

**Bedeutung der *Helicobacter pylori* - induzierten
Cathepsin X-Expression für die Magenkarzinogenese:
Untersuchung am transgenen Mausmodell**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

von Diplom-Biologin Anja Bernhardt

geboren am 19.08.1981 in Herzberg

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. Albert Roessner

2. Prof. Dr. rer. nat. Silja Weßler

eingereicht am: 21.04.2012

verteidigt am: 10.01.2013

WIDMUNG

*Diese Dissertation ist meinem geliebten Cousin **Thomas Höppner** († 29.05.2005) gewidmet, der mir auch noch über die Grenzen des Menschlichen hinaus Liebe, Motivation und Kraft schenkte.*

*... „Es ist vielleicht eine letzte Frucht,
Doch nimmer die erste Blüte,
Was ich aus altem Herzensdrang
In den wenigen Blättern dir biete.“ ... (Fritz Stuhr)*

*Eigentlich verstehen wir uns ohne Worte. Aber heute möchte ich Dir **Kirsten Herrmanns** einmal „**DANKE**“ sagen. Dafür dass du mein Leben reicher machst, weil du es mir ermöglicht hast, an mich zu glauben und für mein eigenes Glück die Verantwortung zu übernehmen.*

Teile dieser Promotionsarbeit wurden bereits wie folgt publiziert:

Originalarbeiten:

Krueger, S., Kuester, D., **Bernhardt, A.**, Wex, T., Roessner, A. (2009) Regulation of cathepsin X overexpression in *H. pylori*-infected gastric epithelial cells and macrophages. *J Pathol.* 217 (4): 581-88.

Bernhardt, A., Kuester, D., Roessner, A., Reinheckel, T., Krueger, S. (2010) Cathepsin X-deficient gastric epithelial cells in co-culture with macrophages: characterization of cytokine response and migration capability after *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem.* 285 (44): 691-700.

Abstracts and Posters:

Bernhardt, A., Kuester, D., Adam, J., Wilsnack, J., Backert, S., Reinheckel, T., Roessner, A., Krueger, S. Activation of cathepsins X and B in a murine model of *H. pylori*-gastritis. 93. Jahrestagung der DGP in Freiburg 2009.

Krueger, S., Kuester, D., **Bernhardt, A.**, Wex, T., Roessner, A. Regulation of cathepsin X overexpression in *H. pylori*-infected gastric epithelial cells and macrophages. 93. Jahrestagung der DGP in Freiburg 2009.

Bernhardt, A., Kuester, D., Roessner, A., Krueger, S. Primary mouse epithelial cells of *CTSX*^{-/-} mice in co-culture with macrophages to examine the functional properties of cathepsin X over-expression in gastric carcinogenesis. 94. Jahrestagung der DGP in Berlin 2010.

Vortrag:

Bernhardt, A., Kuester, D., Roessner, A., Krueger, S. Characterization of epithelial transdifferentiation in a transgenic gastric cancer model by laser capture microdissection combined with gene expression profiling. 95. Jahrestagung der DGP in Leipzig 2011.

INHALTSVERZEICHNIS

I	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
II	TABELLENVERZEICHNIS	I
III	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Bakterium <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>)	1
1.2	Epidemiologie, Pathogenese und <i>H. pylori</i>-assoziierte Krankheiten	2
1.3	Bakterielle Virulenzfaktoren und Induktion von intrazellulären Signaltransduktionswegen.....	3
1.4	Infektionsablauf und klinische Relevanz	5
1.5	Proteasen in der <i>H. pylori</i>-induzierten Magenkarzinogenese	7
1.6	Cathepsine.....	7
1.6.1	Cathepsin X: Struktur, Aktivität und biologische Funktion	9
1.6.2	Cathepsin X in der Magenkarzinogenese	10
2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	12
3	MATERIAL UND METHODEN.....	14
3.1	Materialien.....	14
3.1.1	Chemikalien.....	14
3.1.2	Sonstige Labormaterialien	14
3.1.3	Geräte.....	16
3.1.4	Kitsysteme	17
3.1.5	Marker und Standards.....	17
3.1.6	Puffer, Lösungen und Reagenzien	18
3.1.7	Antibiotika	19
3.1.8	Antikörper.....	19
3.1.9	Enzyme	19
3.1.10	Oligonukleotide	20
3.1.11	Membranen	21
3.1.12	Datenbanken	21
3.1.13	Computerprogramme.....	21

3.2	Verwendete Organismen.....	22
3.2.1	<i>H. pylori</i> Stamm.....	22
3.2.2	Nährmedium für <i>H. pylori</i>	22
3.2.3	Kultivierung von <i>H. pylori</i>	23
3.2.4	Mausstämme	24
3.3	Methoden	25
3.3.1	Maushaltung	25
3.3.2	Orale Infektion der Mäuse mit <i>H. pylori</i>	25
3.3.3	Präparation von Gewebe aus der Maus	26
3.3.4	Zellkultur	27
3.3.5	Isolierung und Kultivierung von primären Epithelzellen	28
3.3.6	Infektion der Zelllinien mit <i>H. pylori</i>	29
3.3.7	Infektion im Transwell®-System	30
3.3.8	Bestimmung der Kolonie-bildenden-Einheiten (<i>cfu</i>)	31
3.3.9	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen.....	32
3.3.10	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe.....	32
3.3.11	RNA-Konzentrationsbestimmung	33
3.3.12	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription	33
3.3.13	Quantitative Real-Time-PCR am <i>LightCycler</i>	34
3.3.14	Agarose-Gelelektrophorese	36
3.3.15	Zelluläre Interaktionen in Kultur-Inserts	36
3.3.16	Oligo GEArray Mikroarray-Analyse.....	37
3.3.17	Proteinextraktion	38
3.3.18	Proteinbestimmung nach Lowry.....	39
3.3.19	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	39
3.3.20	Chemilumineszenz-Detektion	39
3.3.21	Herstellung von Gefrierschnitten und Vorbereitung auf Laser-Mikrodissektion ..	41
3.3.21.1	Kryokonservierte Schnitte	41
3.3.21.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gefrierschnitten	42
3.3.21.3	Cresyl-Violet-Färbung von Gefrierschnitten	42
3.3.21.4	Laser-Mikrodissektion.....	43
3.3.21.5	Isolierung von Gesamt-RNA aus mikrodissezierten Gewebeschnitten.....	44
3.3.21.6	RT ² Nano PreAmp cDNA Synthese	45
3.3.21.7	Real-Time-PCR mit dem RT ² Cytoskeleton Regulators PCR Array.....	47
3.3.22	Statistik	48
4	ERGEBNISSE	50
4.1	Etablierung eines <i>ex vivo</i> -Modells zum Studium der Interaktion zwischen <i>H. pylori</i> und primären Mageneithelzellen.....	50
4.2	<i>H. pylori</i> -induzierte Aktivierung von CTSX in primären Epithelzellen.....	51
4.3	Quantitative Bestimmung der bakteriellen Kolonisation der primären Epithelzelllinien.....	52
4.4	Expression von Cathepsinen - Vergleich der Situation <i>in vivo</i> und Modell <i>in vitro</i>	53

INHALTSVERZEICHNIS

4.5	Induktion von proinflammatorischen Zytokinen in Mono- und Ko-Kulturen nach <i>H. pylori</i> -Infektion.....	55	
4.6	Analyse von Genen der adaptiven Immunabwehr in WT- und <i>ctsx</i> ^{-/-} -primären Epithelzellen nach Ko-Kultur mit <i>H. pylori</i> SS1.....	60	
4.7	Morphologische Veränderungen und Zelluläre Interaktion zwischen den primären Epithelzellen und den Makrophagen.....	62	
4.8	Expression von <i>MIF-1</i> in WT- und <i>ctsx</i> ^{-/-} -Epithelzellen ko-kultiviert mit Makrophagen.....	65	
Kombination von Laser-Mikrodissektion und Mikroarray-Analyse zur Identifizierung von spezifischen Regulatoren des Zytoskeletts und der epithelialen mesenchymalen Transition			66
4.9	Laser-unterstützte Mikrodissektion	66	
4.10	Gefrierschnitte von Mäusemägen.....	67	
4.11	Analyse der Genexpressionsprofile aus verschiedenen Magenzellbereichen von WT- und <i>ctsx</i> ^{-/-} -Mäusen	70	
4.12	Genexpression und Gen-Clusteranalysen in WT- und CTSX-defizienten Mäusen.....	71	
5	DISKUSSION.....	78	
5.1	Suche nach dem geeigneten Mausmagen- <i>H. pylori</i> -Infektionsmodell <i>in vitro</i>	78	
5.2	Expression von verschiedenen Cathepsinen im gesamten Magen der Maus im Vergleich zu den primären Epithelzellen.....	80	
5.3	<i>H. pylori</i> -induzierte Expression von Zytokinen/Chemokinen in ko-kultivierten Makrophagen und Epithelzellen.....	81	
5.4	Untersuchung der Zytokinsekretion an Makrophagen-Kulturen.....	83	
5.5	Differentiell exprimierte Gene der adaptiven Immunabwehr in WT- und <i>ctsx</i> ^{-/-} - Epithelzellen nach <i>H. pylori</i> -Infektion	84	
5.6	CTSX beeinflusst die Migration von Makrophagen in Konfrontations-Zellkulturen	86	
5.7	Expression von MIF-1 in den <i>ctsx</i> ^{-/-} -Epithelzellen.....	87	
5.8	Charakterisierung der epithelialen Transdifferenzierung in einem transgenen Magenkarzinommodell durch Laser-Mikrodissektion kombiniert mit Genexpressionsprofilen	88	
5.9	Laser-unterstützte Mikrodissektion mit nachfolgender Genexpressionsanalyse... ..	89	
5.10	Wahl der effizientesten Färbemethode	90	
5.11	Einfluss der CTSX-Defizienz auf regulatorische Faktoren der gastralen Entzündungsantwort während der <i>H. pylori</i> -Infektion.....	91	
6	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	97	
7	LITERATURVERZEICHNIS	101	
8	ANHANG.....	132	

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG	142
LEBENS LAUF	144
ERKLÄRUNG	145

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer Demenz
AK	Antikörper
Amp	Amplifikation
Arp2/3	<i>adaptor-related protein complex 2/3</i>
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
Aurkc	<i>aurora kinase C</i>
BabA	Adhäsion
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bp	Basenpaar
CagA	<i>cytotoxin-associated gene A</i>
CaMKII	Ca ⁺⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cAMP-PK	cAMP-abhängige Proteinkinase
CAP-GLY	<i>cytoskeleton-associated proteins-Glycine</i>
Ccna1	Cyclin A1
ccnd3	Cyclin D3
CCR2	<i>short for chemokine (C-C motif) receptor 2</i>
CD81	<i>cluster of differentiation molecule 81</i>
Cdc42ep3	<i>cdc42 effector protein</i>
cdkn1α	<i>cycline-dependent kinase inhibitor 1a</i>
Cdk5r1	<i>cycline-dependent kinase 5</i>
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
cfu	Kolonie-bildende-Einheit (<i>colony forming unit</i>)
CK20	Zytokeratin 20
Clip	<i>cap-gly domain containing linker protein</i>
Csk	<i>c-src tyrosine kinase</i>
CTS	Cathepsin
CXCL1	<i>C-X-C-motif ligand 1</i>
Cyfp2	<i>cytoplasmic fragile-X mental retardation interacting protein</i>
dH ₂ O	deionisiertes Wasser (Milli-Q-Anlage)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DMEM	<i>Dulbecco`s modified eagle`s media</i>
DPBS	<i>Dulbecco`s phosphate buffered saline</i>
DTT	Dithiothreitol
EC	<i>Enzyme Committee</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>

EMT	Epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung
ERK	<i>extracellular regulated kinase</i>
FAM5C	<i>family with sequence similarity 5, member C</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FFPE	Formalin-fixiertes-Paraffin-eingebettetes
FlaA,B	Flagellin A,B
gadd45g	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma</i>
GBD	GTPase-Bindedomäne
glmn	Glomulin, <i>FKBP associated protein</i>
HB-EGF	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HCl	Salzsäure
hmgb3	<i>High-mobility group protein B3</i>
<i>H. p./H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IFN- γ	Interferon gamma
inpp5d	<i>inositol polyphosphate-5-phosphatase</i>
IL	Interleukin
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
IVC	individuell ventilierte Käfige
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilo-Dalton
KK	Ko-Kultur
LCM	Laser-Mikrodissektion (<i>laser capture microdissection</i>)
LFA-1	<i>lymphocyte function associated antigen-1</i>
MALT	<i>mucosa associated lymphoid tissue</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
Mapt	<i>microtubule-associated protein tau</i>
MAC-1	<i>macrophage-1 antigen</i>
MCP	<i>monocyte chemotactic protein</i>
MDCK	<i>madin-derby canine cells</i>
MEK	MAPK/ERK-Kinase
MEROPS	<i>database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors</i>
MEZ	mitteleuropäische Zeit
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MMTV-PyMT	<i>mouse mammary tumor virus-polyoma middle T antigen</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger/Boten-RNA</i>
MUC-5AC	Mucin-5AC
MW	Mittelwert
Mylk	<i>myosin light chain kinase</i>
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NF- κ B	<i>nuclear factor-kappaB</i>
NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i>
NO	Stickstoffmonoxid

N-Terminus	aminoterminales Ende
p	Wahrscheinlichkeit
p38	Protein 38
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
PAR1/MAR	<i>protease-activated receptor/microtubule affinity-regulated</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEN	Polyethylenaphthalat
pE	primäre Epithelzellen
PLC	Phospholipase
Ppp1r12	<i>protein phosphatase 1 regulatory subunit 12</i>
PP2A	<i>phospho-serine/threonine phosphatase</i>
prkcd	Protein kinase C delta type
qPCR	quantitative Real-Time-PCR
Rac1	Ras-ähnliches G-Protein
Rho	<i>Ras-homology</i>
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>rotation per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
RQ	relative Quantifizierung/Expressionsunterschied
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2, SH3	<i>src domain</i>
SHP-2	<i>tyrosine-protein phosphatase</i>
SPF	spezifisch pathogenfrei
spp1	Osteopontin
Src	<i>rous sarcoma oncogene</i>
SRR	<i>side reaction reducer</i>
Tab.	Tabelle
T4SS	Typ-4-Sekretionssystem
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween20
TcdBF	Tetrachlorodibenzofuran
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THP-1	permanente monozytäre Leukämie-Zelllinie
Tm	Schmelztemperatur
TM4SF	tetra-transmembranhelix-Molekül
TNF	Tumornekrosefaktor
ToxB	Toxin B
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
ÜN	über Nacht
uPA	Urokinase Plasminogen Aktivator
UreA/B	UreaseA/B

VacA	vakuolisierendes Zytotoxin A
Vol	Volumen
WASP	Wiskott-Aldrich- <i>syndrome protein</i>
WAVE	<i>WASP-family verprolin-homologous protein</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
ZO-1	<i>Zonula Occludens-1</i>

Der Begriff „Expression“ wird in dieser Schrift sowohl authentisch (Expression von Genen), als auch für die Menge an Expressionsprodukt (Proteinmenge) verwendet. Außerdem wurden gebräuchlich allgemeine Begriffe nicht explizit gelistet. Englische Begriffe, für die kein deutsches Äquivalent existiert, wurden kursiv geschrieben und zusammengehörende Wörter durch Bindestriche kenntliche gemacht.

II. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Synthetisierte Primer der verwendeten Gene der Maus.	20
Tab. 2: Reagenzien, für die Proteinextraktion und Proteinanalyse.....	40
Tab. 3: Zusammensetzungen der Gele.....	41
Tab. 4: Expressionsprofil von Genen der adaptiven Immunabwehr.....	62
Tab. 5: Überblick über die mikrodisssezierten Zellbereiche der Magenschleimhaut.	71
Tab. 6: Relative Quantifizierung (RQ) relevanter Kandidatengene	72
Tab. 7: Zusammenfassende Darstellung der relativen Quantifizierung (RQ) aller 84 Gene in WT-Mäusen.....	132
Tab. 8: Zusammenfassende Darstellung der relativen Quantifizierung (RQ) aller 84 Gene in <i>ctsx</i> ^{-/-} -Mäusen	137

III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>H. pylori</i>	1
Abb. 2: Verteilung der Infektionsraten der Weltbevölkerung mit <i>H. pylori</i>	2
Abb. 3: Schematische Darstellung über den CagA-vermittelten Typ-4-Sekretionsweg	5
Abb. 4: Struktur des humanen CATX.....	10
Abb. 5: Orale Infektion mit <i>H. pylori</i> SS1 einer C57BL6/N Maus.....	26
Abb. 6: Isolierung und Kultivierung der primären Epithelzellen.....	29
Abb. 7: Infektion der primären Epithelzellen.....	30
Abb. 8: Querschnitt eines Transwell®-chambers.....	31
Abb. 9: Infektionsexperiment.....	31
Abb. 10: Zelluläre Interaktion in Kultur-Inserts (www.Ibidi.com)	37
Abb. 11: Prinzip der Laser-Mikrodissektion.	44
Abb. 12: Phasenkontrastaufnahmen in 100-facher Vergrößerung der primären Epithelzellen und der CLS103-Zelllinie.	51
Abb. 13: <i>H. pylori</i> -induzierte Aktivierung von CTSX in Magenepithelzellen <i>ex vivo</i>	52
Abb. 14: Quantitative Kultur zur Bestimmung der bakteriellen Kolonisation.....	53
Abb. 15: Expression von CTSX/B/L/K im kompletten Magengewebe und in isolierten primären Epithelzellen.	54
Abb. 16: Infektionsexperiment von Mono-Kulturen.....	55
Abb. 17: Infektionsexperiment von Ko-Kulturen mittels Transwell®-Filtersystem.....	56
Abb. 18: Induktion von proinflammatorischen Zytokinen in Mono- und Ko-Kulturen nach <i>H. pylori</i> -Infektion.	58
Abb. 19: Induktion von proinflammatorischen Zytokinen in ko-kultivierten Makrophagen nach <i>H. pylori</i> -Infektion.....	60
Abb. 20: Zelluläre Interaktion in Konfrontations-Zellkulturen.....	64
Abb. 21: Expression von <i>MIF-1</i> in Epithelzellen ko-kultiviert mit Makrophagen (J774A.1).	65
Abb. 22: Übersichtsaufnahme der Gewebeschnitte.....	68
Abb. 23: Übersichtsaufnahme von SPEM-Gewebeschnitten.....	68
Abb. 24: Vorgehensweise der lasergestützten Mikrodissektion.	69

Abb. 25: Gen-Clusteranalyse von verschiedenen WT-Mukosazellbereichen.	76
Abb. 26: Gen-Clusteranalyse von verschiedenen <i>ctsx</i> ^{-/-} -Mukosazellbereichen.....	77

1 EINLEITUNG

1.1 Das Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

H. pylori ist ein gram-negatives, mikroaerophiles, spiralförmiges Bakterium, welches die Magenschleimhaut im Bereich der Antrum- und Corpus-Region besiedelt ^{1,2,3}. Die Entdeckung bzw. Kultivierung des Keims im Jahre 1982 durch Robin Warren und Barry Marshall war eher durch einen Zufall geprägt ⁴. Aufgrund der Ähnlichkeit zu *Campylobacter*, wurden die *H. pylori* zunächst nach den Kulturbedingungen der *Campylobacter* angezogen ⁵. In weiteren Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass sich die Morphologie und die molekularen und biochemischen Eigenschaften von *H. pylori* den *Campylobacter* unterscheidet ^{6,7,8}, woraufhin *H. pylori* im Jahre 1989 als eine eigenständige Gattung postuliert wurde ⁹. Biochemisch zeichnet sich *H. pylori* primär durch seine Ureaseaktivität aus, die ihm das Überleben im sauren Milieu (pH 1,4) des Magens ermöglicht ^{10,11}. Das Enzym Urease, ein cytosolisches Ni²⁺-haltiges Enzym, besteht aus zwei Untereinheiten (UreA und UreB) und stellt einen essentiellen Faktor für die Pathogenität von *H. pylori* dar ¹². Da jedoch *H. pylori* nur für kurze Zeit bei niedrigen pH-Werten des Magens überleben kann ¹³, dringt es mit Hilfe seiner unipolaren Flagellen in die bicarbonatgepufferte Schleimschicht der Magenmukosa ein ¹⁴.

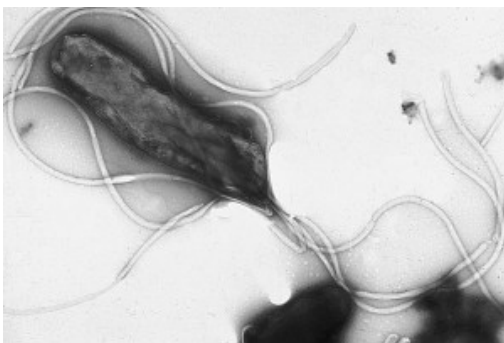


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. pylori*,
© Yutaka Tsutsumi, Fujita Health University School of
Medicine

H. pylori besitzt fünf bis sechs dieser Geißeln (Flagellen), welche jeweils aus zwei strukturellen Untereinheiten (Flagellinproteinen), FlaA (53 kDa) und FlaB (54 kDa) bestehen

^{15,16,17}. Damit ist es dem *H. pylori* möglich, sich aktiv fortzubewegen ¹⁸ und sich in dem vor Säureeinwirkung geschützten viskosen Mukus der Epithelschicht zuzuwenden. Im direkten Kontakt mit der Epitheloberfläche kann der Keim auf unterschiedlichste Weise eine direkte und indirekte Schädigung der Magenschleimhaut verursachen ^{19,20,21,22}. Die Infektion mit dem Keim ist heute eine der häufigsten humanen Infektionskrankheiten mit teils lebensbedrohlichen Folgeerkrankungen. Obwohl *H. pylori*, seit der ersten Anzucht bzw. Kultivierung 1983 aus Magenbiopsien, einer der am gründlichsten untersuchten bakteriellen Krankheitserreger ist, sind viele wesentliche Details des Infektions- und des Krankheitsverlaufes nach wie vor noch nicht ausreichend geklärt ⁵.

1.2 Epidemiologie, Pathogenese und *H. pylori*-assoziierte Krankheiten

H. pylori ist ein weltweit verbreiteter Keim. Etwa 50 % aller Menschen sind mit *H. pylori* infiziert, wobei sich sowohl innerhalb als auch zwischen verschiedenen Ländern große Unterschiede zeigen ^{23,197,198}. In den Industrieländern liegt die Prävalenz bei 20-50 %, während in den Entwicklungsländern über 90 % der Bevölkerung mit *H. pylori* infiziert sind (Abb. 2) ^{24,25,26,27,28}.

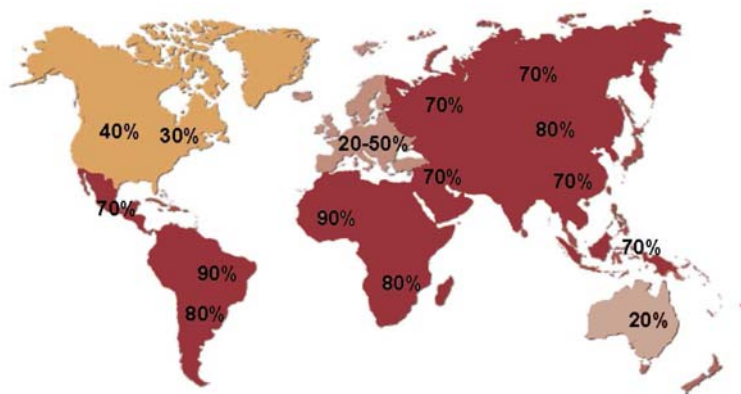


Abb.2: Verteilung der Infektionsraten der Weltbevölkerung mit *H. pylori* (nach www.helico.com).

Für die Inzidenz einer Infektion spielen die geographische Region und der sozioökonomische Status eine wichtige Rolle ^{29,30,31}. Die Rate der Infizierten steigt mit dem Alter der untersuchten Populationsschicht deutlich an, wobei die Infektion meist schon im Kindesalter innerhalb der Familie auf oral-oralem oder fäkal-oralem Weg stattfindet ^{32,33,34,35,36}. In 90 %

der Fälle verläuft eine Infektion mit *H. pylori* symptomlos und kann ohne entsprechende Behandlung jahrzehnte- bis lebenslang im Magen persistieren³⁷. Eine bakterielle Kolonisierung des Magens kann aber auch mit der Entstehung schwerer gastrointestinaler Krankheiten gekoppelt sein^{25,37,38}. Als Folge einer chronischen Entzündung entstehen im Laufe der Jahre Krankheiten wie Ulcerationen, Magenkarzinome^{39,40,41} oder MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*)-Lymphome^{42,43,44,45,46}. Des Weiteren induziert die Infektion mit *H. pylori* eine direkte DNA-Schädigung der Wirtszelle⁴⁷, sowie Apoptose aber auch Proliferation der Wirtszellen^{48,49}. Folgerichtig wurde *H. pylori* im Jahre 1994 von der *World Health Organisation* (WHO) als Karzinogen der Gruppe I eingestuft⁵⁰.

Die Schwere der Erkrankung hängt von den genetischen Wirtsfaktoren, Umwelteinflüssen und vor allem von den Pathogenitätsfaktoren des Bakteriums ab. Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori* wie die *cag*-Pathogenitätsinsel (-PAI) mit dem translozierten Protein Zytotoxin assoziiertes Gen A (CagA), das vakuolisierende Zytotoxin (VacA) sowie das Adhäsins (BabA) sind dabei signifikant mit der Ausbildung einer atrophischen Gastritis verknüpft.

1.3 Bakterielle Virulenzfaktoren und Induktion von intrazellulären Signaltransduktionswegen

Ein Virulenzfaktor von *H. pylori* ist das vakuolisierende Zytotoxin-A (*vacuolating toxin A*, VacA), ein 87 kDa schweres Protein, welches vom Gen *vacA* kodiert wird. Das *vacA*-Gen ist in nahezu allen *H. pylori* Stämmen vorhanden, dennoch zeigen nur etwa 50 % der *H. pylori* Stämme eine vakuolisierende Aktivität^{51,52}. Diesem Phänomen liegen Sequenzpolymorphismen zugrunde, aufgrund derer sich verschiedene VacA-Allele unterscheiden lassen⁵³. Dieser VacA-Polymorphismus zeigt sich in zwei verschiedenen Signalsequenzen (s1 und s2) sowie in zwei verschiedenen Mittelregionen (m1 und m2). *H. pylori* Stämme, die die Kombination s1/m1 besitzen, sezernieren größere Mengen an VacA als s1/m2-Stämme. Die Varianten s2/m1 und s2/m2 werden nicht sezerniert und Stämme mit diesen Genotypen zeigen demzufolge auch keine messbare VacA-Aktivität⁵³. Damit werden *H. pylori* Stämme in hochpathogene Typ-I- und weniger pathogene Typ-II-Stämme unterteilt⁵⁴, wobei die Typ-II-Stämme kein VacA exprimieren und damit weniger virulent sind als die

Typ-I-Stämme⁵⁴. *H. pylori*-Genotypen mit starker vakuolisierender Aktivität (s1m1VacA) sind meist mit der Anwesenheit des *cagA*-Gens assoziiert⁵⁵. Nachfolgende Untersuchungen konnten das *cagA*-Gen als Bestandteil einer Pathogenitätsinsel (-PAI) identifizieren⁵⁶. *H. pylori* Stämme vom Typ-II besitzen keine Pathogenitätsinsel mit CagA als Effektorprotein und wirken nur schwach vakuolisierend^{52,57}. Demnach korrelieren *cagA*/s1m1vacA-positive Stämme mit schweren Krankheitsverläufen und dem Auftreten schwerwiegender Folgeerkrankungen wie Ulcus oder Magenkarzinome^{58,59}. *H. pylori* Stämme vom Typ-I tragen die *cag*-PAI, die für ein Typ-4-Sekretionssystem (T4SS) kodiert⁶⁰, welches die Injektion des CagA-Effektorproteins (130-170 kDa) in die Wirtszellen transloziert⁶¹. Dieses interagiert in der Zielzelle mit diversen Wirtsproteinen und beeinflusst verschiedene Signaltransduktionswege, das Zytoskelett und die Funktion von Proteinen der zellulären *tight junctions* wie dem Gerüstprotein ZO-1 und dem Transmembranprotein JAM (*junctional adhesion molecules*) (Abb. 3)^{62,63}, was zum Aufbrechen der Barrierefunktion des Magenepithels *in vivo* führt. Des Weiteren phosphorylieren die Src-Kinasen (c-Src) das intrazelluläre CagA⁶⁴, welches dann mit weiteren Wirtsproteinen interagieren kann^{65,66}. Phosphoryliertes CagA beispielsweise interagiert mit SHP-2, was zu einer anormalen Aktivität des *bona fide* Oncoproteins führt⁶⁷, dies wiederum resultiert in der Ausbildung des charakteristischen *hummingbird*-Phänotyps und der verstärkten Zellmigration⁶⁸. Das durch CagA aktivierte SHP-2 moduliert über die Interaktionen mit dem c-Met Rezeptor und der Phospholipase C die Regulationsnetzwerke der Signaltransduktion⁶⁹, dies resultiert in der Modifikation zellulärer Elongation und Motilität. Phosphoryliertes CagA ist aber auch in der Lage, c-Src direkt oder indirekt über die Aktivierung von Csk zu blockieren. Dies führt wiederum zur Dephosphorylierung von Ezrin und Cortaktin mit Auswirkung auf die Organisation des Aktin-Zytoskeletts⁷⁰. Selbst die NF-κB-abhängige Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-8, lange als CagA-unabhängiger Vorgang beschrieben, wurde mittlerweile als CagA-abhängiger Vorgang postuliert^{71,72,73,74,75,76,77}.

Die Entstehung der chronischen Gastritis ist durch die vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel dem IL-8, gekennzeichnet. IL-8 induziert eine Infiltration der Magenmukosa mit Entzündungszellen wie den neutrophilen Granulozyten und Monozyten⁷⁸. Des Weiteren resultiert die Infektion von gastrischen Epithelzellen mit

cag-PAI⁺-*H. pylori* Stämmen in einer Aktivierung der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK1/2, sowie den Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1^{79,80,81}.

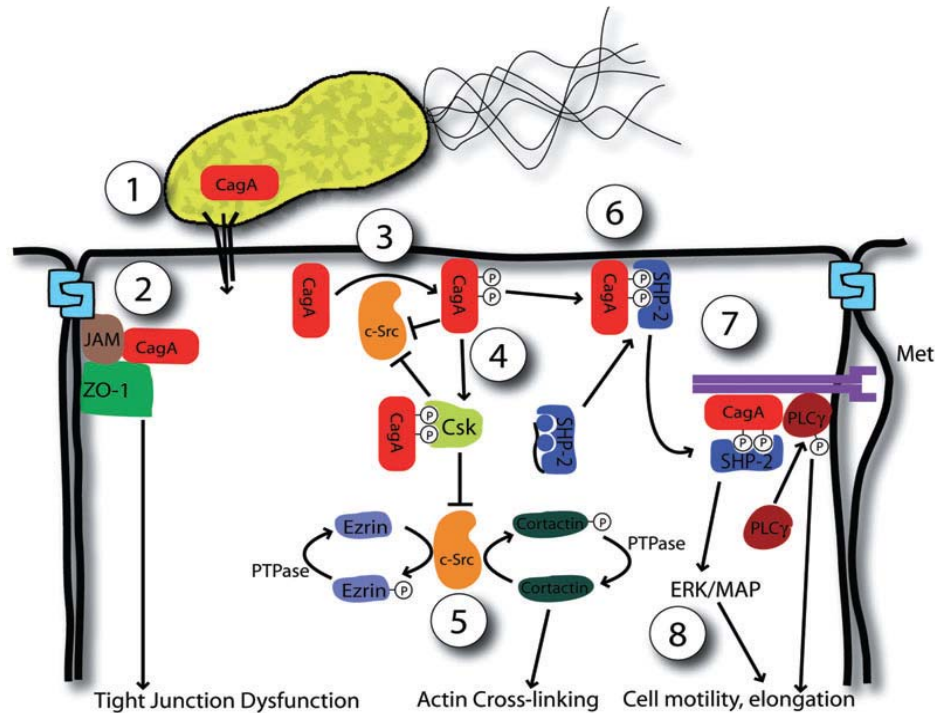


Abb. 3: Schematische Darstellung über den CagA-vermittelten Typ-4-Sekretionsweg.

(1) CagA wird über das T4SS in die Zelle eingeschleust. (2) CagA assoziiert unabhängig von seiner Tyrosinphosphorylierung mit den *tight junction*-Proteinen JAM und ZO-1. (3) Die Src-Tyrosinkinase phosphoryliert CagA an den EPIYA-Seiten. (4) Phosphoryliertes CagA bindet die C-terminale Src-Kinase (Csk), wobei das Src über einen negativen Rückkopplungsmechanismus gehemmt wird. (5) Die Hemmung von c-Src führt zur Dephosphorylierung der zellulären Proteine Cortactin und Ezrin, was zu einer Veränderung der Zellmorphologie und der Beweglichkeit führt. (6) Phosphoryliertes CagA aktiviert das zelluläre SHP-2 über die SH2 Domäne. (7) Der CagA/SHP-2-Komplex interagiert mit dem c-Met-Rezeptor und PLC γ . (8) Das aktivierte SHP-2 stimuliert den ERK/MAPK-Signalweg. Die Aktivierung von SHP-2, c-Met und ERK ist für den CagA-induzierten Elongationstyp und die Zellbewegung erforderlich⁶³.

1.4 Infektionsablauf und klinische Relevanz

Nachdem *H. pylori* auf oralem Weg aufgenommen wurde, findet eine chemotaktische Orientierung des *H. pylori* in Richtung Magenoberfläche statt, gefolgt vom Eindringen in die Mukusschicht und der Kolonisation an das Mukosaepithel. Da eine Heilung, wegen der Fähigkeit des Keims lebenslang im Magen zu persistieren, nicht stattfindet, entwickelt sich im

Verlauf eine chronisch aktive Oberflächengastritis mit einer zusätzlichen Einwanderung von T- und B-Lymphozyten, Monozyten und eosinophilen Granulozyten in der *Lamina propria* der Magenschleimhaut⁸². Diese Erkrankung beginnt meist im präpylorischen antralen Mukosabereich, aber auch in der Corpusregion und kann sich im Laufe der Zeit nach proximal ausbreiten. Infolge der anhaltenden Schleimhautschädigung kann auch ein peptischer Duodenalulkus oder ein Malignom entstehen^{18,83}. Im Rahmen der chronischen Entzündung ist eine umfassende Immunantwort, sowohl des angeborenen als auch erworbenen Immunsystems die Folge. Nach einer starken Infiltration von Granulozyten und Monozyten (nicht-atrophische, aktive Gastritis) in die Magenmukosa⁸⁴, produzieren die Epithelzellen proinflammatorische Zytokine wie IL-8, IL-1 β und den Tumornekrosefaktor (TNF)- α , welche wiederum die Zellen des Immunsystems anlocken⁸⁵. Im Fall einer „normalen“ Infektion wird der Erreger durch Phagozytose und Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen (\bullet OH) und NO beseitigt. *H. pylori* hat jedoch verschiedene Mechanismen entwickelt, der Reaktion des angeborenen Immunsystems zu entkommen. Zur enzymatischen Beseitigung der reaktiven Sauerstoffverbindung bedient er sich der Produktion von Katalase und der Superoxid-Dismutase⁸⁶. Außerdem wird das im oberen Teil der Arbeit beschriebene VacA zur Hemmung der Phagosomen-Reifung produziert, was das Abtöten phagozytierter Zellen durch Makrophagen verhindert^{87,88}. Im späteren Verlauf einer Infektion werden Zellen des adaptiven Immunsystems zur Infektion rekrutiert. Histologische Untersuchungen humaner Magenbiopsien haben gezeigt, dass bei einer Infektion mit *H. pylori* vor allem CD4⁺-T-Lymphozyten dominieren^{89,90}. Dabei stimuliert das freigesetzte IL-12 die Aktivität der natürlichen Killerzellen und die Differenzierung von CD4⁺-T-Lymphozyten zu T_H-Zellen. *H. pylori*-spezifische CD4⁺-T-Lymphozyten aus Biopsien entsprechen somit aufgrund der gebildeten Zytokine (IL-12, IFN- γ , TNF- α) dem Subtyp T_H1. Im weiteren Verlauf der chronischen Entzündung kommt es zu intestinalen Metaplasien und zu Dysplasien. Die beiden morphologischen Veränderungen der Magenmukosa zeichnen sich durch ein Auflösen der Epithelgrenzen, Verlust von Drüsen und säureproduzierender Parietalzellen sowie Infiltration von Immunzellen der Submukosa aus, woraufhin es im weiteren Verlauf zur Bildung von Adenokarzinomen kommen kann^{91,92}.

1.5 Proteasen in der *H. pylori*-induzierten Magenkarzinogenese

Bekannt ist, dass am Wachstum eines Tumors proteolytische Enzyme maßgeblich beteiligt sind, welche die Fähigkeit besitzen, Proteine der extrazellulären Matrix und auch der Basalmembran zu degradieren und somit viele physiologische aber auch pathologische Mechanismen zu beeinflussen⁹³. Die extrazelluläre Matrix besteht aus Proteoglykanen, Glukosaminoglykanen, Kollagen I bis V, Glykoproteinen wie dem Laminin, Fibronectin, Vitronectin oder Thrombospondin und Elastin⁹⁴. Für deren Überwindung spielen Peptidasen wie die Threonin-, Cystein- (z.B. Cathepsine B, D, L), Aspartat- und Serinproteasen (z.B. Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA), Thrombin) sowie Matrixmetalloproteasen (MMPs) eine essentielle Rolle⁹⁵. Diese Enzyme werden von den Tumorzellen selbst, aber auch von Fibroblasten, den Entzündungszellen oder den endothelialen Zellen, welche den Tumor umgeben, synthetisiert und sind ihrerseits in der Lage, die Basalmembran zu degradieren und somit das Wandern und Ausbreiten der Tumorzellen zu erleichtern. Der Umbau von EZM-Bestandteilen und die Prozessierung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen sind aber nicht nur für invasive Prozesse bei Tumoren entscheidend, sondern auch für das Einwandern von Entzündungszellen unerlässlich. Während also mehrere Arbeiten die Expression von Proteasen im Magenkarzinom beschreiben^{96,97}, gab es lange Zeit keine Daten zur Beteiligung von Proteasen bei der Entstehung von Gastriden und premalignen Vorerkrankungen^{98,99,100}. Im Ulkuserkrankungsgewebe fand sich eine signifikant höhere Konzentration von aktiven MMP-1 als in gesunder Mukosa^{101,102}. Im Jahre 2003 belegten dann vier Arbeiten einen Zusammenhang zwischen der *H. pylori*-Stimulation, der Expression von MMP's und der Gewebedestruktion bei Gastritiden und Ulkuserkrankungen^{103,104,105,106}. Zur Expression von Cysteinproteasen bei entzündlichen Magenerkrankungen war noch weniger bekannt^{107,108}.

1.6 Cathepsine

Bei den Cysteinproteasen handelt es sich um Proteasen, die vorrangig in Lysosomen lokalisiert sind und dort Proteine und Peptide spalten und abbauen¹⁰⁹. Die humanen lysosomalen Cysteinproteasen sind die sogenannten Cathepsine, wobei der Begriff Cathepsin

aus dem Griechischen $\kappa\alpha\theta\epsilon\psi\epsilon\iota\nu$ (verdauen) kommt und erstmalig 1929 von Willstätter und Bamann beschrieben wurde ¹¹⁰. Die Cathepsine bilden eine große Gruppe ubiquitär vorkommender Enzyme ¹¹¹ von denen bisher 11 Vertreter (Cathepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, W und X) im humanen Organismus beschrieben wurden ^{112,113,114,115}. Die meisten Cathepsine sind relativ kleine Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 35 kDa und zeigen alle einen ähnlichen Aufbau, bestehend aus einem Signalpeptid, einem Propeptid und der katalytischen Domäne ¹¹⁶. Dabei werden die Cathepsine als prä-Proenzyme exprimiert und mit Hilfe des Signalpeptids über den Mannose-6-Phosphat-Weg durch die ER-Membran zu den Lysosomen transportiert ^{117,118}, wo sie durch Abspaltung des Propeptids aktiviert werden ^{119,120}. Zahlreiche Studien über Struktur, Synthese, Aktivierung und Vorkommen sowie Funktion von Cathepsinen bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen wurden bereits veröffentlicht ^{121,122,123}. Neben der Beteiligung an physiologischen Prozessen sind es aber vor allem die degenerativen, entzündlichen Tumorerkrankungen, die mit Cathepsinen in Zusammenhang gebracht worden sind ^{124,125}. Eine Beteiligung von Cathepsinen wurde z.B. bei der Pankreatitis, Parodontose ¹²⁶, Glomerulonephritis und der rheumatoiden Arthritis ^{127,128} sowie der multiplen Sklerose ¹²⁹ nachgewiesen. Des Weiteren wurden erhöhte Expressionswerte von Cathepsin B, H und L in Tumorgewebe von Brust-, Magen-Darm-, Kopf-Hals-, Lungen-, Kolorektal- und Hautkrebs nachgewiesen ¹¹². CTSB ist nachweislich auch an der Metastasierungskaskade diverser Tumore beteiligt ^{130,131,132}. Cathepsine sind nicht nur direkt am Abbau der EZM beteiligt, sondern auch indirekt, indem sie andere Proteine oder Proteasen aktivieren. Kaskadenartig aktivieren die Cathepsine B und L den Pro-uPA (Urokinasetyp-Plasminogen Aktivator) ^{133,134} und verstärken damit die Proteolyse und die Aktivität weiterer Proteasen, z.B. Plasminogen und Matrixmetalloproteasen (MMPs) ¹³⁵.

Da den Cathepsinen ein diagnostisches und therapeutisches Potenzial in der Karzinogenese zugesprochen wird ¹³⁶, sind Regulations- und Funktionsanalysen spezifischer Proteasen von großer Bedeutung. Ein wichtiger Beitrag hierzu wurde in den letzten Jahren durch die Generierung von Cathepsin-*knock-out*-Mäusen geleistet. Dies zeigte neue individuelle physiologische und pathologische Funktionen von spezifischen Cathepsinen auf. CTSB-defiziente Mäuse zeigten beispielsweise in einem Brustkrebsmodell eine verzögerte Bildung

der Primärtumoren und eine reduzierte Metastasenbildung in der Lunge¹³⁷. CTSB- und L-*double-knock-out*-Mäuse starben sogar kurze Zeit nach der Geburt aufgrund schwerer Hirnatrophien¹³⁸. Auch führt eine Deregulation der Aktivität von CTSK zu einer Akkumulation von Knochenmaterial (Osteosklerose/Osteopetrose)¹³⁹ und der Verlust von CTSK zu einem Knochenverlust (Osteoporose)¹⁴⁰.

1.6.1 Cathepsin X: Struktur, Aktivität und biologische Funktion

Für Cathepsin X (CATX auch: CATZ, P oder Y), eine erst vor kurzem entdeckte Cysteinprotease¹⁴¹, wurde ursprünglich eine ubiquitäre Expression in vielen verschiedenen Geweben postuliert^{142,143}. Unsere Vorarbeiten zeigten jedoch eindeutig eine bevorzugte gewebeabhängige, zellspezifische Expression in Makrophagen und Monozyten^{144,145,146}. Deshalb wäre es möglich, dass CTSX eine spezifische Funktion im Immunsystem und damit auch bei inflammatorischen Prozessen ausübt, da Makrophagen wichtige Effektoren des angeborenen Immunsystems sind. Diese These wird durch Studien von Naegler *et al.* (2006) unterstützt, welche eine erhöhte Expression von CTSX im Plasma von Patienten mit Mehrfachverletzungen nachwies¹⁴⁷. Im Vergleich zu den anderen Cysteinproteasen zeigt das CTSX einige strukturelle Besonderheiten, wie z.B. ein extrem kurzes Propeptid¹⁴⁸. Außerdem findet man eine Insertion von drei Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums (Abb. 4), welche mit zwei weiteren Aminosäuren eine kleine Schleife (*mini-loop*) ausbilden und die Monopeptidyl-Carboxypeptidaseaktivität des Enzyms darstellen¹⁴¹. Für das CATX konnte die für die Cathepsine typische Zwei-Domänen-Struktur gezeigt werden, mit α -Helix-Strukturen im N-terminalen Anteil und mehrheitlich β -Faltblatt-Strukturen in der C-terminalen Domäne¹⁴⁹. Außerdem besitzt die Protease ein RGD-Bindungsmotiv, so dass CTSX mit β_2 - und β_3 -Integrinen interagieren kann, um so Adhäsion und Phagozytose von Makrophagen, die Migration von T-Lymphozyten und Reifung von dendritischen Zellen zu modulieren^{150,151,152}. Eine carboxyterminale Prozessierung ist mittlerweile für LFA-1 und Bradikin/Kallidin nachgewiesen, so dass von einer multifaktoriellen Interaktion von CTSX in der Immunantwort auszugehen ist^{153,154}.

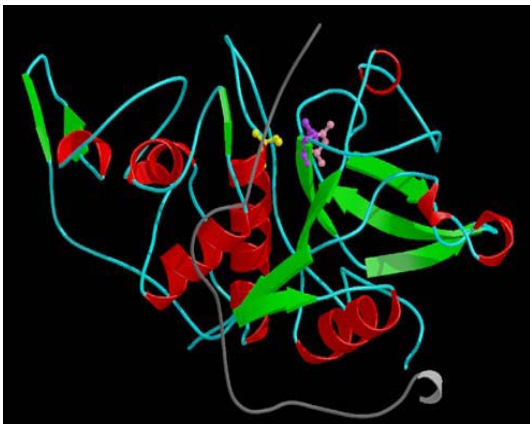


Abb. 4: Struktur des humanen CATX.

