 48(13):3554– 3560, Jul 1988.
- [18] A. Covacci, S. Censini, M. Bugnoli, R. Petracca, D. Burroni, G. Macchia, A. Massone, E. Papini, Z. Xiang, and N. Figura. Molecular characterization of the 128-kda immunodominant antigen of *H. pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(12):5791– 5795, Jun 1993.
- [19] Timothy L Cover and Steven R Blanke. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol*, 3(4):320– 332, Apr 2005.
- [20] Anar Dossumbekova, Christian Prinz, Jorg Mages, Roland Lang, Johannes G Kusters, Arnoud H M Van Vliet, Wolfgang Reindl, Steffen Backert, Dieter Saur, Roland M Schmid, and Roland Rad. *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of HopH gene polymorphisms. *J Infect Dis*, 194(10):1346– 1355, Nov 2006.
- [21] K. A. Eaton, D. R. Morgan, and S. Krakowka. Motility as a factor in the colonisation of genotobiotic piglets by *H. pylori*. *J Med Microbiol*, 37(2):123– 127, Aug 1992.

- [22] D. Falush, C. Kraft, N. S. Taylor, P. Correa, J. G. Fox, M. Achtman, and S. Suerbaum. Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *H. pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(26):15056– 15061, Dec 2001.
- [23] Daniel Falush, Thierry Wirth, Bodo Linz, Jonathan K Pritchard, Matthew Stephens, Mark Kidd, Martin J Blaser, David Y Graham, Sylvie Vacher, Guillermo I Perez-Perez, Yoshio Yamaoka, Francis Mégraud, Kristina Otto, Ulrike Reichard, Elena Katzowitsch, Xiaoyan Wang, Mark Achtman, and Sebastian Suerbaum. Traces of human migrations in *H. pylori* populations. *Science*, 299(5612):1582– 1585, Mar 2003.
- [24] X. G. Fan, D. Kelleher, X. J. Fan, H. X. Xia, and P. W. Keeling. *Helicobacter pylori* increases proliferation of gastric epithelial cells. *Gut*, 38(1):19– 22, Jan 1996.
- [25] Max Farnbacher, Thomas Jahns, Dirk Willrodt, Rolf Daniel, Rainer Haas, Alexander Goesmann, Stefan Kurtz, and Gabriele Rieder. Sequencing, annotation and comparative genome analysis of the gerbil-adapted *H. pylori* strain B8. *BMC Genomics*, 11(1):335, May 2010.
- [26] W. Fischbach, P. Malfertheiner, J. C. Hoffmann, W. Bolten, J. Bornschein, O. Götze, W. Höhne, M. Kist, S. Koletzko, J. Labenz, P. Layer, St Miehlike, A. Morgner, U. Peitz, J. C. Preiss, C. Prinz, U. Rosien, W. E. Schmidt, A. Schwarzer, S. Suerbaum, A. Timmer, G. Treiber, and M. Vieth. [S3-guideline "H. pylori. and gastroduodenal ulcer disease"]. *Z Gastroenterol*, 47:68– 102, 2009.
- [27] W. Fischer, J. Püls, R. Buhrdorf, B. Gebert, S. Odenbreit, and R. Haas. Systematic mutagenesis of the *H. pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol*, 42(5):1337– 1348, Dec 2001.
- [28] Z. Ge and D. E. Taylor. Contributions of genome sequencing to understanding the biology of *H. pylori*. *Annu Rev Microbiol*, 53:353– 387, 1999.
- [29] Bettina Gebert, Wolfgang Fischer, Evelyn Weiss, Reinhard Hoffmann, and Rainer Haas. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*, 301(5636):1099– 1102, Aug 2003.

