

**Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Würzburg**

Vorstand: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

**Expression von Chemokinrezeptoren auf Mageneithelien und
neutrophilen Granulozyten während der Helicobacter pylori Infektion**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Simon Endrich

aus Schollbrunn

Würzburg, 2010

Referent: Prof. Dr. med. Matthias Eck

Koreferent: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 2. August 2010

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung	1
1.1.	Bedeutung von Chemokinrezeptoren in der Pathogenese der <i>Helicobacter pylori</i> Gastritis und des Magenkarzinoms.....	1
1.2.	Das Chemokin – Chemokinrezeptorsystem	3
1.2.1.	Übersicht über Chemokine und Chemokinrezeptoren.....	3
1.2.2.	Physiologische und pathophysiologische Aspekte der Chemokinachse	5
1.3.	Pathogenese <i>Helicobacter pylori</i> assoziierter Erkrankungen unter Berücksichtigung des Chemokin - Chemokinrezeptorsystems.....	8
1.3.1.	Die <i>Helicobacter pylori</i> Gastritis	9
1.3.1.1.	Pathogenese der <i>Helicobacter pylori</i> Gastritis	9
1.3.1.2.	Chemokine und Chemokinrezeptoren in der <i>Helicobacter pylori</i> Gastritis.....	10
1.3.1.3.	Induktion von Chemokinfreisetzung in Epithelzellen durch <i>Helicobacter pylori</i>	11
1.3.2.	Das Magenkarzinom	13
1.4.	Zentrale Fragestellung der Dissertation	15
2.	Material und Methoden	17
2.1.	Material	17
2.1.1.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	17
2.1.2.	Chemikalien	18
2.1.3.	Verwendete Lösungen	19
2.1.4.	Antikörper für die FACS Analyse.....	20
2.1.5.	Enzyme	21
2.1.6.	Oligonukleotide	21
2.1.7.	Verwendete Zellen	24
2.1.7.1.	Neutrophile Granulozyten des peripheren Blutes.....	24

2.1.7.2.	Zelllinien von Magenkarzinomen.....	24
2.1.8.	Proben von Magengewebe	25
2.2.	Methoden	26
2.2.1.	Immunhistochemie von Chemokinrezeptoren auf Magengewebe	26
2.2.2.	Methoden in der Zellkultur.....	27
2.2.2.1.	Kultivieren von Tumorzelllinien.....	27
2.2.2.2.	Kryokonservierung von Tumorzelllinien	27
2.2.3.	Isolation von Primärzellen	28
2.2.3.1.	Isolation von neutrophilen Granulozyten	28
2.2.4.	Kultivierung von <i>Helicobacter pylori</i>	29
2.2.5.	Koinkubation von Epithelzelllinien mit <i>Helicobacter pylori</i>	29
2.2.6.	Koinkubation von neutrophilen Granulozyten mit <i>Helicobacter pylori</i>	30
2.2.7.	Durchflusszytometrie mit FACS Analyse.....	31
2.2.8.	Konfokale Mikroskopie	32
2.2.9.	Messung von IL-8 und TNF α Protein in den Zellkulturüberständen mittels enzyme linked immunoassay (ELISA)	33
2.2.10.	Molekularbiologische Methoden zur Durchführung der semiquantitativen reverse Transkriptase – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	34
2.2.10.1.	Methoden zur Aufreinigung und Konzentrierung von Nukeinsäurelösungen	34
2.2.10.2.	Isolation von RNA	36
2.2.10.3.	Aufreinigung der isolierten RNA durch DNase-I Verdau	37
2.2.10.4.	Qualitätskontrolle der RNA.....	37
2.2.10.5.	Reverse Transkription der mRNA in cDNA	38
2.2.10.6.	Standard Polymerasekettenreaktion mit cDNA als Template...	39