Das Propeptid ist in grau, die katalytischen Reste als Kugel-Stab-Modell dargestellt.

gelb = Cystein 92
violett = Histidin 241
pink = Asparagin 261

<http://merops.sanger.ac.uk/index.htm>

Außerdem besitzt das CTSX höchste Homologie zu CTSB. Aktuelle Daten belegen die gegenseitige Beeinflussung von CTSX- und B, in denen der Verlust des CTSB einen Anstieg des extrazellulären CTSX mit einer gesteigerten Invasionsaktivität bedingt¹³⁷. Zudem gibt es Befunde, dass das CATX an der Entstehung von Tumoren beteiligt ist¹⁵⁵. Bestätigt wurde die verstärkte Expression von CATX in *H. pylori*-infizierten Magenkarzinom-Zellen, in THP-1-Makrophagen, im Magenkarzinomgewebe und auch beim Prostatakarzinom. Die erhöhte Expression im Gewebe fand sich nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in infiltrierenden Makrophagen^{146,156}. CTSX-defiziente Mäuse zeigten darüber hinaus, im Vergleich zum WT und CTSB-defizienten Mäusen, größere Mammatumoren¹⁵⁷, passend zu den Befunden von Decock *et al.* (2008), die in Mammakarzinompatienten niedrige Serumlevel von CTSX nachgewiesen haben¹⁵⁸. Eine Beteiligung an pathologischen Prozessen ist somit zwar nachgewiesen, jedoch ist die spezifische Rolle des CTSX bezüglich des Entzündungsgeschehens und speziell der Magenkarzinogenese völlig unklar.

1.6.2 Cathepsin X in der Magenkarzinogenese

Die Aufgabe dieser Promotionsarbeit ist die Analyse der Expression, Regulation, Lokalisation und Funktion von CTSX im Rahmen einer von *H. pylori*-induzierten Gastritis. Von den Cathepsinen B (CTSB), K (CTSK), L (CTSL), X (CTSX), und W (CTSW) konnte in Magenbiopsien jedoch nur das CTSX, speziell im Antrum, eine signifikant höhere Expression auf mRNA- und Proteinebene nach Stimulation mit *H. pylori* nachgewiesen werden¹⁵⁹. Zum

damaligen Zeitpunkt war unklar, ob dieser Anstieg primär in der vermehrten Anzahl von CTSX-positiven, eingewanderten Makrophagen begründet ist (Hauptquelle der Expression von CTSX) oder aber auch in der Expression von CTSX in Drüsenepithelzellen. In durchgeführten Interaktionsstudien *in vitro* bzw. Ko-Kulturen mit Epithelzellen, Monozyten und Fibroblasten zeigten alle beteiligten Zellpopulationen eine vermehrte Expression, ausgelöst durch die Zell-Zell-Kontakte und Matrixinteraktionen¹⁴⁶. Unter Verwendung weiterer Zellkulturversuche konnte sogar eine differentielle Abhängigkeit der Zellarten vom CagA-Protein des *H. pylori* nachgewiesen werden. Während *cagA*⁻-Infektionen zwar im Epithel eine gesteigerte Expression von CTSX zeigten, können nur *cagA*⁺-Stämme eine Induktion in Makrophagen hervorrufen, was ein weiterer Hinweis auf eine spezifische *H. pylori*-abhängige Regulation der Expression im Magen darstellt. Stimulationsexperimente mit proinflammatorischen Zytokinen/Chemokinen unterstützen die zelltyp-abhängige Regulation von CTSX im Magen. Die Regulation der CTSX-Expression erfolgt dabei im Epithel über den JNK-Signaltransduktionsweg und in den Makrophagen über den ERK1/2-Signalweg. Des Weiteren konnten funktionelle Studien eine Beteiligung an der Erhöhung der Migration von *H. pylori*-infizierten Epithelzellen aufzeigen^{146,160}. Bei der Suche nach möglichen Regulatoren der CTSX-Expression konnte mittels cDNA-Mikroarray eine erhöhte Expression von verschiedenen Genen vor allem von MMP-1 gezeigt werden¹⁶¹. Ob und in welcher Weise die bisher gezeigten bzw. beschriebenen Effekte von CTSX an der *H. pylori*-induzierten Magenkarzinogenese beteiligt sind, bleibt noch weiter zu untersuchen. Zwar korreliert die Expression von CTSX positiv mit einer schlechten Prognose von Patienten, jedoch ist wenig über spezifische tumorbiologische Funktionen von CTSX bekannt.

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, die Bedeutung der *H. pylori*-induzierten CTSX-Expression für die Magenkarzinogenese unter Verwendung eines transgenen Mausmodells zu analysieren und zu charakterisieren. Die ersten bzw. bisherigen Funktionen wurden mit Hilfe von Karzinomzellmodellen identifiziert. Durch die Etablierung von primären Epithelzellen aus Biopsie- bzw. Gastrektomiematerial des Magens, konnte ein *in vivo*-nahes Zellmodell mit allen Eigenschaften eines polarisierten Oberflächenepithels geschaffen werden, wie die Expression von CK20, MUC-5AC und E-Cadherin und intakten Zell-Zell-Kontakten (Expression von ZO-1 und p120 Catenin)¹⁶¹.

Aus einer Kooperation mit der Universitätsklinik in Freiburg (Prof. Peters, PD. Dr. Reinheckel) wurden CTSX-defiziente Mäuse (C57BL/6*ctsz*^{-/-}) zur Verfügung gestellt. Während das Infektionsmodell unter Nutzung des *H. pylori* Stammes Sydney strain 1 (*HpSS1*) andauert, war es Ziel dieser Arbeit vorab Infektionen *in vitro* an primären Zellkulturen der Maus (primäre Epithelzellen und Monozyten/Makrophagen aus WT- und *ctsz*^{-/-}) durchzuführen. Dazu sollte zunächst das humane Primärepithelmodell auf den Mausmagen adaptiert und die *H. pylori*-Infektion *in vitro* etabliert werden. Mit diesem Zellsystem sollte dann eine systematische Untersuchung einzelner Funktions- und Regulationsmechanismen für CTSX durchgeführt werden, um damit potentielle Rückschlüsse und Erklärungen für die Daten *in vivo* zu liefern. Dazu sollen folgenden Untersuchungen an CTSX-defizientem Gewebe bzw. an primären Epithelzellen der Maus und den entsprechenden Kontrollen erfolgen:

- **Analyse der Expression von einzelnen Cathepsinen in *H. pylori*-infizierten und *H. pylori*-freien Proben - Vergleich von Gewebelysaten und primären Zellkulturen mittels qPCR.**
- **Quantifizierung der Expression von Zytokinen (CXCL1, IL-6, IL-1 β) bzw. des Chemokins MCP-1 in Mono- und Makrophagen-Ko-Kulturen von WT- und *ctsx*^{-/-} - Mäusen vor und nach einer *H. pylori*-Infektion mittels qPCRs.**

- **Nachweis differentiell exprimierter Gene der adaptiven Immunabwehr in infizierten und nicht-infizierten WT- und *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen mittels eines spezifischen cDNA-Mikroarrays.**
- **Untersuchung morphologischer Veränderungen und zellulärer Interaktion von CTSX-positiven und -negativen Epithelzellen und Makrophagen mittels Konfrontationskulturen und *Time-lapse* Video Mikroskopie.**
- **Charakterisierung des Einflusses der CTSX-Defizienz auf regulatorische Faktoren der gastralen Entzündungsantwort während der *H. pylori*-Infektion anhand von Laser-Mikrodissektion an Mausmagenproben kombiniert mit Expressionsarrays.**

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Allgemeine in dieser Arbeit verwendete Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, bei den folgenden Firmen bezogen und waren von handelsüblicher Reinheit:

- Biochrom KG
- Merck AG
- Promega GmbH
- Carl Roth GmbH & Co
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- Invitrogen GmbH
- PAA Laboratories GmbH
- Roche Pharma AG
- Peqlab Biotechnologie GmbH

3.1.2 Sonstige Labormaterialien

Glasgefäße zur Aufbewahrung von Lösungen und zur Autoklavierung/Hitzesterilisierung wurden von folgenden Firmen bezogen: Falcon (Heidelberg), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Neolab (Heidelberg).

Labormaterialien	Hersteller
Campygen	Oxoid, Wesel
<i>Chamber Slides</i>	Nunc, Wiesbaden
Deckgläschen	Lagerartikel
Einbettkassetten (histologisch)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Einfrierröhrchen	Greiner-Bio-One, Frickenhausen
Einmalskalpelle	Lagerartikel
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Kanülen und Spritzen	BD Microlance, Bayern
Kultur Insert	Ibidi, Martinsried
<i>LightCycler</i> Kapillaren	Roche, Mannheim
Membran Slides 1,0 Pen	Zeiss, München
Objektträger <i>SuperFrost</i> Plus	Thermo Scientific, München
Petrischalen	Greiner, Solingen
Pinzetten	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Präparatenkasten	Zeiss, München
Präparationsschere	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1ml, 2 ml)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Reaktionsröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Solingen
Rotilabo Färbekästen	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Rotilabo Objektträgerhalter	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Selectip Ureterkatheter	Bard Portsysteme, Karlsruhe
<i>TransBlot Transfer</i> Nitrocellulose	BioRad, München
Transwell®-6-well 0,4 µm	Omni Life Science, Hamburg
Transwell®-Platten	Costar Corning, München
Tuberkulin-Spritzen 1ml	B. Braun, Melsungen
Wattestäbchen	Raucotupf, Rengsdorf
Zellkulturflaschen	Biochrom, Berlin
Zellkulturplatten 6-well	Biochrom, Berlin
Zellkulturschaber	Biochrom, Berlin
Einweg Impfösen	Greiner, Solingen
Uvette 200-1600 nm	Eppendorf, Hamburg

3.1.3 Geräte

Gerätetyp und Hersteller sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet:

<i>Geräte</i>	<i>Hersteller</i>
37°C Schränke	Memmert, Schwabach
-80°C Gefrierschrank	Fryka, Esslingen
ABI PRISM 7900 Sequenzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Brutschränke (CO ₂)	Heraeus, Hanau
Coulter Counter ZII	Coulter Immunotech, Marseille
Elektrophorese-Apparaturen	Advance, Japan
GEArray Chemilumineszenz Detection System	SABiosciences, Biomol, Hamburg
Gel/Western Blot Dokumentationsgerät	Syngene, USA
Gelkammer	Advance, Japan
Heizplatte/Thermomixer	Heidolph, Weilheim
<i>HistoCenter</i>	Shandon, Frankfurt
<i>HyperCenter</i> (LEICA ASP 300)	Leica Microsystems, Wetzlar
Konfokales Mikroskop (LEICA TCS SP2 Mikroskop)	Leica Microsystems, Wetzlar
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Rostock
Leica CM3050S-Kryostat	Leica Mikrosystems, Wetzlar
<i>LightCycler</i> -Gerät	Roche, Mannheim
Magnetrührer	Neolab, Heidelberg
Mikrotom	Microm, Walldorf
Mikrowelle	Miele, Gütersloh
Mini <i>Trans-Blot</i> Electrophoretic <i>Transfer Cell</i>	BioRad, München
Mini-PROTEAN®3 Electrophoresis Cell	BioRad, München
P.A.L.M. Mikrolaser Mikroskop	P.A.L.M Carl Zeiss, Bernried
Paraffinstreckbad	Medax Nagel GmbH, Kiel
PCR System	BioRad, München
Phasenkontrastmikroskop	Nikon, Düsseldorf
pH-Messgerät	WTW, Weilheim
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	Heidolph, Weilheim
Sterilarbeitsbank	Heraeus, Hana
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	Bandelin, Berlin
Vortex	IKA®Werke, Staufen
Waage	Satorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg

3.1.4 Kitsysteme

Kit	Hersteller
<i>ArrayGrade™ cRNA Cleanup Kit</i>	SABiosciences, Biomol, Hamburg
<i>Cell dissociation sieve-Tissue Grinder Kit</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DC Protein Assay	Bio-Rad, München
<i>High Pure RNA Isolations Kit</i>	Roche, Mannheim
<i>High Pure RNA Tissue Kit</i>	Roche, Mannheim
<i>LCM Staining Kit</i>	Ambion, Darmstadt
<i>LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I</i>	Roche, Mannheim
<i>Oligo GEArray® Mouse T-cell and B-cell Activation Microarray</i>	SABiosciences, Biomol, Hamburg
RNeasy® Micro Kit	Qiagen, Hilden
RT ² Nano PreAMP cDNA Synthesis Kit	SABiosciences, Biomol, Hamburg
RT ² Nano PreAmp cDNA Synthesis Primer Mix (PBM-4088)	SABiosciences, Biomol, Hamburg
RT ² Profiler PCR Array (PAMM-088)	SABiosciences, Biomol, Hamburg
RT ² SYBR GREEN/ROX qPCR Master Mix	SABiosciences, Biomol, Hamburg
SuperSignal® Chemilumineszenz Substrat	Millipore, Schwalbach
<i>Transkripter High Fidelity cDNA Synthesis Kit</i>	Roche, Mannheim
TrueLabelingAMP™ 2.0	SABiosciences, Biomol, Hamburg
Vectastatin ABC Kit Elite (Biotin/Avidin)	Biozol, Eching

3.1.5 Marker und Standards

Marker/Standard	Firma
<i>HyperLadder I</i>	Bioline, Luckenwalde
<i>HyperLadder II</i>	Bioline, Luckenwalde
<i>HyperLadder V</i>	Bioline, Luckenwalde

3.1.6 Puffer, Lösungen und Reagenzien

Sofern nicht besonders vermerkt, wurden die Puffer mit destilliertem Wasser angesetzt. Die RNA-Isolation und alle weiteren Ansätze der qRT-PCR erfolgten mit RNase-freiem Wasser aus den jeweiligen Kits (Quiagen, Ambion). Die Zusammensetzungen aller weiteren benötigten Lösungen wurden bei den jeweiligen Methoden beschrieben.

Puffer/Lösungen/Reagenzien	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf
AK-Verdünnungspuffer	DCS – Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
<i>bovine serum albumin</i> (BSA)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
<i>brain heart infusion</i> (BHI)	Fluka, Schweiz
Corbidbalsam	Hecht-Mertens, Kiel
Cryomatrix	Thermo Scientific, München
Crystal 10xDNA Ladepuffer	Eppendorf, Hamburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PAN-Biotech, Aidenbach
<i>Dulbecco's modified eagle media</i> (DMEM)	Invitrogen, Darmstadt
Eosin	MERCK, Darmstadt
Ethanol	MERCK, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
<i>fetal bovine serum</i> (FCS)	PAA, Parsching
Formalin 4 %	MERCK, Darmstadt
Gibco Trypsin (0,05 % + EDTA)	Invitrogen, Darmstadt
Hämatoxylin	MERCK, Darmstadt
Lympholyte M	Cedarlane, CA, USA
Matrigel	BD Biosciences, Heidelberg
Paraffin	Thermo Scientific, München
Pferdeserum	Biochrom, Berlin
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	Invitrogen, Darmstadt
Plus SYBR-Green	Roche, Mannheim
Quantum 286 und 333	PAA, Cölbe
RNase Away	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Rotiphorese® 10x SDS-PAGE Laufpuffer	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
RPMI 1640	PAA, Cölbe
Serva DNA Stain G	Serva, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Xylol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

3.1.7 Antibiotika

Die in der Tabelle aufgeführten Antibiotika wurden von den Firmen Biochrom AG (Berlin) und Sigma Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Sie wurden vor Gebrauch den Nährmedien aus den Stammlösungen zugesetzt.

<i>Antibiotikum</i>	<i>Endkonzentration</i>
Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	4 µg/ml
Gentamycin	10 µg/ml
Kanamycin	8 µg/ml
Nystatin	1 µg/ml
Penicillin/Streptomycin	5 µg/ml
Trimethoprim	5 µg/ml
Vancomycin	10 µg/ml

3.1.8 Antikörper

Immunologische Proteinnachweise bzw. Inhibitorstudien wurden mit den in der Tabelle aufgeführten polyklonalen Antikörpern durchgeführt und, wenn nicht anders angegeben, nach Anweisung des Herstellers verwendet.

<i>Primärer Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Wirt</i>	<i>Quelle</i>
MIF (<i>macrophage migration inhibitory factor</i>)	1:1000	<i>rabbit</i>	Abcam, Cambridge
<i>Sekundäre Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Wirt</i>	<i>Quelle</i>
<i>goat anti rabbit</i>	1:25000	<i>goat</i>	für Proteinchemie: von R&D Systems, Wiesbaden

3.1.9 Enzyme

<i>Enzyme</i>	<i>Firma</i>
Kollagenase I	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Dispase	Invitrogen, Darmstadt

3.1.10 Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten PCR-Oligonukleotide wurden von der Firma Invitek BZW: BioTeZ (Berlin) bezogen und sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Tab. 1: Synthetisierte Primer der verwendeten Gene der Maus.

<i>Gen</i>	<i>Vorwärts-Primer</i>	<i>Rückwärts-Primer</i>	<i>bp</i>	<i>°C</i>
Aktin	GTGCTGTCCCTGTATGCCTCTG	AACCGCTCGTTGCCAATAGTG	349	55
Ctsx	CCTGTCCGGGAGGGAGAA	TGGTTGATAACGGCCTGGTC	137	55
Ctsb	TGCGTTCGGTGAGGACATAGA	GGACGGGAGCCATTGACAT	371	54
Ctsl	GGAGATGAACGCCTTTGGTG	TTACAGCCCTGATTGCCTTGA	311	54
IL-1 β	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	GATCCAACATCTCCAGCTGCA	446	57
Cxcl1	GCACCCAAACCGAAGTCATAGC	TTGTCAGAAGCCAGCGTTCACC	174	60
MCP-1	GCTCTCTCTTCCACCACCAT	GCTCTCCAGCCTACTCATTGGGAT	170	60
IL-6	CACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAGA	CTAGGTTTGCCGAGTAGATCTC	226	52
cd81	AATCCAAGCZCCGAGGCCG	GGCCCCATAGCACCCAGGA	278	60
cdkn1a	AACGCGCTCCAGACGAAGT	GCGATATCCAGACATTCAGAGCCACA	268	60
prkcd	TGCCCTGGTTTGACCCGCAT	GGTCAACACATCACCAGTCTCCTACA	294	60
glmn	GTGCTGGAAGCCCGGGTACTT	GGAGGCATCGAACAACTGGACCAA	298	60
il-18	TGGCCCAGGAACAATGGCTGC	TGGTCTGGGGTTCACTGGCACT	251	60
spp1	GCCACATGGCTGGTGCCTGA	CGGCCGTTGGGACATCGAC	314	60
ap3b1	TGAGCCTGCGCCAGAAACG	GTGGGCGGCCAGTCCTTTCC	286	60
gadd45g	GCGTCAGGATCGCCTACCG	GTGCAGGTCTCGGGCTTCGG	262	60

3.1.11 Membranen

Für den Proteintransfer vom SDS-Gel wurde eine TransBlot Transfer Nitrocellulose Membran (0,45 µm, Bio-Rad, München) verwendet.

3.1.12 Datenbanken

Für die Literatursuche und Analyse von Proteinsequenzen wurden die folgenden Datenbanken verwendet:

Medline "PubMed"	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
genome.dkfz-heidelberg.	http://genius.embnet.dkfzheidelberg.de/menu/
MEROPS-Datenbank	http://www.merops.co.uk/

3.1.13 Computerprogramme

Folgende Computerprogramme wurden zur Auswertung und Analyse der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche verwendet:

- *LightCycler* Software (Roche)
- Adobe Photoshop™ 7.0
- DataAssist v2.0 (www.appliedbiosystems.com/dataassist)
- Gene Tools, Syngene, Cambridge, UK
- GeneTools Scan-und Auswerte-Paket (Syngene BioImaging Systems, Synoptikern Ltd.)
- Microsoft Office (2003)
- PALM Version 2.2 Software
- SigmaPlot Software (2001)

3.2 Verwendete Organismen

3.2.1 *H. pylori* Stamm

In der vorliegenden Arbeit wurde der mausadaptierte *H. pylori* Stamm (*H. pylori* Sydney strain 1 (SS1)) verwendet, welcher freundlicherweise von Prof. Steffen Backert (*School of Biomolecular & Biomedical Science, University College Dublin*) bereitgestellt wurde. Alle Arbeiten wurden unter der Sterilbank in S2-Laborräumen durchgeführt.

3.2.2 Nährmedium für *H. pylori*

Die Kultivierung von *H. pylori* SS1 erfolgte auf Agarplatten (36 g/l GC-Agar-Base, 15 g Bakto Proteose Pepton (Difco/Becton Dickenson, Maryland, USA)), sowie in BHI-Flüssigmedium (BHI-Medium supplementiert mit 10 % FCS, 1 % Vitaminmix, 0,1 % Vancomycin (10 mg/l)). Nach dem Autoklavieren der GC-Agar-Base-Platten wurden 10 ml/l Vitaminmix (siehe unten), 10 % Pferdeserum (100 ml/l) (Biochrom), 10 mg/l Vancomycin, 5 mg/l Trimethoprim, 1 mg/l Nystatin hinzugefügt und nach Bedarf 4 mg/l Chloramphenicol bzw. 8 mg/l Kanamycin. Für die Herstellung des Vitamin-Mixes wurden zunächst zwei Lösungen separat hergestellt, komplett gelöst, vereinigt, auf 1000 ml aufgefüllt und steril filtriert.

Vitamin-Mix:

Lösung 1 (500 ml in dd. H₂O):

100 g/l Dextrose, 10 g/l L-Glutamin, 26 g/l L-Cystein, 0,1 g/l Cocarboxylase, 0,02 g/l Fe(NO₃)₃, 0,003 g/l Thiamin-HCl, 0,013 g/l p-Aminobenzoesäure, 0,25 g/l NAD⁺, 0,01 g/l Vitamin B₁₂

Lösung 2 (300 ml in dd. H₂O + 15 ml HCl):

1,1 g/l L-Cystin, 1 g/l Adenin, 0,03 g/l Guanin-HCl, 0,15 g/l L-Arginin, 0,5 g/l Uracil

Für die Kultivierung von *H. pylori* SS1 wurden bereits fertige *GC-Agar-Base*-Platten verwendet, welche vom Institut für Medizinische Mikrobiologie (Otto-von-Guericke Universität Magdeburg) bereitgestellt wurden. Der verwendete mausadaptierte *H. pylori* SS1 wurde zur Stammhaltung über einen längeren Zeitraum als Glycerolstock gelagert. Dafür wurde der *H. pylori* SS1 einer dicht bewachsenen Platte in Einfriermedium [1,85 g BHI/50 ml dH₂O], 20 % Glycerin, 10 % FCS) resuspendiert und bei -80°C dauerhaft gelagert.

3.2.3 Kultivierung von *H. pylori*

H. pylori SS1 wurde auf *GC-Agar-Base*-Platten (vgl. 3.2.2) kultiviert. Dafür erfolgte zuerst das Ausstreichen des Bakteriums auf Agarplatten mit Hilfe einer sterilen Impföse (Greiner, Solingen, Deutschland) aus den zuvor hergestellten Glycerolstocks (vgl. 3.2.2). Diese wurden dann für 48 h bei 37°C unter mikroaeroben Bedingungen in Anaerobiertöpfen (Oxoid, Wesel, Deutschland) kultiviert. Eine mikroaerophile Atmosphäre (5 % O₂, 10 % CO₂ und 85 % N₂) wurde geschaffen durch Zugabe von Campygen (Oxoid, Wesel, Deutschland). Nach zweitägiger Kultivierung wurde ein Verdünnungsausstrich hergestellt. Mit einem sterilen Wattestäbchen (Raucotupf, Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, Deutschland) wurde das Bakterium von der Platte abgenommen und in 1 ml BHI (Fluka, Schweiz) resuspendiert und auf eine neue Agarplatte ausgestrichen (erste Verdünnung). Anschließend wurde das Wattestäbchen erneut in 1 ml BHI resuspendiert, wiederum auf eine neue *H. pylori* Platte ausgestrichen (zweite Verdünnung), noch einmal in 1 ml BHI resuspendiert und durch Ausstreichung auf eine wiederum neue Platte, die dritte Verdünnung hergestellt. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 48 h bei 37°C unter mikroaeroben Bedingungen in Anaerobiertöpfen. Für die Infektionsexperimente wurde jeweils die dritte Verdünnung bzw. Überimpfung des *H. pylori* Stammes benutzt.

Anlegen von *H. pylori* Flüssigkulturen

Zur Herstellung von *H. pylori* Flüssigkulturen wurde der *H. pylori* Stamm von der dritten Verdünnung (vgl. 3.2.3) in BHI-Flüssigmedium resuspendiert und über Nacht bei 37°C im

Anaerobiertopf unter Campygen-Atmosphäre (Oxoid, Wesel, Deutschland) schüttelnd (160 rpm) inkubiert.

3.2.4 Mäusstämme

Für die vorliegende Arbeit wurden Mäuse des Inzuchtstammes C57BL6/N verwendet. Diese Linie gilt als ein Standardmodell für physiologische Untersuchungen und wird in der vorliegenden Arbeit als Wildtyp-Maus (WT) bezeichnet. Es handelt sich um eigens für Tierversuche gezüchtete Tiere, welche von PD. Dr. Reinheckel (Zentrale Klinische Forschung, Freiburg) bereitgestellt wurden. Außerdem wurden Mäuse mit *knock-out* im Cathepsin B (C57BL/6*ctsb*^{-/-}, Mutation im Allel Ctsbtm1Jde) und *knock-out* im Cathepsin X (C57BL/6*ctsz*^{-/-}, Mutation im Allel Ctsztl1Thre) aus Freiburg bezogen¹⁵⁷. Die Tiere wurden in erforderlichem Umfang im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg weiter gehalten und gezüchtet.

3.3 Methoden

3.3.1 Maushaltung

Die Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen in speziellen einzelbelüfteten IVC-Käfigen (*individually ventilated cages*, Techniplast, Buguggiate, Italien) gehalten. Dabei handelt es sich um Typ-II-Käfige (25 x 40 x 20 cm), deren Boden mit Sägespänen bzw. Holzspänen (Allspan Tierstreu, Niederlande) befüllt waren, welche regelmäßig gewechselt und gesäubert wurden. Die Anzahl der Tiere pro Käfig betrug 1-5 Tiere, wobei alle Tiere in einem Käfig das gleiche Geschlecht hatten (abgesehen von den Zuchtpaaren). Außerdem standen den Tieren pelletiertes Standardfutter (Altromin 7024, Altromin GmbH Lage) und frisches Leitungswasser *ad libitum* zur Verfügung. Die Haltung der Tiere in den klimatisierten Tierhaltungsräumen erfolgte bei einer durchgängigen Raumtemperatur von $22 \pm 1^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchte von $50 \pm 5\%$. Es herrschte ein Lichtregime von Licht-Dunkel = 12:12 mit Licht-an um 6.00 Uhr MEZ. In der Lichtperiode lag die Lichtintensität zwischen 100 und 300 Lux, während der Dunkelperiode bei 5 Lux. Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden unter Einhaltung der Bestimmungen der Deutschen Tierschutzverordnung durchgeführt. Alle Mäuse waren frei von viralen, bakteriellen und parasitären Erkrankungen. Mittels einer durchgeführten Kontroll-Real-Time-PCR konnte der *H. pylori* auch in den Mägen der spezifisch pathogenfreien WT, C57BL/6*ctsz*^{-/-}(*ctsx*^{-/-}) und C57BL/6*ctsb*^{-/-}(*ctsb*^{-/-})-Tieren nicht nachgewiesen werden. Die Haltung der Mäuse und die Tierversuchsvorhaben zu den Infektionsversuchen erfolgten entsprechend der Genehmigung nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) durch das Landesverwaltungsamt Halle/Saale (AZ 42502-2-792 UniMD).

3.3.2 Orale Infektion der Mäuse mit *H. pylori*

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine intragastrale Infektion der C57BL/6 Mäuse, sowie der defizienten *ctsx*^{-/-} und *ctsb*^{-/-}-Mäuse mit dem mausadaptierten *H. pylori* Stamm SS1. Dafür wurden die Bakterien kurz vor der Infektion mit einem Wattestäbchen von der Platte

abgenommen (vgl. 3.2.3) und in BHI-Flüssigmedium suspendiert ($= 10^9$ *H. pylori*/ml). Zur Infektion wurde diese Suspension in einer 1 ml Tuberkulin-Spritze (B. Braun, Melsungen, Deutschland) aufgezogen, die mit einer sterilen Kanüle (BD Microlance, Bayern, Deutschland) und einem gekürzten Ureterkatheter (Bard Portsysteme, Karlsruhe, Deutschland) versehen war. Die Tiere wurden mit der Hand am Nacken fixiert und durch einen in den Magen eingeführten Ureterkatheter die Bakteriensuspension (0,2 ml) appliziert. Die Infektion wurde nach zwei und vier Tagen wiederholt. Für die Infektion mit *H. pylori* wurden sowohl weibliche als auch männliche Tiere verwendet, die zwischen 8 und 12 Wochen alt waren. Kontrollmäuse erhielten 0,2 ml BHI-Flüssigmedium.



Abb. 5: Orale Infektion mit *H. pylori* SS1 einer C57BL6/N Maus mittels einer 1 ml Tuberkulin-Spritze mit gekürztem Ureterkatheter.

3.3.3 Präparation von Gewebe aus der Maus

Maus-Magen für die Isolierung und Kultivierung von primären Epithelzellen

Nicht-infizierte Mäuse (WT, *ctsx*^{-/-}, *ctsb*^{-/-}) im Alter von 12 bis 20 Wochen wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz durch Luxation der Halswirbelsäule getötet. Anschließend wurden die Tiere auf den Rücken gelegt und das Abdomen mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Nach Aufschneiden der Abdominalhaut und der Öffnung des Bauchraumes wurde der Magen mit einer stumpfen Pinzette gefasst, mit einer spitzen Pinzette umgebendes Fettgewebe und sonstige Strukturen abgetrennt und der komplette Magen vom Duodenum bis zum Ösophagus entlang der großen Kurvatur abpräpariert. Die Milz, die im linken Oberbauch direkt unter dem Zwerchfell liegt, wurde auf die selbe Weise abpräpariert und ebenso wie der

entnommene Magen, zur weiteren Aufarbeitung in RPMI 1640-Medium (PAA, Cölbe, Deutschland) überführt.

Maus-Magen für die Isolierung der Gesamt-RNA aus Gewebe

Um die RNA aus dem kompletten Magen der Maus isolieren zu können, wurde der Magen sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff überführt und bis zur Isolierung der Gesamt-RNA bei -80°C gelagert.

Maus-Magen für Kryoschnittpräparate

Nach 24, 36 und 50 Wochen wurden die infizierten und die Kontroll-Mäuse (WT, *ctsx*^{-/-}) getötet. Die in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Magenstücke wurden bei -30°C im Kryostat (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) auf Metallblöckchen in *tissue-freezing*-Medium (Cryomatrix, ThermoScientific, München, Deutschland) aufgefroren und unmittelbar danach bis zum weiteren Schneiden bei -80°C aufbewahrt. Das Gewebe diente zur Isolation der RNA aus mikrodisezierten Gewebeschnitten für anschließende Gen-Expressions-Analysen mittels eines Taqman® *gene expression arrays* (SABiosciences, Hamburg Deutschland).

3.3.4 Zellkultur

Die Kultivierung der murinen Zelllinien CLS103 (murine Magenkarzinom-Zelllinie) und J774A.1 (murine Makrophagen-Zelllinie) erfolgte in üblichen Zellkulturflaschen in RPMI 1640-Nährmedium (CLS103) bzw. in DMEM-Medium (J774A.1), das beides mit 10 % hitzeinaktiviertem (siehe unten) FCS und gegebenenfalls mit 1 % Antibiotika-Antimykotika-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) angereichert wurden. Die Inkubation der Kulturen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Die gewachsenen Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen unter dem konfokalem Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar) kontrolliert und das Kulturmedium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Beim

Erreichen einer konfluent gewachsenen Kultur (Wachstumsdichte 80-90 %) wurden die Zellen geerntet. Hierzu wurde das jeweilige Kulturmedium abgenommen und die Zellmonolayer zweimal mit PBS (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) gespült. Anschließend wurden die Zellen für 45 s mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Nach Entfernung dieser Lösung erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 5 ml entsprechendem Zellkulturmedium vollständig abgespült und je nach Bedarf in neue Zellkulturflaschen oder in 6-well-Zellkulturplatten (Biochrom, Berlin, Deutschland) verdünnt rekultiviert. Bei Bedarf wurde die Zellzahl im Coulter Counter ZII (Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich) gezählt. Für eine Langzeitlagerung wurden die Zellen nach dem Ernten in das jeweilige Kulturmedium mit Zusatz von 10 % DMSO (PAN Biotech, Eidenbach, Deutschland) überführt und in Einfrierröhrchen zunächst für 24 h bei -70°C und dann im flüssigen Stickstoff aufbewahrt. Zur Rekultivierung wurden die eingefrorenen Zellen schnell bei 37°C aufgetaut und sofort in das jeweilige Kulturmedium gegeben. Ein Wechsel des Nährmediums erfolgte am nächsten Tag, damit das noch vorhandene DMSO entfernt wird. Anschließend wurden die Zellen standardisiert weiterkultiviert.

Hitze-Inaktivierung von FCS

Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren wurde das FCS für 30 min bei 56°C inkubiert und anschließend zu 50 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.3.5 Isolierung und Kultivierung von primären Epithelzellen

Für die Isolierung der primären Epithelzellen aus den Mägen der Maus wurden nicht-infizierte WT, *ctsx*^{-/-} und *ctsb*^{-/-} -Mäuse im Alter von 12 bis 20 Wochen verwendet (vgl. 3.3.3). Die Mägen wurden zur weiteren Aufarbeitung in RPMI 1640-Medium (PAA, Cölbe) ohne Antibiotika/Antimykotika überführt, in diesem Medium gewaschen und mit Hilfe eines Skalpells in kleine (1-2 mm²) Gewebestücke geschnitten. Anschließend wurde das Gewebematerial enzymatisch in einer 25 ml Kollagenase I (Sigma, Deisenhofen)/Dispase

(Invitrogen, Darmstadt)-Lösung (12000 U Kollagenase I, 120 U Dispase, 125 mg BSA, ad 100 ml Quantum 286) für 2 h bei 37°C unter Rühren dissoziiert. Außerdem erfolgte eine zweistündige Inkubation der 6-well-Zellkulturplatten (Biochrom, Berlin, Deutschland), welche zuvor mit 1 ml Matrigel™ (5 µl/ml) beschichtet wurden. Das Matrigel™ polymerisiert bei 37°C und stellt in diesem Zustand eine Art künstliche Basalmembran dar. Anschließend wurde das Gewebelysat bei 1500 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert, das entstandene Zellpellet mit PBS gewaschen und in speziellem Epithelkulturmedium Quantum 286 (PAA, Cölbe mit 5 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 10 µg/ml Gentamycin) aufgenommen und in die beschichteten 6-well-Zellkulturplatten überführt (Abb. 6). Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Die gewachsenen Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen unter dem inversen Mikroskop kontrolliert.

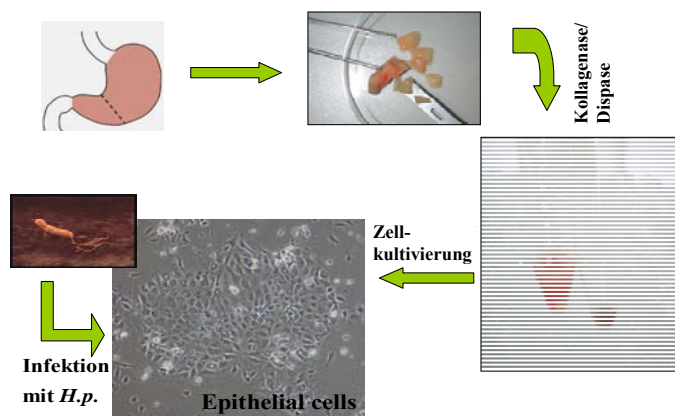


Abb. 6: Isolierung und Kultivierung der primären Epithelzellen

3.3.6 Infektion der Zelllinien mit *H. pylori*

Vor der Infektion mit *H. pylori* SS1 wurden die verschiedenen Zellen in 6-well-Platten mit dem entsprechenden Nährmedium ausgesät und bis zum Erreichen einer konfluent gewachsenen Kultur mit einer Wachstumsdichte von etwa 80-90 % bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Beim Erreichen der Konfluenz erfolgte ein Wechsel des jeweiligen Nährmediums (RPMI 1640 bzw. Quantum 286) ohne Antibiotika/Antimykotika und ohne FCS. Anschließend konnte der *H. pylori* SS1 kultiviert werden (vgl. 3.2.3). Hierzu wurde der jeweilige Bakterienstamm mit einem sterilen Wattestäbchen (Raucotupf, Lohmann &

Rauscher, Rengsdorf, Deutschland) geerntet. Von der Agarplatte (dritte Verdünnung; vgl. 3.2.3) wurde der *H. pylori* abgenommen, sofort in BHI resuspendiert, ihre Dichte bzw. Konzentration photometrisch bei OD₅₆₀ bestimmt und dann mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 50 auf die jeweiligen Zellen gegeben. Außerdem wurden nicht-infizierte Zellen als Kontrollen mitgeführt. Die infizierten, sowie die nicht-infizierten Zellen wurden im Inkubator für 8 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach wurden die jeweiligen Zellen entsprechend weiter verarbeitet bzw. geerntet (vgl. 3.3.4).

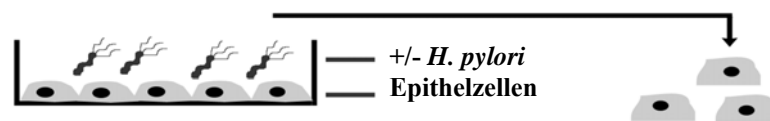


Abb. 7: Infektion der primären Epithelzellen

3.3.7 Infektion im Transwell®-System

Die Infektionsexperimente mittels Transwell®-Filtersystem wurden eingesetzt, um ein *in vivo*-nahes Modell der *H. pylori*-Infektion nachzustellen. Es fanden Filterkulturgefäße Anwendung, die aus zwei durch einen Polycarbonatfilter (0,4 µm Porengröße) voneinander getrennten Zellkammern bestehen, sogenannte Transwell®-*chamber* (Corning-Costar, München, Deutschland). Diese Porengröße verhinderte das Durchdringen von Bakterien. Die primären Epithelzellen (WT, *ctsx*^{-/-}) wurden wie beschrieben isoliert, kultiviert, geerntet (vgl. 3.3.5) und in eine mit Matrigel vorbeschichtete 6-*well*-Platte eingesät. Zur gleichen Zeit erfolgte die Kultivierung der murinen Makrophagen-Zelllinie (J774A.1, 1 x 10⁷ Zellen pro *well*) (vgl. 3.3.4) in den Filtereinsätzen. *H. pylori* SS1 wurde wie beschrieben geerntet (vgl. 3.2.3), in entsprechender Konzentration in 2 ml Kulturmedium resuspendiert und zu den primären Epithelzellen (WT, *ctsx*^{-/-}) in die untere Kammer gegeben. Als Kontrollen dienen nicht-infizierte Ko-Kulturen. Die infizierten und nicht-infizierten Kulturen wurden für 8 h bei 37°C inkubiert und konnten anschließend von den 6-*well*-Platten und den Filtern getrennt geerntet werden. Hierzu wurde der Lysispuffer aus dem *High Pure* RNA Isolationskit von

Roche Diagnostics direkt auf die Zellen gegeben und nach Vorschrift weiterverarbeitet (vgl. 3.3.9).

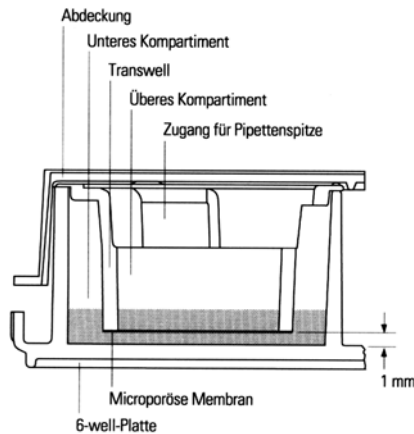


Abb. 8: Querschnitt eines Transwell®-chambers (aus dem Costar Katalog)

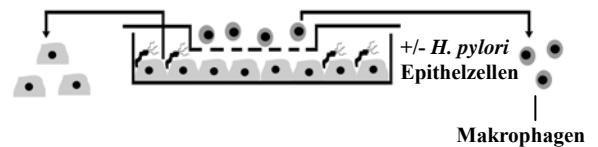


Abb. 9: Infektionsexperiment im Transwell®-Filtersystem

3.3.8 Bestimmung der Kolonie-bildenden-Einheiten (cfu)

Zur Kontrolle der Infektionen wurde die Bestimmung der Kolonie-bildenden-Einheiten (cfu; colony forming units) eingesetzt. Dazu wurden die Epithelzellen (CLS103 und die isolierten primären Epithelzellen der Maus) auf eine Dichte von 5×10^5 Zellen pro Platte gebracht und auf 6 cm Gewebekulturplatten mit dem entsprechenden Nährmedium ausgesät. Bis zum Erreichen einer konfluent gewachsenen Kultur, wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend erfolgte, wie beschrieben, eine *H. pylori*-Infektion der Zellen mit einer MOI von 50. Nach 4 h Inkubation wurden die infizierten Kulturen dreimal mit PBS (pH 7.6) gewaschen, um die nicht adhärenen Bakterien abzulösen. Die Zelllysate wurden mit PBS/0,2 % Saponin nach 15-minütiger Inkubation geerntet. Danach wurden Verdünnungsreihen in den Stufen 1/10, 1/100, 1/1000 und 1/10000 in PBS hergestellt und anschließend auf *Helicobacter*-Platten ausplattiert. Nach einer viertägigen Inkubation im Anaerobiertopf in einer Campygen-Atmosphäre (5 % O_2 , 10 % CO_2 und 85 % N_2) bei 37°C

erfolgte die Bestimmung der Kolonie-bildenden-Einheiten/ml der einzelnen Verdünnungsstufen.

3.3.9 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Für die Transkriptanalyse mittels quantitativer RT-PCR wurde die RNA aus den mono- und ko-kultivierten Zellen (vgl. 3.3.6 und 3.3.7) isoliert. Dazu wurde der *High Pure* RNA Isolationskit von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) verwendet. Nach einer 8-stündigen Inkubation der infizierten und nicht-infizierten Mono- und Ko-Kulturen wurden die Zellen jeweils mit 400 µl Lysispuffer versetzt und mit einem Zellkulturschaber (Biochrom, Berlin, Deutschland) geerntet. Die Zellen wurden bei diesem System nicht im Vorfeld von den Kulturschalen geerntet, sondern direkt auf den Platten lysiert. Anschließend wurde das Zelllysate durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren abgelöst. Das weitere Vorgehen erfolgte exakt nach Herstellerprotokoll. Die Elution der RNA von den Säulen in ein neues Eppendorfgefäß erfolgte je nach Zellmenge mit variablen Mengen an Elutions-Puffer von 50-100 µl. Das Eluat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingelagert. Alle Arbeiten mit RNA wurden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt.

3.3.10 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe

Für die Transkriptanalyse mittels quantitativer RT-PCR wurde die RNA aus dem Magen von WT, *ctsx*^{-/-} und *ctsb*^{-/-}-Mäusen isoliert (vgl. 3.3.3). Dazu wurde der *High Pure RNA Tissue* Kit von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) verwendet. Das entnommene Gewebe wurde im ersten Schritt mit Hilfe eines Mörsers homogenisiert und in 400 µl Lysispuffer aufgenommen. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation wurde der Überstand mit 200 µl Ethanol versetzt. Danach erfolgte die Aufreinigung der RNA nach Herstellerprotokoll. Die Gesamt-RNA wurde mit 100 µl Elutionspuffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingelagert.

3.3.11 RNA-Konzentrationsbestimmung

Photometrische Analyse

Die photometrische Messung der isolierten RNA erfolgte am UV-Spektrophotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge $\lambda = 260$ nm gegen eine Puffernullkontrolle (DEPC) in UVetten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

3.3.12 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Die isolierte Gesamt-RNA (vgl. 3.3.9 und 3.3.10) wurde mit der Methode der reversen Transkription (RT) mittels *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis* Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) in komplementäre DNA umgeschrieben. Dazu wurde nach den Angaben des Herstellers in einer 20 μ l Reaktion, 1 μ g Gesamt-RNA mit 1 μ l Oligo (dT) 18 Primer (50 pmol/ μ l) für 10 min bei 65°C in einem PCR-Gerät (BioRad, München, Deutschland) vorinkubiert, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Die Reaktion wurde anschließend auf Eis abgekühlt, bevor der restliche Reaktionsansatz dazu pipettiert wurde.

Jedem Reaktionsansatz wurden:

4 μ l	5 x <i>Transkriptor High Fidelity Reverse Transkriptase</i> Reaktionspuffer (8 mM MgCL ₂)
0,5 μ l	RNase Inhibitor (40 U/ μ l)
2 μ l	Desoxynukleotid Mix (10 mM)
1 μ l	DTT (5 mM)
1,1 μ l	<i>Transkriptor High Fidelity reverse Transkriptase</i>

zugesetzt, vorsichtig gemischt und kurz abzentrifugiert. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min bei 45-55°C inkubiert und die Reaktion durch fünfminütiges Erhitzen auf 85°C beendet. Die cDNA konnte direkt in die PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden. 2 μ l des Reaktionsansatzes wurden für die nachfolgenden PCR-Amplifikationen eingesetzt.