- [30] R. M. Genta. *Helicobacter pylori* as a promoter of intestinal metaplasia and gastric cancer: an alluring hypothesis in search of evidence. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 7 Suppl 1:S25– S30, Aug 1995.
- [31] M. Gerhard, N. Lehn, N. Neumayer, T. Borén, R. Rad, W. Schepp, S. Miehlke, M. Classen, and C. Prinz. Clinical relevance of the *H. pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(22):12778–12783, Oct 1999.
- [32] Christoph Gradmann. [a matter of methods: the historicity of Koch's postulates 1840-2000]. *Medizinhist J*, 43(2):121– 148, 2008.
- [33] D. Y. Graham and Y. Yamaoka. Disease-specific *H. pylori* virulence factors: the unfulfilled promise. *Helicobacter*, 5 Suppl 1:S3– 9; discussion S27– 31, 2000.
- [34] M. Gschwantler and B. Dragosics. [physiopathology of *H. pylori* infections]. *Acta Med Austriaca*, 27(4):117– 121, 2000.
- [35] S. L. Hazell, D. J. Evans, and D. Y. Graham. *Helicobacter pylori* catalase. *J Gen Microbiol*, 137(1):57– 61, Jan 1991.
- [36] Hideaki Higashi, Kazuyuki Yokoyama, Yumiko Fujii, Shumei Ren, Hitomi Yuasa, Iraj Saadat, Naoko Murata-Kamiya, Takeshi Azuma, and Masanori Hatakeyama. EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *H. pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *J Biol Chem*, 280(24):23130– 23137, Jun 2005.
- [37] D. Ilver, A. Arnqvist, J. Ogren, I. M. Frick, D. Kersulyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand, and T. Borén. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*, 279(5349):373– 377, Jan 1998.
- [38] N. L. Jones and P. M. Sherman. On/off antigenic variation in *H. pylori*: a clue to understanding immune evasion in the host. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 28(2):233– 234, Feb 1999.
- [39] Junqueira. *Histologie*. Springer, 1996.
- [40] Josephine Kang and Martin J Blaser. Bacterial populations as perfect gases: genomic integrity and diversification tensions in *H. pylori*. *Nat Rev Microbiol*, 4(11):826– 836, Nov 2006.
- [41] A. C. Keates, S. Tummala, R. M. Peek, E. Csizmadia, B. Kunzli, K. Becker, P. Correa, J. Romero-Gallo, M. B. Piazuelo, S. Sheth, C. P. Kelly, S. C.

- Robson, and S. Keates. *Helicobacter pylori* infection stimulates plasminogen activator inhibitor 1 production by gastric epithelial cells. *Infect Immun*, 76(9):3992– 3999, Sep 2008.
- [42] Wafa Khamri, Anthony P Moran, Mulugeta L Worku, Q. Najma Karim, Marjorie M Walker, Heidi Annuk, John A Ferris, Ben J Appelmelk, Paul Eggleton, Kenneth B M Reid, and Mark R Thursz. Variations in *H. pylori* lipopolysaccharide to evade the innate immune component surfactant protein d. *Infect Immun*, 73(11):7677– 7686, Nov 2005.
- [43] Marten Kivi and Ylva Tindberg. *Helicobacter pylori* occurrence and transmission: a family affair? *Scand J Infect Dis*, 38(6-7):407– 417, 2006.
- [44] Gergely Klausz, Andrea Tiszai, L. Tiszlavicz, Z. Gyulai, Zsuzsa Lénart, J. Lonovics, and Yvette Mandi. Local and peripheral cytokine response and CagA status of *H. pylori*-positive patients with duodenal ulcer. *Eur Cytokine Netw*, 14(3):143– 148, 2003.
- [45] J. W. Konturek and W. Domschke. [*H. pylori* and gastric acid secretion]. *Z Gastroenterol*, 37(2):187– 194, Feb 1999.
- [46] Takahiko Kudo, Zhannat Z Nurgalieva, Margaret E Conner, Sue Crawford, Stefan Odenbreit, Rainer Haas, David Y Graham, and Yoshio Yamaoka. Correlation between *H. pylori* OipA protein expression and OipA gene switch status. *J Clin Microbiol*, 42(5):2279– 2281, May 2004.
- [47] E. J. Kuipers, D. A. Israel, J. G. Kusters, M. M. Gerrits, J. Weel, A. van Der Ende, R. W. van Der Hulst, H. P. Wirth, J. Höök-Nikanne, S. A. Thompson, and M. J. Blaser. Quasispecies development of *H. pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J Infect Dis*, 181(1):273– 282, Jan 2000.
- [48] E. J. Kuipers, G. I. Pérez-Pérez, S. G. Meuwissen, and M. J. Blaser. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the CagA status. *J Natl Cancer Inst*, 87(23):1777– 1780, Dec 1995.
- [49] Terry Kwok, Dana Zabler, Sylwia Urman, Manfred Rohde, Roland Hartig, Silja Wessler, Rolf Misselwitz, Jürgen Berger, Norbert Sewald, Wolfgang König, and Steffen Backert. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*, 449(7164):862– 866, Oct 2007.
- [50] J. R. Lambert, S. K. Lin, and J. Aranda-Michel. *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 208:33– 46, 1995.