2.2.10.7.	Analyse von PCR Produkten mittels Elektrophorese	40
2.2.10.8.	Qualitätssicherung und -kontrolle in der PCR	40
2.2.10.9.	Durchführung der Semiquantifizierung.....	41
2.2.10.10.	Sequenzierung von PCR – Produkten	42
3.	Ergebnisse	43
3.1.	Chemokinrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten unter dem Einfluss von <i>H.pylori</i>	43
3.1.1.	neutrophile Granulozyten verlieren die Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 in der chronisch aktiven Gastritis	43
3.1.2.	Induktion einer schnellen Herunterregulation von CXCR1- und CXCR2- Protein auf neutrophilen Granulozyten durch <i>Helicobacter pylori</i> in vitro, unabhängig vom <i>cag</i> Status.....	45
3.1.3.	Der Verlust von CXCR1 und CXCR2 Protein unter dem Einfluss von <i>H.pylori</i> scheint auf Rezeptorinternalisation und proteolytischen Abbau zurückzuführen	48
3.1.4.	Die Regulation von CXCR1 und CXCR2 mRNA auf neutrophilen Granulozyten ist abhängig vom <i>H.pylori cag A</i> Status	50
3.1.5.	TNF α und IL-8 sind nicht verantwortlich für die schnelle Herunterregulation von CXCR1 und CXCR2 bei der Koinkubation von neutrophilen Granulozyten mit <i>H.pylori</i>	52
3.2.	Expression von CXCR4 und CCR7 auf epithelialen Zellen des Magens	54
3.2.1.	Expression von CXCR4 und CCR7 auf normaler Magenschleimhaut, intestinaler Metaplasie und Dysplasie, sowie Magenkarzinomen.....	54
3.2.2.	Expression von Chemokinrezeptoren auf Magenepithelzelllinien	56
3.2.3.	Die CCR7 Expression auf Magenkarzinom - Zelllinien wird durch <i>H.pylori</i> hoch geregelt	58
3.2.4.	Die CXCR4 Expression auf Magenkarzinom – Zelllinien ist unabhängig von <i>Helicobacter pylori</i>	60

4.	Diskussion:.....	61
4.1.	Regulation der Expression von CXCR1 und CXCR2 auf neutrophilen Granulozyten durch <i>Helicobacter pylori</i>	61
4.2.	Chemokinrezeptorexpression von Magenepithelzelllinien.....	64
4.2.1.	CXCR4 Expression auf epithelialen Zellen des Magens unter dem Einfluss von <i>Helicobacter pylori</i>	65
4.2.2.	CCR7 Expression auf epithelialen Zellen des Magens unter dem Einfluss von <i>Helicobacter pylori</i>	67
5.	Zusammenfassung:.....	70
6.	Abkürzungsverzeichnis	72
7.	Abbildungsverzeichnis	74
8.	Referenzen:.....	75

1. Einleitung

1.1. Bedeutung von Chemokinrezeptoren in der Pathogenese der *Helicobacter pylori* Gastritis und des Magenkarzinoms

Bereits seit Ende des 19. Jahrhunderts wurden wiederkehrend Berichte über den mikroskopischen Nachweis von spiralförmigen Bakterien auf Magenschleimhaut bzw. in Magenspülflüssigkeit veröffentlicht (1-4). Es dauerte jedoch bis zum Jahre 1982 bis das Phänomen hinreichend geklärt werden konnte.

In diesem Jahr gelang den beiden australischen Wissenschaftlern B. Marshall und R. Warren die Isolation und Kultur spiralförmiger, begeißelter, gram negativer Bakterien aus einer Magenbiopsie eines an einem Ulcus duodeni leidenden Patienten (5). Marshall erfüllte Kochs drittes Postulat, dass der isolierte Keim beim Gesunden die entsprechende Krankheit auslöst, in einem Selbstversuch. Er brachte so den Beweis, dass der Keim, damals noch als *Campylobacter pyloridis* bezeichnet, die Ursache einer Gastritis ist, die durch Eradikation des Erregers mit einem Antibiotikum heilbar ist (6). Als erkannt wurde, dass es sich bei dem entdeckten Keim nicht wie zuerst angenommen um eine *Campylobacter* Unterart, sondern um eine eigene Spezies handelt, erfolgte die Umbenennung in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*).