3.3.13 Quantitative Real-Time-PCR am *LightCycler*

Die quantitative Messung von mRNA-Transkripten wurde an einem ThermoCycler (*LightCycler*TM, Roche, Mannheim) mit der *LightCycler*-Software (Roche) durchgeführt. Dieses System ermöglicht die Quantifizierung von Transkripten durch die Analyse der log-Phase einer PCR, in der eine Amplifikation des PCR-Produktes mit einer Erhöhung eines Fluoreszenzsignales einhergeht. Das Signal resultiert aus der Zunahme von dsDNA, die durch interkalierendes SYBR Green fluoreszent wird. Spezifische Oligonukleotide wurden von der Firma Invitek BZW: BioTeZ (Berlin, Deutschland) bezogen und sind mit deren optimalen *Annealing*-Temperaturen in Tab. 1 aufgeführt. Für die PCR-Reaktion wurde der *LightCycler*® *FastStart DNA Master SYBR Green I*-Kit der Firma Roche nach Herstellerangaben eingesetzt.

Der Reaktionsansatz (20 µl) setzte sich folgendermaßen zusammen:

4 µl	SYBR Green-MasterMix
1 µl	Vorwärts-Primer
1 µl	Rückwärts-Primer
12 µl	RNase-freiem H ₂ O
2 µl	cDNA

Ebenso wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Mitführung einer Standardverdünnungsreihe mit bekannter Konzentration an eingesetzten DNA-Molekülen ermöglichte eine genaue Quantifizierung der cDNA-Moleküle jeder Probe. Zur Herstellung eines spezifischen Standards wurde im Vorfeld das zu analysierende PCR-Fragment in einen geeigneten Plasmidvektor (pCR2.1 TOPO-Vektor des TOPO TA Cloning Kits, Invitrogen, Karlsruhe) kloniert und mindestens drei Verdünnungsstufen des Plasmids als Standard bei jedem Lauf mitamplifiziert. Die Expression der mRNA wurde gegen die Expression des *house keeping genes* mAktin dargestellt. Die vorbereiteten Reaktionsansätze wurden in Glaskapillaren (Roche, Mannheim, Deutschland) pipettiert und bei 1000 x g in einer vorgekühlten Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 1 min bei 4°C

abzentrifugiert. Anschließend wurden die Glaskapillaren in das *LightCycler* Kapillar-Rondell eingesetzt und die PCR-Reaktion gestartet.

Folgende PCR-Bedingungen wurden angewendet:

	10 min	95°C	(Denaturierung)
35x	┌	15 s	95°C (Denaturierung)
		15 s	52-60°C (T _m) (Primer <i>Annealing</i>)
		1 min	72°C (Synthese)
		10 s	72°C (Elongation)

Die *Annealing*-Temperaturen der Oligonukleotide wurden berechnet mit der Formel:

$$T_m [°C] = 4 \times GC + 2 \times AT$$

(GC, AC= Anzahl der Nukleotide in der Primersequenz)

Durch die Bildung des Quotienten aus der Molekülzahl der zu analysierenden cDNA und der Molekülzahl des *house keeping genes* ließen sich die einzelnen Proben untereinander vergleichen. Normalisiert auf die Expression des *house keeping genes* mAktin wurden dann relative Unterschiede in der Expression der Gene in verschiedenen Zellpopulationen anhand der $\Delta\Delta C_t$ Methode ermittelt. Der ΔC_t Wert wurde über die Differenz zwischen dem C_t (*threshold cycle*) der Probe vom Zielgen und dem C_t vom *house keeping genes* berechnet. Der C_t -Wert gibt die Zyklenzahl an, bei der die Fluoreszenz zum ersten Mal einen gewählten Schwellenwert überschreitet. Der $\Delta\Delta C_t$ Wert wurde dann über die Differenz von den ΔC_t Werten der zu vergleichenden Proben berechnet. Der relative Expressionsunterschied (RQ) zwischen zwei Proben kann dann über die Formel $R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ bestimmt werden. Die qPCR Daten wurden mit der *LightCycler*-Software (Roche, Mannheim) und Microsoft MS-Excel ausgewertet. Nach erfolgter Reaktion wurden die PCR-Produkte zur Kontrolle elektrophoretisch in einem 1,8 %igem Agarosegel (vgl. 3.3.14) aufgetrennt und fotografisch dokumentiert.

3.3.14 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse wurden die PCR-Proben in 1/5 Volumen DNA-Ladepuffer (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) auf 1,8 %ige Agarosegele aufgetragen und die DNA Fragmente mit Serva DNA Stain G (Serva, Heidelberg, Deutschland) bei 70-100 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarose wurde in der Mikrowelle (Miele, Gütersloh, Deutschland) aufgekocht und durch Schwenken des Kolbens abgekühlt. Nach Zugabe des Serva DNA Stain G (Ethidiumbromid-Ersatz) wurde die Agarose in die Gelkammern (Advance, Japan) gegossen. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE (siehe unten) verwendet. Durch die Interkalierung des Farbstoffes (Serva DNA Stain G) in die DNA-Moleküle konnten die Banden der Gele unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

10 x TBE (pH 8,3): 108 g Tris
 55 g Borsäure
 40 ml 0,5M EDTA
 ad 1 l Aqua dest.

3.3.15 Zelluläre Interaktionen in Kultur-Inserts

In vitro kann die zelluläre Migration in unterschiedlichen Modellen beobachtet werden. In sogenannten *Scratch Assays* oder *in vitro*-Wundheilungs-Tests wird eine konfluente Zellschicht durch eine Pipettenspitze aufgekratzt und dann verfolgt wie schnell die erzeugte Lücke wieder geschlossen wird. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Kultur-Inserts (Ibidi, Martinsried, Deutschland) die Zellmigration erfasst. Die Kultur-Inserts wurden auf normale Zellkulturplatten gesetzt. Eine besondere biokompatible Oberfläche an der Unterseite wirkte wie ein Kleber und verhinderte den Austritt von flüssigem Medium. Die Zellsuspensionen können in einer oder beiden Kammern des Inserts platziert werden und somit können die jeweiligen Zellen nur in den ausgewiesenen Gebieten wachsen. Die kultivierten Zellen wurden wie zuvor beschrieben geerntet und im Coulter Counter ZII (Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich) gezählt. Anschließend erfolgte das Umsetzen

der jeweiligen Zellsuspensionen in die Vertiefungen des Kultur-Inserts in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml. Die primären Epithelzellen (WT, *ctsx*^{-/-}) wurden in die rechte Seite des Kultur-Inserts gesetzt und die Makrophagen-Zelllinie (J774A.1) in die linke Seite des Inserts. Nach Zellanheftung wurden die Epithelzellen (WT, *ctsx*^{-/-}) mit *H. pylori* SS1 infiziert. Die Trennwand wurde rückstandslos mit Hilfe einer sterilen Pinzette entfernt und es entstand ein zellfreier Spalt von 500-600 μm (Abb. 10). Nach der Entfernung der Kunststoff-Trennwand wurde der entstandene Spalt bzw. die Interaktion der infizierten und nicht-infizierten primären Epithelzellen (WT, *ctsx*^{-/-}) und Makrophagen-Zellen (J774A.1) 60 h lang mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops fotografiert. Die *Time-lapse* Video Mikroskopie (LEICA TCS SP2 Mikroskop, Wetzlar) ist eine elegante Methode, um Zellmigration zu beobachten. Die Zellen wurden in einem Intervall von 15 min fotografiert, die Bilder wurden mit Hilfe des Adobe Photoshop™ ausgewertet und die Laufstrecke der Zellen in die Wunde in Abhängigkeit von der Zeit (m/h; Migrations-Geschwindigkeit) ermittelt. Zur Quantifizierung der Migration wurde ein Maßstab fotografiert (gleiche Vergrößerung aller Bilder). Die Bilder wurden kombiniert und die mittlere Distanz von 10 Zellen an der Spitze über den Verlauf des Experiments bemessen.

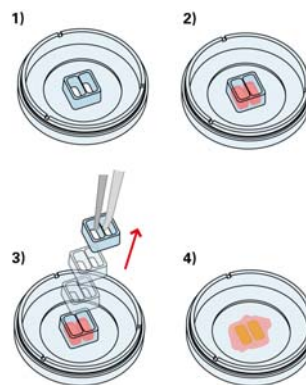


Abb. 10: Zelluläre Interaktion in Kultur-Inserts (www.Ibidi.com)

3.3.16 Oligo GEArray Mikroarray-Analyse

Für die cDNA-Array Analyse wurde der *Oligo GEArray® Mouse T-cell and B-cell Activation Microarray* von SABiosciences Corp. (Biomol, Hamburg, Deutschland) verwendet. DNA-

Mikroarrays erlauben es, die Transkriptionsaktivität zahlreicher Gene parallel zu untersuchen. Der in dieser Arbeit eingesetzte Mikroarray gestattet die simultane Untersuchung von 113 Genen der adaptiven Immunität, welche vorrangig an der T- und B-Zell-Aktivierung, Proliferation und Differenzierung, beteiligt sind. Die komplette Liste der Gene ist auf der SABiosciences Website (http://saweb2.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAMM-053A.html) aufgeführt. Die Gesamt-RNA aus den primären Magene epithelzellen (*H. pylori*-infizierte und nicht-infizierte WT- und *ctsx*^{-/-}-Mäuse) wurden nach Angaben des Herstellers zu einer markierten cRNA transkribiert und diese über Prähybridisierung und Hybridisierung auf den Blot übertragen (*TrueLabelingAMP*TM 2.0 und *ArrayGrade*TM cRNA Cleanup Kit, SABiosciences Corp.). Die Signal-Entwicklung erfolgte mit dem GEMatrix Chemilumineszenz Detektionssystem (SABiosciences Corp.). Die Bilder wurden mit dem *GeneGnome* und *GeneTools Scan*-Auswerte-Paket (Syngene BioImaging Systems, Synoptikern Ltd.) analysiert.

3.3.17 Proteinextraktion

Zum Nachweis von Proteinen wurden die isolierten Mausprimäre epithelzellen (WT, *ctsx*^{-/-}) und die Makrophagen-Zellen (J774A.1), die als Mono- und Ko-Kultur gezüchtet wurden ($\pm H. pylori$) (vgl. 3.3.6 und 3.3.7) direkt auf den jeweiligen Kulturgefäßen lysiert. Hierzu wurde das Nährmedium der Zellen entfernt und je nach Größe der Zellkulturplatte 300 μ l (auf Transwell®-Filter) oder 500 μ l (6-well-Platte) eiskalter Tripleddetergent-Lysispuffer auf die Zellen gegeben. Nach 20-minütiger Inkubationszeit auf Eis wurde das Zelllysate vom Boden abspült und 10 min bei 13000 x g (4°C) zentrifugiert. Die proteinhaltigen Überstände wurden bei -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

Tripleddetergent-Lysispuffer

50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl₂, 0,1 % SDS, 1 % (v/v) NP-40 (Nonidet P-40), 0,5 % Na-desoxycholat \longrightarrow vor Gebrauch 20 μ l Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim, Deutschland) pro 1 ml Lysispuffer hinzufügen.

3.3.18 Proteinbestimmung nach Lowry

Der Proteingehalt der Zellextrakte wurde colorimetrisch unter Verwendung des DC Protein Assays (BIO-Rad, München, Deutschland) unter Einhaltung des Herstellerprotokolls ermittelt. Eingesetzt wurden standardmäßig 5 µl der jeweiligen Probe. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Eichkurve der mitgeführten BSA-Standard-Verdünnungsreihe (0-3 mg/ml).

3.3.19 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach der Proteinextraktion und der Proteinbestimmung wurden die Überstände bzw. Proteine mit 2-fach Laemmlipuffer (siehe unten) verdünnt, so dass in der SDS-Gelelektrophorese gleiche Konzentrationen (30-100 µg) und Volumina eingesetzt werden konnten. Außerdem erfolgte durch ein Erhitzen der Proben auf 100°C für 10 min die Denaturierung der Proteine. Anschließend wurde eine eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt, bei der die Trennung der Proteine einerseits auf der Größe der Moleküle, andererseits auch auf deren Ladung beruht. Die Proben wurden zunächst in einem 4 %igem Sammelgel konzentriert und anschließend im 15 %igen Trenngel aufgetrennt (Tab. 2 und 3). Es wurden dabei vertikale Minigel-Elektrophoresekammern von BioRad (München, Deutschland) verwendet. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden in der *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad, München, Deutschland) nach Angaben des Herstellers auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V über 2-3 h in den mit Transferpuffer gefüllten Gelkammern. Anschließend erfolgte das Waschen der Membran für 3-5 min in dH₂O.

3.3.20 Chemilumineszenz-Detektion

Die Membranen wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde bei RT mit Blockierungslösung (Roti-Block, A151.1 von Roth) inkubiert und jeweils 20 min bei RT (4x) unter Schütteln in TBS-0,1 % Tween 20 gewaschen. Anschließend wurde die

Membran über Nacht bei 4°C mit einer verdünnten Antikörper-Lösung (Primärantikörper: mMIF = 1:1000) inkubiert. Darauf folgende Waschschrte entfernten unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran. Nachfolgend wurde die Membran mit einem spezifischen sekundären Antikörper (mit einer Verdünnung von 0,1-1 µg/ml Blockierungslösung (1:25000; *goat anti rabbit*)) 2 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach weiteren Waschschrten erfolgte nun durch eine Chemilumineszenzreaktion die Sichtbarmachung der spezifischen Proteinbanden. Das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym HRP (Meerrettichperoxidase, *horseradish peroxidase*) katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, bei der Lumineszenz freigesetzt wird. Verwendet wurde das SuperSignal[®] Chemilumineszenz Substrates (Milipore, Schwalbach, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die Detektion erfolgte mit dem *GeneGnome* und die Blots wurden mit dem *GeneTools Scan*-und Auswerte-Paket (Syngene BioImaging Systems, Synoptikern Ltd.) analysiert.

Tab. 2: Reagenzien für die Proteinextraktion und Proteinanalyse

Lösungen/Puffer für Western-Blot	Zusammensetzung
Trenngelpuffer (BioRad)	1,875 M Tris-HCl; 1 % (w/v) SDS, pH 8,8
Sammelgelpuffer (BioRad)	1,875 M Tris-HCl; 0,5 % (w/v) SDS, pH 6,8
Elektrophoresepuffer (Carl Roth) (Rotiphorese 10 x SDSPage)	Verdünnung 1 zu 10:100 ml 10 x SDSPage; 900 ml <i>Aqua dest.</i>
TBS 10 x (Tris)	9 g Tris-Base; 68,5 g Tris-HCl; 87,8 g NaCl; ad 1 l dH ₂ O, pH 7,4-7,6
TBS 1 x (Tris)	100 ml TBS 10 x; ad 1 l dH ₂ O
TBST (TBS 1 x + 0,05 % Tween)	0,5 ml Tween 20 (Sigma); ad 1 l x TBS
Laemmli-Probenpuffer 2fach	0,4 ml SDS; 2,0 ml Glycin; 1,0 ml Mercaptoethanol; 0,0026 g Bromphenolblau; 1,97 g Tris-HCl; ad 10 ml dH ₂ O
Lysispuffer	0,60 g Tris-HCl; 0,88 g Natriumchlorid; 0,10 g SDS; 1,00 ml Nonidet P-40; 0,50 g Natriumdeoxycholat; Natriumazid; ad 100 ml dH ₂ O
Transferpuffer	32,8 g Tris-HCl; 144 g Glycin; ad 1 l dH ₂ O

Tab. 3: Zusammensetzungen der Gele

<i>Gele</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Sammelgel	4 %	6,33 ml dH ₂ O 1,65 ml 40 % Acrylamid/Bis (37, 5:1) 2 ml Sammelgelpuffer 8 µl TEMED 75 µl 10 % (w/v) APS
Trenngel	15 %	3 ml dH ₂ O 5 ml 40 % Acrylamid/Bis (37, 5:1) 2 ml Trenngelpuffer 8 µl TEMED 75 µl 10 % (w/v) APS

3.3.21 Herstellung von Gefrierschnitten und Vorbereitung auf Laser-Mikrodissektion (LCM)

3.3.21.1 Kryokonservierte Schnitte

Für die Laser-Mikrodissektion sowie für die PCR-Array-Untersuchungen wurden nach 24, 36 und 50 Wochen WT- und *ctsx*^{-/-}-Mäuse ($\pm H. pylori$) getötet, der Magen entnommen und in flüssigem Stickstoff überführt (vgl. 3.3.3). Vor der Herstellung der Kryostatschnitte wurden die Objektträger über Nacht mit einer RNase *Away*-Lösung (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) vorbehandelt, anschließend in einem 60°C warmen Trockenschrank getrocknet. Außerdem wurde das verwendete Wasser zuvor mit 0,1 % DEPC (Ambion, Darmstadt, Deutschland) versetzt, 12 h bei 37°C inkubiert und autoklaviert. Alle verwendeten Puffer wurden mit DEPC-Wasser angesetzt. Glasgeräte wurden 8 h bei 180°C sterilisiert und eingeschweißte Plastikware wurde als RNase-frei angesehen. Höchste Priorität hatte das Arbeiten und ständige Wechseln der Labor-Handschuhe (Hartmann, Heidenheim, Deutschland). Die in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Magenstücke wurden bei -30°C im Kryostat (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) auf Metallblöckchen in *tissue-freezing*-Medium (Cryomatrix, ThermoScientific, München, Deutschland) aufgefroren und

unmittelbar darauf bis zum weiteren Schneiden bei -80°C aufbewahrt. Am Kryostaten wurden $10\ \mu\text{m}$ dicke Gefrierschnitte hergestellt, die mit Hilfe von RNase-freien Pinseln auf RNase-freie vorgekühlte Folienobjektträger (MembranSlide 1.0 PEN, Zeiss, München, Deutschland) aufgebracht wurden. Die Schnitte wurden anschließend bei -20°C im Kryostat für 2-3 min belassen und danach histochemisch gefärbt. Zur Markierung der zur Mikrodissektion vorgesehenen Gewebeanteile wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) gefärbt und pathologisch-histologisch begutachtet. Die tatsächlich für die Mikrodissektion verwendeten Gewebeschnitte wurden mit *Cresyl-Violet* angefärbt (vgl. 3.3.21.3).

3.3.21.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gefrierschnitten

Als Orientierungshilfe für die nachfolgende Mikrodissektion wurden der erste und der letzte Gefrierschnitt einer Serie mit H&E angefärbt. Die Gefrierschnitte wurden direkt nach dem Schneiden am Kryostat (Leica CM3050S) für 1 min in 100 % Ethanol fixiert und dann in *Aqua dest.* gespült. Danach wurden sie für 1 min in Hämalaun nach Mayer (MERCK, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt. Es erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Färbung.

3.3.21.3 Cresyl-Violet-Färbung von Gefrierschnitten

Cresyl-Violet-Acetat färbt die Zellkerne dunkelviolet und das Zytoplasma hellviolett an. Diese Färbung wurde bei Gewebeschnitten angewendet, aus denen anschließend Gesamt-RNA isoliert werden sollte. Die *Cresyl-Violet*-Färbung wurde anhand der Färbanleitung von Ambion (LCM Staining Kit, Ambion, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt (siehe unten). Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt und das 75 %ige Ethanol wurde bei -20°C vorgekühlt. Die Xylen-Schritte wurden laut Vorschrift nach dem Waschen in 100 % Ethanol ausgelassen, da das Xylen die Gewebe brüchig machen würde und die Schnitte sich von der PEN-Membran (Polyethylenphthalat) ablösen könnten. Nach der Dehydrierung in 75 % und 100 %igem Ethanol wurden die Gewebeschnitte direkt zur Dissektion verwendet (vgl. 3.3.21.4).

Färbeprotokoll:

I.	95 % Ethanol	30-40 s	(Fixierung)
II.	75 % Ethanol	30-40 s	(Fixierung)
III.	50 % Ethanol	25-30 s	(Fixierung)
IV.	300 µl <i>Cresyl-Violet</i>	20 s-1 min	(Färbung)
V.	50 % Ethanol	25-30 s	(Waschen)
VI.	75 % Ethanol	25-30 s	(Waschen)
VII.	95 % Ethanol	30-40 s	(Waschen)
VIII.	100 % Ethanol	30-40 s	(Waschen)
IX.	100 % Ethanol	30-40 s	(Waschen)
X.	Trocknen	5 min	(Trocknen)

3.3.21.4 *Laser-Mikrodissektion*

Mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion ist es möglich, relativ schnell und gezielt Gewebereiche und sogar einzelne Zellen vom umliegenden Gewebe zu trennen und zu isolieren, um anschließend damit DNA- und RNA-Analysen durchzuführen¹⁶². Die lasergestützte Mikrodissektion der zuvor mit *Cresyl-Violet* gefärbten Gefrierschnittpräparate (vgl. 3.3.21.3) erfolgte nach etablierten Methoden der *lasure capture microdissection* (LCM)¹⁶³ und fand unter Verwendung des P.A.L.M. *Mikrolaser Technologies AG* (P.A.L.M Carl Zeiss, Bernried) statt. Bei der Methode wird durch den kurzen Kontakt des Gewebes mit dem Laserstrahl von nur 1 ns dieses nicht verändert und bleibt somit intakt. Das computergesteuerte System des *Laser Microbeam Systems* besteht aus einem Mikroskop mit UV-Laser, das an einem Computer und an eine digitale Videokamera angeschlossen ist (Abb. 11). Die Schnittpräparate wurden auf dem Objektträgertisch platziert, welcher motorisiert und ebenso computergesteuert ist. Der gepulste Laserstrahl ist an das inverse Mikroskop gekoppelt. Mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware (Palm V2.2 Software) wurde der herauszuschneidende Bereich am Computer markiert, der zu isolierende Gewebeabschnitt mit einem Laserstrahl (337 nm) vom Nachbargewebe abgetrennt und dann vom Laser durch einen ultrakurzen Puls vom Objektträger in den Deckel eines *adhesive cap* (Carl ZEISS, München,

Deutschland) katapultiert (Abb. 11). Die Einstellungen der Geschwindigkeit, Energie und des Fokus des Lasers erfolgten manuell und richteten sich nach dem jeweiligen Gewebetyp und Dicke des Gewebes. Da mit dieser Methode das morphologisch exakt definierte Probenmaterial ohne mechanische Berührung und ohne Anwendung zusätzlicher physikalischer Kräfte, in die Reaktionsgefäße überführt werden kann, war dieses Verfahren aufgrund geringster Kontaminationsgefahr besonders für die Analyse und zur weiteren Isolierung von Nukleinsäuren geeignet.

Verschiedene Schichten der Magenschleimhaut wurden selektiv ausgeschnitten:

- 3/1 Foveolar - bzw. Oberflächenepithel
- 3/2 Parietalzellen - bzw. Nebenzellen und Hauptzellen
- 3/2E Entzündungszellen
- 3/3 SPEM

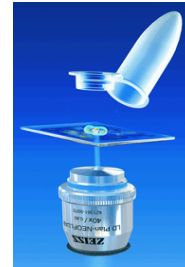


Abb. 11: Prinzip der Laser-Mikrodissektion.

Die Abbildung zeigt links das inverse Mikroskop (*Palm MicroBeam*). Auf dem Computermonitor ist der herauszuschneidende Bereich im Gewebe markiert und kann nun durch einen Laserstrahl vom Nachbargewebe abgetrennt werden, um dann vom Laser durch einen ultrakurzen Puls vom Objektträger in den Deckel eines *adhesive cap* (Zeiss) katapultiert zu werden.

3.3.21.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus mikrodissezierten Gewebeschnitten

Da RNA bei Raumtemperatur sowie in wässriger Umgebung extrem anfällig für RNasen und der darauffolgenden Degradierung ist, wurden alle Arbeitsschritte der RNA-Isolierung und Aufreinigung möglichst schnell und auf Eis durchgeführt. Für die RNA-Isolierung wurden die

Gewebeabschnitte im Deckel in Lysispuffer (Puffer RLT) mit 1 % β -Mercaptoethanol aufgenommen, 15 min bei RT auf dem Kopf stehend inkubiert und anschließend bei höchster Geschwindigkeit für 30 min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die weitere RNA-Isolierung und Präparation aus dem mikrodisezierten Gewebe nach Herstellerprotokoll aus dem RNeasy®Micro Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Auf diese Weise gewann man die gesamte RNA aus den mikrodisezierten Gewebeschnitten, welche bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert wurden.

3.3.21.6 *RT² Nano PreAmp cDNA Synthese*

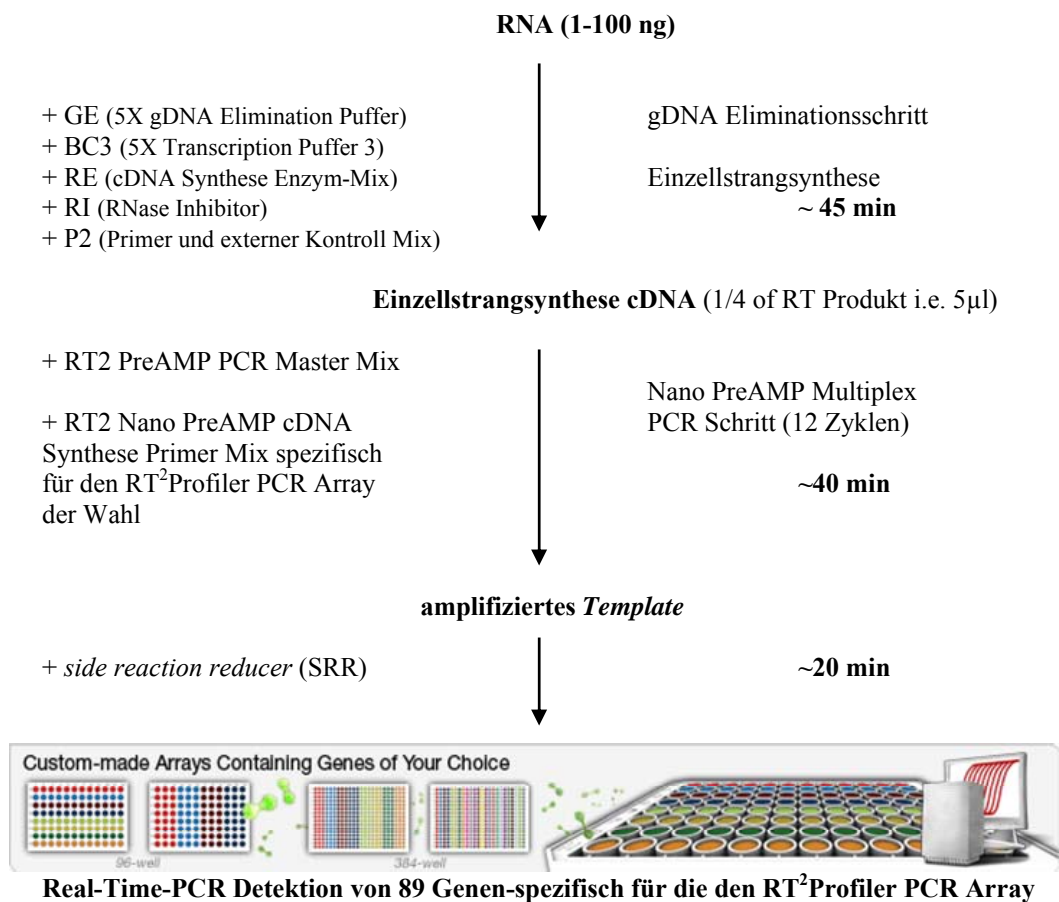
Für die Synthese der cDNA aus der isolierten RNA der mikrodisezierten Gewebeschnitte (3.3.21.5) wurde der *RT² Nano PreAmp cDNA Synthesis Kit* von SABiosciences (Hamburg, Deutschland) verwendet, mit welchem eine Pre-Amplifikation der cDNA von sehr geringen RNA-Mengen (1-100 ng) möglich war. Zuvor wurde die Konzentration der isolierten RNA-Proben mittels eines Eppendorf Photometers bestimmt. Die Konzentrationen wurden auf 10-50 ng totale RNA angeglichen, so dass in der Synthesereaktion gleiche Konzentrationen und Volumina eingesetzt werden konnten. Anschließend erfolgte die reverse Transkription der RNA in cDNA nach Herstellerprotokoll. Das verwendete Kit enthält die Komponenten für die Synthese des cDNA-Einzelstrangs, sowie alle Komponenten für die weitere Amplifizierung der cDNA. Der *RT² PreAmp PCR Master Mix* wurde mit der *RT² Nano PreAmp cDNA* Primermischung (spezifisch) zusammen gemischt und in die PCR-Röhrchen mit der cDNA-Vorlage hinzugefügt. Die *RT² Nano PreAmp cDNA* Primermischung ist für jeden PCR-Array spezifisch und wurde entsprechend dem in dieser Arbeit verwendeten PCR-Arrays ausgesucht. Nach der reversen Transkription wurde die cDNA für 12 Zyklen mit einem Pool aller zu untersuchenden Primern und entsprechenden Sonden pre-amplifiziert.

Folgende PCR-Bedingungen wurden angewendet:

	10 min	95°C (Aktivierung <i>HotStart Taq DNA</i> Polymerase)
12 x	15 s	95°C (Denaturierung)
	2 min	60°C (Synthese)

Nach der Aufarbeitung der Proben mit dem SSR (*side reaction reducer*) konnte die fertige *Nano PreAmp* PCR Reaktion auf Eis oder über Nacht bei -20°C gehalten werden und war damit für den Einsatz im RT-PCR² *Profiler* Array bereit. Bei dieser Methode können rechnerisch bis zu 100 Gene parallel pre-amplifiziert werden, wobei neben inventarisierten Taqman® *gene expression arrays* (SABiosciences, Hamburg, Deutschland) auch selbst entworfene *gene arrays* zum Einsatz kommen können. Nachfolgend ist schematisch der Ablauf der Methode dargestellt.

Arbeitsablauf der RT² Nano PreAmp cDNA Synthese



Total time ~2.5-3 Stunden
(http://www.biomol.de/details/SA/NanoPreAMP_biomol.pdf)

3.3.21.7 Real-Time-PCR mit dem RT² Cytoskeleton Regulators PCR Array

Für die nachfolgende Array Analyse wurde der *Maus Cytoskeleton Regulators PCR Array* (SABiosciences, Hamburg, Deutschland) verwendet. Der in dieser Arbeit eingesetzte PCR-Array gestattet die simultane Untersuchung von 84 Genen, welche das intrazelluläre Gerüst der Biogenese, Organisation, Polymerisation kontrollieren. In der Zelle unterscheiden sich drei Klassen von Zytoskelettfilamenten, die jeweils von unterschiedlichen Proteinen bzw. Proteinklassen gebildet werden, spezifische Begleitproteine besitzen und sich auf verschiedene Weise an den Aufgaben des Zytoskeletts beteiligen. Dazu zählen die Aktinfilamente (oder Mikrofilamente), Intermediärfilamente und die Mikrotubuli. Die regulatorischen Gene für das Zytoskelett wurden durch diesen Array dargestellt, umfassten Calmodulin und Calcineurin, Kinasen und Phosphatasen, relevante ARF und Rho G-Protein-Familien sowie ihre wichtigsten regulatorischen Faktoren. Die komplette Liste der Gene ist auf der SABiosciences Website aufgeführt (http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAMM-088A.html). Alle weiteren Arbeitsschritte richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Es erfolgte das Beladen der 96-well-PCR-Array Platten mit einem Mix aus dem RT² SYBR GREEN/ROX qPCR Master Mix (SABiosciences, Biomol, Hamburg) und der PreAmp PCR Reaktion. Reagenzien für den SYBR Green-Master-Mix waren in dem *Maus Cytoskeleton Regulators PCR Array Kit* (SABiosciences, Hamburg, Deutschland) enthalten und wurden nach dem beigefügten Protokoll vorbereitet und eingesetzt.

Der Reaktionsansatz (2700 µl) setzte sich folgendermaßen zusammen:

1350 µl	2 x SABiosciences RT ² qPCR SYBR Green-MasterMix
102 µl	RT ² Nano PreAMP PCR Reaktion
1248 µl	RNase/DNase-freiem H ₂ O

Jeweils 25 µl des Cocktails wurden anschließend in jedes PCR-Array-well pipettiert und die PCR-Reaktion gestartet. Die quantitative Messung der aRNA-Transkripte wurde an einem

Real-Time-Cycler (ABI PRISM 7900 HT Sequencer, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) mit der *Taqman*-Software (Applied Biosystems) durchgeführt.

Folgende PCR-Bedingungen wurden angewendet:

	10 min	95°C (Aktivierung <i>HotStart Taq DNA</i> Polymerase)
40 x	15 s	95°C (Denaturierung)
	1 min	60°C (Synthese)

Nach Ablauf der PCR-Reaktion wurden die erhaltenen Genexpressionsdaten zur Auswertung und Berechnung in das DataAssist v.2.0 Programm (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) überführt. Durch die Bildung des Quotienten aus der Molekülzahl der zu analysierenden cDNA und der Molekülzahl des *house keeping genes* lassen sich die einzelnen Proben untereinander vergleichen. Normalisiert auf die Expression des *house keeping genes* (Hso90ab1) wurden dann relative Unterschiede in der Genexpression in verschiedenen Proben anhand der $\Delta\Delta C_t$ Methode ermittelt. Der ΔC_t Wert wurde über die Differenz zwischen dem C_t der Probe (*threshold cycle*) vom Zielgen und dem C_t vom *house keeping gene* berechnet. Der C_t -Wert gibt die Zyklenzahl an, bei der die Fluoreszenz zum ersten Mal einen gewählten Schwellenwert überschreitet. Der $\Delta\Delta C_t$ Wert wurde dann über die Differenz von den ΔC_t Werten der zu vergleichenden Proben berechnet. Der relative Expressionsunterschied (RQ) zwischen zwei Proben kann dann über die Formel $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ bestimmt und analysiert werden.

3.3.22 Statistik

Alle Daten in der vorliegenden Arbeit wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Mittels Student's t-Test wurde überprüft, ob sich zwei unabhängige Datengruppen signifikant voneinander unterscheiden. Voraussetzungen für den Test sind annähernde Normalverteilung und hohe Varianzhomogenität¹⁶⁴. Der resultierende Wert p beschrieb dabei die Wahrscheinlichkeit, mit der die Stichproben einander ähnelten, wobei eine statistische Signifikanz bei einem p-Wert von $\leq 0,05$ gegeben war (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$). Die

Berücksichtigung eines internen Standards (*house keeper* = Aktin bzw. Hso90ab1), welcher nahezu konstant pro eingesetzter RNA war, hat gezeigt, dass sich in der vorliegenden Arbeit die interexperimentelle Variabilität in akzeptablen Grenzen hielt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Etablierung eines *ex vivo*-Modells zum Studium der Interaktion zwischen *H. pylori* und primären Mageneithelzellen

Frühere Studien zur Analyse der *H. pylori*-Infektion der humanen Magenmukosa verwendeten zumeist Magenkarzinom-Zelllinien wie die AGS-Zelllinie^{165,166} oder die Nierenkarzinom-Zelllinie MDCK (Hund)¹⁶⁷. Die Magenkarzinom-Zelllinie AGS bildet jedoch kein polarisiertes Epithel aus. Dies wiederum ist der Vorteil der MDCK-Zelllinie, da diese aber aus einem anderen Gewebe und einer anderen Spezies (Hundeniere) isoliert ist, entspricht die Verwendung von isolierten primären Epithelzellen aus dem Magen am ehesten der Situation *in vivo*. Als Mausmodell ist eine murine Magenkarzinom-Zelllinie (CLS103) kommerziell erhältlich. Diese kann wie beschrieben (vgl. 3.3.4) in Zellkulturgefäßen gehalten werden (Abb 12B). Um jedoch ein optimales Mausmodell mit intakten Interzellularkontakten *in vitro* zu finden, wurden aus 12-20 Wochen alten Mäusen (C57BL/6/WT) Mägen präpariert (vgl. 3.3.3), um primäre Epithelzellen (Abb. 12A) zu isolieren und zu kultivieren (vgl. 3.3.5). Anhand von Phasenkontrastaufnahmen wurde die Entwicklung der Zelllinien über einen Verlauf von 2 Wochen dokumentiert. Direkt nach der Aussaat waren unter dem Mikroskop zunächst nur Zellfragmente der Primärkultur zu erkennen, aus denen innerhalb von 12 Stunden kleine Primärzellcluster auswuchsen. Die Magenkarzinom-Zellen (CLS103) wuchsen deutlich schneller, zeigten jedoch eine stärker spindelzellige Morphologie und neigten kaum zur Clusterbildung, sondern eher zum Einzelzellwachstum bis zu einer Wachstumsdichte von ~60 %. In Abbildung 12 (A und B) sind typische Wachstumsmuster für beide Zellarten dargestellt. Die CLS103-Zelllinie bildete in kurzer Zeit (1-2 Tage) einen nahezu dichten, einschichtigen Zellrasen aus, während die primären Epithelzellen der Maus ihre clusterartige Struktur beibehielten und innerhalb dieser weiter auswuchsen. Die Zell-Zell-Adhäsion blieb also über mindestens eine Woche intakt, wie es bereits für die humanen primären Mageneithelzellen beschrieben wurde¹⁶⁸.

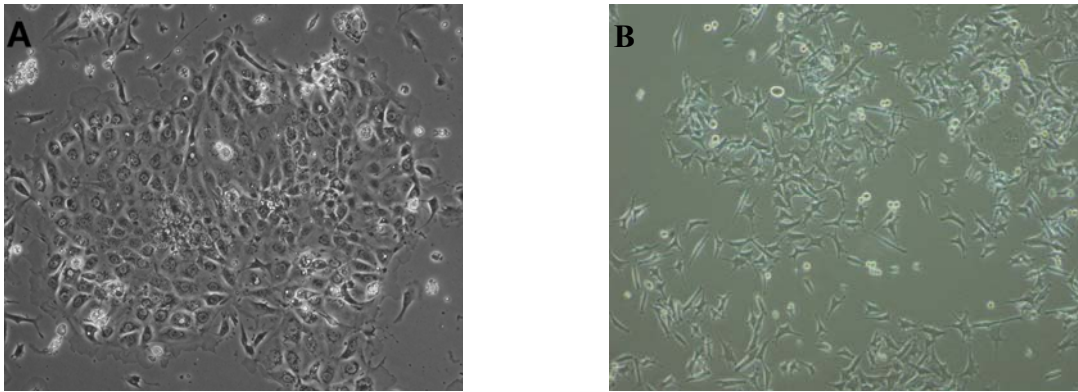


Abb. 12: Phasenkontrastaufnahmen in 100-facher Vergrößerung (Nikon, Düsseldorf) der primären Epithelzellen und der CLS103-Zelllinie.

Abb. A zeigt die isolierten primären Epithelzellen von C57BL/6WT-Mäusen und im Vergleich dazu, die in Abb. B aufgenommene murine Magenkarzinom-Zelllinie CLS103. Beide Zelllinien wurden auf 6-well-Platten kultiviert. Die Aufnahmen erfolgten 24 h nach Präparation bzw. Aussaat.

4.2 *H. pylori*-induzierte Aktivierung von CTSX in primären Epithelzellen

Die Stimulation von CTSX durch *H. pylori* wurde bislang nur in humanen Magenkarzinom-Zelllinien (N87; AGS) und in ko-kultivierten Makrophagen-Zelllinien (THP-1; U937) *in vitro* gezeigt^{146,160}. Daten für die Expression von CTSX im Mausmagen lagen zu Beginn der Dissertation nicht vor, daher wurde zunächst die Expression von CTSX vor und nach *H. pylori*-Infektion in primären Magenepithelzellen im Vergleich zur etablierten Zelllinie näher untersucht. Hierzu wurde die murine Magenkarzinom-Zelllinie (CLS103) in 6-well-Platten kultiviert. Parallel erfolgte die Isolierung der primären Magenepithelzellen aus Mäusen (C57BL/6/WT) im Alter von 12-20 Wochen (vgl. 3.3.5) mit einer darauffolgenden Infektion beider Zellarten mit dem *H. pylori* SS1 (vgl. 3.3.6). Außerdem wurden nicht-infizierte Zellen als Kontrollen mitgeführt. Die Expression von CTSX in den primären Epithelzellen im Vergleich zu der Magenkarzinom-Zelllinie CLS103 wurde nun auf mRNA-Ebene mit Hilfe der qPCR am *LightCycler* (vgl. 3.3.13) analysiert und in Abbildung 13 dargestellt. Die Expressionsanalysen zeigten, dass CTSX in beiden infizierten Zelltypen exprimiert wurde. Für beide Zelltypen konnte nach *H. pylori*-Infektion eine erhöhte Expression an CTSX im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollzellen nachgewiesen werden. Jedoch nur in den primären Magenepithelzellen (pEWT) erfolgte tatsächlich eine signifikante (17-fache) Steigerung von CTSX ($p = 0,0032$) (Abb. 13).

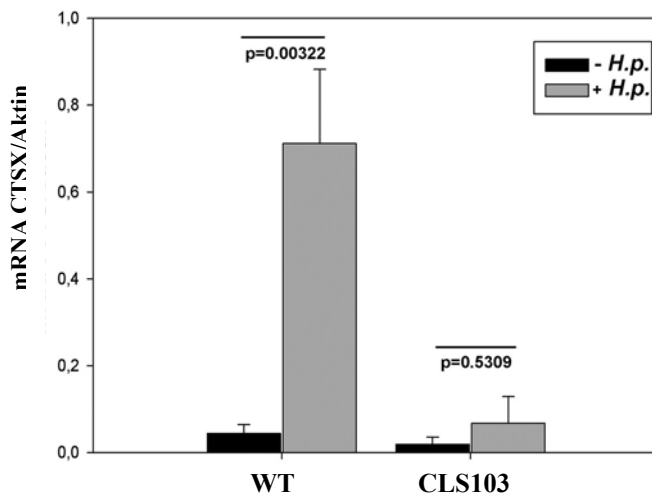


Abb. 13: *H. pylori*-induzierte Aktivierung von CTSX in primären und etablierten Magenepithelzellen *ex vivo*.

Primäre Epithelzellen (WT) und die murine Magenkarzinom-Zelllinie CLS103 wurden mit *H. pylori* SS1 (+*H.p.*) infiziert. Nicht-infizierte Zellen galten als Kontrollen (-*H.p.*). Die Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels qPCR die Expression von CTSX in den einzelnen Zellen analysiert. Die CTSX-Expression nach *H. pylori*-Infektion war in den primären WT-Zellen 13-fach höher als in den CLS103. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte + Standardfehler der CTSX-Expression. Als Signifikanztest wurde der t-Test verwendet; als signifikant galt ein p-Wert < 0,05.

4.3 Quantitative Bestimmung der bakteriellen Kolonisation der primären Epithelzelllinien

Zur Feststellung und Kontrolle der quantitativen *H. pylori*-Besiedlung der primären Epithelzellen wurden die Zellen (CLS103 und die isolierten primären Epithelzellen) (vgl. 3.3.8) ausgesät und wieder mit *H. pylori* SS1 infiziert. Die Zelllysate wurden anschließend auf *Helicobacter*-Platten ausplattiert und nach viertägiger Inkubation erfolgte die Bestimmung der Kolonie-bildenden-Einheiten (CFU/ml der einzelnen Verdünnungsstufen (1:10, 1:100, 1:1000)). Die Abbildung 14 zeigt, dass die Anzahl der CFUs (*colony forming units*) bei infizierten primären Magenepithelzellen deutlich höher war als bei der murinen Magenkarzinom-Zelllinie CLS103. Damit waren die isolierten primären Epithelzellen aus C57BL6/WT-Mäusen mit einer größeren Bakterienlast assoziiert. Somit konnte gezeigt werden, dass die isolierten primären Epithelzellen aus Magenbiopsien der Maus ein geeignetes, optimales Mausmodell *in vitro* darstellen, um die CTSX-Expression, Regulation und Funktion in der *H. pylori*-infizierten Magenmukosa zu analysieren.

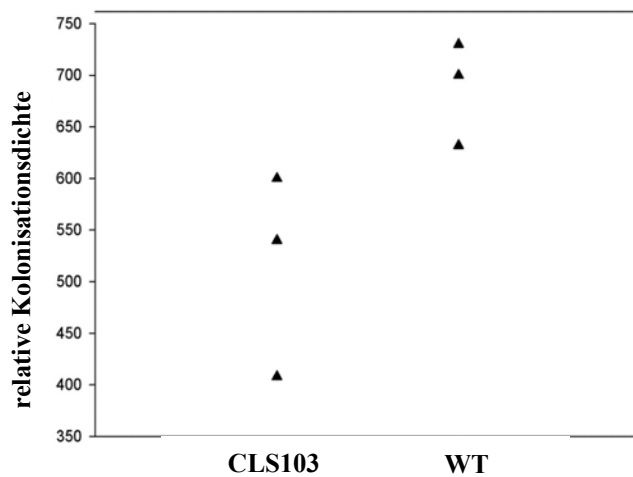


Abb. 14 Quantitative Kultur zur Bestimmung der bakteriellen Kolonisation der primären Epithelzellen und CLS103.

Gezeigt ist, dass die Anzahl der CFUs (*colony forming units*) bei infizierten (+*H. pylori* SS1) primären Magenepithelzellen deutlich höher war als bei der murinen Magenkarzinom-Zelllinie CLS103 (+*H. pylori* SS1). Die Werte der Abb. sind als relative Kolonisationsdichte pro ml der einzelnen Verdünnungsstufen dargestellt. Jede Raute repräsentiert einen Versuch.