- [51] T. D. Lawley, W. A. Klimke, M. J. Gubbins, and L. S. Frost. F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol Lett*, 224(1):1– 15, Jul 2003.
- [52] A. Lee, J. Fox, and S. Hazell. Pathogenicity of *H. pylori*: a perspective. *Infect Immun*, 61(5):1601– 1610, May 1993.
- [53] W. H. Li and L. A. Sadler. Low nucleotide diversity in man. *Genetics*, 129(2):513– 523, Oct 1991.
- [54] Ana Manuel Dantas Machado, C. Figueiredo, Raquel Seruca, and Lene Juel Rasmussen. *Helicobacter pylori* infection generates genetic instability in gastric cells. *Biochim Biophys Acta*, 1806(1):58– 65, Aug 2010.
- [55] H. M. Malaty, D. G. Evans, D. J. Evans, and D. Y. Graham. *Helicobacter pylori* in hispanics: comparison with blacks and whites of similar age and socioeconomic class. *Gastroenterology*, 103(3):813– 816, Sep 1992.
- [56] H. M. Malaty and D. Y. Graham. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *H. pylori* infection. *Gut*, 35(6):742– 745, Jun 1994.
- [57] H. M. Malaty, T. Kumagai, E. Tanaka, H. Ota, K. Kiyosawa, D. Y. Graham, and T. Katsuyama. Evidence from a nine-year birth cohort study in japan of transmission pathways of *H. pylori* infection. *J Clin Microbiol*, 38(5):1971– 1973, May 2000.
- [58] B. J. Marshall and J. R. Warren. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1(8390):1311– 1315, Jun 1984.
- [59] Hitomi Mimuro, Toshihiko Suzuki, Shigenori Nagai, Gabriele Rieder, Masato Suzuki, Takeshi Nagai, Yukihiro Fujita, Kanna Nagamatsu, Nozomi Ishijima, Shigeo Koyasu, Rainer Haas, and Chihiro Sasakawa. *Helicobacter pylori* dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. *Cell Host Microbe*, 2(4):250– 263, Oct 2007.
- [60] Yuzo Mitsuno, Shin Maeda, Haruhiko Yoshida, Yoshihiro Hirata, Keiji Ogura, Masao Akanuma, Takao Kawabe, Yasushi Shiratori, and Masao Omata. *Helicobacter pylori* activates the proto-oncogene c-fos through SRE transactivation. *Biochem Biophys Res Commun*, 291(4):868– 874, Mar 2002.
- [61] A. Morgner, N. Lehn, L. P. Andersen, C. Thiede, M. Bennedsen, K. Trebesius, B. Neubauer, A. Neubauer, M. Stolte, and E. Bayerdörffer. *Helicobacter heilmannii*-associated primary gastric low-grade malt lymphoma: complete