Marshall und Warren, die durch die Entdeckung und Erforschung des *H. pylori* das Verständnis der Pathogenese von Erkrankungen des Magens revolutionierten, wurden 2005 durch die Verleihung des Nobelpreises für Medizin geehrt (7).

H. pylori kolonisiert die epitheliale Schleimschicht und verursacht eine charakteristische Entzündung der Magenschleimhaut, die als chronisch aktive Gastritis bezeichnet wird. Diese ist gekennzeichnet durch Infiltration der Tunica mucosa und der Foveolae gastricae mit neutrophilen Granulozyten, sowie der Ausbildung eines reaktiven, folliculär-lymphatischen Infiltrats (8-10). In der *H. pylori* Gastritis moduliert ein charakteristisches Chemokinmilieu über die Chemokinrezeptoren der einwandernden Leukozyten die Beschaffenheit des entzündlichen Infiltrats (11-14). Die spezifische Chemokinfreisetzung wird dabei durch direkte

Interaktion von *H.pylori* mit Wirtszellen gesteuert. Die induzierte Immunantwort ist ineffektiv, da es nicht zur natürlichen Eradikation des Keims kommt.

Auf dem Boden der *H. pylori* Infektion entstehen als sekundäre Neoplasien, Adenokarzinome des Magens (15-17). Von der WHO wird *H. pylori* deshalb als definitives Karzinogen der Klasse 1 eingestuft (18). Der Weg der Karzinogenese führt dabei vom nicht entzündeten Magen über die *H. pylori* Gastritis zur intestinalen Metaplasie und Dysplasie und schließlich zum Adenokarzinom (19).

Auch Zellen von Magenkarzinomen exprimieren Chemokinrezeptoren, die diesen die Reaktion auf Chemokinsignale ermöglichen. Die Expression von Chemokinrezeptoren auf Zellen eines Magenkarzinoms wird mit einer schlechten Prognose und der Fähigkeit zur Metastasierung assoziiert. Somit scheinen Chemokinrezeptoren zumindest in der Ausprägung des Tumorleidens eine entscheidende Rolle zu spielen (20-29).

Ob *H.pylori* selbst, neben der Chemokinfreisetzung im Rahmen der Infektion, auch die Expression von Chemokinrezeptoren zu regulieren vermag, ist bislang nicht bekannt und stellt die zentrale Fragestellung der nachfolgenden Arbeit dar.

1.2. Das Chemokin – Chemokinrezeptorsystem

1.2.1. Übersicht über Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine sind eine Unterfamilie von Zytokinen, deren Bedeutung zunächst in der Rekrutierung von Entzündungszellen gesehen wurde.

Chemokine werden anhand der Position von spezifischen Cysteinresten, die an der Ausbildung der Tertiärstruktur der Peptide beteiligt sind, in vier Untergruppen, die CXC, CC, C und C3XC Chemokinen unterteilt (30-32).

Vor dem ersten Cystein liegt bei ELR-positiven CXC - Chemokinen, eine Sequenz von drei Aminosäuren bestehend aus Glutaminsäure – Leucin – Arginin, die entsprechend der internationalen Nomenklatur als E-L-R abgekürzt wird. Neben ihrem gemeinsamen ELRC-Motiv haben diese in der ursprünglichen Funktion der Chemokine, durch die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten, eine funktionelle Gemeinsamkeit.

Die bislang bekannten Vertreter der Gruppe sind IL-8, Gro- α , Gro- β , Gro- γ , ENA-78, LDGF-PBP, GCP-2.

Die ELR negativen CXC-Chemokine, ohne ein entsprechendes ELR Motiv beschrieben, sind funktionell beteiligt an Migrationsvorgängen von Lymphozyten. Bekannte Vertreter sind bislang PF4, Mig, IP10, SDF-1 α/β , BUNZO/STRC33, I-TAC und BLC/BCA-1.