4.4 Expression von Cathepsinen-Vergleich der Situation *in vivo* und Modell *in vitro*

Nach Etablierung des Zellmodells *in vitro* wurde dieses auf die genmanipulierten Mäuse (*ctsb^{-/-}*, *ctsx^{-/-}*) übertragen und zunächst das allgemeine Expressionsmuster der relevanten Cathepsine (CTSX/B/L/K) im Vergleich zum kompletten Magengewebe der WT und der Cathepsin-defizienten Mäuse untersucht, um die Qualität der etablierten Zellmodelle hinsichtlich ihrer Cathepsinexpression bewerten zu können. Hierzu wurden nicht-infizierte Mäuse (WT, *ctsx^{-/-}*, *ctsb^{-/-}*) im Alter von 12 bis 20 Wochen getötet, der Magen entnommen und die gesamte RNA isoliert. Die RNA der primären Epithelzellen und der korrespondierenden Mägen wurde umgeschrieben und mittels qPCR die Expression der CTSX/B/L und K untersucht (Abb. 15). Die relative Expression der Cathepsine im Gewebe (Abb. 15A) ist mit dem Expressionsniveau in den primären Magenepithelzellen vergleichbar (Abb. 15B). Die Expression von CTSX ist im *ctsb^{-/-}*-Gewebe verdoppelt und in den *ctsb^{-/-}*-Zellen sogar versechsfacht im Vergleich zum jeweiligen WT-Status. Ähnlich verhielt sich die Expression von CTSL, welches in den *ctsx^{-/-}*-Mägen um das 1,7-fache und in den isolierten primären *ctsx^{-/-}*-Zellen um das 2,7-fache erhöht ist. Im Vergleich zu den WT-Mäusen wurden CTSB und CTSK in den *ctsb^{-/-}*- und in den *ctsx^{-/-}*-Mäusen bis zu 100-fach stärker exprimiert. Damit entspricht die Verwendung primärer Epithelzellen der Situation *in vivo*, auch wenn die Expression der Cathepsine in den primären Magenepithelzellen ~2-fach niedriger war als in dem

isoliertem Mausgewebe. Zusammenfassend war erkennbar, dass die genmanipulierten Mägen (*ctsx*^{-/-} und *ctsb*^{-/-}-Zellen sowie Gewebe) signifikant mehr Cathepsine exprimierten als im WT.

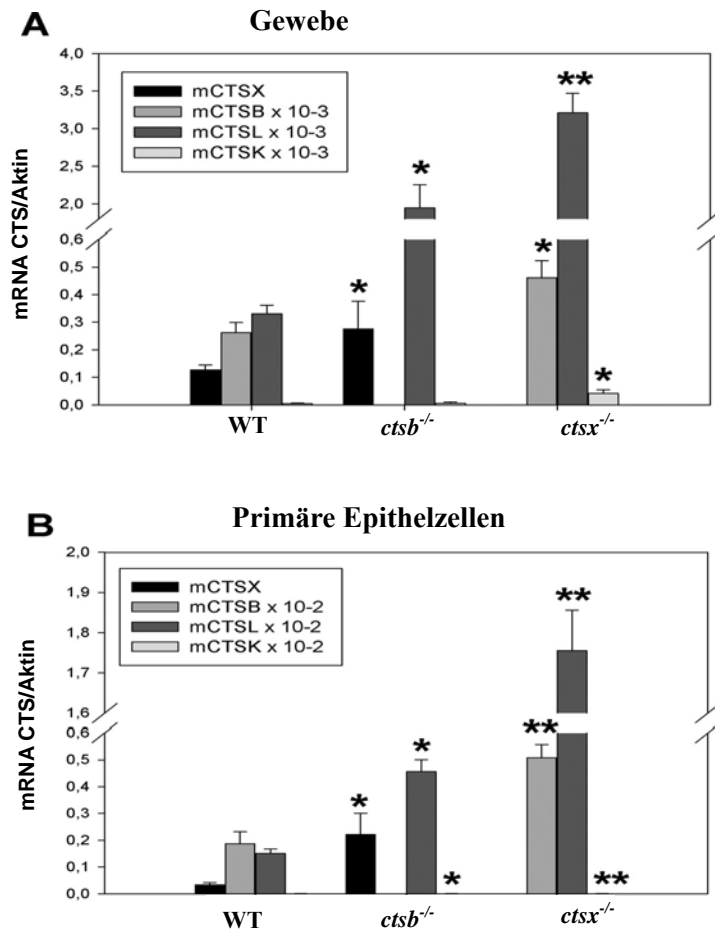


Abb. 15: Expression von CTSX/B/L/K im kompletten Magengewebe der Maus und in isolierten primären Epithelzellen.

Die Expression der Cathepsine war in den primären Epithelzellen 2-fach niedriger als im isolierten Magengewebe. Die CTSX-Expression war im *ctsb*^{-/-}-Gewebe doppelt und in den *ctsb*^{-/-}-Zellen sogar sechsfach erhöht. Ebenso kam es zu einer verstärkten Expression an CTSB gegenüber der Expression im jeweiligen WT, welche in den *ctsx*^{-/-}-Mägen um das 1,7-fache und in den isolierten primären *ctsx*^{-/-}-Zellen um das 2,7-fache anstieg. Im Vergleich zu den WT-Mäusen wurde in den *ctsx*^{-/-}- und *ctsb*^{-/-}-Mäusen das CTSL und das CTSK bis zu 100-fach gesteigert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte (n=3). Bei dem Vergleich von WT und *knock-out*-Variante wurde der t-Test verwendet und die Signifikanz im Diagramm wie folgt (*, p ≤ 0,05; **, p ≤ 0,01) dargestellt.

4.5 Induktion von proinflammatorischen Zytokinen in Mono- und Ko-Kulturen nach *H. pylori*-Infektion

Das Immunsystem dient dem Organismus als körpereigene Abwehr gegen fremde Zellen und Antigene^{169,170}. Dabei nehmen die Monozyten/Makrophagen im Immunsystem eine entscheidene Rolle ein, da sie an der Produktion von Zytokinen wie IL-6 und TNF- α beteiligt sind, welche der Steuerung des Immunsystems dienen¹⁷¹. Da *H. pylori* die Produktion von Entzündungs-assoziierten Zytokinen und Chemokinen in den Wirtszellen stimuliert^{74,172}, wurde nun der Einfluss von *H. pylori* auf die Expression von solchen Mediatoren im Zusammenhang mit der Expression von CTSX untersucht. Da zusätzlich die Makrophagen als Hauptquelle der Expression von CTSX identifiziert sind, diese aber, entgegen den Epithelzellen, nicht in direktem Kontakt mit dem Bakterium stehen, wurden Ko-Kulturversuche mittels Transwell®-Filtersystemen durchgeführt (Abb. 16). Zum Vergleich wurden in der vorliegenden Dissertation die Expression an Zytokinen in Mono-Kulturen, der in den Ko-Kulturen (primäre Epithelzellen kultiviert mit der Makrophagen-Zelllinie J774A.1) gegenübergestellt. Die primären Epithelzellen (WT, *ctsx*^{-/-}) wurden kultiviert (vgl. 3.3.5), in die untere Kammer einer 6-well-Platte eingesät und dort mit dem *H. pylori* SS1 (MOI50) infiziert (vgl. 3.2.7). Zur gleichen Zeit erfolgte die Kultivierung der Makrophagen-Zelllinie (J774A.1) (vgl. 3.3.4), die in die oberen Kammern gesetzt wurden (Abb. 17). Als Kontrollen dienten die jeweiligen nicht-infizierten Varianten. Beide Zell-Kompartimente waren durch eine Membran von 0,4 μm Porengröße getrennt, welche die freie Diffusion von beispielsweise Mediatoren ermöglichte, die Bakterien jedoch im unteren Bereich zurückhielten. Diese Anordnung sollte in etwa der Situation *in vivo*, bei der die Makrophagen auch nicht in direktem Kontakt mit dem *H. pylori* gelangen, entsprechen.

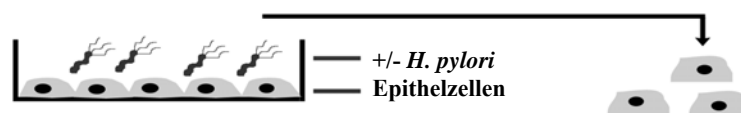


Abb. 16: Infektionsexperiment von Mono-Kulturen.

Wie in dieser Abb. dargestellt, wurden für die Mono-Kulturen die isolierten primären Epithelzellen (WT; *ctsx*^{-/-}) einzeln auf Gewebeplatten kultiviert und mit/ohne *H. pylori* SS1 (MOI50) infiziert.

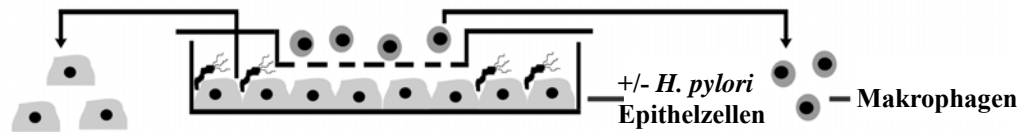


Abb. 17: Infektionsexperiment von Ko-Kulturen mittels Transwell®-Filtersystem.

Die primären Epithelzellen (WT, *ctsx*^{-/-}) wurden isoliert, in die untere Kammer einer 6-well-Platte eingesät und mit dem *H. pylori* SS1 (MOI50) infiziert. Die Makrophagen-Zelllinie (J774A.1) wurde in die obere Kammer gesetzt. Beide Zell-Kompartimente waren durch eine Membran von 0,4 µm Porengröße getrennt.

Wie in Abbildung 16 dargestellt, wurden für die Mono-Kulturen die isolierten primären Epithelzellen einzeln auf Gewebepplatten kultiviert und mit/ohne dem *H. pylori* SS1 (MOI50) infiziert. Die infizierten und nicht-infizierten Kulturen wurden für 8 h bei 37 °C inkubiert und anschließend die Expression der Zytokine/Chemokine CXCL1, IL-6, IL-1β, MCP-1 in den mono- und ko-kultivierten primären Epithelzellen (WT, *ctsx*^{-/-}) und der Makrophagen-Zelllinie (J774A.1) mittels qPCR (vgl. 3.3.13) analysiert (Abb. 18, 19).

In den ko-kultivierten WT-Epithelzellen wurde das Zytokin CXCL1 35-fach weniger exprimiert als in den mono-kultivierten Zellen (Abb. 18A und B), mit einer 7,4-fachen Steigerung in den ko-kultivierten und einer 10,2-fachen Erhöhung in den mono-kultivierten WT-Epithelzellen nach *H. pylori*-Stimulation (Abb. 18D und C). In der Abbildung 18C ist außerdem der CXCL1-Anstieg in den *ctsx*^{-/-}-primären Epithelzellen nach *H. pylori*-Infektion dargestellt. Obwohl die Expression an CXCL1 in den mono-kultivierten *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen geringer war als in den mono-kultivierten WT-Epithelzellen ist nach *H. pylori*-Infektion eine vergleichbare CXCL1-Konzentration im WT und in den *ctsx*^{-/-}-Zellen zu verzeichnen (Abb. 18A und C). Wie auch schon bei den isolierten WT-Zellen, wurde das Zytokin CXCL1 in den ko-kultivierten *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen weniger exprimiert als in den Mono-Kulturen (Abb. 18B), aber die Steigerung der Expression nach der *H. pylori*-Infektion war in beiden Zellkulturen (Mono- und Ko-Kulturen) vergleichbar (Abb. 18C und D). Eine Tendenz zur höheren Expression an CXCL1 nach Infektion war in den *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen im Vergleich zu den WT-Zellen erkennbar (Abb. 18D).

Da das Chemokin IL-6 einer der wichtigsten Vermittler der *H. pylori*-induzierten granulozytären Infiltration ist ^{173,174}, wurde dessen Expression in der Magenschleimhaut quantifiziert und analysiert. Verglichen mit den WT-Epithelzellen war die Expression

signifikant geringer in den *ctsx*^{-/-}-mono-kultivierten ($p \leq 0,001$) und ko-kultivierten ($p = 0,06$) primären Epithelzellen (Abb. 18A und B). Nach der Infektion mit dem *H. pylori* SS1 erfolgte ein signifikanter Anstieg ($p = 0,044$) der Expression von IL-6 in den *ctsx*^{-/-}-ko-kultivierten Primärzellen im Gegensatz zur Expression in den WT-Zellen (Abb. 18D).

Interleukine, wie das proinflammatorisch wirksame IL-1 β erfüllen ebenfalls wichtige Aufgaben bei der Modulation der Immunantwort^{175,176}. Das Expressionsniveau von IL-1 β war ähnlich dem von IL-6 in den mono- und ko-kultivierten WT-Epithelzellen (Abb. 18A-D), mit einer 4,5-fachen Induktion durch *H. pylori* in den Mono-Kulturen (Abb. 18C). Die Menge an IL-1 β in den *ctsx*^{-/-}-mono-kultivierten primären Epithelzellen war kaum nachweisbar (Abb. 18A). Die Expression von IL-1 β war in den *ctsx*^{-/-}-ko-kultivierten Epithelzellen im Vergleich zu den WT-Zellen signifikant kleiner ($p = 0,006$) (Abb. 18B). Eine Stimulation mit *H. pylori* löste ebenfalls keine Induktion von IL-1 β aus (Abb. 18D).

Zur weiteren Charakterisierung von anti-inflammatorischen Prozessen in der *H. pylori*-infizierten Magenschleimhaut wurde die Expression des Chemokins MCP-1 in gleicher Weise quantifiziert. Abbildung 18A und B zeigen, dass das MCP-1 in den *ctsx*^{-/-}-Zellen weniger exprimiert wurde, im Vergleich zu den mono- und ko-kultivierten WT-Epithelzellen (Abb. 18A und B). Außerdem waren keine signifikanten Unterschiede infolge der *H. pylori*-Infektion auf die Induktion von MCP-1 in den *ctsx*^{-/-}- und WT-Zellen ersichtlich (Abb. 18C und D).

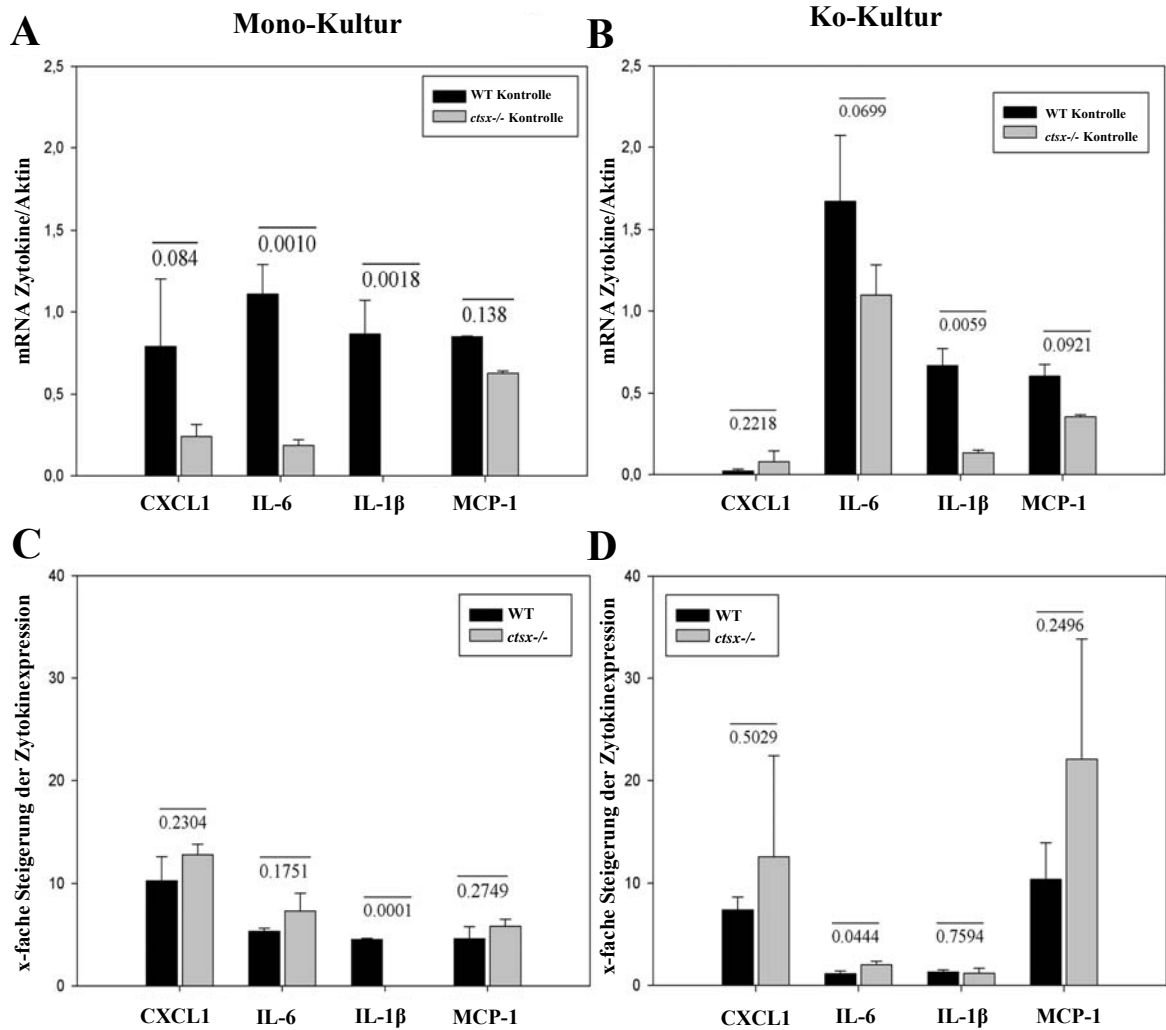


Abb. 18: Induktion von proinflammatorischen Zytokinen in Mono- und Ko-Kulturen nach *H. pylori*-Infektion.

Die primären Epithelzellen (WT; *ctsx*^{-/-}) wurden isoliert, mono- und ko-kultiviert mit der Makrophagen-Zelllinie (J774A.1), mit dem *H. pylori* SS1 infiziert (Abb. 16 und 17) und die Expression der Zytokine (CXCL1, IL-6, IL-1 β) bzw. des Chemokins MCP-1 analysiert. **A-B**, Dargestellt ist die basale Zytokinexpression von nicht-infizierten WT- und *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen. **C-D**, Dargestellt ist die X-fache Steigerung der Zytokinexpression nach Infektion mit dem *H. pylori* SS1. Die Werte setzen sich zusammen aus dem Quotienten der Expressionsdaten der Zytokine vor und nach *H. pylori*-Infektion. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte + Standardfehler der Zytokinexpression. Als Signifikanztest wurde der t-Test verwendet; als signifikant galt ein p-Wert < 0,05.

Eine Signifikanz ließ sich jedoch bei der Expression an MCP-1 in den Makrophagen-Zellen (J774A.1) ko-kultiviert mit den *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen erkennen. Die Expression von MCP-1 war in den Makrophagen-Zellen (J774A.1) ko-kultiviert mit den WT-Epithelzellen signifikant schwächer ($p = 0,048$) im Vergleich zu den mit *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen ko-kultivierten Makrophagen-Zellen (Abb. 19A). Dessen ungeachtet hatte die Infektion mit *H. pylori* SS1 keinen Einfluss auf den Anstieg der Expression von MCP-1 in den jeweiligen Zellkulturen (Abb. 19B). Die Makrophagen (J774A.1) exprimierten generell wenig CXCL1, was sich auch nicht nach einer *H. pylori*-Stimulation der primären Epithelzellen änderte (Abb. 19A und B). Bei genauerer Betrachtung der Expression von IL-6, die in den ko-kultivierten Makrophagen-Zellen noch sehr gering ausfiel (Abb. 19A), war eine Steigerung der Expression an IL-6 nach *H. pylori*-Infektion in beiden ko-kultivierten Makrophagen (WT und *ctsx*^{-/-}) erkennbar. Der Anstieg von IL-6 war in den *ctsx*^{-/-}-ko-kultivierten Makrophagen-Zellen (J774A.1) signifikant höher ($p = 0,0218$) als in den WT-Zellen (Abb. 19B). Die Expression von IL-1 β , welches keine Induktion in den ko-kultivierten Epithelzellen nach *H. pylori*-Infektion zeigte, stieg jedoch in den Makrophagen (J774A.1) ko-kultiviert mit den *ctsx*^{-/-}- und WT-Epithelzellen um das 12- bis 25-fache an, wobei es keine signifikanten Unterschiede zwischen den WT- und *ctsx*^{-/-}-ko-kultivierten Makrophagen-Zellen gab (Abb 19B).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Expression der untersuchten Zytokine/Chemokine (CXCL1, IL-6, IL-1 β , MCP-1) in den *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen geringer war als in den WT-Epithelzellen. Eine Zytokininduktion nach *H. pylori*-Infektion in den *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen war tendenziell stärker als in den zu vergleichenden WT-Zellkulturen. Auffällig war die 18-fach höhere Expression an MCP-1 in den Makrophagen-Zellen (J774A.1) ko-kultiviert mit den *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen, ebenso wie die stärkere Induktion aller Zytokine im Vergleich zu den Makrophagen-Zellen (J774A.1) ko-kultiviert mit den WT-Epithelzellen.

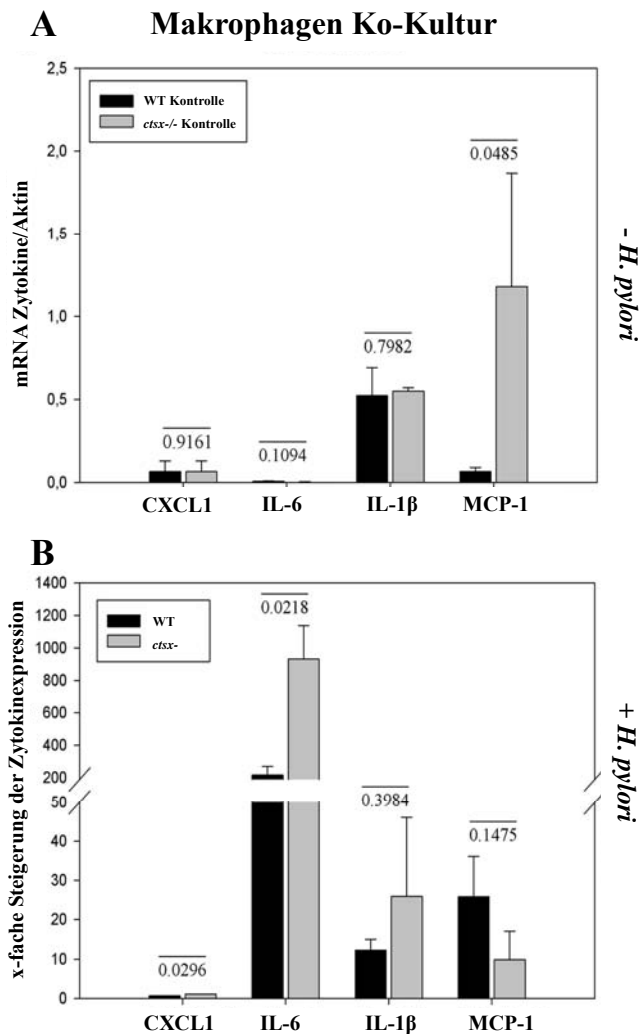


Abb. 19: Induktion von proinflammatorischen Zytokinen in ko-kultivierten Makrophagen nach *H. pylori*-Infektion.

Die Makrophagen-Zelllinie (J774A.1) wurde ko-kultiviert mit primären Epithelzellen (WT; *ctsx*^{-/-}) mit dem *H. pylori* SS1 infiziert und die Expression der Zytokine (CXCL1, IL-6, IL-1β) bzw. des Chemokins MCP-1 in den ko-kultivierten Makrophagen analysiert.

A, Dargestellt ist die basale Expression der Zytokine von nicht-infizierten Makrophagen-Zellen (J774A.1) ko-kultiviert mit den WT- und *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen.

B, Dargestellt ist die X-fache Steigerung der Expression der Zytokine nach Infektion mit dem *H. pylori* SS1.

Die Werte setzen sich zusammen aus dem Quotienten der Expressionsdaten der Zytokine vor und nach *H. pylori*-Infektion. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte + Standardfehler der Zytokinexpression. Als Signifikanztest wurde der t-Test verwendet, als signifikant galt ein p Wert < 0,05.

4.6 Analyse von Genen der adaptiven Immunabwehr in WT- und *ctsx*^{-/-}-primären Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *H. pylori* SS1

Zum Schutz vor eindringenden Erregern entwickelten alle mehrzelligen Organismen schon früh in der Evolution Abwehrmechanismen, um Pathogene zu zerstören und ihre Virulenzfaktoren zu neutralisieren¹⁷⁷. Diese Form der Abwehr wird als angeborene Immunität bezeichnet. Erst im Laufe der Evolution entwickelte sich zusätzlich zur angeborenen Immunität, das so genannte adaptive (spezifische) Immunsystem, welches ein

gezieltes Vorgehen gegen Erreger ermöglicht¹⁷⁸. Die Infektion mit *H. pylori* steigert die Produktion von Entzündungs-assoziierten Zytokinen und Chemokinen in den Wirtszellen^{74,172}. Neben dieser proinflammatorischen Immunreaktion induziert *H. pylori* auch eine regulatorische T- und B-Zell-Antwort^{179,180,181}. Um herauszufinden, wie sich in dieser Hinsicht das mRNA Gen-Expressionsmuster von WT- und *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen unter Einfluss von *H. pylori*-Stimulation verändert, wurde ein cDNA-Mikroarray (*Oligo GEArray*® *Mouse T-cell and B-cell Activation Mikroarray*) gewählt. Dieser gestattete die simultane Untersuchung von 113 Genen, welche an der T- und B-Zell-Aktivierung, Proliferation und Differenzierung, den wichtigsten Schritten der adaptiven Immunität, beteiligt sind. Die RNA aus den primären Epithelzellen (infizierte und nicht-infizierte WT- und *ctsx*^{-/-}-Mäuse) wurde zu einer markierten cRNA transkribiert und die Synthese richtete sich, wie auch die anschließenden Arbeitsschritte, nach den Angaben des Herstellers (*TrueLabelingAMP*TM 2.0 und *ArrayGrade*TM *cRNA Cleanup* Kit). In Tab. 4 sind die Expressionsverhältnisse (vor/nach *H. pylori*-Infektion) der WT- und *ctsx*^{-/-}-primären Epithelzellen dargestellt. Diese wurden pro Blot ermittelt und nachfolgend die wichtigsten mittels qPCR kontrolliert. Die entgültigen Ergebnisse wurden als x-fache Veränderungen ausgedrückt (nach der Formel: Infektion/Kontrolle). Nach Normalisierung und Korrektur der Daten konnte für die Mehrheit der Gene kein Unterschied in der Expression zwischen WT- und *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen nach einer Infektion mit *H. pylori* SS1 gefunden werden. In den *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen gab es jedoch 12 differentiell exprimierte Gene, deren Expression nach *H. pylori*-Infektion um mindestens 1,5-fach heraufreguliert wurden. Einige von diesen Genen, zum Beispiel *ccnd3*, *ap3b1* und *gadd45g*, zeigten in den WT-Zellen kein verändertes Expressionsmuster nach *H. pylori*-Stimulation (Tab. 4). Interessanterweise sind 8 dieser 12 Gene in T-Zell- oder B-Zell-Proliferation beteiligt, während nur vier Gene in der T- und B-Zell-Differenzierung reguliert werden. Einbezogen wurden nur Gene, die mindestens um den Faktor 1,5 im Vergleich zur Kontrolle herauf- oder herunterreguliert wurden. Die Ergebnisse der qPCR stimmten weitgehend mit denen des Mikroarrays überein. Am herausragendsten war die 3-fache Steigerung der Expression von *spp1* in den *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen, gefolgt von *cd81* (2-fache Steigerung) nach *H. pylori*-Infektion. Die Induktion von *hmgb3*, *inpp5d* und *ccnd3* im Mikroarray, konnte mit Hilfe der qPCR nicht validiert werden. Darüber hinaus wurde

festgestellt, dass das *glmn* als einziges Gen stärker in den WT-Zellen heraufreguliert wurde. Dennoch wurde die Mehrzahl der Gene in den *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen stärker heraufreguliert im Vergleich zu den WT-Epithelzellen nach *H. pylori*-Infektion.

Tab. 4: Expressionsprofil von Genen der adaptiven Immunabwehr nach *H. pylori*-Infektion in WT- und *ctsx*^{-/-}-Primärepithelzellen.

Die Expressionsverhältnisse (vor/nach *H. pylori*-Infektion) wurden pro Blot und mittels qRT-PCR ermittelt und die entgültigen Ergebnisse als x-fache Veränderungen ausgedrückt (infiziert/nicht-infiziert). Die Mehrzahl der gezeigten Gene wurde in den *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen nach *H. pylori*-Infektion heraufreguliert.

	Mikroarray		qPCR (± SD)	
	WT -fach	<i>ctsx</i> ^{-/-} -fach	WT -fach	<i>ctsx</i> ^{-/-} -fach
B-Zell Proliferation				
<i>cd81</i>	1,40	2,12	1,43 ± 0,4	2,01 ± 0,6
<i>cdkn1a</i>	1,06	1,76	1,07 ± 0,4	1,60 ± 1,2
<i>prkcd</i>	1,52	1,90	1,05 ± 1,0	1,20 ± 0,8
B-Zell Differenzierung				
<i>hmgb3</i>	1,42	2,19	-	-
<i>inpp5d</i>	1,61	1,70	-	-
T-Zell Proliferation				
<i>ccnd3</i>	-	1,90	-	-
<i>glmn</i>	1,23	1,97	2,01 ± 1,2	1,70 ± 0,1
<i>il-18</i>	1,50	1,75	1,32 ± 0,1	1,59 ± 0,1
<i>il-10</i>	1,55	1,65	-	-
<i>spp1</i>	1,02	2,62	1,05 ± 0,9	3,03 ± 0,1
T-Zell Differenzierung				
<i>ap3b1</i>	-	1,85	1,09 ± 0,1	1,52 ± 0,2
<i>gadd45g</i>	-	1,55	0,51 ± 0,2	1,38 ± 0,1

4.7 Morphologische Veränderungen und Zelluläre Interaktion zwischen den primären Epithelzellen und den Makrophagen

Es ist seit langem bekannt, dass *H. pylori* mit diversen Wirtsproteinen interagiert, Veränderungen im Zytoskelett, zellulären *tight junctions* und der Migration auslösen kann¹⁸². Im Jahre 2005 konnte meine Arbeitsgruppe bereits nachweisen, dass CTSX in humanen Zellkulturen an der *H. pylori*-induzierten Migration beteiligt ist. So stellte sich die Frage, ob

der Verlust von CTSX Auswirkungen auf die Morphologie, zelluläre Migration und zelluläre Interaktion der primären Epithel- und Makrophagen-Zellen der Maus hat. Dafür wurden sogenannte *Scratch Assays* oder Wundheilungs-Tests *in vitro* durchgeführt (vgl. 3.3.15). Es erfolgte die Kultivierung der primären Epithelzellen (WT, *ctsx*^{-/-}) und der Makrophagen-Zelllinie (J774A.1) in gegenüberliegenden Vertiefungen der Inserts, sowie die darauffolgende Infektion ($\pm H. pylori$) der jeweiligen Zellen. Nach der Entfernung der Trennwand wurde die Veränderung der Zellmorphologie und die Interaktion der infizierten und nicht-infizierten Epithelzellen (WT, *ctsx*^{-/-}) mit den Makrophagen-Zellen (J774A.1) mit Hilfe der *Time-lapse* Video Mikroskopie beobachtet. Abbildung 20A zeigt die Interaktion von *H. pylori* SS1-infizierten WT- (2. Reihe, unten) und *ctsx*^{-/-} (4. Reihe, unten) -Epithelzellen mit der Makrophagen-Zelllinie (jeweils oben) über eine Zeitspanne von 60 h. Der Zeitpunkt, an dem die Trennwand entfernt wurde, um die Wunde zu erschaffen, wurde als 0 h definiert. Es kann gesagt werden, dass die *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen deutlich langsamer wanderten ($p \leq 0,05$) als die WT-Zellen, unabhängig vom Infektionsstatus. Darüber hinaus war die Migrationsgeschwindigkeit von den infizierten Zellen und den entsprechenden Makrophagen signifikant niedriger ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollen (Abb. 20B). Innerhalb von 24 bis 48 h, erreichten die primären Epithelzellen die Grenzlinie der Makrophagen-Zellen, wohingegen die Makrophagen nicht innerhalb der ersten 48 h migrierten. Interessanterweise überwucherten die Makrophagen nach dieser Inkubationzeit relativ rasch die Epithelzellen (*-H. pylori*). Diese Beobachtung konnte aber weder in den infizierten primären WT-Epithelzellen noch in den infizierten *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen nachgewiesen werden. Zusammenfassend waren die Makrophagen ko-kultiviert mit den *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen in der Lage, die künstliche Wunde nach 60 h Inkubation früher und schneller zu schließen, als die Makrophagen ko-kultiviert mit den WT-Epithelzellen.

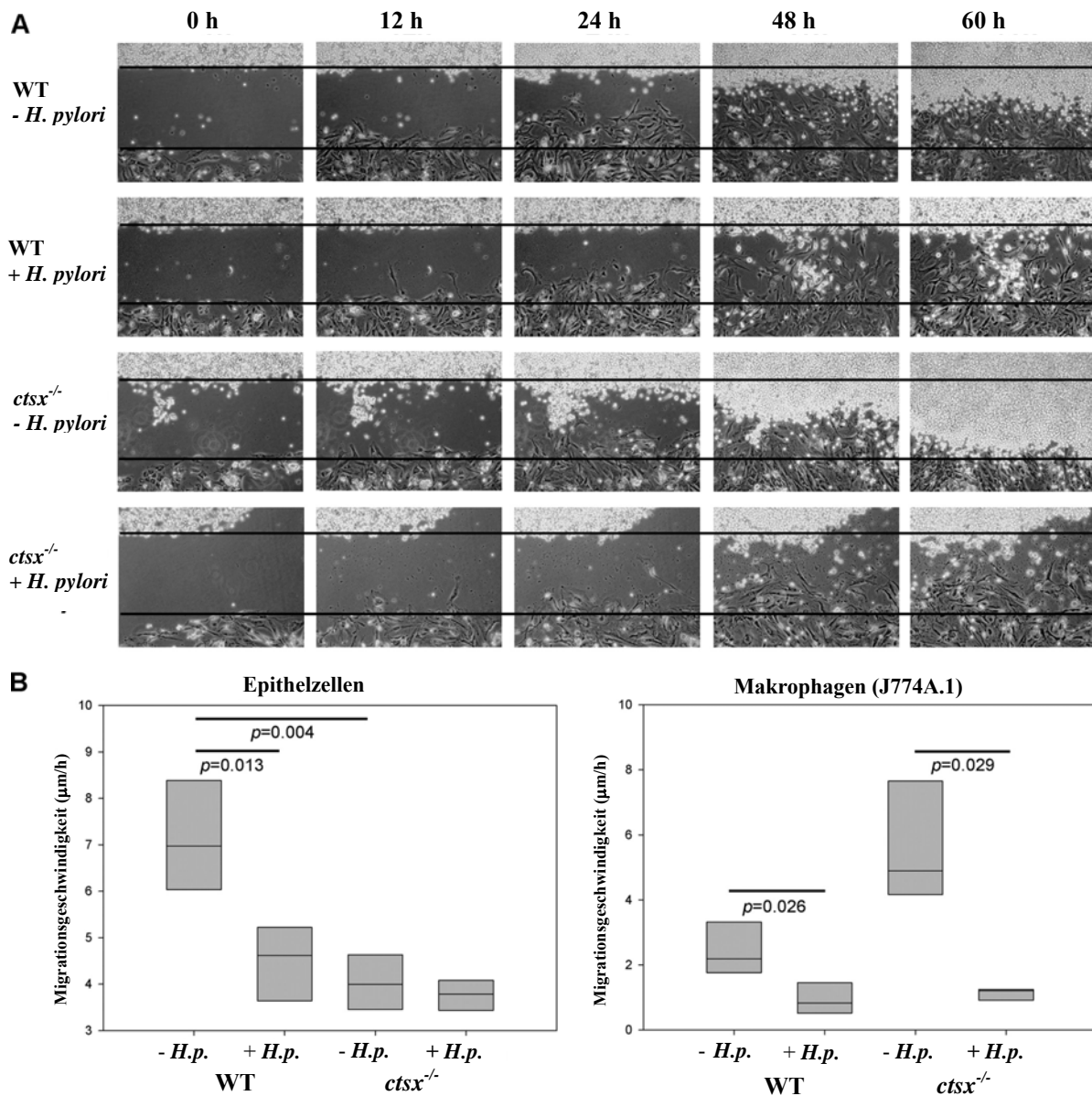


Abb. 20: Zelluläre Interaktion in Konfrontations-Zellkulturen

Um die Interaktion von nicht-infizierten (-*H. pylori*) und infizierten (+*H. pylori*) WT- und *ctsx*^{-/-}-primären Epithelzellen mit der Makrophagen-Zelllinie (J774A.1) über eine Zeitspanne von 60 h zu untersuchen, wurde ein sogenannter *Scratch Assay* durchgeführt. 6 h nach der Infektion wurde die Trennwand entfernt und dieser Zeitpunkt als Punkt 0 h definiert. **(A)** *Time-lapse* Video Mikroskopie mit exemplarischen Bildern von 0-60 h. **(B)** Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeit als Laufstrecke der Zellen in die Wunde in Abhängigkeit von der Zeit. Die Ergebnisse sind als Boxplots mit Medianen dargestellt. Als Signifikanztest wurde der t-Test verwendet; als signifikant galt ein p-Wert < 0,05.

4.8 Expression von MIF-1 in WT- und *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen ko-kultiviert mit Makrophagen

Die ursprünglich erkannte biologische Funktion, als ein Inhibitor der zufälligen Migration von Monozyten und Makrophagen zu agieren, war namensgebend für den *migration inhibitory factor* (MIF). Da MIF nicht nur eine wesentliche Rolle in Zellwachstum und -differenzierung spielt, sondern auch in der Regulation der Wundheilung involviert ist^{183,184,185}, wurde bezugnehmend auf die Ergebnisse des Wundheilungsversuches (vgl. 3.3.15) die Expression des Zytokins MIF-1 im Verlauf der *H. pylori*-Infektion analysiert. Zum Nachweis wurden wieder die primären Epithelzellen (WT, *ctsx*^{-/-}) und die Makrophagen-Zellen (J774A.1), als Mono- und Ko-Kultur gezüchtet ($\pm H. pylori$) (vgl. 3.3.6 und 3.3.7) und mittels Western-Blot Analyse die Expression von MIF-1 (Abb. 21) untersucht. In Abbildung 21 wird deutlich, dass die *H. pylori* SS1-Stimulation in den WT- und *ctsx*^{-/-}-Kulturen keinen Einfluss auf die Expression von MIF-1 hatte. Allerdings wurde ein 5-fach niedrigerer MIF-Proteingehalt in den *ctsx*^{-/-}-Zellen detektiert, im Vergleich zu den WT-Zellen. Ebenso zeigten die ko-kultivierten Makrophagen nur einen geringeren Einfluss der CTSX-Defizienz auf die Expression von MIF-1 nach Infektion mit *H. pylori* (Abb. 21). Diese Ergebnisse könnten dennoch die Tendenz in den Konfrontations-Kulturen erklären, in denen die Makrophagen kultiviert mit den *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen in der Lage sind, die künstliche Wunde früher und schneller zu schließen, als die Makrophagen in Nachbarschaft mit den WT-Epithelzellen.

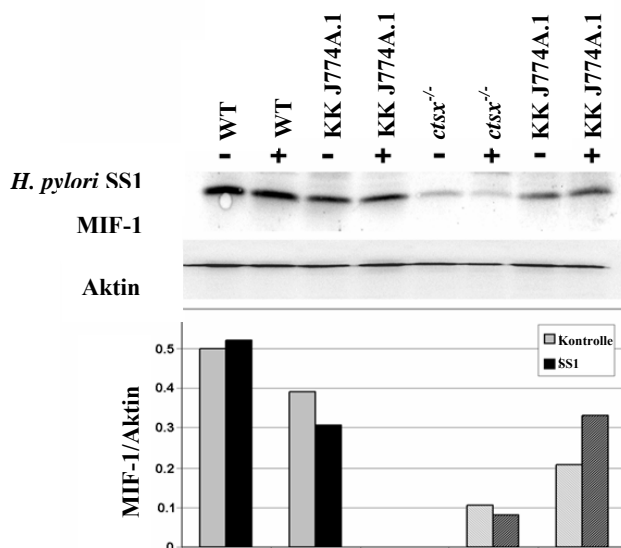


Abb. 21: Expression von MIF-1 in WT- und *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen ko-kultiviert mit Makrophagen (J774A.1).

Primäre Epithelzellen (WT, *ctsx*^{-/-}) und die Makrophagen-Zellen (J774A.1) wurden als Mono- und Ko-Kultur (KK) gezüchtet ($\pm H. pylori$) und mittels Western-Blot die Expression von MIF-1 untersucht. MIF-1 wurde gegen Aktin abgeglichen und die erhaltenen Banden densitometrisch ausgewertet und quantifiziert.

Kombination von Laser-Mikrodissektion und Mikroarray-Analyse zur Identifizierung von spezifischen Regulatoren des Zytoskeletts und der Epithelial-mesenchymalen Transition

Parallel zu dieser Promotionsarbeit liefen die Infektionsexperimente an den WT- und *ctsx*^{-/-}-Mäusen und deren histologische Auswertung. Hierbei konnten morphologisch Unterschiede zwischen den infizierten WT- und *ctsx*^{-/-}-Mäusen definiert werden. Die *ctsx*^{-/-}-Mäuse zeigten eine vermehrte Einwanderung von Makrophagen, erhöhte Proliferation und eine signifikant stärkere Ausprägung der sogenannten SPEM (*spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia*) (Daten nicht gezeigt).

In diesem Teil der vorliegenden Promotion wurden daher mittel Laser-Mikrodissektion eben diese interessanten Bereiche des Magens separiert und eine Mikroarray-Analyse durchgeführt, um potentielle Kandidatengene, die an der Regulation des Zytoskeletts und der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) beteiligt sein könnten, zu identifizieren. Dabei stand nun die Frage im Vordergrund, welchen Einfluss der Verlust der in dieser Arbeit untersuchten Protease CTSX auf die epitheliale Transdifferenzierung in der Magenkarzinogenese besitzt?

4.9 Laser-unterstützte Mikrodissektion

In den letzten Jahren haben technische Fortschritte insbesondere auf dem Gebiet der Laser-unterstützten Mikrodissektion die PCR-Analyse geringster Mengen an Zellen bis auf Einzelzellniveau hin ermöglicht^{186,187,188,189}. Schon zuvor fanden verschiedenste Methoden der Mikrodissektion Anwendung¹⁹⁰. Mit diversen Instrumenten wurden die relevanten Zellen aus dem histologischen Präparat herausgelöst, jedoch hatten die meisten dieser Verfahren zur Folge, dass die Morphologie des umliegenden Gewebes unwiederbringlich verloren war und es nicht mehr für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung stand. Um dieses Problem zu umgehen wird seit einigen Jahren die Technik der lasergesteuerten Mikrodissektion von Gefrierschnitten bzw. zytologischen Präparaten für die Isolierung von homogenen, morphologisch identischen Zellpopulationen angewendet¹⁶². Bei diesem Verfahren werden mit Hilfe eines Lasers einzelne Zellen oder Zellgruppen aus heterogenem Gewebe unter

optischer Kontrolle isoliert¹⁹¹. Zur Mikrodissektion von Zellarealen und einzelnen Zellen der Mausmagenmukosa wurde im Zuge dieser Dissertation auf das *PALM MicroBeam System* der Firma P.A.L.M. Microlaser Technologies zurückgegriffen.

Das entsprechende Gewebe für die laserassistierte Mikrodissektion wurde nach 24, 36 und 50 Wochen von den infizierten (+*H. pylori* SS1) und nicht-infizierten (-*H. pylori* SS1) WT- und *ctsx*^{-/-}-Mäusen gewonnen (vgl. 3.3.3). Zur Herstellung der Magen-Gewebeschnitte wurden dann am Kryostaten 10 µm dicke Gefrierschnitte hergestellt, um danach histochemisch gefärbt zu werden. Mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion erfolgte anschließend das Herausschneiden der zu untersuchenden Zellareale (Oberflächen-, Parietal-, Entzündungszellen und SPEM) aus verschiedenen Regionen des Gewebes, um daran die Expressionsanalyse vorzunehmen (vgl. 3.3.21.4 und 3.3.21.6).

4.10 Gefrierschnitte von Mäusemägen

Als Vorbereitung für die Mikrodissektion der Kryostatschnitte erfolgte von allen Gewebeproben zuvor eine H&E-Färbung. Diese Schnitte wurden histologisch beurteilt und die Kennzeichnung der spezifischen Zellbereiche vorgenommen. In dieser Arbeit wurde nach einer schnellen und zuverlässig reproduzierbaren Methode gesucht, die es einerseits ermöglichte, das Magengewebe im gefrorenen Zustand in sehr dünne (10 µm) Schnitte zu schneiden und andererseits diese mit einem kurzen Färbeprotokoll möglichst schonend zu behandeln, damit die Qualität der Probe keinen Schaden nimmt und der Gehalt an intakter RNA nicht abgebaut bzw. verringert wird. Die für die Mikrodissektion verwendeten Gewebeschnitte wurden nach einem verkürzten Protokoll mit *Cresyl-Violet* angefärbt (vgl. 3.3.21.4) und zeigten eine reguläre Morphologie (Abb. 22 und 23).