- remission after curing the infection. *Gastroenterology*, 118(5):821– 828, May 2000.
- [62] N. Murata-Kamiya, Y. Kurashima, Y. Teishikata, Y. Yamahashi, Y. Saito, H. Higashi, H. Aburatani, T. Akiyama, R. M. Peek, T. Azuma, and M. Hatakeyama. *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene*, 26(32):4617– 4626, Jul 2007.
- [63] Masanori Naito, Takeshi Yamazaki, Ryouhei Tsutsumi, Hideaki Higashi, Kazunori Onoe, Shiho Yamazaki, Takeshi Azuma, and Masanori Hatakeyama. Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *H. pylori*. CagA. *Gastroenterology*, 130(4):1181– 1190, Apr 2006.
- [64] Gerardo Nardone and Andrea Morgner. *Helicobacter pylori* and gastric malignancies. *Helicobacter*, 8 Suppl 1:44– 52, 2003.
- [65] Christina Nilsson, Anna Skoglund, Anthony P Moran, Heidi Annuk, Lars Engstrand, and Staffan Normark. An enzymatic ruler modulates lewis antigen glycosylation of *H. pylori*. LPS during persistent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(8):2863– 2868, Feb 2006.
- [66] S. Odenbreit, J. Püls, B. Sedlmaier, E. Gerland, W. Fischer, and R. Haas. Translocation of *H. pylori*. CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*, 287(5457):1497– 1500, Feb 2000.
- [67] Stefan Odenbreit. Adherence properties of *H. pylori*: impact on pathogenesis and adaptation to the host. *Int J Med Microbiol*, 295(5):317– 324, Sep 2005.
- [68] Stefan Odenbreit, Kirstin Swoboda, Iris Barwig, Stefan Ruhl, Thomas Borén, Sibylle Koletzko, and Rainer Haas. Outer membrane protein expression profile in *H. pylori*. clinical isolates. *Infect Immun*, 77(9):3782– 3790, Sep 2009.
- [69] K. Ogura, S. Maeda, M. Nakao, T. Watanabe, M. Tada, T. Kyutoku, H. Yoshida, Y. Shiratori, and M. Omata. Virulence factors of *H. pylori*. responsible for gastric diseases in mongolian gerbil. *J Exp Med*, 192(11):1601– 1610, Dec 2000.
- [70] Naomi Ohnishi, Hitomi Yuasa, Shinya Tanaka, Hirofumi Sawa, Motohiro Miura, Atsushi Matsui, Hideaki Higashi, Manabu Musashi, Kazuya Iwabuchi, Misao Suzuki, Gen Yamada, Takeshi Azuma, and Masanori Hatakeyama. Transgenic expression of *H. pylori*. CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(3):1003– 1008, Jan 2008.

- [71] H. Osawa, K. Sugano, M. Iwamori, M. Kawakami, M. Tada, and M. Nakao. Comparative analysis of colonization of *H. pylori* and glycolipids receptor density in mongolian gerbils and mice. *Dig Dis Sci*, 46(1):69– 74, Jan 2001.
- [72] Suneesh Kumar Pachathundikandi, Sabine Brandt, Joseph Madassery, and Steffen Backert. Induction of tlr-2 and tlr-5 expression by *H. pylori* switches *cagpaI*-dependent signalling leading to the secretion of IL-8 and TNF- α . *PLoS One*, 6(5):e19614, 2011.
- [73] E. Papini, M. de Bernard, E. Milia, M. Bugnoli, M. Zerial, R. Rappuoli, and C. Montecucco. Cellular vacuoles induced by *H. pylori* originate from late endosomal compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(21):9720– 9724, Oct 1994.
- [74] J. Parsonnet, S. Hansen, L. Rodriguez, A. B. Gelb, R. A. Warnke, E. Jellum, N. Orentreich, J. H. Vogelstein, and G. D. Friedman. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med*, 330(18):1267– 1271, May 1994.
- [75] M. Plebani, D. Basso, L. Brigato, M. Cassaro, F. Farinati, F. Di Mario, and M. Rugge. A new method for detecting anti *H. pylori* antibodies: an analytical and clinical evaluation. *J Clin Lab Anal*, 8(4):219– 222, 1994.
- [76] C. Prinz, M. Schöniger, R. Rad, I. Becker, E. Keiditsch, S. Wagenpfeil, M. Classen, T. Rösch, W. Schepp, and M. Gerhard. Key importance of the *H. pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res*, 61(5):1903– 1909, Mar 2001.
- [77] Christian Prinz, Nadia Hafsi, and Petra Volland. *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. *Trends Microbiol*, 11(3):134– 138, Mar 2003.
- [78] Camilla Recordati, Valentina Gualdi, Melanie Craven, Lorenza Sala, Mario Luini, Anna Lanzoni, Mark Rishniw, Kenneth W Simpson, and Eugenio Scanziani. Spatial distribution of *Helicobacter spp.* in the gastrointestinal tract of dogs. *Helicobacter*, 14(3):180– 191, Jun 2009.
- [79] H. Renz-Polster. *Basislehrbuch Innere Medizin*. Urban & Fischer, 2001.
- [80] ResiNet-Studie, 2008.
- [81] O. Ricuarte, O. Gutierrez, H. Cardona, J. G. Kim, D. Y. Graham, and H. M T El-Zimaity. Atrophic gastritis in young children and adolescents. *J Clin Pathol*, 58(11):1189– 1193, Nov 2005.