Im Gegensatz dazu folgen die beiden N-terminalen Cysteinreste der CC- Chemokine in der Aminosäuresequenz direkt aufeinander. Bei den Zielzellen der vermittelten Chemotaxis handelt es sich meist vorrangig um Monozyten und T-Zellen, jedoch auch um B-Zellen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen, sowie um basophile und eosinophile Granulozyten.

Bislang bekannte Vertreter der β -Chemokine sind Mip-1 α u. β , MDC, TECK, TARC, RANTES, HCC-1 u. 4, DC-CK1, Mip-3 α u. β , MCP 1-4, Eotaxin, I309, MIP-5, MPIF-1, 6CKine, CTACK, sowie MEC.

Von der C-Untergruppe sind bisher nur das Lymphotaktin α und β als einzige Vertreter bekannt. Strukturell auffällig ist das Fehlen des ersten und dritten Cysteins. Die Funktion des Lymphotactins besteht in der Anlockung von T-Zellen in den Thymus.

Bei der Gruppe der C3XC Gruppe liegen zwischen den beiden N-terminalen Cysteinen drei andere Aminosäuren. Der einzige beim Menschen gefundene Vertreter ist das Fraktalkin, welches sowohl als membranständiges Protein, sowie in löslicher Form vorkommt, und chemotaktisch auf T-Zellen, Monozyten und neutrophile Granulozyten wirkt. (30-34)

Chemokine wirken über Chemokinrezeptoren auf die jeweiligen Effektorzellen. Bislang konnten 19 verschiedene Chemokinrezeptoren identifiziert werden. Die Einteilung erfolgt in vier verschiedenen Gruppen, korrespondierend zur Einteilung der Chemokine in CC-Chemokinrezeptoren, in CXC-Chemokinrezeptoren, in XC-Chemokinrezeptoren, sowie in C3XC-Chemokinrezeptoren.

Das Bindungsverhalten der Rezeptoren zur jeweiligen Chemokin Untergruppe ist spezifisch, sie binden jedoch in der Regel mehrere Chemokine der Untergruppe (33).

Die intrazelluläre Signalkaskade erfolgt abhängig von $G_{i\alpha/o}$ über Kalziumeinstrom und Aktivierung der Proteinkinase C und der Phospholipase $C\beta 2$ (35).

Die Kalziumfreisetzung als kurzfristiger und rascher Effekt der Ligandenbindung ermöglicht die zur aktiven, amöboiden Migration erforderliche Aktinpolymerisation. Darüber hinaus fungiert Kalzium als „second messenger“ mit Einfluss auf die Genexpression. Durch die Aktivierung der Proteinkinase C, die durch Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten eine Schlüsselrolle in der Auslösung von weiteren Signalkaskaden spielt, kommt es unter anderem zur Aktivierung des ras – raf – MAP-Kinase Signalwegs (36, 37).

Die Bindung eines Liganden an einen Chemokinrezeptor löst somit eine weitreichende Signalkaskade aus, die über bloße Zellmotilität hinausgeht.

Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über Chemokine und ihre korrespondierenden Rezeptoren (siehe Anhang 1)

1.2.2. Physiologische und pathophysiologische Aspekte der Chemokinachse

Die Expression der Chemokinrezeptoren wurde zunächst auf Zellen der myeloischen und lymphatischen Reihe nachgewiesen.

Primär wurde ihre Funktion darin gesehen, den Zellen zu ermöglichen, auf chemotaktische Signale hin, mit aktiver Migration an den Ort der Entzündung zu reagieren (38). Neben der Wanderung der Zellen in das entzündete Gewebe, wird auch das Gefüge des entzündlichen Infiltrats selbst, durch Chemokine organisiert. Beispielweise bilden knock-out – Mäuse für das Gen von BCA-1 (CXCL13) oder dessen Rezeptor CXCR5 keine Payerschen Plaques aus (39, 40).