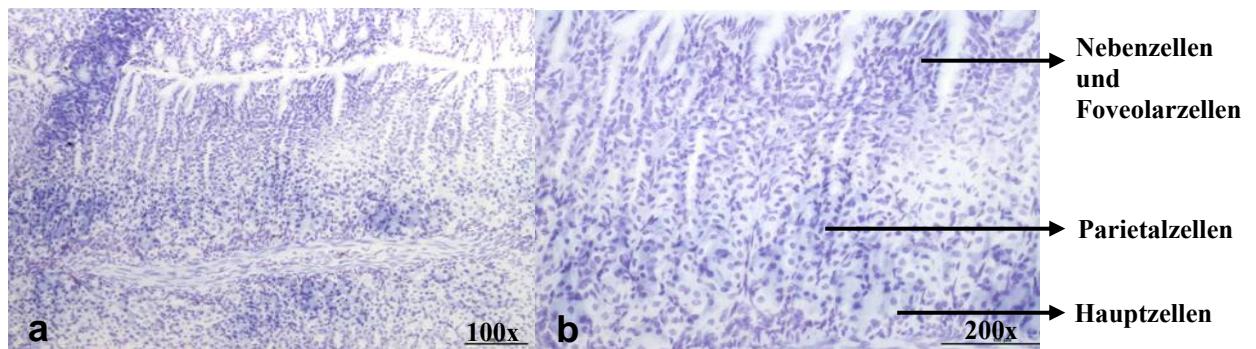


Abb. 22: Übersichtsaufnahme der Gewebeschnitte.
 Gewebeschnitte nach der *Cresyl-Violet*-Färbung (a = 100x; b = 200x)

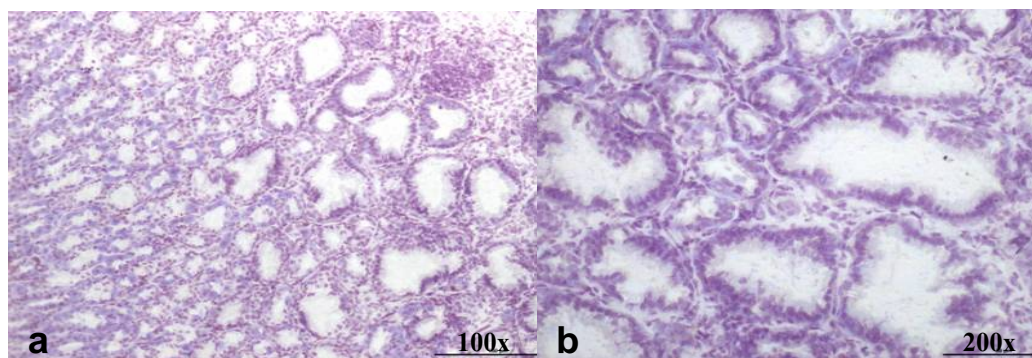


Abb. 23: Übersichtsaufnahme von SPEM-Gewebeschnitten.
 Gewebeschnitte nach der *Cresyl-Violet*-Färbung (a = 200x; b = 400x)

Bevor mit dem Herausschneiden einzelner Areale aus der Magenschleimhaut begonnen wurde, war es wichtig, dass die gefärbten Schnitte vollständig trocken waren, da es sonst durch den Laser zu einer Überhitzung des Schnittes kommen kann. Außerdem war es nicht möglich eine angemessene RNA aus den Gewebebereichen zu isolieren, wenn nicht auf ein sauberes Arbeiten mit RNase freien Reagenzien und sterilen Materialien geachtet wurde. Eine Auswahl von Mikrofotogrammen der dissezierten Zellen ist in Abbildung 24 dargestellt. Hierbei handelte es sich um intakte und um angeschnittene Zellen. Man erhielt daher letztendlich nur das vollständige genetische Material von etwa einem Zehntel der dissezierten Zellen. In der Abbildung 24 ist beispielhaft die experimentelle Vorgehensweise der Dissektion von den Nebenzellen und vereinzelt SPEM-Bereichen mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion dargestellt. Die jeweiligen Zellareale wurden zunächst am Bildschirm markiert (weiße Linie). Anschließend wurden diese mittels eines UV-Lasers automatisch entlang der markierten Schnittlinie ausgeschnitten.

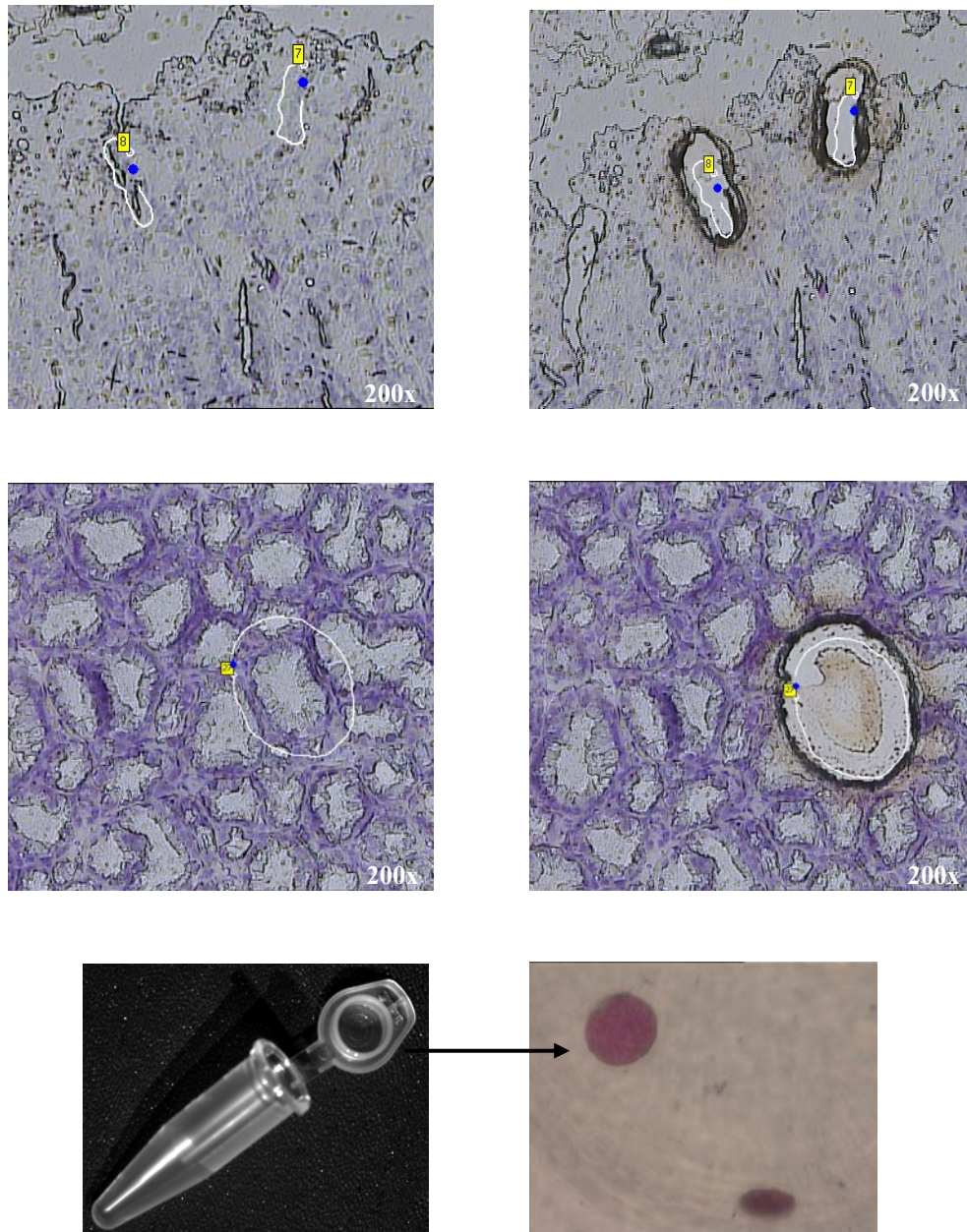


Abb. 24: Vorgehensweise der lasergestützten Mikrodissektion.

Die linken Bilder zeigen die markierten Areale der Magenmukosazellbereiche (Oben: Nebenzellen; Mitte: SPEM bei einer Vergrößerung von 200x). In den rechten Bildern ist der jeweilige Gewebeschnitt mit den ausgeschnittenen Arealen dargestellt. Das unterste Bild ist eine Zoomaufnahme des *caps* mit einem exemplarisch geschossenen Zellbereich.

4.11 Analyse der Genexpressionsprofile aus verschiedenen Magenzellbereichen von WT- und *ctsx*^{-/-}-Mäusen

Nach der Färbung und dem Herausschneiden der zu untersuchenden Zellareale mittels Laser-Mikrodissektion erfolgte die Isolierung der RNA, sowie die Synthese bzw. Pre-Amplifikation der cDNA aus dem mikrodissezierten Gewebebereichen nach den jeweiligen Herstellerprotokollen (vgl. 3.3.21.7). Damit waren die isolierten Zellbereiche für den Einsatz in den *RT-PCR² Profiler Array* zur Analyse eines Genexpressionsprofils bereit. Die minimale für eine erfolgreiche cDNA-Amplifikation notwendige Anzahl an dissezierten Zellen betrug etwa 200-300 Zellen. Für die Array Analyse wurde der *Maus Cytoskeleton Regulators PCR Array* verwendet, der die simultane Untersuchung von 84 Genen gestattet (http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAMM-088A.html). Diese umfassten Calmodulin und Calcineurin, Kinasen und Phosphatasen, relevante Rho G-Protein-Familien sowie ihre wichtigsten regulatorischen Faktoren. Es wurden zwei verschiedene Gruppen (WT- und *ctsx*^{-/-}) zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach *H. pylori*-Stimulation in drei unterschiedlichen Magenzellbereichen untersucht und miteinander verglichen (Tab. 5). Das Ziel der Untersuchungen war im ersten Teil, zu schauen, welche Gene überhaupt in welchen Gewebebereichen der Magenmukosa reguliert werden und im zweiten Teil, ob der Verlust des CTSX einen Einfluss auf die jeweiligen Expressionsprofile besitzt und ob sich das Expressionsmuster der Gene im Laufe des Entzündungsprozesses verändert. Die erhaltenen Genexpressionsdaten wurden, wie in Material & Methoden beschrieben, ausgewertet (vgl. 3.3.21.7). Der relative Expressionsunterschied (RQ) wurde somit zwischen den infizierten (+*H. pylori*) und den nicht-infizierten WT- und *ctsx*^{-/-}-Mägen über die Formel $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ bestimmt und analysiert.

Tab. 5: Überblick über die mikrodissezierten Zellbereiche der Magenschleimhaut.

Die Untersuchung erfolgte an zwei verschiedenen Gruppen (WT und *ctsx*^{-/-}) zu drei verschiedenen Zeitpunkten (24, 36, 50 Wochen) mit und ohne *H. pylori* SS1-Infektion in unterschiedlichen Magenzellbereichen.

	WT ($\pm H. pylori$)	<i>ctsx</i> ^{-/-} ($\pm H. pylori$)
24 Wochen	3/1 Oberflächenepithel 3/2 Parietalzellen	3/1 Oberflächenepithel 3/2 Parietalzellen
36 Wochen	3/1 Oberflächenepithel 3/2 Parietalzellen 3/2E Entzündungszellen	3/1 Oberflächenepithel 3/2 Parietalzellen 3/2E Entzündungszellen
50 Wochen	3/2 Parietalzellen 3/2E Entzündungszellen 3/3 SPEM	3/2 Parietalzellen 3/2E Entzündungszellen 3/3 SPEM

4.12 Genexpression und Gen-Clusteranalysen in WT- und CTSX-defizienten Mäusen

Die genaue Vorgehensweise bei der Auswertung der Primärdaten ist dem Arbeitsteil Material & Methoden zu entnehmen. Die gesamten Datenergebnisse der relativen Quantifizierung (RQ) aller 84 Gene sind aus dem Anhang zu entnehmen. Als gesunde Kontrollgruppen wurden nicht-infizierte Mäuse ausgewählt. Nach Normalisierung und Korrektur der Daten konnte für die Mehrheit der Gene ein Unterschied in der Expression zwischen WT und *ctsx*^{-/-} 36 Wochen nach *H. pylori*-Infektion gezeigt werden, unabhängig vom Magenzellbereich. In den mikrodissezierten WT-Zellgeweben wurde die Mehrzahl der Gene nach 36 Wochen *H. pylori*-Infektion heraufreguliert, im Vergleich zu den *ctsx*^{-/-}-Zellgeweben. In den *ctsx*^{-/-}-Magenzellen kam es erst ab 50 Wochen nach *H. pylori*-Infektion zur Steigung der Expression einer Vielzahl von Genen. Unter den 84 differentiell regulierten Transkripten befanden sich einige relevante Kandidatengene, welche sehr stark in den Entzündungszellen und den SPEM-Bereichen heraufreguliert wurden. Dargestellt in Tabelle 6 sind die Ergebnisse der RQ von sechs Genen, welche nach der vollständigen Analyse aller Daten und aller 84 Gene besonders auffällig waren, u.a. *mapt* (*microtubule-associated protein tau*), *mylk2* (*myosin light chain kinase*), *Aurkc* (*aurora kinase C*), *cdk5r1* (*cyclin-dependent kinase 5*) und *cyfip2* (*cytoplasmic fragile-X mental retardation interacting protein; sra, pir121*). Bei genauerer

Betrachtung dieser Expressionsdaten nach *H. pylori*-Infektion, fällt die erhöhte Steigerung des Gens *mapt* in den *ctsx*^{-/-}-Mägen in der 36-sten Woche nach *H. pylori*-Stimulation auf, unabhängig von den Zellbereichen (in Tab. 6 rot markiert). Die Steigung der Expression von *mylk2* erfolgte erst 50 Wochen nach *H. pylori*-Infektion, wobei diese in den WT- und in den *ctsx*^{-/-}-Entzündungszellen und SPEM-Bereichen am stärksten anstieg. Des Weiteren wurde die Expression nach *H. pylori*-Stimulation von den Genen *aurkc*, *cdk5r1*, *cyfip2* und *wasp* im WT heraufreguliert, besonders in den Entzündungszellen und den SPEM-Regionen. Angedeutet durch einen Strich in Tab. 6 sind die Zellbereiche, in denen kein Expressionsmuster erstellt werden konnte. Dabei handelte es sich im WT, sowie auch in den *ctsx*^{-/-}-Mägen 24 und 36 Wochen nach *H. pylori*-Infektion um den Bereich 3/3 (SPEM-Gewebebereich), welcher erst nach 36 Wochen *H. pylori*-Stimulation erkennbar war, wobei ab diesem Zeitpunkt jedoch keine eindeutigen Oberflächenzellen mehr sichtbar waren.

Tab. 6: Relative Quantifizierung (RQ) relevanter Kandidatengene

Der RQ wurde zwischen den infizierten (+*H. pylori*) und den nicht-infizierten (-*H. pylori*) WT- und *ctsx*^{-/-}-Mägen über die Formel $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ vorgenommen. Unter den 84 differentiell regulierten Transkriptgenen befanden sich 6 Kandidatengene (RQ>1,5)

	RQ WT (± <i>H. pylori</i>)			RQ <i>ctsx</i> ^{-/-} (± <i>H. pylori</i>)		
	3/1	3/2/-3/2E	3/3	3/1	3/2/-3/2E	3/3
24 Wochen						
<i>mapt</i>	3,43	28,13	-	-	0,04	-
<i>mylk2</i>	52,81	0,06	-	-	40,26	-
<i>aurkc</i>	1,54	0,06	-	-	0,04	-
<i>cdk5r1</i>	6,64	0,84	-	-	0,73	-
<i>cyfip2</i>	0,27	28,60	-	-	0,01	-
<i>wasp</i>	1,54	47,79	-	-	0,11	-
36 Wochen						
<i>mapt</i>	18,47	14,23	-	117,99	435,36	-
<i>mylk2</i>	1,78	27,69	-	14,48	6,48	-
<i>aurkc</i>	0,04	0,69	-	2,79	9,75	-
<i>cdk5r1</i>	35,92	14,55	-	3,17	12,56	-
<i>cyfip2</i>	53,96	63,46	-	17,22	13,28	-
<i>wasp</i>	245,43	369,64	-	204,42	2,22	-
50 Wochen						
<i>mapt</i>	-	4,44	25,05	-	5,61	4,92
<i>mylk2</i>	-	205,81	143,65	-	401,60	49,53
<i>aurkc</i>	-	14,53	81,95	-	2,05	0,06
<i>cdk5r1</i>	-	4,55	35,31	-	6,40	12,80
<i>cyfip2</i>	-	0,28	1,39	-	0,01	0,02
<i>wasp</i>	-	0,04	0,02	-	30,06	0,04

Wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt und auch anhand der Daten im Anhang erkennbar, generieren Mikroarray-Experimente besonders große Datenmengen. Es ist schwierig bis unmöglich ein derartig großes Datenset zu verarbeiten. Aus diesem Grund war eine Visualisierung aller Expressionsdaten mittels Clusteranalyse eine gute Möglichkeit diese Vielfalt verständlicher darzustellen. Das Grundkonzept in Clusteranalysen ist, exprimierte Gene zu identifizieren und je nach Bereich zu gruppieren. Clusteranalysen organisieren die Daten und clustern die Veränderungen im Genexpressionsmuster und nicht die tatsächliche Veränderung der Genexpression. Es können sich somit sowohl herauf- als auch herabregulierte Gene in denselben Cluster befinden. In dieser Arbeit wurde der hierarchische agglomerierende Algorithmus zur Clusteranalyse verwendet, welcher mit einer beliebigen Anzahl von Clustern startet, vereinigt oder teilt die vorhandenen Cluster entsprechend eines bestimmten Distanzmaßes. Mit Hilfe dieser Clusteranalyse, war es möglich, die Gene entsprechend ihrer Expressionsähnlichkeiten in den verschiedenen Gewebebereichen spezifischen Gruppen zuzuordnen. Die Clusteranalyse erfolgte unter Anwendung des Pearson Korrelationseffizienten sowie der *Average Link* Methode (durchschnittlicher Abstand zwischen den Punkten aus zwei Clustern)¹⁹². Nach der Berechnung aller Abstände zwischen den Punkten zweier Cluster (Genexpression bzw. ΔCt der drei Gewebeschichten) wurde der Mittelwert über alle Abstände gebildet und wie in Abbildung 25 und 26 als Baum von Clustern dargestellt. Das in den Abbildungen erkennbare Dendrogramm ist ein wichtiges Hilfsmittel bei der Navigation innerhalb der Daten der gesamten Gene. Hierbei repräsentieren die Zeilen des Dendogramms die unterschiedlichen 84 Gene, die Spalten dagegen die verschiedene Gewebeprobe. Auf diese Weise wurde eine übersichtliche Darstellung der Expressionsdynamik für jedes einzelne Gen und für jeden einzelnen Gewebebereich im Versuchsverlauf möglich.

Anhand der Abb. 25 und 26 ist erkennbar, dass sich unabhängig vom WT- oder *ctsx*^{-/-}-Magengewebe das infizierte Oberflächenepithel den nicht-infizierten Kontrollen sehr ähnlich war. Die infizierten Parietalzellen, die Entzündungszellen und auch die mikrodisszierten SPEM-Bereiche hatten hingegen weniger große Ähnlichkeit bezüglich des Expressionsprofils als die beiden zuvor genannten Zellcluster. Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe der

Clusteranalyse beurteilt, welche Gene eine ähnliche Expressionsdynamik aufwiesen. Die Visualisierung der 84 Expressionswerte erfolgt mit *heat map* in den dargestellten Dendogrammen. Bei gesteigerter Expression sind die betroffenen Gene rot dargestellt, die herabregulierten Gene hingegen blau. Die Zeilen des Dendogramms stellen die Gene mit ihrer Varianz dar, wobei der Abstand der Gene voneinander in den Stammbäumen den Grad der Gemeinsamkeiten zeigt. Anhand des resultierenden Dendrogramms (Abb. 25 und 26) konnten auf Genebene 3-4 größere Cluster identifiziert werden. In beiden Clusteranalysen (WT und *ctsx*^{-/-}) unabhängig vom Zeitpunkt (24, 36 oder 50 Wochen) gruppieren sich unterschiedliche Gene zusammen. Bei Betrachtung aller 84 Gene, sind die Gengruppen, die miteinander clustern, sich somit sehr unähnlich. Aus der Ähnlichkeit des Expressionsprofils zweier oder mehrerer Gene kann man darauf schließen, dass sie im Allgemeinen nicht in direkter funktionaler Beziehung stehen. Innerhalb dieser Cluster werden die stark regulierten Gene aus Tab. 6 betrachtet und ihre unmittelbare Nachbarschaft im Cluster-Baum analysiert. So konnten weitere auffällige Gene gefunden werden, die durch die strikten Filterkriterien bisher unberücksichtigt blieben. Erstaunlicherweise stehen die 6 relevanten Kandidatengenen nicht in direktem Zusammenhang, jedoch sind in unmittelbarer Nähe dieser Gene das vermehrte Vorhandensein anderer bestimmter Gene auffällig. Die identifizierten Gene werden nachfolgend kurz beschrieben, ihre Lokalisation im Cluster-Baum ist zusätzlich in den Abbildungen dargestellt.

- In allen WT-Zellbereichen zeigte das Gen *mylk2* eine ähnliche Expression wie das Gen *ccna1* (*cyclin-A1*), jedoch nicht in den *ctsx*^{-/-}-mikrodissezierten Zellbereichen (36 und 50 Wochen).
- In allen WT-Zellbereichen zeigte das Gen *cyfip2* eine ähnliche Expression wie das Gen *ppp1r12* (*protein phosphatase 1 regulatory subunit 12*), jedoch nicht in den *ctsx*^{-/-}-mikrodissezierten Zellbereichen (36 und 50 Wochen).
- In allen WT-Zellbereichen zeigt das Gen *wasp* eine ähnliche Expression wie das Gen *cdc42ep3* (*cdc42 effector protein*), jedoch nicht in den *ctsx*^{-/-}-mikrodissezierten Zellbereichen (36 und 50 Wochen).

- In allen WT-Zellbereichen zeigte das Gen *aurkc* eine ähnliche Expression wie das Gen *clip* (*CAP-GLY domain containing linker protein*), jedoch nicht in den *ctsx*^{-/-}-mikrodissezierten Zellbereichen (24 und 50 Wochen).

In den Abbildungen 25 und 26 sind mit Hilfe von farblich markierten Pfeilen diese sechs Gene verdeutlicht, an denen die Zusammengehörigkeit der einzelnen sechs Gene untereinander erkennbar ist. Zusammengefasst konnte für die hier untersuchten Faktoren ein Zusammenhang zwischen dem Verlust des CTSX und der Expression von Zytoskelettgenen im Verlauf des Entzündungsprozesses gezeigt werden.

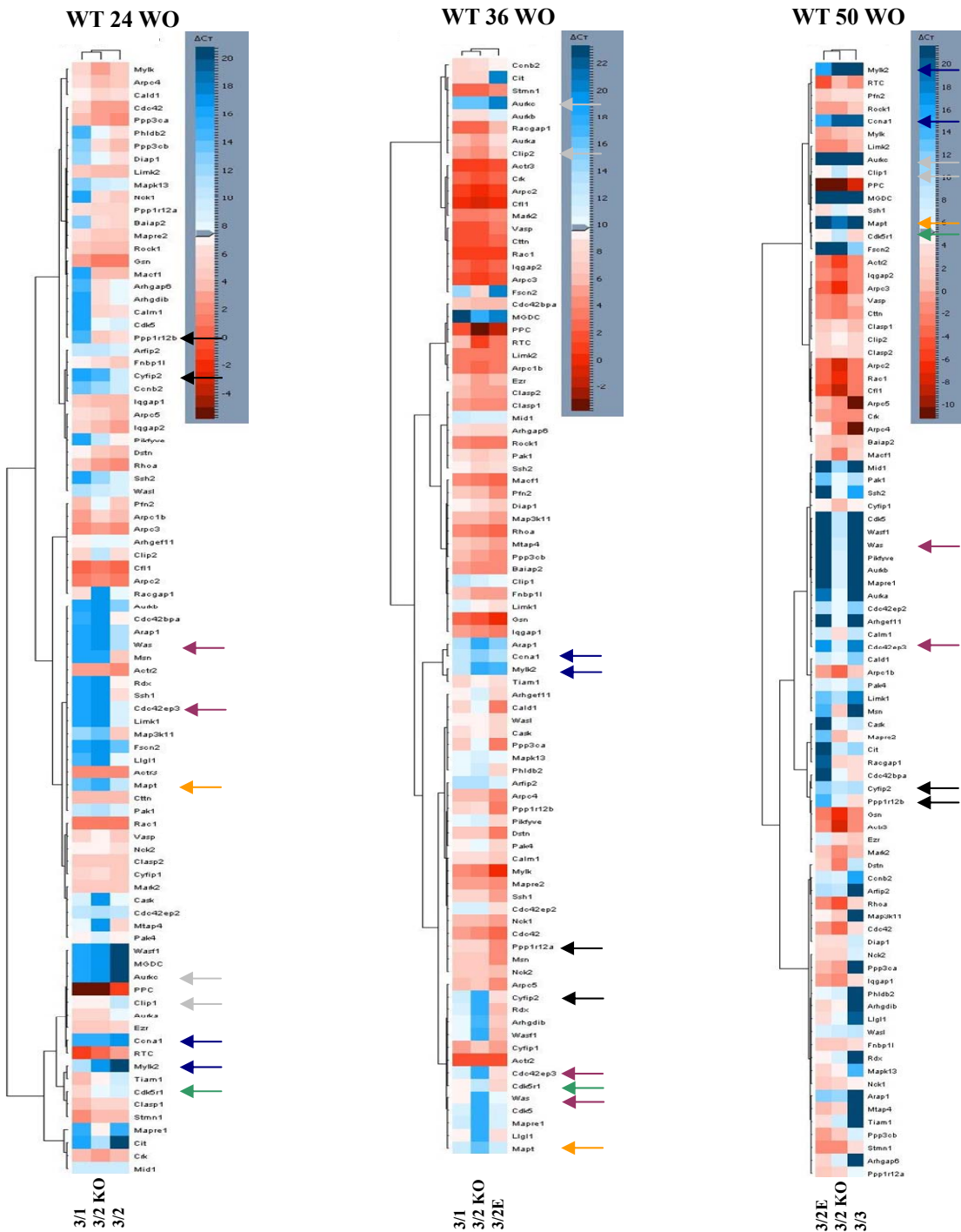


Abb. 25: Gen-Clusteranalyse von verschiedenen WT-Mukosazellbereichen.

Dargestellt ist das Clustering über alle auf dem Mikroarray gespotteten Gene zu drei verschiedenen Zeitpunkten in drei verschiedenen Magenzellbereichen. Es wurde der hierarchische agglomerierende Algorithmus zur Clusteranalyse verwendet. Die horizontalen Balken repräsentieren die individuellen Gene, die vertikalen Säulen stehen für die einzelnen Gewebeprobe. Der Abstand und die Höhe der Klammern im Dendrogramm verdeutlichen den Grad der Gemeinsamkeit. Alle heraufregulierten Gene sind in rot, alle herabregulierten Gene in blau markiert. In beiden Clusteranalysen gruppierten sich nicht dieselben Gengruppen zusammen (dargestellt bzw. hervorgehoben durch Pfeile).

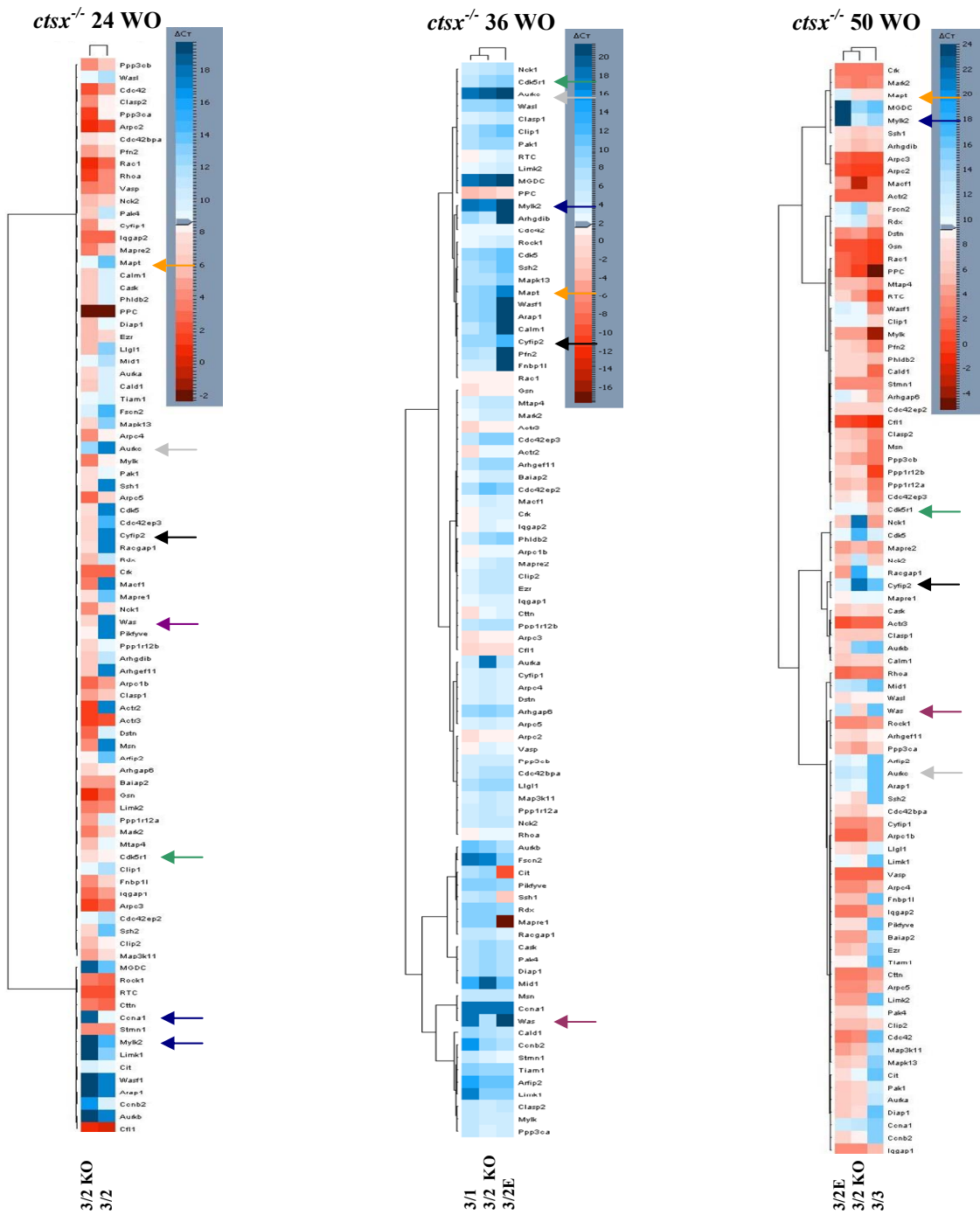


Abb. 26: Gen-Clusteranalyse von verschiedenen *ctsx*^{-/-}-Mukosazellbereichen.

Dargestellt ist das Clustering über alle auf dem Mikroarray gespotteten Gene zu drei verschiedenen Zeitpunkten in drei verschiedenen Magenzellbereichen. Es wurde der hierarchische agglomerierende Algorithmus zur Clusteranalyse verwendet. Die horizontalen Balken repräsentieren die individuellen Gene, die vertikalen Säulen stehen für die einzelnen Gewebeproben. Der Abstand und die Höhe der Klammern im Dendrogramm verdeutlichen den Grad der Gemeinsamkeit. Alle heraufregulierten Gene sind in rot, alle herabregulierten Gene in blau markiert. In beiden Clusteranalysen gruppieren sich nicht dieselben Gengruppen zusammen (dargestellt bzw. hervorgehoben durch Pfeile).

5 DISKUSSION

H. pylori ist ein gram-negatives, mikroaerophiles, spiralförmig gewundenes Bakterium, welches die Magenschleimhaut des Menschen kolonisiert. Es induziert eine lokale Immunantwort, welches mit der Entstehung schwerer gastrointestinaler Krankheiten wie aktiver chronischer Gastritis und Geschwüren des Magens und des Zwölffingerdarms oder malignen Tumoren assoziiert^{3,37,46,77,193,194,195,196}. Darüber hinaus ist das Bakterium an der Entwicklung von Magenadenokarzinomen^{197,198} und des MALT-Lymphoms¹⁹⁶ beteiligt^{199,200}. Die *H. pylori*-assoziierte Gastritis geht einher mit einer massiven Infiltration der Magenschleimhaut durch Granulozyten, T-Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen^{38,201,202}. Cysteinproteasen waren bisher bei entzündlichen Magenerkrankungen wenig untersucht^{97,107,203}. Die Cathepsine bilden eine große Gruppe ubiquitär vorkommender Enzyme von denen mittlerweile 11 Vertreter im humanen Organismus beschrieben wurden, darunter Cathepsin B, L, K, W und X, welche für den unspezifischen Abbau von unterschiedlichen Proteinen in Lysosomen verantwortlich sind aber auch entscheidene Rollen bei pathologischen Prozessen wie z.B. Krebs und Entzündungsprozessen erfüllen können¹¹². In der Literatur finden sich mittlerweile eine Anzahl von Hinweisen auf die Beteiligung von Cathepsinen im Magenkarzinom bzw. in der *H. pylori*-assoziierten Gastritis. Die am meisten verbreiteten endosomalen/lysosomalen Cysteinproteasen CTSB und L zeigten in späten Stadien des voranschreitenden Magenkarzinoms (atrophe Gastritis, epitheliale Dysplasie) eine Hochregulation¹⁰⁷. Jedoch sind die spezifischen Funktionen und Regulationen der Cysteinproteasen im Magen bis heute noch nicht detailliert beschrieben. Durch eine Reihe von Inhibitions-Studien in Zellkulturversuchen wurden Cathepsine in den letzten Jahren immer öfter auch als potentielle prognostische Faktoren entdeckt^{136,204,205}.

5.1 Suche nach dem geeigneten Mausmagen-*H. pylori*-Infektionsmodell *in vitro*

Eine Voraussetzung für die Untersuchung der *H. pylori*-induzierten Expression von CTSX während der Magenkarzinogenese ist das Vorhandensein eines geeigneten Modells *in vitro*, welches die Situation *in vivo* bzw. den Verlauf der Infektion und die Pathologie der Infektion

beim Menschen so genau wie möglich simuliert. Geeignete *H. pylori*-Infektions- bzw. Tiermodelle *in vivo* wurden in den letzten Jahren erfolgreich etabliert^{206,207,208,209,210,211,212}. Auf dieser Basis konnte ein Cathepsin-*knock-out*-Infektions- bzw. Tiermodell etabliert werden, welches es ermöglicht, die komplexen physiologischen Abläufe zu untersuchen, die während einer Magenkarzinogenese *in vivo* ablaufen. Anknüpfend an die vorwiegend deskriptiven Untersuchungen zur Expression von CTSX war es Ziel dieser Arbeit, spezifische Funktionsmechanismen sowie potentielle Regulations- und Interaktionsmoleküle *in vitro* zu identifizieren. Dafür standen natürlich permanente Zelllinien aus immortalisierten Zellen zur Verfügung, jedoch sind aber Primärkulturen unumstritten die weitaus bessere Variante *in vivo*-Abläufe nachzuahmen. Permanente Zelllinien werden aus verschiedenen Geweben (Haut, Schuppe, Muskel, Gonaden) einmalig gewonnen und über viele Generationen weitergezüchtet. Der Nachteil permanenter Zelllinien liegt im Verlust der metabolischen Kapazität mit fortschreitender Generationszahl²¹³. Selten sind diese Zelllinien aus gesundem Gewebe etabliert oder sie wurden genetisch manipuliert. Wie bereits beschrieben, finden für den Magen häufig die Adenokarzinomzelllinie AGS und die MDCK-Zellen (*madin-derby canine cells*) Verwendung, wobei die AGS-Zellen jedoch, aufgrund fehlender Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungsproteine keinen polarisierten Monolayer ausbilden können^{165,166}. Die MDCK-Zellen bilden zwar ein polarisiertes Epithel aus, jedoch handelt es sich um Zellen, die weder humanen Ursprungs sind, noch aus dem Magen stammen^{167,214}. Für einige Experimente mit *H. pylori* wurde die Zelllinie NCI-N87 verwendet¹⁶⁰. Diese Zelllinie wurde aus der Lebermetastase eines Adenokarzinoms isoliert²¹⁵ und ähnelt dem Phänotyp eines Magenepithels relativ gut, da sie sowohl intakte Adhärenzverbindungen besitzt sowie verschiedene Magen hormone produziert und freisetzt²¹⁵, jedoch mit der Einschränkung, dass es sich immer noch um Tumorzellen handelt.

Primäre Epithelzellen aus speziellen Lokalisationen sind auch heute noch kaum käuflich zu erwerben. Die von meiner Arbeitsgruppe etablierte Methode zur Isolierung primärer humaner Epithelzellen aus Magenresektaten bzw. Biopsiematerialien, erwies sich als effizientes und verlässliches Werkzeug, um die Auswirkungen einer *H. pylori*-Infektion unter *in vivo*-nahen Bedingungen zu untersuchen¹⁶⁸. Nach 24 h bildeten die isolierten primären Zellen Cluster aus und konnten für etwa eine Woche in Kultur gehalten werden. Dieses etablierte

Isolationsprotokoll wurde als Grundlage dieser Dissertation zur Isolierung primärer Epithelzellen aus der Maus genutzt. Für die geplanten Untersuchungen wurden neben den „normalen“ WT-Mäusen auch CTSX-defiziente Mäuse zur Epithelzellgewinnung herangezogen. Als Vergleich wurde die murine Magenkarzinom-Zelllinie (CLS103), etabliert aus einem Adenokarzinom von NMRI-Mäusen, herangezogen. Erwartungsgemäß konnte auch diese Zelllinie dem direkten Vergleich mit den Primärzellen nicht standhalten. Neben der Einzelzellmorphologie als Hinweis auf defekte Interzellularkontakte zeigten die CLS103-Zellen auch eine deutlich geringere Besiedlungsdichte von *H. pylori* und nur eine schwache Induktion von CTSX im Vergleich mit den clusterartig wachsenden primären Epithelzellen (vgl. Abb. 12).

In der vorliegenden Studie wurden demzufolge die primären Epithelzellen verwendet, um über Effekte des CTSX-Mangels im Verlauf der *H. pylori*-Infektion Rückschlüsse auf mögliche Interaktionen und Funktionen der Protease ziehen zu können. Die Ko-Kultur mit Makrophagen, welche Hauptzellen der CTSX- und Zytokin-Expression *in vivo* darstellen, diente der weiteren Verbesserung der *in vivo*-nahen Situation.

5.2 Expression von verschiedenen Cathepsinen im gesamten Magen der Maus im Vergleich zu den primären Epithelzellen

In der vorliegenden Studie wurde zunächst das allgemeine Expressionsmuster der relevanten Cathepsine (CTSXB/L) im Magengewebe der WT und der transgenen Mäuse (*ctsx*^{-/-} und *ctsb*^{-/-}) im Vergleich zu den korrespondierenden primären Epithelzellen untersucht. Die Expression der Cathepsine im Gewebe war erwartungsgemäß etwas stärker als in den primären Magenepithelzellen, da bei diesen z.B. die Entzündungszellen als Lieferanten der Cathepsine fehlten. Dennoch war das Expressionsniveau der Cathepsine untereinander vergleichbar, so dass die Verwendung primärer Epithelzellen hinsichtlich der Expression der Cathepsine der Situation *in vivo* entspricht. Die transgenen Mäusemagen (*ctsx*^{-/-}- und *ctsb*^{-/-}-Zellen sowie Gewebe) exprimierten signifikant mehr Cathepsine als im WT. Die Expression von CTSX verdoppelte sich im *ctsb*^{-/-}-Gewebe und wurde in den *ctsb*^{-/-}-Zellen sogar versechsfacht, im Vergleich zum jeweiligen WT. Diese kompensatorische Wirkung von

CTSX wurde bereits durch Vasiljeva *et al.* (2006) gezeigt¹³⁷. Das hier verwendete MMTV-PyMT (*mouse mammary tumor virus-polyoma middle T antigen*)-Mausmodell zeigte in der CTSB-*knock-out*-Variante eine Zunahme der CTSX-Expression. Es konnte auf der Oberfläche der Tumorzellen statt CTSB aktives CTSX detektiert werden. Damit wurde das Fehlen des einen Cathepsins offensichtlich durch ein anderes Cathepsin ausgeglichen.

Andersherum scheint es eine schwächere kompensatorische Funktion von CTSX durch CTSB zu geben, denn die Expression an CTSB stieg in den *ctsx*^{-/-}-Mägen um das 1,7-fache und in den isolierten primären *ctsx*^{-/-}-Zellen um das 2,7-fache an. Ähnliche Daten wurden wiederum auch in dem MMTV-PyMT-Modell gefunden¹⁵⁷. Dass primäre Zellkulturen aufgrund ihrer definierten Zellsorten sogar besser geeignet sind, bestimmte Enzyme oder Enzymgruppen zu untersuchen, als das ursprüngliche Gewebe ist eine Tatsache. Festuccia *et al.* (1995) empfahlen z.B. die Bestimmung der Aktivität des Plasminogen-Aktivators in Primärzellkulturen und nicht in den Gewebeproben vorzunehmen²¹⁶. Friedrich *et al.* (1999) beschrieben ebenso eine erhöhte Expression der Cathepsine in den Primärzellen der Tumorproben, während die Tumorgewebe eine niedrigere Expression der Cathepsine im Vergleich zum gesunden Gewebe zeigten²¹⁷. Dies bestätigt einerseits meine Beobachtungen, weist aber auch darauf hin, dass Primärmodelle einer genauen Überprüfung im Vergleich zum Gewebe bedürfen.

5.3 *H. pylori*-induzierte Expression von Zytokinen/Chemokinen in ko-kultivierten Makrophagen und Epithelzellen

Die Stimulation mit *H. pylori* aktiviert Signaltransduktionswege und damit die Produktion bzw. Ausschüttung von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-8, IL-18, TNF- α und INF- γ durch die Epithelzellen. Es kommt im Verlauf zu einer chronischen Entzündungsreaktion, einhergehend mit der Gewebeeinfiltration durch Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen^{201,202,218,219,220,221}. CTSX zeigt in entzündlichen und Tumorgeweben eine sehr zellspezifische Expression, vor allem in Monozyten und Makrophagen^{143,159}. Alle bisherigen Arbeiten zur *H. pylori*-induzierten Magenkarzinogenese unterstützen die Identifizierung der Makrophagen als Hauptquelle der CTSX-Expression

^{146,160}. CTSX induziert die Adhäsion und Phagozytose von Makrophagen, sowie die Reifung von dendritischen Zellen. Darüber hinaus regelt es die Proliferation und Migration von T-Lymphozyten ¹⁵⁰. Die genaue Rolle der Cathepsine in inflammatorischen Prozessen, speziell des Magens ist jedoch noch nicht geklärt. Die Stimulationen verschiedenster Primärkulturen mit Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β oder Interferon- γ konnte die Expression bzw. Sekretion von CTSS, CTSB oder CTSL beeinflussen ^{122,222,223,224,225,226}. Aufgrund der Dominanz der Expression von CTSX in Makrophagen und einer wahrscheinlichen Interaktion mit Zytokinen war davon auszugehen, dass der Verlust von CTSX zu einer Verschiebung der Zytokinantwort nach *H. pylori*-Stimulation führt. Zur Analyse der Expression von CXCL1 (mausanalog zu IL-8), IL-6, IL-1 β und MCP-1, wurden die infizierten und die nicht-infizierten mono- bzw. ko-kultivierten primären Magenepithelzellen und die Makrophagen-Zelllinie J774A.1 untersucht. Außerdem zeigten alle Zytokine (mit Ausnahme von MCP-1) eine deutlich reduzierte Expression in den *ctsx*^{-/-}-Mono-Kulturen, mit nicht nachweisbarer Expression an IL-1 β . Nach *H. pylori*-Infektion drehte sich diese Tendenz um, da die Zytokinexpression in den *ctsx*^{-/-}-primären Epithelzellen stärker war als in den WT-Zellkulturen. Der auffälligste Unterschied wurde in dieser Arbeit bei IL-1 β entdeckt, welches in den *ctsx*^{-/-}-defizienten Zellen um das 5-fache gesunken war, im Vergleich zu den WT-Zellen. Diese Interaktion von IL-1 β und dem CTSX wird weiter untersucht werden und kennzeichnet möglicherweise ein neues Interaktionsfeld dieser Protease. Andererseits stieg die Transkription von IL-6 signifikant in den ko-kultivierten *ctsx*^{-/-}-Zellen nach *H. pylori*-Infektion an, im Vergleich zu den WT-Zellen. In den Gewebeuntersuchungen der infizierten WT- und *ctsx*^{-/-}-Mäuse finden sich diese Daten tatsächlich bestätigt. Hier fand sich zwar keine eindeutig gesteigerte Induktion der Zytokine in den *ctsx*^{-/-}- versus WT-Mäusen nach 24 Wochen *H. pylori*-Infektion, allerdings zeigte sich weitere 12 Wochen später eine signifikant längeranhaltende und höhere Induktion der meisten Zytokine in den *ctsx*^{-/-}-Mäusen (Daten noch nicht publiziert). Auf welche Weise CTSX die Zytokinausschüttung im Epithel regulieren kann, bleibt zu untersuchen.