- [82] G. Rieder, R. A. Hatz, A. P. Moran, A. Walz, M. Stolte, and G. Enders. Role of adherence in interleukin-8 induction in *H. pylori*-associated gastritis. *Infect Immun*, 65(9):3622– 3630, Sep 1997.
- [83] Gabriele Rieder, Juanita L Merchant, and Rainer Haas. Helicobacter pylori *cag*-type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in mongolian gerbils. *Gastroenterology*, 128(5):1229– 1242, May 2005.
- [84] M. Rossi, M. L. Hänninen, J. Revez, M. Hannula, and R. G. Zanoni. Occurrence and species level diagnostics of Campylobacter spp., enteric *Helicobacter spp.* and Anaerobiospirillum spp. in healthy and diarrheic dogs and cats. *Vet Microbiol*, 129(3-4):304– 314, Jun 2008.
- [85] N. R. Salama, G. Otto, L. Tompkins, and S. Falkow. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect Immun*, 69(2):730– 736, Feb 2001.
- [86] Laurence Salaün, Sarah Ayraud, and Nigel J Saunders. Phase variation mediated niche adaptation during prolonged experimental murine infection with *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, 151(Pt 3):917– 923, Mar 2005.
- [87] Sabine Schneider, Christiane Weydig, and Silja Wessler. Targeting focal adhesions: *Helicobacter pylori*-host communication in cell migration. *Cell Commun Signal*, 6:2, 2008.
- [88] Mitchell L Schubert. Gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol*, 23(6):595– 601, Nov 2007.
- [89] E. D. Segal, J. Cha, J. Lo, S. Falkow, and L. S. Tompkins. Altered states: involvement of phosphorylated *cagA* in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(25):14559– 14564, Dec 1999.
- [90] Matthias Selbach, Stefan Moese, Christof R Hauck, Thomas F Meyer, and Steffen Backert. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 277(9):6775– 6778, Mar 2002.
- [91] Matthias Selbach, Stefan Moese, Robert Hurwitz, Christof R Hauck, Thomas F Meyer, and Steffen Backert. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-src inactivation. *EMBO J*, 22(3):515– 528, Feb 2003.