Die biologische Bedeutung der Chemokinsignale bei der Wanderung von Leukozyten, beschränkt sich nicht allein auf entzündliche Prozesse. Es werden auch physiologische, nicht primär inflammatorische Wanderungsvorgänge von Leukozyten, zu den lymphatischen Organen und innerhalb dieser, durch Chemokine vermittelt.

Einige Chemokine werden beispielsweise konstitutiv in Lymphknoten exprimiert. Diese nehmen Einfluss auf die Migration der Lymphozyten zu den Lymphknoten, steuern aber auch die Wanderung der Lymphozyten innerhalb des Lymphknotens. Sie sind dadurch maßgeblich am Aufbau der funktionellen Substruktur der lymphatischen Gewebe beteiligt (41-43).

Die Chemokin Achse spielt ebenfalls eine Rolle bei homöostatischen Prozessen anderer Gewebe, die nicht primär lymphatischen Ursprungs sind.

Zum Beispiel findet bei der kutanen Wundheilung ein engmaschiges, chemokinmoduliertes Zusammenspiel zwischen eingewanderten Leukozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten statt. Interessanterweise dirigieren Chemokinsignale hierbei jedoch nicht nur die einwandernden Leukozyten.

Chemokinrezeptoren werden ebenfalls von Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten exprimiert.

Für Keratinozyten ist die Expression von CXCR2 nachgewiesen worden. Am

Modell der kutanen Wundheilung liegen IL-8 und Gro- α insbesondere an den Wundrändern in hoher Konzentration vor. Infolgedessen kommt es zur gerichteten Proliferation der Keratinozyten, bzw. zur Einwanderung in das Wundgebiet vom Wundrand her, und somit zur epithelialen Deckung (44).

Neben der Haut wurde die Expression von Chemokinrezeptoren auch auf anderen Epithelien nachgewiesen, u.a. auf Bronchialepithel, intestinalen Epithelien und Endometrium (45-48). Auch hier wird die Expression der Chemokinrezeptoren im Zusammenhang der Gewebemöostase, sowie der Epithelzellaktivierung und konsekutiven Zytokinsekretion im Rahmen inflammatorischer Prozesse gesehen (45, 46).

Das Chemokinrezeptorsystem ist ebenfalls Teil der Biologie maligner Tumoren. Analog zu der Bedeutung der Chemokinrezeptoren in der Physiologie der Epithelien, sind nicht nur Malignome mesenchymaler Herkunft, sondern auch Karzinome in der Lage, Chemokinrezeptoren zu exprimieren. Ihre Zellen sind somit in der Lage, auf Chemokinsignale zu reagieren.

Es ist für eine Vielzahl Karzinome der Nachweis erbracht worden, dass von den malignen Zellen Chemokinrezeptoren exprimiert werden. Die Expression von Chemokinrezeptoren auf den epithelialen Zellen des Karzinoms wird dabei meist mit Tumorprogression und Metastasierung in Verbindung gebracht (49).

Zwei Rezeptoren spielen in der Tumorbilogie hierbei die Hauptrolle. Zum einen ist dies CXCR4, zum anderen CCR7. Ihre Synthese durch die Tumorzellen scheint hierbei, bedingt durch die maligne Entartung stattzufinden (50, 51).

Die Expression von CXCR4 wurde unter anderem in Karzinomen der Mamma (52), Lunge (53), Blase (54), Prostata (55) und Niere (56), des Colon (57), Nasopharynx (58), Pankreas (59), und Magens (24), sowie im Neuroblastom (60) und zahlreichen Malignomen mesenchymalen Ursprungs (61-63) nachgewiesen.

Die physiologische Bedeutung von CXCR4 und dessen Liganden CXCL12 ist eng mit Wachstum, Entwicklung und Zelldifferenzierung verknüpft.

CXCR4 interagiert nur mit einem einzigen Liganden, SDF-1 (CXCL12 nach der systematischen Nomenklatur) (64-67).