5.4 Untersuchung der Zytokinsekretion an Makrophagen-Kulturen

Für die Ko-Kulturen als Modell für die Interaktion des infizierten Epithels mit den darunterliegenden Gewebsmakrophagen wurde die Makrophagen-Zelllinie J774A.1, die aus einer Aszitesflüssigkeit von BALB/c Mäusen (ATCC, TIB-67TM) isoliert wurde, verwendet. Aufgrund der Tatsache, dass in der Milz alle wesentlichen Zellen (Makrophagen, Lymphozyten usw.) vorhanden sind, wurden zunächst auch Untersuchungen mit primären Makrophagen aus der Milz der WT- und *ctsx*^{-/-}-Mäuse versucht (Daten nicht gezeigt). Leider ließen sich jedoch die Makrophagen nicht dauerhaft in ausreichenden Mengen und Reinheit isolieren und alle Präparationen hatten stets auch einen hohen Prozentanteil an lymphozytären Zellen. Des Weiteren konnten die mit den primären Makrophagen/Lymphozyten erhaltenen Daten nur bedingt mit den Ergebnissen der Untersuchungen mit der Makrophagen-Zelllinie J774A.1 in Einklang gebracht werden. Deml *et al.* (2004 und 2005) isolierten aus der Milz Splenozyten und Makrophagen, um auch hier einen genaueren Aufschluss über die Sekretion verschiedener Zytokine nach *H. pylori*-Infektion zu erhalten^{227,228}. Mittels ELISA wurden die Konzentrationen von TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12 und IFN- γ bestimmt und ebenso wie in meinen Ergebnissen kam es zu einer sehr geringeren bzw. zu einer negativen Sekretion der einzelnen untersuchten Zytokine, wie beispielsweise dem IL-6.

Zur Etablierung des Systems wurde demzufolge weiterhin die Makrophagen-Zelllinie J774A.1 verwendet. Diese wurden bereits erfolgreich in *H. pylori*-Infektionsstudien getestet²²⁹ und gelten als adäquates Modell in der Maus. Die J774A.1-Zellen zeigten keinerlei Einfluss der CTSX-Defizienz auf die Expression von CXCL1, IL-6 und IL-1 β in nicht-infizierten Ko-Kulturen. Wie schon bei den Epithelzellen konnte besonders für IL-6 eine signifikante höhere Induktion nach *H. pylori*-Infektion in den mit *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen ko-kultivierten Makrophagen nachgewiesen werden, im Vergleich zur WT-Ko-Kultur. Der Verlust des CTSX in den primären Epithelzellen scheint ohne Einfluss von *H. pylori* die Expression von MCP-1 in den ko-kultivierten Makrophagen zu stimulieren, wohingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den WT- und *ctsx*^{-/-}-Ko-Kulturen in der Reaktion auf *H. pylori* gefunden wurde. Dem Hinweis auf eine Interaktion von CTSX und MCP-1 wird derzeit noch nachgegangen. MCP-1, das als potenter Stimulus von Monozyten und

basophilen Granulozyten über seinen Rezeptor CCR2 wirkt und von einer Vielzahl an Zellen, wie Makrophagen, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen produziert wird²³⁰, spielt in der *H. pylori*-Infektion des Magens eine entscheidende Rolle. Dies zeigte eine Studie in antralen Magenbiopsien mit einer signifikant gesteigerten Transkriptionsrate von MCP-1 nach *H. pylori*-Infektion²³¹. Gleiches konnte in der Magenkarzinom-Zelllinie MKN28 gezeigt werden²³². Insgesamt müssen die erhaltenen Ergebnisse natürlich kritisch ausgewertet werden, da durch die CTSX-exprimierenden J774A.1-Makrophagen kein rein CTSX-defizientes Milieu in den Ko-Kulturen erzielt wurde. Auf eine si-vermittelte Reduktion von CTSX wurde verzichtet, da hiermit in der Regel ~50 % der Expression trotzdem bestehen bleiben. Erfreulicherweise werden allerdings die Befunde *in vitro* durch die Daten der Mäuse *in vivo* gestützt. Hier konnte nach 50 Wochen *H. pylori*-Infektion ein stärkeres Makrophageninfiltrat in den *ctsx*^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden, was auf eine gut koordinierte und eindeutige Wirkung von CTSX im Entzündungsprozess hinweisen könnte.

5.5 Differentiell exprimierte Gene der adaptiven Immunabwehr in WT- und *ctsx*^{-/-} - Epithelzellen nach *H. pylori*-Infektion

Neben der proinflammatorischen Immunreaktion induziert *H. pylori* auch eine adaptive Immunantwort. Zwei Gruppen von Zellen stellen die wesentlichen Elemente der adaptiven Immunität dar. Die T-Lymphozyten, welche zum einen die zellvermittelte Immunantwort gewährleisten und zum anderen die B-Lymphozyten unterstützen, sowie die B-Lymphozyten selbst, die für die humorale Immunität verantwortlich sind, also für jene Abwehrmaßnahmen, die sich über sezernierte Antikörper gegen Eindringlinge wie *H. pylori* richten²³³. *H. pylori* bewirkt zum einen die Bildung von Antikörpern durch B-Lymphozyten, zum anderen eine T_H1-polarisierte T-Zell-Antwort⁸⁹. Roth *et al.* (1999) zeigten in einem Modell an T-Zell-defizienten Mäusen, dass die T-Zell-vermittelte Immunantwort der essentielle Mediator der *H. pylori*-assoziierten pathologischen Veränderungen im Magen ist^{234,235}. Die T-Zell-defizienten Mäuse entwickelten im Gegensatz zu C57BL/6WT-Mäusen keine gastrale Entzündung und auch keine präkanzerösen Läsionen infolge einer Infektion mit *H. felis*²³⁵. Über die Spaltung von LFA-1 steht CTSX in direktem Zusammenhang mit der Migration von

T-Lymphozyten¹⁵⁴. Auf der Suche nach weiteren potentiellen Effektoren der adaptiven Immunantwort in WT- und *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen konnten mehrere Gene identifiziert werden. Fraglich war die Signifikanz der Gene im Vergleich zwischen den WT- und *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen. Von den 113 untersuchten Genen, welche an der T- und B-Zell-Aktivierung, Proliferation und Differenzierung, den wichtigsten Schritten der adaptiven Immunität, beteiligt sind, wurden 12 Gene identifiziert, die in den *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen nach *H. pylori*-Infektion heraufreguliert wurden. In den WT-Epithelzellen kam es nur in neun dieser Gene zu einer erhöhten Expression, wobei drei Gene (*ccnd3*, *ap3b1* und *gadd45g*) sogar herunterreguliert wurden. Das in der Analyse am stärksten hochregulierte Gen war das *spp1* (3,03-fache Steigerung), gefolgt von *cd81* (2,01-fache Steigerung), was auch schon in vorangegangenen Studien von Junnila *et al.* (2009) gezeigt werden konnte²³⁶. Das SPP1 ist ein von Immunzellen sezerniertes, saures Phosphoprotein²³⁷, das vor allem während der Gewebe-Erneuerung/-Umbau exprimiert wird und an Stress-Reaktionen, Zelladhäsionen, Entzündungen, Wundheilungen und Prävention von Apoptose beteiligt ist^{238,239,240}. Das Protein wirkt positiv auf die Lebenszeit von autoimmunen T-Zellen, indem es die natürliche Apoptose der Zellen hemmt²⁴¹. Das SPP1 wurde als möglicher neuer prognostischer Marker für das maligne Melanom vorgestellt^{242,243} und geht in verschiedenen Tumortypen mit einer Tumorprogression einher und bestimmt über Apoptoseinhibition, Neovaskularisation, Migration und Invasion den metastatischen Phänotyp²⁴⁴. Es stellt sich nun jedoch die Frage, warum das *spp1* in den *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen stärker exprimiert wurde als in den WT-Zellen? Integrin $\alpha v \beta_3$ ist als SPP1-Rezeptor beschrieben und gilt als sicherer Interaktionspartner von CTSX^{151,245,246}. Das lässt auf die Hypothese schließen, dass es aufgrund des fehlenden CTSX zu einem erhöhten Zusammenspiel zwischen den Integrinen und dem SPP1 kommt. Ein Mechanismus für diese Interaktion ist allerdings noch nicht bekannt.

Neben dem SPP1 konnte ein weiteres Zelloberflächen-Protein, das CD81, identifiziert werden. CD81 gehört zu der relativ neuentdeckten Familie der tetra-transmembranhelix-Moleküle (TM4SF). Auch für das hochregulierte *cd81*, berichten neuste Studien, dass es die Adhäsion, Morphologie, Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von B- und T-Zellen beeinflusst^{247,248}. In der Tumorforschung spielen diese Funktionen und Komplexpartner der Tetraspanine eine immer größere Rolle²⁴⁹. Assoziationen von Tetraspaninen (CD81) mit

Integrinen wurden ebenfalls bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben^{250,251,252}, denn CD81 bildet Komplexe mit z.B. $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 4\beta 1$ ^{253,254}. Ein Zusammenhang mit Cathepsinen, speziell dem CTSX, konnte jedoch bisher nicht definiert werden.

Zusammenfassend führte der Verlust von CTSX zu einem deutlichen Anstieg der B- und T-Zell-Aktivatoren, was darauf hinweist, dass das CTSX die Lymphozyten-Differenzierung und/oder die Aktivierung beeinflusst. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den bisherigen Studien, die die Interaktion von CTSX mit $\beta 2$ -Integrin-Rezeptoren analysieren. CTSX aktiviert bzw. interagiert mit dem Mac-1-Rezeptor, was die Lymphozyten-Proliferation und Clusterbildung beeinflusst. Außerdem fördert das CTSX die Immunantwort über die Aktivierung von LFA-1²⁵⁵. Zusammen mit diesen Erkenntnissen unterstützen meine Daten die Wirkung von CTSX bei der Steuerung der Immunantwort. Dies, zusammen mit der gefundenen Adhäsionsregulationen in monozytären Zellen *in vitro*, und die Lokalisation der CTSX-Integrin-Komplexe an Stellen der Zell-Zell-Interaktion^{151,256}, könnten weitere Ansatzpunkte zur Aufklärung der Funktion von CTSX in der *H. pylori*-induzierten Magenkarzinogenese darstellen.

5.6 CTSX beeinflusst die Migration von Makrophagen in Konfrontations-Zellkulturen

Die Untersuchung zur Interaktion der Magenepithelzellen und der Makrophagen-Zellen erfolgte basierend auf den Erkenntnissen, dass die Bindung von *H. pylori* an Epithelzellen die Aktivierung von Signalkaskaden auslöst, die u.a. eine Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen stimulieren^{85,257} und somit die Einwanderung von Makrophagen in die Magenmukosa bewirken⁸⁴. Die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch die Epithelzellen wird von *H. pylori* *cag*-PAI-abhängig induziert^{74,258}, was zur Reorganisation des Zytoskeletts und zur Veränderungen der Zellmorphologie führt. In kultivierten Epithelzellen wurde die morphologische Veränderung der Zellen durch *H. pylori* als Elongationsphänotyp bezeichnet^{69,259}. Frühere Berichte aus der Gruppe von Dr. Steffen Backert zeigten, dass ein funktionelles Ausschalten von Rac1 durch dominant-negative Konstrukte oder bestimmte GTPase-inaktivierende Toxine (z.B. ToxB oder

TcdBF) mit einer Blockierung der Zellmigration und des Elongationsphänotyps einhergehen²⁶⁰. Proteasen sind klassische Mediatoren einer gesteigerten zellulären Motilität und invasiven Verhaltens von Tumorzellen. CTSX konnte in AGS-Magenkarzinomzellen als *H. pylori*-induzierter Migrationsfaktor beschrieben werden¹⁴⁶. Die durchgeführten Konfrontationskulturen spiegeln unsere Erkenntnisse aus den Studien wieder und bestätigen ebenso die Daten von Sevenich *et al.* (2010)¹⁵⁷. Das *knock-down* von CTSX zeigte einen Trend zur verminderten epithelialen Beweglichkeit und zur gesteigerten Migration der Makrophagen. Eine mögliche Erklärung könnte auch hier die Interaktion von CTSX mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ sein, da Integrine für die Adhäsion und Migration von Zellen essentiell sind¹⁵¹.

5.7 Expression von MIF-1 in den *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen

Wong *et al.* (2009) konnten in ihren Untersuchungen an transgenen Mäusen zeigen, dass MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) in der durch *H. pylori*-ausgelösten Gastritis ein entscheidender Vermittler, sowohl in der angeborenen als auch in der T_H1-Immunantwort, ist²⁶¹. MIF ist ein proinflammatorisches Zytokin, das vor allem von den Zellen des Immunsystems produziert und sezerniert wird²⁶² und mit einer Vielzahl von entzündlichen Krankheiten assoziiert ist^{263,264,265,266,267,268,269}. Bei Patienten mit Gastritis und entzündlichen Darmkrankheiten war die MIF-Konzentration sowohl im Serum als auch lokal im Gewebe deutlich erhöht²⁷⁰. Die Daten der vorliegenden Studie, korrelieren mit der Hypothese, dass der Verlust von CTSX die Migration von Makrophagen induziert. In den *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen konnte das Protein MIF-1 kaum gefunden werden. Niedrige Expression von MIF wurde ebenso in einer HIV-Studie von Kibiki *et al.* (2007) nachgewiesen²⁷¹, welche auch gleichzeitig mit einer erhöhten Mortalitätsrate korrelierte. Außerdem erfolgten mehrere Untersuchungen, die Hinweise darauf gaben, dass MIF eine entscheidene Rolle in der Zellproliferation spielt, denn in diesen Fällen konnte eine Überexpression von MIF in Tumorzellen im Vergleich zum Primärgewebe nachgewiesen werden²⁷². Eine eindeutige Einordnung von MIF ist, aufgrund seiner diversen Funktionen, schwierig, weshalb über MIF auch eine Vielzahl kontroverser Beschreibungen vorhanden sind²⁷³. Wahrscheinlich muss differenziert werden, in welcher Phase MIF nützlich oder auch schädlich wirkt. Die

vorliegende Untersuchung ließ jedoch eher auf eine unspezifische als auf eine spezifische Interaktion schließen.

Die in dieser Arbeit beobachteten Effekte reichen letztendlich nicht zur endgültigen Klärung der Frage nach der Bedeutung der *H. pylori*-induzierten CTSX-Expression für die Magenkarzinogenese aus. Des Weiteren sind Systeme *in vitro* nicht in der Lage, die Funktionen *in vivo* von CTSX in der Magenkarzinogenese im vollen Umfang zu klären. Weitere Experimente sind notwendig, um der genauen Bedeutung von CTSX näher zu kommen. Laser-Mikrodissektion (LCM) in Kombination mit der PCR-Array-Technologie stellt ein leistungsfähiges Werkzeug zur Analyse morphologischer Veränderungen im Magenepithel während der *H. pylori*-Magen-Krebsentstehung auf der Gen-Ebene dar.

5.8 Charakterisierung der epithelialen Transdifferenzierung in einem transgenen Magenkarzinommodell durch Laser-Mikrodissektion kombiniert mit Genexpressionsprofilen

Die Epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT) spielt eine wesentliche Rolle bei der Tumormetastasierung, aber auch bei physiologischen Prozessen wie der Embryogenese und der Wundheilung wird die Fähigkeit von Zellen, ihre Morphologie und transkriptionelle Aktivität zu verändern, gefordert^{274,275}. Als Antwort auf TGF β -1 verlieren die Zellen ihre epitheliale Morphologie und nehmen eine fibroblastoide Gestalt an. Intrazellulär verändert sich das Zytoskelett und die Zell-Zell-Adhäsion geht verloren²⁷⁶. Ein pathogener *H. pylori* Stamm war in Zellkulturversuchen in der Lage bestimmte EMT Marker zu induzieren. Anschließende Untersuchungen *in vivo* belegten eine kooperative Beteiligung vom MMP-7, HB-EGF und Gastrin an diesem Prozess²⁷⁷.

Aber welchen Einfluss hat nun der Verlust der in dieser Arbeit untersuchten Protease CTSX auf die epitheliale Transdifferenzierung in der Magenkarzinogenese? Diese Frage stand nun im Vordergrund der weiteren Untersuchungen in dieser Dissertation. Eines der größten Probleme bei der Untersuchung der EMT stellt die selektive Isolierung von RNA in den entsprechenden Zellpopulationen dar, die normalerweise sehr schwierig ist. Da das von mir

verwendete *H. pylori*-Mausmodell alle Stadien von der akuten über die chronische Entzündung bis hin zur Metaplasie erfasst, konnten diverse Zellpopulationen zu verschiedenen Zeiten und Zuständen problemlos als Gewebeproben gewonnen werden. Um hieraus definierte Zellenbereiche der Magenmukosa zu isolieren, ist die Laser-Mikrodissektion die Methode der Wahl, um dann im Anschluss Expressionsstudien in Abhängigkeit vom Vorhandensein von CTSX und der Stimulation von *H. pylori* durchzuführen.

5.9 Laser-unterstützte Mikrodissektion mit nachfolgender Genexpressionsanalyse

Die Laser-Mikrodissektion (LCM) ist eine mikroskopische Technik, die es in nur einem Schritt ermöglicht, unter direkter mikroskopischer Visualisierung, aus einem Abschnitt von komplexen, heterogenen Geweben ausgewählte Zell-Populationen zu beschaffen¹⁹¹. In der Literatur wurden in den letzten Jahren verschiedene Methoden beschrieben, die eine Isolierung und Anreicherung von gezielten relevanten Zellen bzw. Einzelzellen beschreiben, wobei jedoch nur die Technik der Mikrodissektion es ermöglicht, aus einem Schnitt mehrere Regionen und verschiedene Zellarten zu isolieren¹⁶². Außerdem kommt es nicht zu chemischen Veränderungen der DNA, RNA oder Proteinen des Gewebes, da das Gewebe, aufgrund der abgeschwächten Laserenergie durch den absorbierenden Transferfilm, nur einen geringen Teil der Laserstrahlung abbekommt^{190,278,279}.

In dieser Arbeit wurden bestimmte Zellareale der Magenmukosa (vgl. 3.3.21.4) von WT- und *ctsx*^{-/-}-Mäusen mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion herausgeschnitten, um diese daraufhin getrennt voneinander zu untersuchen bzw. zu analysieren. Die Technik ermöglichte eine schnelle und fehlerfreie Probenaufarbeitung für eine anschließende Expressionsanalyse. Die Isolation von RNA aus diesen minimalen Probenmengen ist nach wie vor kein standardisiertes Verfahren, dennoch können mittlerweile mit einigem Aufwand qualitativ hochwertige Ergebnisse bis hin zum Einzelzellniveau geliefert werden. Zweifelsohne ermöglichte diese Technik eindrucksvolle Einblicke in komplexe Genexpressionsmuster in den WT- und *ctsx*^{-/-}-Magen-Zellbereichen für die spezifische Untersuchung von CTSX. Der methodenbedingte Nachteil besteht aber in ihrer Anforderung an frisches oder tiefgefrorenes

Untersuchungsmaterial, da ihre Anwendung an Paraffingewebe oftmals nur unzureichende Ergebnisse lieferte und nur das kryokonservierte Gewebe die aussagekräftigsten Daten erbrachte.

5.10 Wahl der effizientesten Färbemethode

Im Laufe des Versuches stellte sich heraus, dass die Mikrodisektionsprozedur optimiert werden musste, um zum einen eine RNA-Degradierung zu vermeiden und zum anderen die beste RNA-Ausbeute für die anschließende Expressionsanalyse zu erlangen. Der Erfolg der Ergebnisse der LCM ist stark von der Probenaufarbeitung, insbesondere von der Gefrierschnittpräparation, aber auch von der Färb- und der Fixierungsmethode abhängig. Generell muss darauf geachtet werden, dass die Bearbeitungszeit so kurz wie möglich gehalten wird. Ein hohes Risiko der RNA-Degradierung birgt sich in Färbemethoden, welche in wässriger Umgebung durchgeführt werden²⁸⁰. Die Färbung mit *Cresyl-Violet* ermöglicht eine sehr schnelle und schonende Färbung in einer 100 %igen alkoholischen *Cresyl-Violet*-Lösung, damit die Qualität der Probe keinen Schaden nimmt²⁸¹. Um einen zusätzlichen Schritt zu vermeiden und die Färbezeit so kurz wie möglich zu halten, wurden die Färbeschritte verkürzt. Außerdem wurden die Xylen-Schritte laut Vorschrift nach dem Waschen in 100 %igem Ethanol ausgelassen, da das Xylen die Gewebe brüchig machen würde und eine Adhäsion der Schnitte an die PEN-Membran (Polyethylenphthalat) der Folienobjektträger beeinträchtigen würde. Des Weiteren erfolgte zusätzlich nach den Färbeschritten eine Trocknung der Gewebeschnitte von 2 min, was die RNA-Degradierung weiterhin minimierte. Entsprechend diesen neuen Vorgängen wurde das Protokoll geändert. Neben der Optimierung der Färbemethode wurden ebenso die Parameter des Lasers angepasst, damit das Gewebe in einem Durchgang vom Nachbargewebe getrennt werden konnte. Bei mehrmaligen Lasern des Gewebematerials wäre der Erhalt an intakter RNA nicht mehr zu 100 % gegeben. Viele Arbeitsgruppen haben sich schon mit der Extraktion von RNA aus mikrodisezierten Geweben auseinandergesetzt^{190,191}. Eine Studie von Fend *et al.* (2000) zeigte, dass zwischen dem Einsatz von Gefrierschnitten, Paraffinschnitten, immungefärbten Schnitten und zytologischen Zellpräparationen keine Unterschiede zu verzeichnen waren²⁸².

Dieses kann von mir nicht bestätigt werden, denn leider eignete sich das FFPE-Gewebe, trotz kurzer Fixierungszeit und Verwendung von gepuffertem Paraplast, nur eingeschränkt bzw. kaum für die Mikrodissektion mit darauffolgender Genexpressionsanalyse.

Bei Verwendung von Gefriermaterial ist es wichtig zu erwähnen, dass der Magen nicht komplett in Cryomatrix eingebettet werden darf, sondern das Cryomatrix nur als eine Art „Einfriertisch“ genutzt wurde. Damit war gewährleistet, dass die Qualität der RNA keinen Schaden nahm. Generell und zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der Laser-Mikrodissektion mit anschließender RNA-Gewinnung bzw. Isolierung besonders auf die Probenaufarbeitung geachtet werden sollte, denn eine hochreine intakte RNA ist die wichtigste Voraussetzung für den Erhalt von verlässlichen Mikroarray-Ergebnissen.

5.11 Einfluss der CTSX-Defizienz auf regulatorische Faktoren der gastralen Entzündungsantwort während der *H. pylori*-Infektion

Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten bereits *H. pylori*-abhängige Faktoren in Magenbiopsien/Gastrektomiepräparaten oder in stimulierten Epithelzellen bzw. Makrophagen anhand von Genexpressionen in Mikroarrays^{283,284,285}. Um eine umfassende Übersicht über die Regulation potentieller Kandidatengene zu erhalten, die die Entzündungsreaktion und das Zytoskeletts bei Stimulation mit *H. pylori* beeinflussen könnten, wurde eine Mikroarray-Analyse durchgeführt. Der durchgeführte cDNA-Array (*Maus Cytoskeleton Regulators PCR Array*) gestattet die simultane Untersuchung von 84 Genen, welche die Biogenese, Organisation, Polymerisation und Depolymerisation von *scaffolding* Proteinen in der Zelle kontrolliert. Hierbei wurde die Veränderung des Genexpressionsmusters von *H. pylori*-infizierten und nicht-infizierten WT- und *ctsx*^{-/-}-Mägen untersucht und miteinander verglichen. Die *H. pylori*-spezifische Expressionsanalyse erfolgte in drei verschiedenen Zellbereichen des Magens, wobei in allen Bereichen die Mehrheit der Gene eine beachtliche Dimension und Komplexität der Interaktion vom Keim und den Bereichen der Magenmukosa zeigte. In den mikrodissezierten WT-Zellgeweben erfolgte nach 36 Wochen *H. pylori*-Infektion ein Anstieg der Mehrzahl der Gene, wohingegen dieser Effekt zeitverzögert, erst nach 50 Wochen in den *ctsx*^{-/-}-Geweben auftrat (vgl. 4.12 und Anhang). Diese veränderte

Expression betrifft vor allem Gene, die eine Rolle bei der Polarisierung, Poly-/Depolymerisation von Aktin-Filamenten und der Zellteilung spielen. Unter den in diesem Teil der vorliegenden Arbeit ermittelten potentiellen Kandidatengenen waren sechs relevante Gene (*mapt*, *mylk2*, *aurkc*, *cdk5r1*, *cyfip2*, *wasp*), welche ab der 36-sten Woche nach *H. pylori*-Infektion in den mikrodisssezierten Entzündungszellen und im SPEM signifikant heraufreguliert wurden. Interessanterweise werden nicht nur drei dieser Gene, sondern auch CTSX mit neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Alzheimer in Zusammenhang gebracht ^{286,287,288}.

MAPT (*microtubule-associated protein* TAU) ist ein sehr hydrophiles Protein, welches in seiner natürlichen Form im zentralen und peripheren Nervensystem vorliegt ^{286,289}. Das Protein TAU besitzt die Fähigkeit Tubulinbildung zu induzieren ²⁹⁰ und besitzt im gesunden Hirn eine mikrotubulistabilisierende Funktion. In Alzheimer-Hirnen ist TAU hyperphosphoryliert ²⁹¹ und stark glykosyliert ²⁹², womit das TAU-Protein seine Funktion verliert. Wird TAU überexprimiert, inhibiert es den gerichteten Organellentransport, welcher über Kinesin und Dynein gesteuert wird. Die Phosphorylierung des Proteins kann über eine große Vielzahl von Kinasen *in vitro* erfolgen, z.B. die Ca⁺⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) ²⁹³, die Caseinkinase II ²⁹⁴, die cAMP-abhängige Proteinkinase (cAMP-PK) ²⁹³, die MAP-Kinase (auch als ERK2 bekannt) ²⁹⁵ und die cyclinabhängige Kinase 5 (CDK5/p35) ²⁹⁶. Eine Verbindung zwischen der Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 (*extracellular signal-related kinase 1/2*) und der Regulation der Expression von CTSX durch *H. pylori* konnte schon in vergangenen Studien nachgewiesen werden ¹⁴⁶. Es könnte sich also hier auch um eine indirekte Wirkung durch die reine Stimulation bestimmter Signaltransduktionswege handeln. Es gibt aber Hinweise auf eine Interaktion anderer Cysteinproteasen. Die Hemmung von CTSB und CTSL führte in Hippocampuschnitten zu einer Degradation von MAPT durch die Aspartatprotease CTSD ²⁹⁷. Darüber hinaus ist die *H. pylori*-Infektion bereits in drei Studien mit der Alzheimer Krankheit in Verbindung gebracht worden ^{298,299,300}. Das CagA kann die PAR1/MAR-Kinase (*protease-activated receptor/microtubule affinity-regulating kinases*) inhibieren, welche daraufhin die MAP-Kinase (TAU) phosphoryliert und die epitheliale Polarität bzw. Barrierefunktion zerstört und

somit eine Veränderung der Morphologie des Epithels verursacht^{301,302,303}. Warum speziell in den CTSX-defizienten Entzündungszellen das *mapt* hochreguliert wurde und ob es sich hierbei um einen spezifischen oder einen sekundären Effekt der *H. pylori*-Infektion handelt, muss weiter untersucht werden.

Die **CDK5R1**-Kinase (*cyclin-dependent kinase 5 activator 1*) moduliert die Zellreifung, Differenzierung, Migration und Apoptose in verschiedenen Geweben über die Interaktion von p35 mit CDK5^{288,304,305}. Des Weiteren wurde eine Aktivierung von pro-apoptotischen Genen und anschließender Mitochondrien-vermittelter Apoptose durch eine Interaktion zwischen dem CDK5 und dem p53 Protein (Tumor-Suppressor-Protein) gefunden^{306,307}. Ein Zusammenspiel zwischen Cathepsinen und CDK5R1 oder CDK5 ist bisher nicht beschrieben. Unsere Daten belegen trotz genereller Hochregulation auch keine drastischen Unterschiede zwischen den WT- und *ctsx*^{-/-}-Zellbereichen, so dass wahrscheinlich dieses Protein für CTSX und dessen Funktion keine entscheidende Rolle spielen wird.

Gleiches gilt für das **CYFIP2** Protein (*cytoplasmic fragile X mental retardation interacting protein2*), auch hier sind die Expressionssteigerungen zwischen den WT- und *ctsx*^{-/-}-Zellbereichen kaum auffällig. Ebenso ist die Funktion der CYFIP-Proteine noch weitgehend unbekannt. Es wird jedoch spekuliert, dass das CYFIP bei der Regulierung der translationalen Maschinerie an die synaptischen Terminals ebenfalls wieder im zentralen Nervensystem, beteiligt ist²⁸⁷. Bekannt ist jedoch, dass das CYFIP2 mit dem Rac1 interagiert, um daraufhin die WAVE ausgelöste Erhöhung der T-Zell-Adhäsion zu erleichtern. Außerdem konnte die in der Clusteranalyse gefundene funktionelle Beziehung zwischen der Protein-Phosphatase-Familie und dem CYFIP-Protein durch Castets *et al.* (2005) bestätigt werden³⁰⁸. Das PP2A ist eine *phospho-serine/threonine phosphatase* und in vielen Prozessen wie der Regulation des Zellzyklusses und der Zytoskelett-Reorganisation beteiligt³⁰⁹. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das PP2A mit Cofilin, einer nachgeschalteten Komponente der Rac1-Kaskade, interagiert, es dephosphoryliert und eine Aktin-Depolimerisation verursacht^{310,311,312,313,314}. Der kanzerogene Inhibitor von PP2A (CIP2A) gilt als neu identifiziertes Onkoprotein im Magenkarzinom. Er wird durch eine *H. pylori*-Infektion CagA-abhängig induziert und ist an

der Regulation von Proliferation/Seneszenz in Magenzellen beteiligt³¹⁵. Beide Prozesse sind auch für CTSX als Wirkorte beschrieben, so dass ein Zusammenhang zwischen dem geclusterten PP2A und der CTSX-Defizienz derzeit noch nicht ausgeschlossen wird³¹⁶.

Die **Aurora-Kinase C (AURKC)** gehört zu der Familie von Serin/Threonin-Kinasen, besitzt grundlegende Aufgaben während der Mitose und der Zellzyklus-Regulation und ist außerdem unerlässlich für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität³¹⁷. In mehreren Krebsarten wurden die Veränderungen in der Proteinexpression mit der Aggressivität und Progression der jeweiligen Krankheit in Verbindung gebracht³¹⁸. Des Weiteren zeigten diverse Studien eine direkte Interaktion von Aurora-Kinase A mit den wichtigen Tumor-Suppressor-Genen, wie z.B. dem p53 Protein^{319,320}. Aurora-Kinase B ist im Zusammenhang mit *H. pylori*-abhängigen Zellzyklusprozessen genannt worden, hat aber offensichtlich hier keine direkte Bedeutung³²¹. Die Ähnlichkeit des Expressionsprofils von AURKC und CAP-GLY (*domain containing linker protein 1*) konnte in der Literatur keine Bestätigung finden, so dass zu kontrollieren ist, ob die massive Induktion von AURKC in der SPEM von WT-Tieren sich im Vergleich zu *ctsx*^{-/-}-Mäusen bestätigen wird.

Sowohl im skelettalen als auch im glatten Muskel (Magen-Darm-Kanal) ist eine Erhöhung oder Erniedrigung der cytosolischen Ca⁺⁺-Konzentration für die Initiierung einer Kontraktion bzw. Relaxation das auslösende Signal. Durch die erhöhte Ca⁺⁺-Konzentration wird beispielsweise die Ca⁺⁺/Calmodulin-abhängige *myosin light chain kinase (MYLK)* aktiviert, die durch Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins (MLC) eine Reorganisation des Zytoskeletts einleitet^{322,323}. Ridley und Hall (1992) zeigten erstmalig die Beteiligung an der Reorganisation des Actin-Zytoskeletts durch aktiviertes RhoA. Dieses bindet an ROCK und bewirkt dadurch die Aktivierung der Kinase, woraufhin die Phosphorylierung des MLC und MYLK eine Veränderung von Zellformen und Motilität verursacht³²⁴. Eine Hypermethylierung von MYLK wurde zudem erst kürzlich zusammen mit FAM5C als potentieller Biomarker zur Diagnose von Magenkarzinomen im Serum beschrieben³²⁵. Interessanterweise konnte die Heraufregulation von MYLK nach *H. pylori*-Infektion auch in der Literatur gezeigt werden. Der Funktionsverlust von Occludin, Claudin-4 und Claudin-5

nach *H. pylori*-Infektion von konfluenten transformierten Epithelzellen ging einher mit einer Erhöhung der epithelialen Durchlässigkeit und wurde eindeutig als MYLK-abhängig definiert^{326,327}. Inwieweit die sehr hohe Expression von MYLK in den SPEM-Proben und vor allem den Entzündungsarealen in diese Datenlage passt, wird derzeit mittels immunhistochemischer Analysen an größeren Gewebecohorten geprüft.

H. pylori-cagA-positive Stämme induzieren eine verstärkte Expression von Rho-GTPasen wie Rac1 und CDC42^{80,328}, welches an die GTPase-Bindungsdomäne (GBD) von **WASP** bzw. N-WASP bindet, wodurch (aufgrund einer Konformationsänderung der Proteine) eine vermittelte Arp2/3-Aktivierung ausgelöst wird^{329,330,331}. Der Arp2/3-Komplex ist in Bereichen des raschen Aktinfilament-Wachstums, wie den Lamellipodien, zu finden^{332,333,334}. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Clusteranalyse, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das hochregulierte WAS-Protein in seinem Expressionsprofil dem Expressionscluster des CDC42-Proteins sehr ähnlich war und damit wird die funktionelle Beziehung bestätigt. Des Weiteren sind die Proteine der WASP-Familie auch an der Bildung von Podosomen beteiligt, welche aufgrund der Induktion der schnellen Aktin-Polymerisation den Abbau der extrazellulären Matrix beeinflussen^{335,336,337}. Neuste Studien fanden einen neuen Bindungspartner von N-WASP, welcher ebenfalls durch *H. pylori* aktiviert wird und an der Podosomen-Bildung beteiligt ist³³⁸. Das Cortactin spielt eine wichtige Rolle bei der Tumordinvasion, wobei es über zwei unabhängige Wege, durch Stimulation von ERK und Inaktivierung von Src, beeinflusst wird^{70,339,340}. Da CTSX über seine Integrin-bindungsabhängige Adhäsion mit hoher Wahrscheinlichkeit auch an der Lamellopodien- und Podosomen-Bildung beteiligt ist, scheint ein Zusammenspiel dieser beiden Enzyme wahrscheinlich. WASP wurde seltsamerweise im Oberflächenepithel von WT- und *ctsx*^{-/-}-Mäusen in gleicher Weise hochreguliert, wohingegen im Entzündungsinfiltrat der *ctsx*^{-/-}-Mäuse nahezu keine Induktion stattfand, während in den WT-Mäusen der dritthöchste RQ-Wert der Studie ermittelt wurde. Da CTSX anhand der Befunde *in vivo* eindeutig eine Funktion in der Makrophagen- und Lymphozyteneinwanderung zugesprochen wird, ist der Verlust an WASP in den CTSX-defizienten Entzündungszellen bemerkenswert und wird derzeit intensiv untersucht.

Bei detaillierter Betrachtung der Expressionssteigerungen, unterstützt die in dieser Arbeit durchgeführte Array-Analyse die bisherigen Literatur-Daten über den Einfluss von *H. pylori* auf eine große Vielzahl von Signaltransduktionswegen^{73,341,342}. Die Ähnlichkeit des Oberflächenepithels (+*H. pylori*) mit den nicht-infizierten Kontroll-Zellbereichen in Bezug auf das Genprofil, bestätigt nur die morphologischen Vorgänge im Verlauf der Karzinogenese der Mäusemägen, da die entscheidenden epithelialen Veränderungen hier in der Tiefe und nicht an der Oberfläche erfolgen. Folgerichtig fanden sich sechs unterschiedliche Gene mit einem auffälligen Expressionsmuster, vor allem in den mikrodissezierten Entzündungszellen und SPEM-Bereichen nach *H. pylori*-Infektion. Erstaunlicherweise stehen diese relevanten Kandidatengene (Tab. 6), nicht in direktem Zusammenhang bzw. in direkter funktionaler Beziehung zueinander. Warum die Zusammensetzung der Cluster in den WT und transgenen Mäusen zum Teil sehr unterschiedlich ist, bleibt nach wie vor fraglich, zeigt aber andererseits einen eindeutigen Bezug von CTSX zu zytoskeletalen Vorgängen. Darauf weist auch das verzögerte Einsetzen der Hochregulation vieler Gene in den *ctsx*^{-/-}-Gewebe hin. Bislang wurden noch keinerlei arraybasierte Expressionsstudien an *ctsx*^{-/-}-Mausgeweben durchgeführt. Somit geben die hier gezeigten Daten erste Ansätze für umfangreiche Folgestudien zu Struktur-/Funktionsbeziehungen von CTSX und den identifizierten B- und T-Zell- sowie Zytoskelle-Markern.

6 ZUSAMMENFASSUNG

H. pylori wurde im Jahr 1994 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zum Klasse-I-Karzinogen erklärt. Das Bakterium ist ein extrazelluläres Pathogen, welches die humane Magenschleimhaut besiedelt und eine lokale Immunantwort induziert. Die Infektion mit dem *H. pylori* führt zur Entstehung von chronischer Gastritis, Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren oder der Ausbildung maligner Tumore des Magens. Die Cathepsine B, L, K, W und ebenfalls das untersuchte Cathepsin X, werden unterschiedlich stark in der entzündeten und neoplastischen Magenschleimhaut exprimiert. Eine zunehmende Zahl von Daten aus der Fachliteratur weist immer deutlicher darauf hin, dass zwar das CTSB die dominante Cysteinprotease ist, jedoch ausschließlich für das CTSX konnte eine signifikante Induktion in Magenbiopsien bei *H. pylori*-infizierten Patienten nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu vielen anderen Cysteinproteasen ist die Funktion, Regulation, die *H. pylori*-spezifische Induktion von CTSX und deren Bedeutung in der Magenkarzinogenese *in vivo* und *in vitro* unverstanden und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung eines transgenen Mausmodells evaluiert. Es wurden zusätzlich zu den etablierten Zellkulturmodellen primäre Zellkulturen direkt aus der Maus (primäre Epithelzellen aus WT- und C57BL/6*ctsx*^{-/-}) etabliert, um der Situation *in vivo* zu entsprechen. Mit diesem Zellsystem konnten *in vivo*-nah spezifische Funktionen des induzierten CTSX im Rahmen der *H. pylori*-induzierten Magenkarzinogenese identifiziert und bereits beobachtete Effekte *in vivo* bestätigt werden. Des Weiteren konnte in den *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen nach *H. pylori*-Infektion eine Tendenz zur stärkeren Induktion der proinflammatorischen Zytokine gezeigt werden. Außerdem konnte in Konfrontations-Zellkulturen der Einfluss von CTSX auf die Makrophagen-Migration über den Faktor MIF-1 nachgewiesen werden. Über eine cDNA-Mikroarray-Analyse wurde CTSX ebenfalls mit Faktoren der T-Zell- und B-Zell-Proliferation in Verbindung gebracht, so dass eine gut koordinierte und eindeutige Wirkung von CTSX in den entzündlichen Prozessen gegeben ist.

Die Forschung zielt mittlerweile auf eine möglichst komplette Inventur der Proteine sowie die Beschreibung des Netzwerkes an Protein-Wechselwirkungen in einer Zelle oder einem Organismus ab, welche charakteristisch sind für den spezifischen zellulären Zustand und die

Funktion der Proteine. Die Laser-Mikrodissektion (LCM) in Kombination mit der PCR-Array-Technologie stellt hierfür ein ideales Werkzeug dar. Über drei verschiedene Zeitpunkte (24, 36, 50 Wochen nach *H. pylori*-Stimulation) in vier verschiedenen Magenzellpopulationen wurden sechs Zytoskelett-assoziierte Gene identifiziert, die differentielle Expressionsmuster in *ctsx*^{-/-}- versus WT-Zellpopulationen aufzeigten. WASP, MYLK sowie PP2A wurden als Interaktionsmoleküle von CTSX postuliert und stellen die Basis für zukünftige Struktur-/Funktionsanalysen zur Klärung der funktionellen Bedeutung des CTSX im Rahmen der Magenkarzinogenese dar.

SUMMARY

In 1994 *H. pylori* was declared class I carcinogen by the WHO. The bacterium is an extracellular pathogen which colonizes the human stomach in the area of the antrum and corpus region and induces a local immune reaction in the stomach lining. The infection with *H. pylori* leads to the generation of chronic gastritis, stomach and duodenal ulcers or the formation of malignant tumors of the stomach. The cathepsin B, L, K, W and CTSX, which was analysed here, are differently expressed in the inflamed and neoplastic stomach. An increasing number of data from the literature show a significant induction exclusively for the CTSX in stomach biopsies from *H. pylori* infected patients, although CTSE is the dominant cysteine protease. Unlike many other cysteine proteases the function, regulation, the *H. pylori*-specific induction of the CTSX and its meaning are largely not understood in stomach carcinogenesis *in vivo* and *in vitro* and therefore we used *ctsx*-deficient mice in a *H. pylori* gastritis mouse model. In addition to the established cell culture model we isolated mouse primary epithelial cells directly from WT and C57BL/6 *ctsx*^{-/-} -mice, to mimic the *in vivo* situation. With this cell system we could identify *in vivo*-near the specific functions of the induced CTSX in the context of *H. pylori*-induced stomach carcinogenesis and thus we could confirm former results *in vivo*. In addition, *ctsx*^{-/-} -epithelial cells show a tendency for higher proinflammatory cytokine induction after *H. pylori* infection. Furthermore the influence of CTSX on macrophage migration could be proved with the factor MIF-1 in confrontation cell cultures. By using cDNA microarray assays we also found a connection between CTSX and the factors of T- and B-cell proliferation, so that there is a well coordinated and clear effect of CTSX in the inflammatory processes.

Meanwhile, the research is aimed at a complete description of the protein as well as an analysis of protein interaction in cells or organisms, which are characteristic for the specific cellular condition and the function of the proteins. The laser-microdissection (LCM) in combination with the PCR array technology represents an ideal model for this investigation. Using four different stomach cell populations and 3 different time points (24, 36, 50 weeks after *H. pylori*-stimulation), we identified 6 cytoskeleton-associated genes, that show differential expression patterns in *ctsx*^{-/-} - versus WT cell populations. WASP, MYLK as well as PP2A

were postulated as interaction molecules of CTSX and represent the baseline for future structure-/ functional analyses for the clarification of the functional meaning of CTSX in the context of the gastric carcinogenesis.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Blaser, M. J., Atherton, J. C. (2004) *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest.* 113: 321-33.
2. Marshall, B. J., Warren, J. R. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 1: 311-15.
3. Montecucco, C., Rappuoli, R. (2001) Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2: 457-66.
4. Marshall, B. J. (1989) History of the discovery of *C. pylori*. In: Blaser MJ (ed): *Campylobacter pylori* in gastritis and peptic ulcer disease. Igaku-Shoin, New York Tokyo. 7-23.
5. Warren, J. R., Marshall, B. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet.* 1: 1273-75.
6. Goodwin, C. S., McCulloch, R. K., Armstrong, J. A., Wee, S. H. (1985) Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J Med Microbiol.* 19: 257-67.
7. Goodwin, C. S. (1990) Taxonomy of *Helicobacter pylori* and related bacteria. In: Malfertheiner, P., Ditschuneit, H. (eds): *Helicobacter pylori*, gastritis and peptic ulcer. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 3-8.
8. Kung, J. S. L., Ho, B., Chan, S.H. (1989) Biotyping of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol.* 29: 203-06.
9. Goodwin, C. S., Armstrong, J. A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M. D., Sly, L. I., McConnell, W., Harper, W. E. S. (1989) Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 39: 397-405.
10. Hu, L. T., Mobley, H. L. (1990) Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 58: 992-98.
11. Teyssen, S., Chari, S. T., Scheid, J., Singer, M. V. (1995) Effect of repeated boluses of intravenous omeprazole and primed infusions of ranitidine on 24-hour intragastric pH in healthy human subjects. *Dig Dis Sci.* 40: 247-55.

12. Eaton, K. A., Brooks, C. L., Morgan, D. R., Krakowka, S. (1991) Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.* 59: 2470-75.
13. Sachs, G., Weeks, D. L., Melchers, K., Scott, D. R. (2003) The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Physiol.* 65: 349-69.
14. Schreiber, S., Buckler, R., Groll, C., Azevedo-Vethacke, M., Garten, D., Scheid, P., Friedrich, S., Gatermann, S., Josenhans, C., Suerbaum, S. (2005) Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen *in vivo*. *Infect Immun.* 73: 1584-89.
15. Eaton, K. A., Suerbaum, S., Josenhans, C., Krakowka, S. (1996) Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun.* 64: 2445-48.
16. Labigne, A., de Reuse, H. (1996) Determinants of *Helicobacter pylori* pathogenicity. *Infect Agents Dis.* 5: 191-202.
17. Leying, H., Suerbaum, S., Geis, G., Haas, R. (1992). Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol Microbiol.* 6: 2863-74.
18. Lee, A. (1994) The microbiology and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol.* 29 (201): 2-6.
19. Bode, G., Malfertheiner, P., Lehnhardt, G., Ditschuneit, H. (1990) Virulence factors of *Helicobacter pylori* – ultrastructural features. In: Malfertheiner, P., Ditschuneit, H. (eds.): *Helicobacter pylori*, gastritis and peptic ulcer. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 63-73.
20. Dekigai, H., Murakami, M., Kita, T. (1995) Mechanism of *Helicobacter pylori* associated gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci.* 40: 1332-39.
21. Furuta, T., Baba, S., Takashima, M., Futami, H., Arai, H., Kajimura, M., Hanai, H., Kaneko, E. (1998) Effect of *Helicobacter pylori* infection on gastric juice pH. *Scand J Gastroenterol.* 33: 357-63.
22. Leunk, R. D. (1991) Production of a cytotoxin by *Helicobacter pylori*. *Rev Infect Dis.* 13 (8): 686-89.
23. Pounder, R. E., Ng, D. (1995) The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther.* 9 (2): 33-39.