- [92] Cynthia M Sharma, Steve Hoffmann, Fabien Darfeuille, J. Reignier, Sven Findeiss, Alexandra Sittka, Sandrine Chabas, Kristin Reiche, J. Hackermüller, Richard Reinhardt, Peter F Stadler, and J. Vogel. The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 464(7286):250– 255, Mar 2010.
- [93] Bor-Shyang Sheu, Hsiao-Bai Yang, Yu-Chun Yeh, and Jiunn-Jong Wu. *Helicobacter pylori* colonization of the human gastric epithelium: a bug’ s first step is a novel target for us. *J Gastroenterol Hepatol*, 25(1):26– 32, Jan 2010.
- [94] Jay V Solnick, Lori M Hansen, Nina R Salama, Jenni K Boonjakuakul, and Michael Syvanen. Modification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein expression during experimental infection of rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(7):2106– 2111, Feb 2004.
- [95] J. Spencer and A. C. Wotherspoon. Gastric malt lymphoma and *Helicobacter pylori*. *Cancer Surv*, 30:213– 231, 1997.
- [96] C. Spiegelhalder, B. Gerstenecker, A. Kersten, E. Schiltz, and M. Kist. Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infect Immun*, 61(12):5315– 5325, Dec 1993.
- [97] Kerstin Stingl, Karlheinz Altendorf, and Evert P Bakker. Acid survival of *Helicobacter pylori*. how does urease activity trigger cytoplasmic ph homeostasis? *Trends Microbiol*, 10(2):70– 74, Feb 2002.
- [98] Sebastian Suerbaum and Mark Achtman. *Helicobacter pylori*: recombination, population structure and human migrations. *Int J Med Microbiol*, 294(2-3):133– 139, Sep 2004.
- [99] Toshiro Sugiyama and Masahiro Asaka. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Med Electron Microsc*, 37(3):149– 157, Sep 2004.
- [100] M. Tsujii, S. Kawano, S. Tsuji, K. Nagano, T. Ito, N. Hayashi, H. Fusamoto, T. Kamada, and K. Tamura. Ammonia: a possible promotor in *Helicobacter pylori*-related gastric carcinogenesis. *Cancer Lett*, 65(1):15– 18, Jul 1992.
- [101] unknown. Urease-test. wikipedia.
- [102] Jérôme Viala, Catherine Chaput, Ivo G Boneca, Ana Cardona, Stephen E Girardin, Anthony P Moran, Rafika Athman, Sylvie Mémet, Michel R Huerre, Anthony J Coyle, Peter S DiStefano, Philippe J Sansonetti, A. Labigne, John Bertin, Dana J Philpott, and Richard L Ferrero. Nod1 responds to peptidoglycan

- delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*, 5(11):1166– 1174, Nov 2004.
- [103] G. Wang, M. Z. Humayun, and D. E. Taylor. Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol*, 7(12):488– 493, Dec 1999.
- [104] D. L. Weeks, S. Eskandari, D. R. Scott, and G. Sachs. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*, 287(5452):482– 485, Jan 2000.
- [105] Tobias Wiedemann, Eva Loell, Susanna Mueller, Mechthild Stoeckelhuber, Manfred Stolte, Rainer Haas, and Gabriele Rieder. *Helicobacter pylori* cag-pathogenicity island-dependent early immunological response triggers later precancerous gastric changes in mongolian gerbils. *PLoS One*, 4(3):e4754, 2009.
- [106] S. C. Winans, D. L. Burns, and P. J. Christie. Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. *Trends Microbiol*, 4(2):64– 68, Feb 1996.
- [107] D. Wodarek, W. Pakszys, and M. Barlik. [*Helicobacter pylori*- does it only cause gastroduodenal disease?]. *Pol Merkur Lekarski*, 11(65):456– 459, Nov 2001.
- [108] Y. Yamaoka, D. H. Kwon, and D. Y. Graham. A m(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipa) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(13):7533– 7538, Jun 2000.
- [109] Y. Yamaoka, O. Ojo, S. Fujimoto, S. Odenbreit, R. Haas, O. Gutierrez, H. M T El-Zimaity, R. Reddy, A. Arnqvist, and D. Y. Graham. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut*, 55(6):775– 781, Jun 2006.
- [110] Yoshio Yamaoka. Increasing evidence of the role of *Helicobacter pylori* SabA in the pathogenesis of gastroduodenal disease. *J Infect Dev Ctries*, 2(3):174– 181, 2008.
- [111] Yoshio Yamaoka, Shogo Kikuchi, Hala M T el Zimaity, Oscar Gutierrez, Michael S Osato, and David Y Graham. Importance of *Helicobacter pylori* OipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology*, 123(2):414– 424, Aug 2002.