In der menschlichen Physiologie sind neben beschriebenen Einflüssen auf die Homöostase des intestinalen Epithels und der Angiogenese weitere Zusammenhänge beschrieben, die Rückschlüsse auf die Rolle von CXCR4 in malignen Tumoren erlauben.

CXCL12 wird beim Erwachsenen u.a. von den Stromazellen des Knochenmarks gebildet. Es interagiert mit den hämatopoetischen Stammzellen, die CXCR4 exprimieren (68, 69). Die Chemotaxis findet bei den hämatopoetischen Stammzellen ausschließlich über die CXCR4 - CXCL12 Achse statt, was als Mechanismus für deren selektive Einwanderung in das Knochenmark, sowie deren Retention im Knochenmark angesehen wird (70-73). Ebenso wird die Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark, sowie das zielgerichtete Einwandern der Plasmazellen ins Knochenmark, mit deren Expression von CXCR4 und der Interaktion mit CXCL12 assoziiert (74, 75).

Über einen analogen Mechanismus findet auch die Einwanderung und Ansiedelung der aus dem Tumorverbund dissoziierten malignen Zellen in das Knochenmark im Rahmen der Metastasierung statt (49).

Weitere Gewebe, in denen CXCL12 in hoher Konzentration vorkommt sind Lunge, Leber, Lymphknoten, Peritoneum und Gehirn, also typische „Metastasenorgane“. Die dortige Ansiedelung von Tumorzellen verschiedenen Ursprungs wird ebenfalls durch die Expression von CXCR4 auf den Tumorzellen vermittelt, sodass diese in der Lage sind, auf das dort vorkommende SDF-1 zu reagieren.

CXCR4 muss somit als eines der Schlüsselproteine der Metastasierung angesehen werden (49).

Auch die Expression von CCR7 wurde auf zahlreichen Tumoren nachgewiesen. Entsprechend der physiologischen Bedeutung des Rezeptors bei der Wanderung von Zellen lymphatischen Ursprungs, ist die Synthese von CCR7 zunächst auf zahlreichen Malignomen lymphatischen Ursprungs nachgewiesen worden. CCR7 ist jedoch ebenfalls nachweisbar auf zahlreichen epithelialen Tumoren, wie zum Beispiel Karzinomen von Mamma (76), Endometrium (77), Zervix (78),

Magen (26, 27), Leber und Pankreas (79, 80), Oesophagus (81), Colon (82), Prostata (83) oder dem malignen Melanom (84).

Die Expression von CCR7 ist hierbei eng mit der lymphatischen Metastasierung assoziiert. Über einen Mechanismus, der analog zu dem für dendritische Zellen beschriebenen abläuft, kann die Einwanderung und Ansiedelung der Tumorzellen in den Lymphknoten über die Interaktion von CCL21 mit CCR7 stattfinden (85). Auch der Einbruch der Tumorzellen in die Lymphbahnen findet via CCR7 statt (49).

Klinisch ist die Expression von CCR7 von Tumorzellen häufig mit schlechter Prognose verknüpft.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Interaktion zwischen Chemokinen und Chemokinrezeptoren in der Physiologie und Pathophysiologie des gesamten Organismus eine umfassende Bedeutung zukommt. Neben der Chemotaxis von Leukozyten wird auch die Architektur der Lymphknoten und der entzündlichen Infiltrate über Chemokine vermittelt. Auf Epithelzellen exprimierte Chemokinrezeptoren verschiedener Epithelien, scheinen für die Homöostase des Epithels eine entscheidende Rolle zu spielen. Auf malignen Tumoren exprimierte Chemokinrezeptoren scheinen in den Vorgang der Metastasierung einzugreifen, wobei hier die beiden Rezeptoren CXCR4 und CCR7 die Hauptrolle spielen.