24. Dixon, M. F., Ectors, N. L. (1995) Gastric cancer. *Curr opin in gastroenterol.* 11 (1): 38-41.
25. Graham, D. Y., Adam, E., Reddy, G. T., Agarwal, P. J., Agarwal, R., Evans, jr. D. E., Malaty, H. M., Evans, D. G. (1991) Seroepidemiology of *helicobacter pylori* infection in India - Comparison of developing and developed countries. *Dig dis sci.* 36: 1084-88.
26. Megraud, F., Brassens-Rabbe, M. P., Denis, F., Belbouri, A., Hoa, D. Q. (1989) Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J Clin Microbiol.* 27: 1870-73.
27. Feldmann, R. A., Eccersley, A. J., Hardie, J. M. (1998) Epidemiology of *Helicobacter pylori*: acquisition, transmission, population prevalence and disease-to-infection ratio. *Br Med Bull.* 54: 39-53.
28. Suerbaum, S., Achtman, M. (2004) *Helicobacter pylori*: recombination, population structure and human migrations. *Int J Med Microbiol.* 294: 133-39.
29. Aspholm-Hurtig, M., Dailide, G., Lahmann, M., Kalia, A., Ilver, D., Roche, N., Vikstrom, S., Sjostrom, R., Linden, S., Backstrom, A. (2004) Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. *Science.* 305: 519-22.
30. Malaty, H. M., Evans, D. G., Evans, D. J. Jr., Graham, D. Y. (1992) *Helicobacter pylori* in Hispanics: comparison with blacks and whites of similar age and socioeconomic class. *Gastroenterol.* 103: 813-16.
31. Malaty, H. M., Graham, D. Y. (1994) Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 35: 742-45.
32. Han, S. R., Zschausch, H. C., Meyer, H. G., Schneider, T., Loos, M., Bhakdi, S., Maeurer, M. J. (2000) *Helicobacter pylori*: clonal population structure and restricted transmission within families revealed by molecular typing. *J Clin Microbiol.* 38: 3646- 51.
33. Malaty, H. M., Nyren, O. (2003) Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 8 (1): 8-12.
34. Megraud, F. (1995) Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment Pharmacol Ther.* 9 (2): 85-91.
35. Malaty H. M., Graham D. Y., Klein P. D., Evans D. G., Adams, E., Evans D. J.(1991) Transmission of *Helicobacter pylori* infection. Studies in families of healthy individuals. *Scand J Gastroenterol.* 26 (9): 927-32.

36. Rothenbacher, D., Winkler, M., Gonser, T., Adler, G., Brenner, H. (2002) Role of infected parents in transmission of *helicobacter pylori* to their children. *Pediatr Infect Dis J.* 21: 674-79.
37. Kuipers, E. J., Thijs, J. C., Festen, H. P. (1995) The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 9: 59-69.
38. Vaira, D., Miglioli, M., Mule, P., Holton, J., Menegatti, M., Vergura, M., Biasco, G., Conte, R., Logan, R. P., Barbara, L. (1994) Prevalence of peptic ulcer in *Helicobacter pylori* positive blood donors. *Gut.* 35: 309-12.
39. Forman, D. (1991) *Helicobacter pylori* infection: a novel risk factor in the etiology of gastric cancer. *J Natl Cancer Inst.* 83 (23): 1702-03.
40. Nomura, A., Stemmermann, G. N. (1993) *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 8 (3): 294-303.
41. Parsonnet, J., Friedmann, G. D., Vandersteen, D. P. (1991) *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med.* 325 (16): 1127-31.
42. Dixon, M. F. (1990) *Helicobacter pylori* and peptic ulceration: Histopathological aspects. *J Gastroenterol Hepatol.* 6: 125-30.
43. Fiocca, R., Villani, L., De Giacomo, C., Perego, M., Trespi, E., Solcia, E. (1989) Morphological evidence of *campylobacter pylori* pathogenicity in chronic gastritis and peptic ulcer. *Acta Gastro-Enterol Belgica.* 52: 324-35.
44. Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., Taniyama, K., Sasaki, N., Schlemper, R. J. (2001) *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med.* 345: 784-89.
45. Wotherspoon, A. C., Ortiz Hidalgo, C., Falzon, M. R., Isaacson, P. G. (1991) *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet.* 338: 1175-76.
46. Wotherspoon, A. C., Doglioni, C., Diss, T. C., Pan, L., Moschini, A., deBoni, M., Isaacson, P. G. (1993) Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet.* 342: 575-77.
47. Schmausser, B., Mueller, S. O., Eck, M., Moller, M., Muller-Hermelink, H., Stopper, H. (2000) *Helicobacter pylori* induces DNA damage *in vitro*. *Cancer Lett.* 152: 145-49.

48. Peek, E. M. Jr., Wirth, H. P., Moss, S. P., Yang, M., Abdalla, A. M., Tham, K. T., Zhang, T., Tang, L. H., Modin, I. M., Blaser, M. J. (2000) *Helicobacter pylori* alters gastric epithelial cell cycle events and gastric secretion in Mongolian gerbils. *Gastroenterol.* 118: 48-59.
49. Xia, H. H., Talley, N. J. (2001) Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol.* 96: 16-26.
50. IARC (1999) Shistosomes, liver flukes and *helicobacter pylori*. *WHO Publications* 61: 177-240.
51. Cover, T. L., Hanson, P. I., Heuser, J. E. (1997) Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of asse bly. *J Cell Biol.* 138: 759-69.
52. Atherton, J. C., Cao, P., Peek, R. M. J., Tummuru, M. K., Blaser, M. J., Cover, T. L. (1995) Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem.* 270: 17771.
53. Atherton, J. C., Peek, R. M., Jr., Tham, K. T., Cover, T. L., and Blaser, M. J. (1997) Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 112: 92-99.
54. Baldari, C. T., Lanzavecchia, A., Telford, J. L. (2005) Immune subversion by *Helicobacter pylori*. *Trends Immunol.* 26: 199-207.
55. Van de Bovenkamp, J. H., Mahdavi, J., Korteland-Van Male, A. M., Buller, H. A., Einerhand, A. W., Boren, T., Dekker, J. (2003) The MUC5AC glycoprotein is the primary receptor for *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Helicobacter.* 8: 521-532.
56. Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N.(1993) Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci. USA* 90: 791-795.
57. Blaser, M. J. (1996). Role of vacA and the cagA locus of *Helicobacter pylori* in human disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 10 (1): 73-77.
58. Ghiara, P., Marchetti, M., Blaser, M. J., Tummuru, M. K., Cover, T. L., Segal, E. D., Tompkins, L. S., Rappuoli, R. (1995) Role of the *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, CagA, and urease in a mouse model of disease. *Infect Immun.* 63: 4154-60.

59. Telford, J. L., Ghiara, P., Dell'orco, M., Comanducci, M., Burroni, D., Bugnoli, M., Tecce, M. F., Censini, S., Covacci, A., Xiang, Z., *et al.* (1994) Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med.* 179: 1653-58.
60. Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., Haas, R. (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science.* 287: 1497-1500.
61. Backert, S., Ziska, E., Brinkmann, V., Zimny-Arndt, U., Fauconnier, A., Jungblut, P. R., Naumann, M., Meyer, T. F. (2000) Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatuses. *Cell Microbiol.* 2: 155-64.
62. Amieva, M. R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L. S., Nelson, W. J., Falkow, S. (2003) Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science.* 300 (5624): 1430-34.
63. Bourzac, K. M., Guillemin, K. (2005) *Helicobacter pylori*-host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cell Microbiol.* 7 (7): 911-19.
64. Selbach, M., Moese, S., Hauck, C. R., Meyer, T. F., Backert, S. (2002) Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem.* 277: 6775-78.
65. Asahi, M., Azuma, T., Ito, S., Ito, Y., Suto, H., Nagai, Y., Tsubokawa, M., Tohyama, Y., Maeda, S., Omata, M., Suzuki, T., Sasakawa, C. (2000) *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Med.* 191: 593-602.
66. Tsutsumi, R., Higashi, H., Higuchi, M., Okada, M., Hatakeyama, M. (2003) Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J Biol Chem.* 278: 3664-70.
67. Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., Hatakeyama, M. (2002) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science.* 295: 683-86.
68. Tsutsumi, R., Takahashi, A., Azuma, T., Higashi, H., Hatakeyama, M. (2006) Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol Cell Biol.* 26: 261-76.
69. Churin, Y., Al-Ghoul, L., Kepp, O., Meyer, T. F., Birchmeier, W., Naumann, M. (2003) *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *J Cell Biol.* 161 (2): 249-55.

70. Selbach, M., Moese, S., Hurwitz, R., Hauck, C. R., Meyer, T. F., Backert, S. (2003) The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *Embo Journal*. 22: 515-28.
71. Brandt, S., Kwok, T., Hartig, R., König, W., Backert, S. (2005) NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci*. 102 (26): 9300-05.
72. Crabtree, J. E., Shallcross, T. M., Heatley, R. V., Wyatt, J. I. (1991) Mucosal tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Gut*. 32 (12): 1473-77.
73. Crabtree, J. E., Peichl, P., Wyatt, J. I., Stachl, U., Lindley, I. J. (1993) Gastric interleukin-8 and IgA IL-8 autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection. *Scandinavian Journal of Immunology*. 37 (1): 65-70.
74. Crabtree, J. E., Covacci, A., Farmery, S. M., Xiang, Z., Tompkins, D. S., Perry, S., Lindley, I. J., Rappuoli, R. (1995) *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J Clin Pathol*. 48 (1): 41-45.
75. Fischer, W., Puls, J., Buhrdorf, R., Gebert, B., Odenbreit, S., Haas, R. (2001) Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol*. 42: 1337-48.
76. Gionchetti, P., Vaira, D., Campieri, M., Holton, J., Menegatti, M., Belluzzi, A., Bertinelli, E., Ferretti, M., Brignola, C., Migliolo, M. Barbara, L. (1994) Enhanced mucosal interleukin-6 and -8 in *Helicobacter pylori*-positive dyspeptic patients. *Am J Gastroent*. 89: 883-87.
77. Peek, R. M. Jr., Blaser, M. J. (2002) *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*. 2: 28-37.
78. Dixon, M. F. (1994) Pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 201: 7-10.
79. Keates, S., Hitti, Y. S., Upton, M., Kelly, C. P. (1997) *Helicobacter pylori* infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. *Gastroenterol*. 113: 1099-1109.
80. Naumann, M., Wessler, S., Bartsch, C., Wieland, B., Covacci, A., Haas, R., Meyer, T. F. (1999) Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the cag pathogenicity island. *J Biol Chem*. 274 (44): 31655-62.

81. Pomorski, T., Meyer, T. F., Naumann, M. (2001) *Helicobacter pylori*-induced prostaglandin E (2) synthesis involves activation of cytosolic phospholipase A (2) in epithelial cells. *J Biol Chem.* 276: 804-10.
82. Quiding-Jarbrink, M. L. H., Ahlstedt, I., Holmgren, J., Svennerholm, A.M. (2001) Human gastric B cell responses can be induced by intestinal immunisation. *Gut.* 49: 512-18.
83. Marshall, B. J. (1994) *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol.* 89 (1): 116-28.
84. Del Giudice, G., Michetti, P. (2004) Inflammation, immunity and vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 9 (1): 23-28.
85. Polenghi, A., Bossi, F., Fischetti, F., Durigutto, P., Cabrelle, A., Tamassia, N., Cassatella, M. A., Montecucco, C., Tedesco, F., de Bernard, M. (2007) The neutrophil activating protein of *Helicobacter pylori* crosses endothelia to promote neutrophil adhesion in vivo. *J Immunol.* 178: 1312-20.
86. Wang, G., Alamuri, P., Maier, R. J. (2006) The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.* 61: 847-60.
87. Allen, L. A. (2007) Phagocytosis and persistence of *Helicobacter pylori*. *Cell Microbiol* 9: 817-28.
88. Zheng, P. Y., Jones, N. L. (2003) *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. *Cell Microbiol.* 5: 25-40.
89. Bamford, K. B., Fan, X., Crowe, S. E., Leary, J. F., Gourley, W. K., Luthra, G. K., Brooks, E. G., Graham, D. Y., Reyes, V. E., Ernst, P. B. (1998) Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenter.* 114: 482-92.
90. D'Elis, M. M., Manghetti, M., De, C. M., Costa, F., Baldari, C. T., Burrioni, D., Telford, J. L., Romagnani, S., Del Prete, G. (1997) T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J Immunol.* 158: 962-67.
91. Correa, P., Houghton, J. (2007) Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 133: 659-72.
92. Sipponen, P., Marshall, B. J. (2000) Gastritis and gastric cancer. Western countries. *Gastroenterol Clin North Am.* 29 (3): 579-92.

93. Siewinski, M., Gutowicz, J., Zarzycki, A., Mikulewicz, W. (1996) Role of Cysteine Endopeptidases in Cancerogenesis. *Cancer Biother Radiopharm.* 11: 169-76.
94. Mignatti, P., Rifkin, D. B. (1993) Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* 73: 161-95.
95. Demchik, L. L., Sloane, B. F. (1999) Cell-surface proteases in cancer. In *Proteases: New Perspectives*, Turk, ed., Birkhäuser Verlag, Basel/Switzerland: 109-24.
96. Murray, G. I., Duncan, M. E., Arbuckle, E., Melvin, W. T., Fothergill, J. E. (1998) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. *Gut.* 43: 791-797.
97. Herszenyi, L., Plebani, M., Carraro, P., De Paoli, M., Roveroni, G., Cardin, R., Foschia, F., Tulassay, Z., Naccarato, R., Farinati, F. (2000) Proteases in gastrointestinal diseases. *Cin Chim Acta.* 291 (2): 171-87.
98. DeClerck, Y. A., Mercurio, A. M., Stack, M. S., Chapman, H. A., Zutter, M. M., Muschel, R. J., Raz, A., Matrisian, L. M., Sloane, B. F., Noel, A., *et al.* (2004) Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am J Pathol.* 164: 1131-39.
99. Guinec, N., Dalet-Fumeron, V., Pagano, M. (1993) "In vitro" study of basement membrane degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B, B-like and L. Digestion of collagen IV, laminin, fibronectin, and release of gelatinase activities from basement membrane fibronectin. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 374: 1135-46.
100. Lah, T. T., Kos, J., Blejec, A., Frkovic-Georgio, S., Golouh, R., Vrhovec, I. I., Turk, V. V. (1997) The expression of lysosomal proteinases and their inhibitors in breast cancer: possible relationship to prognosis of the disease. *Pathol Oncol Res.* 3: 89-99.
101. Gooz, M., Gooz, P., Smolka, A. J. (2001) Epithelial and bacterial metalloproteinases and their inhibitors in *H. pylori* infection of human gastric cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281 (3): 823-32.
102. Menges, M., Chan, C. C., Zeitz, M., Stallmach, A. (2000) Higher concentration of matrix-metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) in *H. pylori*-compared to NSAID-induced gastric ulcers. *Z Gastroenterol.* 38 (11): 887-91.
103. Bebb, J. R., Letley, D. P., Thomas, R. J., Aviles, F., Collins, H. M., Watson, S. A., Hand, N. M., Zaitoun, A., Atherton, J. C. (2003) *Helicobacter pylori* upregulates matrilysin (MMP-7) in epithelial cells *in vivo* and *in vitro* in a *Cag* dependent manner. *Gut.* 52: 1408-13.

104. Crawford, H. C., Krishna, U. S., Israel, D. A., Matrisian, L. M., Washington, M. K., Peek, R. M. Jr. (2003) *Helicobacter pylori* strain-selective induction of matrix metalloproteinase-7 *in vitro* and within gastric mucosa. *Gastroenterol.* 125: 1125-36.
105. Mori, N., Sato, H., Hayashibara, T., Senba, M., Geleziunas, R., Wada, A., Hirayama, T., Yamamoto, N. (2003) *Helicobacter pylori* induces Matrix Metalloproteinase-9 through activation of nuclear factor kappaB. *Gastroenterol.* 124: 983-92.
106. Wroblewski, L. E., Noble, P. J., Pagliocca, A., Pritchard, D. M., Hart, C. A., Campbell, F., Dodson, A. R., Dockray, G. J., Varro, A. (2003) Stimulation of MMP-7 (matrilysin) by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells: role in epithelial cell migration. *J Cell Sci.* 116: 3017-26.
107. Farinati, F., Herszenyi, L., Plebani, M., Carraro, P., De Paoli, M., Cardin, R., Roveroni, G., Rugge, M., Nitti, D., Grigioni, W. F., D'Errico, A., Naccarato, R. (1996) Increased levels of Cathepsin B and L, urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type-1 as an early event in gastric carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 17: 2581-87.
108. Barrera, C., Ye, G., Espeio, R., Gunasena, S., Almanza, R., Leary, J., Crowe, S., Ernst, P., Reyes, V. E. (2001) Expression of cathepsins B, L, S, and D by gastric epithelial cells implicates them as antigen presenting cells in local immune responses. *Hum Immunol.* 62 (10): 1081-91.
109. Coffey, J. W., De Duve, C. (1968) Digestive activity of lysosomes. I. The digestion of proteins by extracts of rat liver lysosomes. *J Biol Chem.* 243: 3255-63.
110. Willstaetter, R., Bamann, E. (1929) Über die Proteasen der Magenschleimhaut. *Hoppe Seylers Z Physiol Chemie.* 180: 127-43.
111. Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F. (1998). Handbook of Proteolytic Enzymes. *Academic Press.* London.
112. Mohamed, M. M., Sloane, B. F. (2006) Cysteine Cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer.* 6 (10): 764-75.
113. Inaoka, T., Bilbe, B., Ishibashi, O., Tezuka, K., Kumegawa, M., Kokubo, T. (1995) Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Biochem Biophys Res Comm.* 206: 89-96.
114. Linnevers, C., Smeekens, S. P., Broemme, D. (1997) Human cathepsin W, a putative cysteine protease predominantly expressed in CD8+ T-lymphocytes. *FEBS Lett.* 405: 253-59.

115. Velasco, G., Ferrando, A. A., Puente, X. S., Sánchez, L. M., López-Otín, C. (1994) Human cathepsin O. *J Biol Chem.* 269 (43): 27136-42.
116. Kirschke, H., Barrett, A. J., Rawlings, N. D. (1995) Proteinases 1. Lysosomal cysteine proteinases. In: *Protein Profile. Academic Press London.* 2: 1587-1644.
117. Erickson, A. H. (1989) Biosynthesis of lysosomal endopeptidases. *J Cell Biochem.* 40 (1): 31-41.
118. Gupta, D. K., Schmidt, A., von Figura, K., Hasilik, A. (1984) Processing and transport of lysosomal enzymes in human monocyte line U937. *Physiol Chem Hoppe Seyler.* 365 (8): 867-76.
119. Matsueda, R., Umeyama, H., Kominami, E., Katunuma, N. (1988) Design and synthesis of cathepsin B inhibitors by an affinity labelling approach. *Chem Lett.* 1857-60.
120. Nishimura, Y., Kawabata, T., Kato, K. (1988) Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymic activation and proteolytic processing *in vitro*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 261 (1): 64-71.
121. Brooks, S. A., Lomax-Browne, H. J., Carter, T. M., Kinch, C. E., Hall, D. M. (2010) Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem.* 112 (1): 3-25.
122. Chapman, H. A., Riese, R. J., Shi, G. P. (1997) Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol.* 59: 63-88.
123. Jedeszko, C., Sloane, B. F. (2004) Cysteine Cathepsins in human cancer. *Biol Chem.* 385: 1017-27.
124. Cavallo-Medved, D., Rudy, D., Blum, G., Bogyo, M., Caglic, D., Sloane, B.F. (2009) Livecell imaging demonstrates extracellular matrix degradation in association with active cathepsin B in caveolae of endothelial cells during tube formation. *Exp Cell Res.* 315 (7): 1234-46.
125. Sloane, B. F., Yan, S., Podgorski, I., Linebaugh, B. E., Cher, M. L., Mai, J., Cavallo-Medved, D., Sameni, M., Dosesco, J., Moin, K. (2005) Cathepsin B and tumor proteolysis: contribution of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol.* 15 (2): 149-57.
126. Trabandt, A., Mueller-Ladner, U, Kriegsmann, J., Gay, R. E, Gay, S. (1995) Expression of proteolytic cathepsins B, D, and L in periodontal gingival fibroblasts and tissues. *Lab Invest.* 73: 205-12.
127. Lenarcic, B., Gabrijelcic, D., Rozman, B., Drobnic-Kosorok, M., Turk, V. (1988) Human cathepsin B and cysteine proteinase inhibitors (CPIs) in inflammatory and metabolic joint diseases. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 369: 257-61.

128. Mueller-Ladner, U., Gay, R. E., Gay, S. (1996) Cysteine proteinases in arthritis and inflammation. *Perspect Drug Discov Design*. 6: 87-98.
129. Bever, C. T. Jr., Garver, D. W. (1995) Increased cathepsin B activity in multiple sclerosis brain. *J Neurol Sci*. 131: 71-73.
130. Hirano, T., Manabe, T., Takeuchi, S. (1993) Serum cathepsin B levels and urinary excretion of cathepsin B in the cancer patients with remote metastasis. *Cancer Lett*. 70: 41-44.
131. Krueger, S., Haechel, C., Buehling, F., Roessner, A. (1999) Inhibitory effects of antisense cathepsin B cDNA transfection on invasion and motility in human osteosarcoma cell line. *Cancer Res*. 59 (23): 6010-14.
132. Krueger, S. J., Keshamouni, G. V., Atanaskova, N., Reddy, B. K. (2001) Temporal and quantitative regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) modulates cell motility and invasion. *Oncogene*. 20: 4209-18.
133. Goretzki, L., Schmitt, M., Mann, K., Calvete, J., Chucholowski, N., Kramer, M., Gunzler, W. A., Janicke, F., Graeff, H. (1992) Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. *FEBS Lett*. 297: 112-18.
134. Kobayashi, H., Schmitt, M., Goretzki, L., Chucholowski, N., Calvete, J., Kramer, M., Gunzler, W. A., Janicke, F., Graeff, H. (1991) Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (Pro-uPA). *J Biol Chem*. 266: 5147-52.
135. Gocheva, V., Joyce, J. A. (2007) Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle*. 6 (1): 60-64.
136. Jean, D., Rousselet, N., Frade, R. (2006) Expression of cathepsin L in human tumor cells is under the control of distinct regulatory mechanisms. *Oncogene*. 25: 1474-84.
137. Vasiljeva, O., Papazoglou, A., Krüger, A., Brodoefel, H., Korovin, M., Deussing, J., Augustin, N., Nielsen, B. S., Almholt, K., Bogyo, M., Peters, C., Reinheckel, T. (2006) Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res*. 66: 5242-50.
138. Felbor, U., Kessler, B., Mothes, W., Goebel, H. H., Ploegh, H. L., Bronson, R. T., Olsen, B. R. (2002) Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsin B and L. *Proc Natl Acad Sci*. 99: 7883-88.

139. Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., Moritz, J. D., Schu, P., von Figura, K. (1998) Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci. USA* 95: 13453-58.
140. Deaton, D. N., Kumar, S. (2004) Cathepsin K inhibitors: their potential as anti-osteoporosis agents. *Prog Med Chem.* 42: 245-375.
141. Naegler, D. K., Menard, R. (1998) Human cathepsin X: a novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions. *FEBS Lett.* 434: 135.
142. Deussing, J., Olshausen, I., Peters, C. (2000) Murine and human cathepsin Z: cDNA-cloning, characterizing of the genes and chromosomal localization. *Biochim Biophys Acta.* 1491: 93-106.
143. Kos, J., Sekirnik, A., Premzl, A., Zavasnik, B. V., Langerholc, T., Repnik, U., Turk, B., Werle, B., Golouh, R., Jeras, M., Turk, V. (2005) Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Exp Cell Res.* 306 (1): 103-13.
144. Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J. F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C., Desjardins, M. (2001) The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol.* 152 (1):165 -80.
145. Journet, A., Chapel, A., Kieffer, S., Louwagie, M., Luche, S., Garin, J. (2000) Towards a human repertoire of monocytic lysosomal proteins. *Electrophoresis.* 21 (16): 3411 -19.
146. Krueger, S., Kalinski, T., Hundertmark, T., Wex, T., Kuester, D., Peitz, U., Ebert, M., Naegler, D. K., Kellner, U., Malfertheiner, P., Naumann, M., Roecken, C., Roessner, A. (2005) Up-regulation of Cathepsin X in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *J Pathol.* 207: 32-42.
147. Naegler, D. K., Lechner, A. M., Oettl, A., Kozaczynska, K., Scheuber, H. P., Gippner- Steppert, C., Bogner, V., Biberthaler, P., Jochum, M. (2006) An enzyme-linked immunosorbent assay for human cathepsin X, a potential new inflammatory marker. *J Immunol Methods.* 308: 241-50.
148. Santamaria, I., Velasco, G., Pendas, A. M., Fueyo, A., Lopez-Otin, C. (1998) Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *J Biol Chem.* 273: 16816-23.
149. Sivaraman, J., Naegler, D. K., Zhang, R., Menard, R., Cygler, M. (2000) Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine. *J Mol Biol.* 295: 939-51.

150. Obermajer, N., Magister, S., Kopitar, A. N., Tepes, B., Ihan, A., Kos, J. (2009) Cathepsin X prevents an effective immune response against *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Cell Biol.* 88: 461-71.
151. Lechner, A., Assfalg-Machleidt, I., Zahler, S., Stoeckelhuber, M., Machleidt, W., Jochen, M., Naegler, D. K. (2006) RGC-dependent binding of procathepsin X to integrin $\alpha_v\beta_3$ mediates cell-adhesive properties. *J Biol Chem.* 281: 39588-97.
152. Nascimento, F. D., Rizzi, C. C. A., Nantes, I. L., Stefe, I., Turk, B., Carmona, A. K., Nader, H. B., Juliano, L., Tersariol, I. L. S. (2005) Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Arch Biochem Biophys.* 436 (2): 323-32.
153. Naegler, D. K., Kraus, S., Feierler, J., Mentele, R., Lottspeich, F., Jochum, M., Faussner, A. (2010) A cysteine-type carboxypeptidase, cathepsin X, generates peptide receptor agonists. *Int Immunopharmacol.* 10 (1): 134-9.
154. Jevnikar, Z., Obermajer, N., Doljak, B., Turk, S., Gobec, S., Svajger, U., Hailfinger, S., Thome, M., Kos, J. (2011) Cathepsin X cleavage of the beta2 integrin regulates talin-binding and LFA-1 affinity in T cells. *J Leukoc Biol.* 90 (1): 99-109.
155. Rumpler, G., Becker, B., Hafner, C., McClelland, M., Stolz, W., Landthaler, M., Schmitt, R., Bosserhoff, A., Vogt, T. (2003) Identification of differentially expressed genes in models of melanoma progression by cDNA array analysis: SPARC, MIF and a novel cathepsin protease characterize aggressive phenotypes. *Exp Dermatol.* 12: 761-71.
156. Naegler, D. K., Krueger, S., Kellner, A., Ziomek, E., Menard, R., Buhtz, P., Krams, M., Roessner, A., Kellner, U. (2004) Up-regulation of Cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate.* 60: 109-19.
157. Sevenich, L., Schurigt, U., Sachse, K., Gajda, M., Werner, F., Mueller, S., Vasiljeva, O., Schwinde, A., Klemm, N., Deussing, J., Peters, C., Reinheckel, T. (2010) Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice. *Proc Natl Acad Sci. USA* 107: 2497-2502.
158. Decock, J., Obermajer, N., Vozelj, S., Hendrickx, W., Paridaens, R., Kos, J. (2008) Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin X and cystatin C in sera of patients with early-stage and inflammatory breast cancer. *Int J Biol Markers.* 23 (3): 161-68.
159. Buehling, F., Peits, U., Krueger, S., Kuester, D., Vieth, M., Gebert, L., Roessner, A., Weber, E., Malfertheimer, P., Wex, T. (2004) Cathepsins K, L, B, X and W are differentially expressed in normal and chronically gastric mucosa. *Biol Chem.* 385: 439-45.

160. Krueger, S., Kuester, D., Bernhardt, A., Wex, T., Roessner, A. (2009) Regulation of Cathepsin X overexpression in *H. pylori*-infected gastric epithelial cells and macrophages. *J Pathol.* 217 (4): 581-88.
161. Krueger, S., Hundertmark, T., Kalinski, T., Peitz, U., Malferteiner, P., Naumann, M., Roessner, A. (2006) Coordinate activation of matrix-metalloproteinase 1 and invasion of gastric epithelial cells in response to *H. pylori* encoding the pathogenicity island. *J Biol Chem.* 281 (5): 2868-75.
162. Fink, L., Bohle, R. M. (2005) Laser microdissection and RNA analysis. *Methods Mol Biol.* 293: 167-85.
163. Fink, L., Stahl, U., Ermert, L., Kummer, W., Seeger, W., Bohle, R. M. (1999) Rat porphobilinogen deaminase gene: a pseudogene-free internal standard for laser assisted cell picking. *Biotechn.* 26: 510-16.
164. Precht, M., Kraft, R. (1992) Bio-Statistik 1. Oldenbourg Verlag, 5., vollständig überarbeitete Auflage, München-Wien.
165. Franco, A. T., Israel, D. A., Washington, M. K., Krishna, U., Fox, J. G., Rogers, A. B., Neish, A. S., Collier-Hyams, L., Perez-Perez, G., Hatakeyama, M., Whitehead, R., Gaus, K., O' Brien, D. P., Romero-Gallo, J., Peek, Jr. R. M. (2005) Activation of β -catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci. USA* 102: 10646-51.
166. Murata-Kamiya, N., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Yamahashi, Y., Saito, Y., Higashi, H., Aburatani, H., Akiyama, T., Peek, Jr. R. M., Azuma, T., Hatakeyama, M. (2007) *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the β -catenin signal that promotes Intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene.* 26: 4617-26.
167. Sokolova, O., Bozko, P. M., Naumann, M. (2008) *Helicobacter pylori* suppresses GSK3 β activity to promote β -catenin activity. *J Biol Chem.* 238: 29367-74.
168. Krueger, S., Hundertmark, T., Kuester, D., Kalinski, T., Peitz, U., Roessner, A. (2007) *Helicobacter pylori* alters the distribution of ZO-1 and p120ctn in primary human gastric epithelial cells. *Pathol Res Pract.* 203: 433-44.
169. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (1993) Cell migration and inflammation. *Immunol.* 13.1-13.8. Mosby: London.
170. Van Furth, R. (1992) Mononuclear phagocytes: biology of monocytes and macrophages. *Kluwer Academic Publishers.* ISBN: 0-7923-1843-9.

171. Murphy, C., Newsholme, P. (1999) Macrophage-mediated lysis of a b-cell line, tumour necrosis factor- α release from bacillus Calmette-Guérin (BCG)-activated murine macrophages and interleukin-8 release from human monocytes are dependent on extracellular glutamine concentration and glutamine metabolism. *Clinical Science*. 96: 89-97.
172. Crabtree, J. E. (1996) Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 215: 3-10.
173. Baggiolini, M., Walz, A., Kunkel, S. L. (1989) Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest*. 84: 1045-49.
174. Yamaoka, Y., Kita, M., Kodama, T., Sawai, N., Imanishi, J. (1996) *Helicobacter pylori* cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. *Gastroenterol*. 110: 1744-52.
175. Reale, M., Barbacane, R. C., DiGioacchino, M., Felaco, M., Croce, A., Ferro, F. M., Lotti, T. M., Conti, P. (2001) Differential expression and secretion of RANTES and MCP-1 in activated peripheral blood mononuclear cell cultures of atopic subjects. *Immunol Lett*. 76 (1): 7-14.
176. Reale, M., DiGiulio, C., Cacchio, M., Barbacane, R. C., Grilli, A., Felaco, M., Bianchi, G., DiGioacchino, M., Conti, P. (2003) Oxygen supply modulates MCP-1 release in monocytes from young and aged rats: decrease of MCP-1 transcription and translation is age-related. *Mol Cell Biochem*. 248 (1-2): 1-6.
177. Medzhitov, R., Janeway, C. A. Jr. (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. 91: 295-98.
178. Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., Ezekowitz, R. A. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*. 284: 1313-18.
179. Rad, R., Brenner, L., Bauer, S., Schwendy, S., Layland, L., da Costa, C. P., Reindl, W., Dossumbekova, A., Friedrich, M., Saur, D., Wagner, H., Schmid, R. M., Prinz, C. (2006a) CD25⁺/Foxp3⁺ T cells regulate gastric inflammation and *Helicobacter pylori* colonization *in vivo*. *Gastroenterol*. 131: 525-37.
180. Raghavan, S., Holmgren, J. (2005) CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 44: 121-27.
181. Wilson, K. T., Crabtree, J. E. (2007) Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterol*. 133: 288-308.

182. Wessler, S., Gimona, M., Rieder, G. (2011) Regulation of the actin cytoskeleton in *Helicobacter pylori*-induced migration and invasive growth of gastric epithelial cells. *Cell Commun Signal.* 9 (1): 27.
183. Abe, R., Shimizu, T., Ohkawara, A., Nishihira, J. (2000) Enhancement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in injured epidermis and cultured fibro blasts. *Biochem Biophys Acta.* 1500: 1-9.
184. Matsuda, A., Tagawa, Y., Matsuda, H., Nishihira, J. (1997) Expression of macrophage migration inhibitory factor in corneal wound healing in rats. *Invest Ophthalmol Visual Sci.* 38: 1555-62.
185. Shimizu, T., Abe, R., Ohkawara, A., Nishihira, J. (1999) Ultraviolet B radiation upregulates the production of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 112: 210-15.
186. Dietmaier, W., Hartmann, A., Wallinger, S., Heinmoeller, E., Kerner, T., Endl, E., Jauch, K. W., Hofstaedter, F., Rueschoff, J. (1999) Multiple mutation analyses in single tumor cells enabled by improved whole genome amplification. *Am J Pathol.* 154: 83-95.
187. Heinmoeller, E., Qiang, L., Sun, Y., Schlake, G., Hill, K. A., Weiss, L. M., Sommer, S. S. (2002a) Toward efficient analysis of mutations in single cells from ethanol-fixed, paraffin-embedded, and immunohistochemically-stained tissues. *Lab Invest.* 82: 443-53.
188. Heinmoeller, E., Schlake, G., Renke, B., Liu, Q., Hill, K. A., Sommer, S. S., Rüschoff, J. (2002b) Microdissection and molecular analysis of single cells or small cell clusters in pathology and diagnosis – significance and challenges. *Anal Cell Pathol.* 24: 125-34.
189. Schuetze, K., Lahr, G. (1998) Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nat Biotechnol.* 16: 737-42.
190. Bonner, R. F., Emmert Buck, M., Cole, K., Pohida, T., Chuaqui, R., Goldstein, S., Liotta, L. A. (1997) Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science.* 278 (5342): 1481-83.
191. Emmert-Buck, M. R., Bonner, R. F., Smith, P. D., Chuaqui, R. F., Zhuang, Z., Goldstein, S. R., Weiss, R. A., Liotta, L. A. (1996) Laser capture microdissection. *Science.* 274 (5289): 998-1001.
192. D'andrade, R. (1978) "U-Statistic Hierarchical Clustering." *Psychometrika.* 4: 58-67.
193. Covacci, A., Telford, J. L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., Rappuoli, R. (1999) *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science.* 284: 1328-33.

194. Graham, D. Y. (1991) *Helicobacter pylori*: its epidemiology and its role in duodenal ulcer disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 6: 105-13.
195. Monack, D. M., Mueller, A., Falkow, S. (2004) Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol.* 2: 747-65.
196. Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A. B., Warnke, R. A., Jellum, E., Orentreich, N., Vogelman, J. H., Friedman, G. D. (1994) *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med.* 330: 1267-71.
197. The Eurogast Study Group (1993/1993a) An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Lancet.* 341: 1359-62.
198. The Eurogast Study Group (1993b) Epidemiology of, and risk factors for, *Helicobacter pylori* infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. *Gut.* 34: 1672-76.
199. Malfertheiner, P., Sipponen, P., Naumann, M., Moayywdi, M. B., Megraud, F., Xiao, S. D., Sugano, K., Nyren, O., Lejondal, H. (2005) *H. pylori*-Gastric Cancer Task Force. *Helicobacter pylori* eradication has the potential to prevent gastric cancer: a state-of-the-art critique. *Am J Gastroenterol.* 100 (9): 2100-15.
200. Suerbaum, S., Michetti, P. (2002) *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med.* 347 (15): 1175-86.
201. Allen, L. A. (2001) The role of the neutrophil and phagocytosis in infection caused by *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Infect Dis.* 14 (3): 273-77.
202. Mayer-Scholl, A., Averhoff, P., Zychlinsky, A. (2004) How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol.* 7 (1): 62-66.
203. Herszenyi, L., Plebani, M., Carraro, P., De Paoli, M., Cardin, R., Di Mario, F., Kusstatscher, S., Naccarato, R., Farinati, F. (1997) Impaired fibrinolysis and increased protease levels in gastric and duodenal mucosa of patients with active duodenal ulcer. *Am J Gastroenterol.* 92 (5): 843-47.
204. Colella, R., Jackson, T., Goodwyn, E. (2004) Matrigel invasion by the prostate cancer cell lines, PC3 and DU145, and cathepsin L + B activity. *Biotech Histochem.* 79: 121-27.
205. Tardy, C., Codogno, P., Autefage, H., Levade, T., Andrieu-Abadie, N. (2006) Lysosomes and lysosomal proteins in cancer cell death (new players of an old struggle). *Biochim Biophys Acta.* 1765: 101-25.

206. Dubois, A., Berg, D. E., Incecik, E. T., Fiala, N., Heman-Ackah, L. M., Perez-Perez, G. I., Blaser, M. J. (1996) Transient and persistent experimental infection of nonhuman primates with *Helicobacter pylori*: implications for human disease. *Infect Immun.* 64: 2885-91.
207. Fox, J. G., Correa, P., Taylor, N. S., Lee, A., Otto, G., Murphy, J. C. Rose, R. (1990) *Helicobacter mustelae*-associated gastritis in ferrets. An animal model of *Helicobacter pylori* gastritis in humans. *Gastroenterol.* 99: 352-61.
208. Lee, A., O'Rourke, J., De Ungria, M. C., Robertson, B., Daskalopoulos, G., Dixon, M. F. (1997) A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterol.* 112: 1386-97.
209. Marchetti, M., Arico, B., Burrioni, D., Figura, N., Rappuoli, R., Ghiara, P. (1995) Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science.* 267: 1655-58.
210. Matsumoto, S., Washizuka, Y., Matsumoto, Y., Tawara, S., Ikeda, F., Yokota, Y., Karita, M. (1997) Induction of ulceration and severe gastritis in Mongolian gerbil by *Helicobacter pylori* infection. *J Med Microbiol* 46: 391-97.
211. Shomer, N. H., Dangler, C. A., Whary, M. T., Fox, J. G. (1998) Experimental *Helicobacter pylori* infection induces antral gastritis and gastric mucosa-associated lymphoid tissue in guinea pigs. *Infect Immun.* 66: 2614-18.
212. Yokota, K., Kurebayashi, Y., Takayama, Y., Hayashi, S., Isogai, H., Isogai, E., Imai, K., Yabana, T., Yachi, A., Oguma, K. (1991) Colonization of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of Mongolian gerbils. *Microbiol Immunol.* 35: 475-80.
213. Zahn, T., Hauck, C., Holzschuh, J., Braunbeck, T. (1995) Acute and sublethale toxicity of seepage waters from garbage dumps to permanent cell lines and primary cultures of hepatocytes from Raunbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A novel approach to environmental risk for chemicals and chemical mixtures. *Zb Hyg.* 196: 455-79.
214. Gekle, M., Wunsch, S., Oberleithner, H., Silbernagl, S. (1994) Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *Pflugers Arch.* 428: 157-62.
215. Basque, J. R., Chenard, M., Chailier, P., Menard, D. (2001) Gastric cancer cell lines as models to study human digestive functions. *J Cell Biochem.* 81: 241-51.

216. Festuccia, C., Vicentini, C., di Pasquale, A. B., Aceto, G., Zazzeroni, F., Miano, L., Bologna, M. (1995) Plasminogen activator activities in short-term tissue cultures of benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *Oncol Res.* 7: 131- 38.
217. Friedrich, B., Jung, K., Lein, M., Tuerk, I., Rudolph, B., Hampel, G., Schnorr, D., Loening, S. A. (1999) Cathepsins B, H, L and cysteine protease inhibitors in malignant prostate cell lines, primary cultured prostatic cells and prostatic tissue. *Europ J of Cancer.* 35 (1): 138-44.
218. Bechi, P., Balzi, M., Becciotini, A., Mangen, A., Raggi, C. C., Amorosi, A., Dei, R. (1996) *Helicobacter pylori* and cell proliferation of the gastric mucosa: possible implications for gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol.* 91: 271-76.
219. Mori, N., Wada, A., Hirayama, T., Parks, T. P., Stratowa, C., Yamamoto, N. (2000) Activation of intercellular adhesion molecule 1 expression by *Helicobacter pylori* is regulated by NF-kappaB in gastric epithelial cancer cells. *Infect Immun.* 68: 1806-14.
220. Naumann, M., Crabtree, J. E. (2004) *Helicobacter pylori*-induced epithelial cell signalling in gastric carcinogenesis. *Trends Microbiol.* 12 (1): 29-36.
221. Shimoyama, T., Crabtree, J. E. (1997) Mucosal chemokines in *Helicobacter pylori* infection. *J Physiol Pharmacol.* 48 (3): 315-23.
222. Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling, F., Leist, M., Jaattela, M. (2001) Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol.* 153 (5): 999-1010.
223. Gresser, O., Weber, E., Hellwig, A., Riese, S., Regnier-Vigouroux, A. (2001) Immunocompetent astrocytes and microglia display major differences in the processing of the invariant chain and in the expression of active cathepsin L and cathepsin S. *Eur J Immunol.* 31 (6): 1813-24.
224. Guicciardi, M. E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S. F., Svingen, P. A., Peters, C., Kaufmann, S. H., Gores, G. J. (2000) Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest.* 106 (9): 1127-37.
225. Schwarz, G., Boehncke, W. H., Braun, M., Schroter, C. J., Burster, T., Flad, T., Dressel, D., Weber, E., Schmid, H., Kalbacher, H. (2002) Cathepsin S activity is detectable in human keratinocytes and is selectively upregulated upon stimulation with interferon-gamma. *J Invest Dermatol.* 119 (1): 44-49.

226. Gerber, A., Wille, A., Welte, T., Ansorge, S., Buehling, F. (2001) Interleukin-6 and transforming growth factor- β 1 control expression of cathepsins B and L in human lung epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res.* 21: 11-19.
227. Deml, L., Aigner, M., Decker, J., Eckhardt, A., Schutz, C., Mittl, P. R. E., Barabas, S., Denk, S., Knoll, G., Lehn, N., Schneider-Brachert, W. (2005) Characterization of the *Helicobacter pylori* Cysteine-Rich Protein A as a T-Helper Cell Type 1 Polarizing Agent. *Infect Immun.* 73 (8): 4732-42.
228. Deml, L., Aigner, M., Eckhardt, A., Decker, J., Lehn, N., Schneider-Brachert, W. (2004) Application of single-cell cultures of mouse splenocytes as an assay system to analyze the immunomodulatory properties of bacterial components. *Methods Mol Med.* 94: 159-75.
229. Assmann, I. A., Enders, G., Puels, J., Rieder, G., Haas, R., Hatz, R. A. (2001) Role of virulence factors, cell components and adhesion in *Helicobacter pylori*-mediated iNOS induction in murine macrophages, *FEMS Immunol Med Microbiol.* 30: 133-38.
230. Baggiolini, M. (2001) Chemokines in pathology and medicine. *Journal of Internal Med.* 250: 91-104.
231. Shimoyama, T., Everett, S. M., Dixon, M. F., Axon, A. T. R., Crabtree, J. E. (1998) Chemokine mRNA expression in gastric mucosa is associated with *Helicobacter pylori* cagA positivity and severity of gastritis. *J Clin Pathol.* 51: 765-70.
232. Watanabe, N., Shimada, T., Ohtsuka, Y., Hiraishi, H., Terano, A. (1997) Proinflammatory cytokines and *Helicobacter pylori* stimulate CC-chemokine expression in gastric epithelial cells. *J Physiol Pharmacol.* 48 (3): 405-13.
233. Goll, R., Husebekk, A., Isaksen, V., Kauric, G., Hansen, T., Florholmen, J. (2005) Increased Frequency of Antral CD4 β T and CD19 β B Cells in Patients with *Helicobacter pylori*-Related Peptic Ulcer Disease. *Scand J Immunol.* 61: 92-97.
234. Eaton, K. A., Ringler, S. R., Danon, S. J. (1999) Murine splenocytes induce severe gastritis and delayed-type hypersensitivity and suppress bacterial colonization in *Helicobacter pylori* infected SCID mice. *Infect Immun.* 67: 4594-602.
235. Roth, K. A., Kapadia, S. B., Martin, S. M., Lorenz, R. G. (1999) Cellular immune responses are essential for the development of *Helicobacter felis*-associated gastric pathology. *J Immunol.* 163: 1490-97.