- [112] H. Yoshiyama, H. Nakamura, M. Kimoto, K. Okita, and T. Nakazawa. Chemotaxis and motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *J Gastroenterol*, 34 Suppl 11:18– 23, 1999.
- [113] Rocco Maurizio Zagari and Franco Bazzoli. Gastric cancer: who is at risk? *Dig Dis*, 22(4):302– 305, 2004.

6 Abkürzungsverzeichnis

α -	anti
AK	Antikörper
AP-A	Alkalische Phosphatase-gekoppeltes Protein A
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BabA	blood group antigen binding adhesin
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
<i>cagA</i>	<i>cytotoxin-associated gen A</i>
CagA	cytotoxin-associated protein A
<i>cag-PAI</i>	<i>cytotoxin-associated gen-Pathogenitätsinsel</i>
CagY	cytotoxin-associated Protein Y
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxiribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ERK	extracellular signal regulated kinase
FCS	fötales Kälberserum
GEBS	Glycerin-EDTA-Bromphenolblau-Sarkosyl-Lösung
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
mAK	monoklonaler Antikörper
MALT	Mukosa-assoziiertes Lymphgewebe
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NF- κ B	nuclear factor- κ B
OD	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
OipA	outer inflammatory protein A
OMP	Familie der <i>outer membran proteins</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

POX	Meerrettichperoxidase
P-Tyr	Phosphotyrosin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHP-2	Tyrosinphosphatase mit SH2 (Src Homologieregion 2)-Domäne
SSM	slipped strand mispairing
Strep	Streptomycin
T4SS	Typ IV-Sekretionssystem
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris (hydroxymethyl)-Aminomethan
VacA	Vakuolisierendes Zytotoxin A
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Einheiten

A	Ampere
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
g	Gramm
kb	kilo-Basenpaare
l	Liter
mM	Millimolar
rpm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
μ g	mikro (10^{-6}) Gramm

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Gabriele Rieder für ihre unermüdliche Geduld und ihr sehr großes Engagement, mich in meiner Arbeit zu unterstützen. Sie war eine wirkliche Doktor – Mutter für mich!

Prof. Rainer Haas möchte ich danken für die Genehmigung und Bereitstellung meines Arbeitsplatzes.

Mein herzlicher Dank gilt besonders auch Tobias Wiedeman für seine geduldige Einweisung in alle angewendeten Labortechniken und für viele wertvolle Anregungen sowie auch Eva Loell für ihre Hilfe und Unterstützung bei meiner Arbeit.

Mein lieber Dank gilt Gabriele (3.OG) für die Erstellung der tollen 2D-Gelelektrophorese-Bilder und natürlich auch für viele schöne Gespräche!

Bei Max bedanke ich mich herzlichst für viele entspannte und immer schöne und unterhaltsame Stunden sowie für seine große Hilfsbereitschaft im Labor.

Danke Stefanie und Stefan sowie Anette und Katja für Eure Unterstützung und ein gutes Arbeitsklima im Labor sowie an Steffi, Claudia, Luisa, Lisa und Wolfgang für stets aufbauende Worte und stete Hilfsbereitschaft bei allen Fragen rund um meine Arbeit.

Danke natürlich auch an Evelyn und Friedericke, dass sie mir immer so offen und herzlich begegnet sind und mir all meine Ängste vor strengen MTAs genommen haben.

Ganz lieben Dank an Frau Atina Haberkern für die präzise Lektorenarbeit und die vielen wertvollen Anregungen.

An dieser Stelle auch herzlichen Dank an das Institut für Biomathematik in Großhadern.

Meiner kleinen Familie, also meinem Sohn Paulo und meinem Freund Florian, danke ich für ihr Verständnis über all die Monate und dass sie immer für mich da sind. Meiner großen Familie, meiner Schwester und meinen Eltern, danke ich für ihren unerschütterlichen Glauben an mich und ihre stete Unterstützung in allen nur erdenklichen Lebenslagen.