1.3. Pathogenese *Helicobacter pylori* assoziierter Erkrankungen unter Berücksichtigung des Chemokin - Chemokinrezeptorsystems

Die Infektion mit *H. pylori* ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten weltweit. *H. pylori* wird je nach geographischer Region bei 15% (weiße Australier) bis 95% (Algerier) der untersuchten Testpersonen gefunden. In Europa beträgt die

Durchseuchung durchschnittlich etwa 35%, mit zunehmendem Lebensalter steigt der Grad der Durchseuchung (86-88).

Auf dem Boden der *H. pylori* Infektion entstehen die chronisch aktive Gastritis, die gastroduodenale Ulcuskrankheit, aber auch MALT Lymphome und Magenkarzinome (5, 15-17, 89-95).

Die Grundvoraussetzung für die Entstehung beider Krankheitsentitäten ist die Infektion mit *H.pylori*, das heißt die Etablierung der Gewebekolonisation durch den Keim und die Auslösung einer entsprechenden ineffektiven Immunreaktion, die nicht zur Eradikation des Keims führt.

1.3.1. Die *Helicobacter pylori* Gastritis

1.3.1.1. Pathogenese der *Helicobacter pylori* Gastritis

H. pylori kolonisiert die Schleimschicht, die dem Oberflächenepithel des Magens aufliegt. Der Keim sichert sich trotz der induzierten Immunreaktion, das Überleben in seiner ökologischen Nische, durch zahlreiche Virulenzfaktoren, zum Beispiel der Bildung von Urease, einem hohen Grad von Mobilität durch die Begeißelung, oder der Adhärenz der Bakterien an Epithelzellen (96, 97).

Die induzierte inflammatorische Reaktion des Wirtes wird als chronisch aktive Gastritis bezeichnet. Diese ist histomorphologisch charakterisiert durch Infiltration der Schleimhaut mit neutrophilen Granulozyten. Daneben kommt es zur Akkumulation von B- und T- Lymphozyten, sowie Makrophagen in lymphfollikel-ähnlichen Konglomeraten in der Lamina propria an der Basis der Schleimhaut in Form eines reaktiv ausgebildeten mucosaassoziierten lymphatischen Gewebes (MALT; **m**ucosa **a**ssociated **l**ymphatic **t**issue) (8-10). Die induzierte Immunantwort ist ineffektiv, da es nicht zur natürlichen Eradikation kommt.

Die lokale Gewebeschädigung bei der *H. pylori* Gastritis wird über folgende zwei Wege verursacht.

Erstens kommt es zur direkten Schädigung des Epithels durch *H. pylori* über verschiedenen Zytotoxine, wie z.B. das *cagA*- oder *vacA*-Protein (98).

Zweitens kommt es zur Aktivierung der eingewanderten neutrophilen Granulozyten durch *H. pylori* und zur konsekutiven Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale (99).

Die Aktivität der Entzündung wird morphologisch assoziiert mit dem Ausmaß der Infiltration des Gewebes mit neutrophilen Granulozyten.

Die entscheidende Eigenschaft der Leukozyten, die ein Verlassen des Blutstroms und ein Einwandern in die Magenschleimhaut ermöglicht, ist ihr Vermögen, auf chemotaktische Signale reagieren zu können. Im infizierten Gewebe werden von Epithelzellen und Makrophagen der Lamina propria Chemokine synthetisiert; die Leukozyten tragen die entsprechenden Chemokinrezeptoren und vermögen daher auf dieses Signal in entsprechender Weise zu reagieren. Chemokinrezeptoren spielen somit eine zentrale Rolle in der Pathogenese der *H.pylori* Gastritis.

1.3.1.2. Chemokine und Chemokinrezeptoren in der *Helicobacter pylori* Gastritis

Bekanntes Signale die zur Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten führen sind die CXC Chemokine IL-8 und Gro- α . Beide Chemokine werden in der *H. pylori* Gastritis von den Epithelzellen synthetisiert. In mehreren Studien ist belegt, dass beide Zytokine an der Infiltration der Mucosa mit neutrophilen Granulozyten wesentlich beteiligt sind (11-14).