236. Junnila, S., Kokkola, A., Mizuguchi, T., Hirata, K., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Puolakkainen, P., Monni, O. (2009) Gene expression analysis identifies over-expression of CXCL1, SPARC, SPP1, and SULF1 in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 49: 28-39.
237. Senger, D. R., Wirth, D. F., Hynes, R. O. (1979) Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell*. 16: 885-93.
238. El-Tanani, M. K. (2008) Role of osteopontin in cellular signaling and metastatic phenotype. *Front Biosci*. 13: 4276-84.
239. Johnston, N. I., Gunasekharan, V. K., Ravindranath, A., O'Connell, C., Johnston, P. G., El-Tanani, M. K. (2008) Osteopontin as a target for cancer therapy. *Front Biosci*. 13: 4361-72.
240. Wang, K. X., Denhardt, D. T. (2008) Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev*. 19: 333-45.
241. Bellahcène, A., Castronovo, V., Ogbureke, K. U., Fisher, L. W., Fedarko, N. S. (2008) Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 8 (3): 212-26.
242. Alonso, S. R., Tracey, L., Ortiz, P., Perez-Gomez, B., Palacios, J., Pollan, M., Linares, J., Serrano, S., Seaz-Castillo, A. I., Sanchez, L., Pajares, R., Sanchez A., Artiga, M. J., Piris, M. A., Rodriguez-Peralto, J. L. (2007) A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res*. 67: 3450-60.
243. Jaeger, J., Koczan, D., Thiesen, H. J., Ibrahim, S. M., Gross, G., Spang, R., Kunz, M. (2007) Gene expression signatures for tumor progression, tumor subtype and tumor thickness in laser-microdissected melanoma tissues. *Clin Cancer Res*. 13: 806-15.
244. Wai, P. Y., Kuo, P. C. (2008) Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 27: 103-18.
245. Johnson, G. A., Burghardt, R. C., Spencer, T. E., Newton, G. R., Ott, T. L., Bazer, F. W. (1999) Ovine osteopontin: II. Osteopontin and avb3 integrin expression in the uterus and conceptus during the peri-implantation period. *Biol Reprod*. 61: 892-99.
246. Rolli, M., Fransvea, E., Pilch, J., Saven, A., Felding-Habermann, B. (2003) Activated integrin alphavbeta3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* 100: 9482-87.

247. Levy, S., Todd, S. C., Maecker, H. T. (1998) CD81 (TAPA-1): A molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune systems. *Annu Rev Immunol.* 16: 89-109.
248. Luo, R. F., Zhao, S., Tibshirani, R., Myklebust, J. H., Sanyal, M., Fernandez, R., Gratzinger, D., Marinelli, R. J., Lu, Z. S., Wong, A., Levy, R., Levy, S., Natkunam, Y. (2010) CD81 protein is expressed at high levels in normal germinal center B cells and in subtypes of human lymphomas. *Hum Pathol.* 41 (2): 271-80.
249. Hu, C. C., Liang, F. X., Zhou, G., Tu, L., Tang, C. H., Zhou, J., Kreibich, G., Sun, T. T. (2005) Assembly of urothelial plaques: tetraspanin function in membrane protein trafficking. *Mol Biol Cell.* 16: 3937-50.
250. Maecker, H. T., Todd, S. C., Levy, S. (1997) The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J.* 11: 428-42.
251. Sincock, P. M., Fitter, S., Parton, R. G., Berndt, M. C., Gamble, J. R., Ashman, L. K. (1999) PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localised to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiple integrins and modulates cell function. *J Cell Sci.* 112 (6): 833-44.
252. Yauch, R. L., Hemler, M. E. (2000) Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase. *Biochem J.* 351 (3): 629-37.
253. Charrin, S., Le Naour, F., Oualid, M., Billard, M., Faure, G., Hanash, S. M., Boucheix, C., Rubinstein, E. (2001) The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J Biol Chem.* 276: 14329-37.
254. Stipp, C. S., Hemler, M. E. (2000) Transmembrane-4-superfamily proteins CD151 and CD81 associate with alpha 3 beta 1 integrin, and selectively contribute to alpha 3 beta 1- dependent neurite outgrowth. *J Cell Sci.* 113 (11): 1871-82.
255. Obermajer, N., Repnik, U., Jevnikar, Z., Turk, B., Kreft, M., Kos, J. (2008) Cystein protease cathepsin X modulates immune response via activation of β_2 Integrins. *Immunol.* 124: 76-88.
256. Obermajer, N., Premzl, A., Zavasnik, B. T., Turk, B., Kos, J. (2006) Carboxypeptidase cathepsin X mediates beta2-integrin-dependent adhesion of differentiated U-937 cells. *Exp Cell Res.* 312: 2515-27.
257. Satin, B., DelGiudice, G., Della Bianca, V., Dusi, S., Laudanna, C., Tonello, F., Kelleher, D., Rappuoli, R., Montecucco, C., Rossi, F. (2000) The neutrophilactivating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med.* 191: 1467-76.

258. Noach, L. A., Bosma, N. B., Jansen, J., Hoek, F. J., van Deventer, S. J., Tytgat, G. N. (1994) Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol.* 29: 425-29.
259. Segal, E. D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., Tompkins, L. S. (1999) Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci. USA* 96 (25): 14559-64.
260. Brandt, S., Shafikhani, S., Balachandran, P., Jin, S., Hartig, R., Konig, W., Engel, J. Backert, S. (2007) Use of a novel coinfection system reveals a role for Rac1, H-Ras, and CrkII phosphorylation in *Helicobacter pylori*-induced host cell actin cytoskeletal rearrangements. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 50: 190-205.
261. Wong, B. L., Zhu, S. L., Huang, X. R., Ma, J., Xia, H. H., Bucala, R., Wong, B. C., Lan, H. Y. (2009) Essential role for macrophage migration inhibitory factor in gastritis induced by *Helicobacter pylori*. *Am J Pathol.* 174: 1319-28.
262. Calandra, T., Roger, T. (2003) Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 3: 791-800.
263. Becker, H., Willeke, P., Schotte, H., Domschke, W., Gaubitz, M. (2008) Macrophage migration inhibitory factor may contribute to vasculopathy in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* 27 (10): 1307-11.
264. Bozza, M., Satoskar, A. R., Lin, G., Lu, B., Humbles, A. A. Gerard, C., *et al.* (1999) Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med.* 189 (2): 341-46.
265. Bozza, F. A., Gomes, R. N. Japiassu, A. M., Soares, M., Castro-Faria-Nato, H. C., Bozza, P. T., *et al.* (2004) Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock* 22 (4): 309-13.
266. Bruchfeld, A., Carrero, J. J., Qureshi, A. R., Lindholm, B., Barany, P., Heimbürger, O., Hu, M., Lin, X., Stenvinkel, P., Miller, E. J. (2009) Elevated serum macrophage migration inhibitory factor (MIF) concentrations in chronic kidney disease (CKD) are associated with markers of oxidative stress and endothelial activation. *Mol Med.* 15 (3-4): 70-75.
267. Camlica, H., Duranyildiz, D. Oguz, H., Oral, E. N., Yasasever, V. (2008) The diagnostic value of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in gastric cancer. *Pathol Oncol Res.* 14 (1): 79-83.

268. Kim, J. Y., Kwok, S. K., Hur, K. H., Kim, H. J., Kim, N. S., Yoo, S. A., Kim, W. U., Cho, C. S. (2008) Up-regulated macrophage migration inhibitory factor protects apoptosis of dermal fibroblasts in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 152 (2): 328-35.
269. Xia, H. H., Lam, S. K., Huang, X. R., Wong, W. M., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Lan, H. Y., Wong, B. C. (2004) *Helicobacter pylori* infection is associated with increased expression of macrophage migratory inhibitory factor-by epithelial cells, T cells, and macrophages-in gastric mucosa. *J Infect Dis.* 190 (2): 293-302.
270. Ohkawara, T., Nishihira, J., Takeda, H., Asaka, M., Sugiyama, T. (2005) Pathophysiological roles of macrophage migration inhibitory factor in gastrointestinal, hepatic, and pancreatic disorders. *J Gastroenterol.* 40: 117-22.
271. Kibiki, G. S., A. J. van der Ven, A. J. A. M., Geurts-Moespot, A., Shao, J., Calandra, T., Sweep, F. C. G. J., Dolmans, W. M. V. (2007) Serum and BAL macrophage migration inhibitory factor levels in HIV infected Tanzanians with pulmonary tuberculosis or other lung diseases. *Clin Immunol.* 123 (1): 60-65.
272. Meyer-Siegler, K. L., Bellino, M. A., Tannenbaum, M. (2002) Macrophage migration Inhibitory factor evaluation compared with prostate specific antigen as a biomarker in patients with prostate carcinoma. *Cancer.* 94 (5): 1449-56.
273. Kudrin, A., Ray, D. (2008) Cunning factor: macrophage migration inhibitory factor as a redox-regulated target. *Immunol Cell Biol.* 86 (3): 232-38.
274. Siegel, P. M., Massague, J. (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer.* 3 (11): 807-21.
275. Thiery, J. P. Chopin, D. (1999) Epithelial cell plasticity in development and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 18: 31-42.
276. Miettinen, P. J., Ebner, R., Lopez, A. R., Derynck, R. (1994) TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol.* 127 (6): 2021-36.
277. Yin, Y., Grabowska, A. M., Clarke, P. A., Whelband, E., Robinson, K., Argent, R. H., Tobias, A., Kumari, R., Atherton, J. C., Watson, S. A. (2010) *Helicobacter pylori* potentiates epithelial: mesenchymal transition in gastric cancer: links to soluble HB-EGF, gastrin and matrix metalloproteinase-7. *Gut.* 59 (8): 1037-45.

278. Banks, R. E., Dunn, M. J., Forbes, M. A., Stanley, A., Pappin, D., Naven, T., Gough, M., Harnden, P., Selby, P. J. (1999) The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis-preliminary findings. *Electrophoresis*. 20: 689-700.
279. Simone, N. L., Bonner, R. F., Gillespie, J. W., Emmert-Buck, M. R., Liotta, L. A. (1998) Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends Genet*. 14: 272-76.
280. Serth, J., Kuczyk, A., Paeslack, U., Lichtinghagen, R., Jonas, U. (2000) Quantitation of DNA extracted after micropreparation of cells from frozen and formalin-fixed tissue sections. *Am J Pathol*. 156: 1189-96.
281. Burnett, R. A., Brown, I. L., Findlay, J. (1987) Cresyl fast violet staining method for *campylobacter* like organisms. *J Clin Pathol*. 40: 353-56.
282. Fend, F., Kremer, M., Quintanilla-Martinez, L. (2000) Laser capture microdissection: methodical aspects and applications with emphasis on immuno-laser capture microdissection. *Pathobiol*. 68: 209-14.
283. Guillemin, K., Salama, N. R., Tompkins, L. S., Falkow, S. (2002) Cag pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci. USA* 99: 15136-41.
284. Maeda, S., Otsuka, M., Hirata, Y., Mitsuno, Y., Yoshida, H., Shiratori, Y., Masuho, Y., Muramatsu, M., Seki, N., Omata, M. (2001b) cDNA microarray analysis of *Helicobacter pylori*-mediated alteration of gene expression in gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 284: 443-49.
285. Wen, S., Felley, C. P., Bouzourene, H., Reimers, M., Michetti, P., Pan-Hammarstrom, Q. (2004) Inflammatory gene profiles in gastric mucosa during *Helicobacter pylori* infection in humans. *J Immunol*. 172: 2595-2606.
286. Lindwall, G., Cole, R. D. (1984) The purification of tau protein and the occurrence of two phosphorylation states of tau in brain. *J Biol Chem*. 259: 12241-45.
287. Schenck, A., Bardoni, B., Moro, A., Bagni, C., Mandel, J. L. (2001) A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. *Proc Natl Acad Sci. USA* 98: 8844-49.

288. Paglini, G., Caceres, A. (2001) The role of the Cdk5-p35 kinase in neuronal development. *Eur J Biochem.* 268: 1528-33.
289. Cleveland, D. W., Hwo, S. Y., Kirschner, M. W. (1977) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol.* 116: 227-47.
290. Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., Kirschner, M. W. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci. USA* 72: 1858-62.
291. Jameson, L., Frey, T., Zeeberg, B., Dalldorf, F., Caplow, M. (1980) Inhibition of microtubule assembly by phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Biochemistry.* 19: 2472-79.
292. Ledesma, M. D., Bonay, P., Colaco, C., Avila, J. (1994) Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J Biol Chem.* 269: 21614-19.
293. Johnson, G. V. (1992) Differential phosphorylation of tau by cyclic AMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: metabolic and functional consequences. *J Neurochem.* 59: 2056-62.
294. Greenwood, J. A., Scott, C. W., Spreen, R. C., Caputo, C. B., Johnson, G. V. (1994) Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as primary phosphate acceptor. *J Biol Chem.* 269: 4373-80.
295. Drewes, G., Lichtenberg-Kraag, B., Baumann, K., Goris, J., Merlevede, W., Mandelkow, E. (1992) Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J.* 11: 2131-38.
296. Lew, J., Wang, J. H. (1995) Neuronal cdc2-like kinase. *Trends Biol Sci.* 20 (1): 33-37.
297. Bednarski, K., Lynch, G. (1996) Cytosolic proteolysis of tau by cathepsin D in hippocampus following suppression of cathepsins B and L. *J Neurochem.* 67 (59): 1846-55.
298. Kountouras, J., Deretzi, G., Zavos, C., Karatzoglou, P., Touloumis, L., Nicolaidis, T., Chatzopoulos, D., Venizelos, I. (2005) Association between *Helicobacter pylori* infection and acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Eur J Neurol.* 12: 139-43.
299. Kountouras, J., Tsolaki, M., Boziki, M., Gavalas, E., Zavos, C., Stergiopoulos, C., Kapetanakis, N., Chatzopoulos, D., Venizelos, I. (2007) Association between *Helicobacter pylori* infection and mild cognitive impairment. *Eur J Neurol* 14: 976-82.

300. Malaguarnera, M., Bella, R., Alagona, G., Ferri, R., Carnemolla, A., Pennini, G. (2004) *Helicobacter pylori* and Alzheimer's disease: a possible link. *Eur J Intern Med.* 15: 381-86.
301. Drewes, G., Ebneith, A., Preuss, U., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E. (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell.* 89 (2): 297-308.
302. Ebneith, A., Drewes, G., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E. (1999) Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 44: 209-24.
303. Saadat, I., Higashi, H., Obuse, C., Umeda, M., Murata-Kamiya, N., Saito, Y., Lu, H., Ohnishi, N., Azuma, T., Suzuki, A., Ohno, S., Hatakeyama, M. (2007) *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature.* 447: 330-33.
304. Rosales, J. L., Lee, K. Y. (2006) Extraneuronal roles of cyclin-dependent kinase 5. *Bioessays.* 28: 1023-34.
305. Weishaupt, J. H., Neusch, C., Bahr, M. (2003) Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) and neuronal cell death. *Cell Tissue Res.* 312: 1-8.
306. Bode, A. M., Dong, Z. (2004) Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 4: 793-805.
307. Jong-Hee, L., Hea-Sook, K., Sung-Jin, L., Kyong-Tai, K. (2007) Stabilization and activation of p53 induced by Cdk5 contributes to neuronal cell death. *J Cell Science.* 120: 2259-71.
308. Castets, M., Schaeffer, C., Bechara, E., Schenck, A., Khandjian, E. W., Luche, S., Moine, H., Rabilloud, T., Mandel, J. L., Bardoni, B. (2005) FMRP interferes with the Rac1 pathway and controls actin cytoskeleton dynamics in murine fibroblasts. *Hum Mol Genet.* 14 (6): 835-44.
309. Zolnierowicz, S. (2000) Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem Pharmacol.* 60: 1225-35.
310. Ambach, A., Saunus, J., Konstandin, M., Wesselborg, S., Meuer, S.C. and Samstag, Y. (2000) The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin binding protein cofilin in human T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 30: 3422-31.
311. Gungabissoon, R. A. Bamberg, J. R. (2003) Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/cofilin. *J Histochem Cytochem.* 51: 411-20.

312. Luo, L. (2002) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and Structural Plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 3: 601-35.
313. Meberg, P. J., Bamburg, J. R. (2000) Increase in neurite outgrowth mediated by overexpression of actin depolymerizing factor. *J Neurosci.* 20: 2459-69.
314. Samstag, Y., Nebl, G. (2003) Interaction of cofilin with serinephosphatases PP1 and PP2A in normal and neoplastic human T lymphocytes. *Adv Enzyme Regul.* 43: 197-211.
315. Zhao, D., Liu, Z., Ding, J., Li, W., Sun, Y., Yu, H., Zhou, Y., Zeng, J., Chen, C., Jia, J. (2010) *Helicobacter pylori* CagA upregulation of CIP2A is dependent on the Src and MEK/ERK pathways. *J Med Microbiol.* 59 (3): 259-65.
316. Kraus, S., Bunsen, T., Schuster, S., Cichoń, M. A., Tacke, M., Reinheckel, T., Sommerhoff, C. P., Jochum, M., Naegler, D. K. (2011) Cellular senescence induced by cathepsin X downregulation. *Eur J Cell Biol.* 90 (8): 678-86.
317. Vader, G., Lens, S. M. (2008) The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1786: 60-72.
318. Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W. L., Gray, J. W., Sahin, A., Brinkley, B. R., Sen, S. (1998) Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet.* 20: 189-93.
319. Kaestner, P., Stolz, A., Bastians, H. (2009) Determinants for the efficiency of anti-cancer drugs targeting either Aurora-A or Aurora-B kinases in human colon carcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 8: 2046-56.
320. Kojima, K., Konopleva, M., Tsao, T., Nakakuma, H., Andreeff, M. (2008) Concomitant inhibition of Mdm2-p53 interaction and Aurora kinases activates the p53-dependent postmitotic checkpoints and synergistically induces p53-mediated mitochondrial apoptosis along with reduced endoreduplication in acute myelogenous leukaemia. *Blood.* 112: 2886-95.
321. Fehri, L. F., Rechner, C., Janssen, S., Mak, T. N., Holland, C., Bartfeld, S., Brueggemann, H., Meyer, T. F. (2009) *Helicobacter pylori*-induced modification of the histone H3 phosphorylation status in gastric epithelial cells reflects its impact on cell cycle regulation. *Epigenetics.* 4 (8): 577-86.
322. Daniel, J. L., Molish, I. R., Rigmaiden, M., Stewart, G. (1984) Evidence for a role of myosin phosphorylation in the initiation of the platelet shape change response. *J Biol Chem.* 259 (15): 9826-31.

323. Nachmias, V. T., Kavalier, J., Jacobowitz, S. (1985) Reversible association of myosin with the platelet cytoskeleton. *Nature*. 313 (5997): 70-72.
324. Ridley, A. J., Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. 70 (3): 389-99.
325. Chen, L., Su, L., Li, J., Zheng, Y., Yu, B., Yu, Y., Yan, M., Gu, Q., Zhu, Z., Liu, B. (2012) Hypermethylated FAM5C and MYLK in serum as diagnosis and pre-warning markers for gastric cancer. *Dis Markers*. 32(2): 195-202.
326. Fedwick, J. P., Lapointe, T. K., Meddings, J. B., Sherman, P. M., Buret, A. G. (2005) *Helicobacter pylori* activates myosin light-chain kinase to disrupt claudin-4 and claudin-5 and increase epithelial permeability. *Infect Immun*. 73 (12): 7844-52.
327. Terrés, A. M., Pajares, J. M., Hopkins, A. M., Murphy, A., Moran, A., Baird, A. W., Kelleher, D. (1998) *Helicobacter pylori* disrupts epithelial barrier function in a process inhibited by protein kinase C activators. *Infect Immun*. 66: 2943-50.
328. Churin, Y., Kardalidou, E., Meyer, T. F., Naumann, M. (2001) Pathogenicity I landdependent activation of Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in *Helicobacter pylori* infection. *Mol Microbiol*. 40 (4): 815-23.
329. Covacci, A., Rappuolo, R. (2000) Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. *J Exp Med*. 191: 587-92.
330. Kalmann, D., Weiner, O. D., Goosney, D. L., Sedat, J. W., Finlay, B. B., Abe, A., Bishop, J. M. (1999) Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. *Nat Cell Biol*. 1: 389-91.
331. Weaver, A. M., Karginov, A. V., Kinley, A. W., Weed, S. A., Li, Y., Parsons, J. T., Cooper, J. A. (2001) Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Current Biol*. 11: 370-74.
332. Machesky, L. M., Reeves, E., Wientjes, F., Mattheyse, F. J., Grogan, A., Totty, N. F., Burlingame, A. L., Hsuan, J. J., Segal, A. W. (1997) Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins. *Biochem J*. 328 (1): 105-12.

333. Schafer, D. A., Welch, M. D., Machesky, L. M., Bridgman, P. C., Meyer, S. M., Cooper, J. A. (1998) Visualization and molecular analysis of actin assembly in living cells. *J Cell Biol.* 143: 1919-30.
334. Svitkina, T. M., Borisy, G. G. (1999) Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol.* 145: 1009-26.
335. Gimona, M., Buccione, R., Courtneidge, S. A., Linder, S. (2008) Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Curr Opin Cell Biol.* 20: 235-41.
336. Linder, S., Nelson, D., Weiss, M., Aepfelbacher, M. (1999) Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc Natl Acad Sci. USA* 96: 9648-53.
337. Mizutani, K., Miki, H., He, H., Maruta, H., Takenawa, T. (2002) Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Research.* 62: 669-74.
338. Linder, S., Aepfelbacher, M. (2003) Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* 13: 376-85.
339. Lin, J., Liu, J., Wang, Y., Zhu, J., Zhou, K., Smith, N., Zhan, X. (2005) Differential regulation of cortactin and N-WASP-mediated actin polymerization by missing in metastasis (MIM) protein. *Oncogene.* 24: 2059-66.
340. Martinez-Quiles, N., Ho, H. Y. H., Kirschner, M. W., Ramesh, N., Geha, R. S. (2004) Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP. *Mol Cell Biol.* 24: 5269-80.
341. Blaser, M. J., Perez-Perez, G. I., Kleanthous, H., Cover, T. L., Peek, R. M., Chyou, P. H., Stemmermann, G. N., Nomura, A. (1995) Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cag A* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 55: 2111-15.
342. Parsonnet, J., Friedman, G. D., Orentreich, N., Vogelman, H. (1997) Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 40 (3): 297-301.

8 ANHANG

Tab. 7: Zusammenfassende Darstellung der relativen Quantifizierung (RQ) aller 84 Gene in WT-Mäusen

Assay RQ für WT								
	24Wo WT	24WO WT		36WO WT	36WO WT		50WO WT	50WO WT
	Parietalzellen	Oberfläche		Oberfläche	Entzündung		Entzündung	SPEM
Actb	2,1904	0,6067	Actb	2,1649	0,6482	Actb	0,1968	0,134
Actr2	2,1702	1,0304	Actr2	1,3921	1,2752	Actr2	1,1418	4,4524
Actr3	1,4586	1,1157	Actr3	0,6261	0,7212	Actr3	0,3986	1,9379
Arap1	45,9212	1,5459	Arap1	7,9536	19,5379	Arap1	1,3586	0,1803
Arfp2	2,6067	0,835	Arfp2	5,2877	1,1593	Arfp2	0,4556	0,0306
Arhgap6	0,3926	0,0028	Arhgap6	0,8414	0,3724	Arhgap6	3,5393	0,008
Arhgdib	0,5189	0,0015	Arhgdib	1468,23	163,02	Arhgdib	1,3926	0,0039
Arhgef11	1,5351	1,7534	Arhgef11	9,863	2,2881	Arhgef11	0,0009	0,0051
Arpc1b	3,1303	3,5108	Arpc1b	0,7122	0,6446	Arpc1b	0,611	0,5416
Arpc2	1,4127	1,5424	Arpc2	0,6933	0,7337	Arpc2	0,9963	3,1392
Arpc3	1,988	2,1296	Arpc3	0,5711	0,7444	Arpc3	1,1976	2,423
Arpc4	0,6143	0,2866	Arpc4	3,8259	1,1858	Arpc4	0,0523	12819,8
Arpc5	2,037	0,5752	Arpc5	5,6675	2,5151	Arpc5	0,521	28478,2
Aurka	0,2497	1,0319	Aurka	0,1056	0,706	Aurka	0,0023	0,0051
Aurkb	12,8081	1,5459	Aurkb	0,1346	0,6913	Aurkb	0,0025	0,0144
Aurkc	0,0603	1,5459	Aurkc	0,0371	0,6962	Aurkc	14,531	81,9246

	24Wo WT	24WO WT		36WO WT	36WO WT		50WO WT	50WO WT
	Parietalzellen	Oberfläche		Oberfläche	Entzündung		Entzündung	SPEM
Baiap2	1,9625	0,0071	Baiap2	1,1656	0,7407	Baiap2	0,6585	2026
Cald1	0,5475	0,2542	Cald1	135,55	5,1693	Cald1	0,2204	0,1143
Calm1	0,5198	0,0007	Calm1	3,2313	0,8118	Calm1	0,0691	0,119
Cask	561,394	284,394	Cask	4,6672	1,8651	Cask	0,0009	0,2387
Ccna1	0,5251	1,3741	Ccna1	4,2511	7,786	Ccna1	145,7	133,99
Ccnb2	6,7034	0,3776	Ccnb2	0,3732	1,2681	Ccnb2	0,3739	0,0596
Cdc42	1,5905	0,2926	Cdc42	3,5354	0,9509	Cdc42	0,5711	0,148
Cdc42bpa	810,865	2,3583	Cdc42bpa	0,5926	0,3951	Cdc42bpa	0,001	2,5466
Cdc42ep2	1,8792	1,6269	Cdc42ep2	4,5132	0,8844	Cdc42ep2	0,1076	0,152
Cdc42ep3	290,935	1,5459	Cdc42ep3	685,945	137,74	Cdc42ep3	0,0152	0,037
Cdk5	0,5229	0,0033	Cdk5	144,3	110,908	Cdk5	0,0073	0,0411
Cdk5r1	0,8359	6,6441	Cdk5r1	35,9185	14,5547	Cdk5r1	4,5501	35,3093
Cfl1	1,7042	1,9199	Cfl1	0,5184	0,591	Cfl1	0,9063	2,978
Cit	0,001	0,0269	Cit	0,0001	1,0625	Cit	0,0043	0,5789
Clasp1	1,1047	3,2905	Clasp1	1,0768	0,5316	Clasp1	1,7498	8,2372
Clasp2	1,3041	1,1361	Clasp2	1,0069	0,5536	Clasp2	0,8521	2,8127
Clip1	0,1262	0,9716	Clip1	1,8474	0,2172	Clip1	4,3994	12,3982
Clip2	12,559	28,1678	Clip2	0,2356	0,7907	Clip2	1,4177	3,7051
Crk	0,637	0,7486	Crk	0,4369	0,4757	Crk	0,9151	10,0881
Ctnn	1,5664	1,1638	Ctnn	0,3509	0,6265	Ctnn	1,622	4,8614

	24Wo WT	24WO WT		36WO WT	36WO WT		50WO WT	50WO WT
	Parietalzellen	Oberfläche		Oberfläche	Entzündung		Entzündung	SPEM
Cyfp1	2,582	1,5711	Cyfp1	3,319	2,5789	Cyfp1	0,1442	0,1557
Cyfp2	28,6023	0,2666	Cyfp2	53,962	63,465	Cyfp2	0,2754	1,3917
Diap1	2,6872	0,0424	Diap1	4,5271	0,4913	Diap1	0,6068	0,1715
Dstn	2,3775	0,2948	Dstn	11,7593	1,5492	Dstn	0,1589	0,0194
Ezr	0,6242	1,0125	Ezr	0,554	0,4223	Ezr	0,1093	5,2217
Fnbp11	4,3972	0,8216	Fnbp11	1,5586	0,5061	Fnbp11	1,0045	0,4617
Fscn2	6,7642	1,5459	Fscn2	0,0001	0,0088	Fscn2	25,4801	2668,4
Gapdh	1,7217	0,3603	Gapdh	2,2403	1,0191	Gapdh	0,3272	0,213
Gsn	0,7691	0,3252	Gsn	1,9253	0,4604	Gsn	0,5584	1,8269
Gusb	1,2394	0,0069	Gusb	1,3247	0,7738	Gusb	0,7799	0,1968
Hprt1	24245,1	17697,4	Hprt1	0,392	0,4859	Hprt1	2,4578	7,949
Hso90ab1SC	1	1	Hso90ab1SC	1	1	Hso90ab1SC	1	1
Iqgap1	1,4517	0,8399	Iqgap1	1,4095	0,6977	Iqgap1	0,9005	0,2092
Iqgap2	2,415	0,4617	Iqgap2	0,5455	0,7324	Iqgap2	1,3205	6,5324
Limk1	188,481	1,5459	Limk1	2,0316	0,3604	Limk1	0,3043	0,2231
Limk2	1,1919	0,5435	Limk2	0,6643	0,642	Limk2	2,3263	4,4094
Llgl1	539,343	4,2408	Llgl1	601,34	398,097	Llgl1	1,2785	0,0106
Macf1	0,8579	0,0002	Macf1	1,7894	0,6095	Macf1	0,2351	0,4492
Map3k11	620,903	4,0598	Map3k11	1,5148	0,7631	Map3k11	0,1656	0,0013
Mapk13	1,9818	0,1001	Mapk13	1,4892	1,2143	Mapk13	1,0493	0,0399

	24Wo WT	24WO WT		36WO WT	36WO WT		50WO WT	50WO WT
	Parietalzellen	Oberfläche		Oberfläche	Entzündung		Entzündung	SPEM
Mapre1	0,0042	0,0035	Mapre1	140,697	82,6134	Mapre1	0,0026	0,0148
Mapre2	1,1495	0,2449	Mapre2	2,1059	0,8221	Mapre2	0,0047	0,2748
Mapt	28,1314	3,4267	Mapt	18,4673	14,2324	Mapt	4,4435	25,052
Mark2	1,1903	1,1209	Mark2	0,7357	0,7841	Mark2	0,3475	2,2601
MGDC	0,0603	1,5459	MGDC	0,149	0,0238	MGDC	25,4801	143,655
Mid1	0,9047	0,9395	Mid1	1,0473	0,5433	Mid1	0,0193	0,1085
Msn	2186,36	0,958	Msn	5,5839	0,9595	Msn	0,0061	0,0016
Mtap4	2403,33	468,25	Mtap4	2,2537	0,6277	Mtap4	2,2321	0,0021
Mylk	0,5021	0,3094	Mylk	12,8987	0,6393	Mylk	1,6546	1,6681
Mylk2	0,0603	52,8062	Mylk2	1,7779	27,6935	Mylk2	205,81	143,655
Nck1	3,3477	0,0012	Nck1	1,952	0,9297	Nck1	1,0178	0,2217
Nck2	1,9333	1,3846	Nck2	2,2353	0,994	Nck2	0,8293	0,1716
Pak1	7,0614	1,9597	Pak1	0,9297	0,3083	Pak1	0,0323	0,2213
Pak4	2,5447	2,119	Pak4	5,2963	1,4045	Pak4	0,2783	0,2036
Pfn2	13,4113	19,7025	Pfn2	2,6996	0,4411	Pfn2	1,458	1,4835
Phldb2	2,9844	0,0113	Phldb2	28,7639	4,5642	Phldb2	0,7685	0,0113
Pikfyve	9,4169	0,0234	Pikfyve	10,8919	1,8043	Pikfyve	0,002	0,0111
PPC	0,0616	1,5268	PPC	0,8914	0,1951	PPC	29,7811	121,92
Ppp1r12a	1,0361	0,496	Ppp1r12a	8,1517	0,9062	Ppp1r12a	1,5941	0,2087
Ppp1r12b	0,4312	0,0012	Ppp1r12b	29,5388	1,4574	Ppp1r12b	0,0343	5,3218

	24Wo WT	24WO WT		36WO WT	36WO WT		50WO WT	50WO WT
	Parietalzellen	Oberfläche		Oberfläche	Entzündung		Entzündung	SPEM
Ppp3ca	1,2136	0,476	Ppp3ca	111,331	7,3943	Ppp3ca	0,7116	0,0006
Ppp3cb	3,5978	0,0059	Ppp3cb	2,1627	0,6588	Ppp3cb	2,1464	0,1111
Rac1	1,6999	1,257	Rac1	0,8593	0,9182	Rac1	1,0406	4,7669
Racgap1	338,43	1590,6	Racgap1	0,0781	0,7011	Racgap1	0,0005	0,6687
Rdx	132,15	1,5459	Rdx	4142,08	129,4	Rdx	1,0194	0,0087
Rhoa	1,8808	0,3973	Rhoa	2,067	0,6318	Rhoa	0,6689	0,1453
Rock1	1,086	0,4242	Rock1	0,9178	0,6233	Rock1	1,8599	1,926
RTC	0,1413	3,1627	RTC	0,9537	0,2634	RTC	20,0051	28,6704
Ssh1	1117,17	1,5459	Ssh1	4,501	0,7018	Ssh1	2,0938	3,0261
Ssh2	9,3789	0,0591	Ssh2	0,875	0,3126	Ssh2	0,0011	0,0375
Stmn1	1,0418	2,9073	Stmn1	0,2842	0,7604	Stmn1	1,5018	0,3062
Tiam1	0,2305	10,2506	Tiam1	1,5086	3,6987	Tiam1	5,1965	0,0223
Vasp	4,7179	2,268	Vasp	0,2984	0,6529	Vasp	1,1569	1,8641
Was	47,7862	1,5459	Was	245,437	369,641	Was	0,044	0,0248
Wasfl	0,0603	1,5459	Wasfl	3627,65	240,829	Wasfl	0,0085	0,048
Wasl	2,2649	0,3405	Wasl	3,8766	1,5207	Wasl	0,9988	0,8433

Tab. 8: Zusammenfassende Darstellung der relativen Quantifizierung (RQ) aller 84 Gene in *ctsx*^{-/-}-Mäusen

Assay RQ für <i>ctsx</i> ^{-/-}					
	24Wo <i>ctsx</i> ^{-/-}	36WO <i>ctsx</i> ^{-/-}	36WO <i>ctsx</i> ^{-/-}	50WO <i>ctsx</i> ^{-/-}	50WO <i>ctsx</i> ^{-/-}
	Parietalzellen	Oberfläche	Entzündung	Entzündung	SPEM
Actb	0,0749	1498269,7	7255024,2	1,0699	2,8544
Actr2	0	1,0142	3,5047	0,7998	1,2183
Actr3	0,6894	0,8882	3,8156	0,5591	0,6264
Arap1	5,9907	3004,84	84,6003	2,3787	0,018
Arfp2	0,0143	1,0744	0,0632	3,4017	0,0233
Arhgap6	0,5496	0,3875	1,1634	3,245	69,8357
Arhgdib	0,0347	50406,9	4681,7	4,228	1,3766
Arhgef11	0,0005	0,9782	6,5577	1,4586	0,5376
Arpc1b	0,2798	1,2748	2,7116	1,0739	0,2318
Arpc2	0,489	0,6782	2,0486	1,5619	1,2117
Arpc3	0,3666	1,2002	3,4148	1,6924	1,0903
Arpc4	0,0637	0,3704	1,4237	1,0051	0,3325
Arpc5	0,0637	0,7249	1,0789	0,9771	0,2622
Aurka	0,1502	0,0002	1,5072	0,5335	0,0176
Aurkb	5,9907	0,1577	0,0928	0,0035	0,0018
Aurkc	0,0404	2,7919	9,7473	2,0519	0,0597
Baiap2	0,935	0,9883	6,2385	0,9328	0,0023

	24Wo <i>ctsx</i> ^{-/-}	36WO <i>ctsx</i> ^{-/-}	36WO <i>ctsx</i> ^{-/-}	50WO <i>ctsx</i> ^{-/-}	50WO <i>ctsx</i> ^{-/-}
	Parietalzellen	Oberfläche	Entzündung	Entzündung	SPEM
Cald1	0,0592	0,6396	0,2318	0,9798	70,8384
Calm1	0,0861	9055,43	36937,6	0,3826	0,3676
Cask	0,0659	0,7914	0,9523	0,2803	0,4289
Ccna1	841,136	1,8426	1,1225	0,5263	0,1148
Ccnb2	8,51082	0,4768	0,0017	0,2295	0,002
Cdc42	0,1144	1,4536	1,3361	0,5309	0,0001
Cdc42bpa	0,6509	0,5665	3,1947	1,2002	0,2111
Cdc42ep2	0,1273	0,6265	6,2304	1,185	1,7463
Cdc42ep3	0,0056	0,8342	8,1089	0,5721	22,1831
Cdk5	0,0012	2,1552	3,104	0,0047	0,4848
Cdk5r1	0,7292	3,175	12,5613	6,397	12,7967
Cfl1	1,4208	1,2502	4,363	1,1565	2,3152
Cit	1,7692	0	0	0,294	0,002
Clasp1	0,4949	2,2315	5,1657	0,8474	0,8663
Clasp2	0,0804	1,1745	0,5022	1,6149	10,1661
Clip1	0,1165	2,8066	8,887	1,1573	6,2332
Clip2	0,1706	1,1256	4,0218	0,8983	0,2207
Crk	0,8685	0,7896	4,5479	1,4771	1,3122
Ctnn	1,3197	1,3033	7,0826	0,9801	0,2895
Cyfp1	0,0778	0,4606	1,2557	1,0671	0,599

	24Wo <i>ctsx</i> ^{-/-}	36WO <i>ctsx</i> ^{-/-}	36WO <i>ctsx</i> ^{-/-}	50WO <i>ctsx</i> ^{-/-}	50WO <i>ctsx</i> ^{-/-}
	Parietalzellen	Oberfläche	Entzündung	Entzündung	SPEM
Cyfp2	0,01	17,2239	13,2797	0,01	0,0165
Diap1	0,0818	0,488	0,7851	0,3222	0,001
Dstn	0,0084	0,4349	1,3157	0,6388	2,7402
Ezr	0,3846	1,1716	6,5998	0,8837	0,0014
Fnbp11	0,1483	62739	80716,5	1,0811	0,0003
Fscn2	0,0549	0,0071	0,0025	0,0725	13,1904
Gapdh	0,087	0,6069	1,8067	1,3884	1,2909
Gsn	0,2432	0,9073	4,1857	0,7797	1,6831
Gusb	0,3379	0,2259	0,1218	0,7251	1,9703
Hprt1	3,757	1,651	3,4427	0,1548	0,6864
Hso90ab1SC	1	1	1	1	1
Iqgap1	0,2586	1,1216	2,6127	0,7609	0,3287
Iqgap2	0,7079	0,8083	2,8769	1,0305	0,1126
Limk1	103,601	0,9217	0,0037	1,4709	0,0091
Limk2	0,5562	1,8632	3,2891	0,8613	0,0002
Llg1	0,0055	0,7276	1,8933	1,1414	0,1486
Macf1	0,0004	0,7442	3,362	170,05	5,1519
Map3k11	0,0944	0,4164	1,9196	0,6909	0,0021
Mapk13	0,014	4,1277	6,7002	0,6876	0,0018
Mapre1	0,0122	0	0	0,2983	0,5363

	24Wo <i>ctsx</i> ^{-/-}	36Wo <i>ctsx</i> ^{-/-}	36Wo <i>ctsx</i> ^{-/-}	50Wo <i>ctsx</i> ^{-/-}	50Wo <i>ctsx</i> ^{-/-}
	Parietalzellen	Oberfläche	Entzündung	Entzündung	SPEM
Mapre2	0,1724	1,8193	11,7151	0,5301	0,9869
Mapt	0,0316	117,993	435,357	5,6132	4,9183
Mark2	0,0697	0,8349	6,3225	1,4953	1,2986
MGDC	23,1039	2,7919	6,4814	912,924	168,813
Mid1	0,1552	0,0017	0,1226	0,3077	0,0462
Msn	0,0004	2,0768	1,1103	2,0513	19,4067
Mtap4	0,1124	0,9012	4,2822	1,6182	3,5683
Mylk	0,0561	1,2879	0,5647	1,5546	464,161
Mylk2	40,2607	14,4838	6,4814	401,646	49,5346
Nck1	0,0718	1,849	4,448	0	3,0045
Nck2	0,4622	0,6632	1,6384	0,0104	0,801
Pak1	0,4593	1,8037	3,4311	0,4974	0,0253
Pak4	0,0451	0,5159	0,8207	0,8407	0,2069
Pfn2	0,2549	41505,8	21812	1,3284	25,2848
Phldb2	0,0737	1,7161	16,4143	1,1589	4,4453
Pikfyve	0,0023	0,3864	0,4491	0,783	0,0022
PPC	0,7995	3,0802	7,9534	5,7849	15,7772
Ppp1r12a	0,0237	0,4563	1,8968	0,7667	8,6101
Ppp1r12b	0,278	1,1953	3,4056	0,7327	156,931
Ppp3ca	0,0103	1,6125	0,3053	2,1125	0,264

	24Wo <i>ctsx</i> ^{-/-}	36WO <i>ctsx</i> ^{-/-}	36WO <i>ctsx</i> ^{-/-}	50WO <i>ctsx</i> ^{-/-}	50WO <i>ctsx</i> ^{-/-}
	Parietalzellen	Oberfläche	Entzündung	Entzündung	SPEM
Ppp3cb	0,2441	0,9431	1,1225	1,3837	4,2467
Rac1	0,2366	1,592	1,5836	1,4534	2,1745
Racgap1	0,0014	0,2894	0,2926	0,0001	0,0136
Rdx	0,0231	0,5866	0,5557	0,2	19,8509
Rhoa	0,1434	0,717	1,4197	0,7106	0,534
Rock1	1,3952	2,0446	2,7427	1,1386	0,831
RTC	1,1712	2,7911	5,2511	7,4298	161,257
Ssh1	0,0012	0,0015	0,0033	2,512	2,152
Ssh2	0,007	5,1813	10,8771	3,3683	0,0036
Stmn1	1,2315	0,8918	0,1379	1,0171	1,4923
Tiam1	0,5138	1,089	0,3527	0,9088	0,0051
Vasp	0,7876	0,5045	3,4491	1,0169	0,8233
Was	0,11	204,42	2,2214	30,06	0,0454
Wasfl	5,9907	2451,74	5441,1	1,86	180,491
Wasl	0,1128	1,4345	2,2253	0,596	0,3265

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Albert Roessner und bei Frau Dr. Sabine Krueger für die Möglichkeit, dieses interessante Thema an seinem Institut und in ihrer Arbeitsgruppe bearbeiten zu können und für die engagierte und lehrreiche Betreuung, bedanken.

Ich danke allen Mitarbeitern des gesamten Instituts für Pathologie für die freundliche Zusammenarbeit, die Beantwortung vieler Fragen und für die Schaffung eines angenehmen Arbeitsklimas. Dabei sind besonders die TA's Kirsten Herrmanns, Doreen Medau, Gabi Becker und alle TA's aus dem DNA-Labor für die stetige Hilfsbereitschaft im Laboralltag und für den Spaß am Rande hervorzuheben. In dieser Aufzählung darf aber auch unsere Frau Hella Wolf nicht fehlen, die es nicht immer leicht mit meinen immunhistochemischen Ansprüchen hatte. Besonders möchte ich mich auch bei Anne Teller bedanken, mit der man jederzeit eine rege Diskussion über die Ergebnisse führen konnte.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. Roland Hartig für seine hilfreiche Unterstützung und Betreuung bei der modernen Mikroskopie.

An Herrn Prof. Dr. Steffen Backert und Dr. Sabine Brandt geht ein besonderer Dank für die Bereitstellung des *Helicobacter pylori* SS1 und der sehr guten fachlichen Beratung. Danke für die uneingeschränkte Hilfe zu jeder Tageszeit!

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei Dr. T. Reinheckel und Prof. C. Peters vom Institut für Molekulare Medizin und Zellforschung, A.-Ludwig Universität Freiburg für die Kooperation und für die zur Verfügung gestellten defizienten Mäuse. Ein ganz großes Dankeschön gilt dabei natürlich auch allen Mitarbeitern des zentralen Tierlabors O.-v.-Guericke Universität, die sich wunderbar um die Betreuung der Tiere kümmerten.

Mein größter Dank gilt aber meiner Familie und meinen Freunden, die zum Gelingen dieser Arbeit einen großen Teil beigetragen haben!

Dabei danke ich meiner Familie für die Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit, die Aufmunterungen in schwierigen Phasen und dafür das sie immer an mich glaubten und hinter mir standen.

Ohne sie wäre ich nicht soweit gekommen!

Meinen Freunden danke ich aus tiefsten Herzen, im Besonderen Kirsten Herrmanns und Kathrin Patsias für die Hilfe in wirklich allen Lebensnotlagen. Besonders für die Geduld und die Zeit, die sie immer wieder für mich aufbrachten.

An letzter Stelle möchte ich einen lieben Dank meinem Freund Mathias Wolff und meiner kleinen Tochter Mira Wolff zukommen lassen. Ich danke euch für die Liebe und die Kraft und das Verständnis das ihr für meine Launen aufbrachtet.

Vielen Dank!

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Anja Bernhardt
Geburtsdatum: 19.08.1981
Geburtsort: Herzberg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Adresse: Angerstrasse 4; 39326 Wolmirstedt

Schulische Ausbildung

1988 bis 1994: Grundschule Falkenberg
1997 Auslandsaufenthalt in Frankreich (Lanion)
1994 bis 2001 Friedrich Stoy Gymnasium Falkenberg
Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

10.2001 bis 09.2007 Diplom-Biologie Studium an der
Martin-Luther Universität Halle/Wittenberg
Abschluss: Diplom-Biologie

Thema Diplomarbeit: „Aggression und Schutzmöglichkeit in Familien Mongolischer
Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus* MELNE EDWARDS, 1867)
unter kontrollierten Bedingungen.“

Promotionsarbeit

seit 12.2007 Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
Institut für Pathologie
Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Thema Promotionsarbeit: „Bedeutung der *Helicobacter pylori*-induzierten Cathepsin X-
Expression für die Magenkarzinogenese:
Untersuchung am transgenen Mausmodell.“

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation über die:

**Bedeutung der *Helicobacter pylori* - induzierten
Cathepsin X-Expression für die Magenkarzinogenese:
Untersuchung am transgenen Mausmodell**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Magdeburg, den

Anja Bernhardt