Sie steuern die Migration der neutrophilen Granulozyten von den kleinen Gefäßen der Magenschleimhaut in das Magenepithel über die von den Neutrophilen exprimierten korrespondierenden Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2

(100). CXCR1 bindet selektiv IL-8 mit hoher Affinität, wohingegen CXCR2 unspezifischer eine Reihe von Chemokinen aus der CXC Familie bindet, insbesondere jedoch auch IL-8 und Gro- α (101-103).

Die Konzentration von IL-8 und Gro- α als elementare Faktoren der Neutrophilenrekrutierung spielen eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der *H. pylori* Gastritis in der Modulation der Entzündungsaktivität. Die Konzentration beider Chemokine kann somit, ebenso wie die Menge der eingewanderten neutrophilen Granulozyten, als Korrelat der Entzündungsaktivität angesehen werden (14, 104-108).

1.3.1.3. Induktion von Chemokinfreisetzung in Epithelzellen durch *Helicobacter pylori*

Die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine erfolgt durch Epithelzellen und Makrophagen der Lamina propria nach deren Aktivierung, sowie durch die neutrophilen Granulozyten selbst.

Der pathophysiologisch maßgebliche erste Schritt der Zellaktivierung in der *H. pylori* Infektion ist die Adhäsion des Bakteriums über Adhäsine an die Magenepithelzelle. Diese führt im Weiteren zu einer Interaktion verschiedener Virulenzfaktoren mit der Epithelzelle, was zur Aktivierung der Zelle und in Folge dessen zur Zytokinfreisetzung führt. Bekannte Mechanismen der Epithelzellaktivierung durch *H. pylori* sind:

a) Die Bindung der Urease Untereinheit β mit CD 74

H. pylori bildet große Mengen von Urease. Ungefähr 5 – 10% der bakteriellen Gesamtproteinmasse besteht aus dem Enzym. Sie besteht aus 2 Untereinheiten α und β (109, 110).

Einerseits sichert das Enzym durch die katalytische Hydrolyse von Harnstoff in CO_2 und NH_3 das Überleben des Bakteriums in der lebensfeindlichen Umge-

bung des Magens durch Schaffung eines höheren pH Mikromilieus. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass auch in neutralem Milieu das Vorhandensein der Urease essentiell für die Persistenz des Bakteriums ist. Hier kommt der oberflächlich gelegenen Urease besondere Bedeutung zu. Die β Untereinheit agiert als Adhäsion über eine Interaktion mit CD74 und MHC II Komplexen. Beide Proteine werden von Magenepithelzellen exprimiert (111). Die Bindung an MHC II kann zur Induktion der Apoptose führen (112). Durch die Bindung an CD74, der MHC Klasse II-assoziierten invariante Kette kommt es seinerseits zur Aktivierung des „nuclear factor κ B“ (NF κ B) (113). Die Aktivierung von NF κ B führt im Weiteren zur Aktivierung des IL-8 Genes und damit zur Freisetzung von IL-8 (114).

b) NF κ B unabhängige Aktivierung über das **outer inflammatory protein A** (OipA)

Das OipA ist ein Protein der äußeren Membran *H. pylori*. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass *cag* negative (siehe unten) *H. pylori* Stämme, die OipA exprimieren in Kulturen von Magenepithelzellen 3 mal mehr IL-8 Produktion hervorrufen, als solche ohne OipA (115). Der Mechanismus der Zellaktivierung nimmt dabei einen NF κ B unabhängigen Weg, stattdessen kommt es über den JAK (Januskinase) – Stat (Signaltransduktor und Aktivator der Transkription) – Weg zur Phosphorylierung von Stat1 und infolgedessen dann zur Sekretion von IL-8. Das Protein der Zellmembran, welches mit OipA interagiert, ist bislang nicht bekannt.

c) *CagA* Transfer durch den Typ IV Sekretionsmechanismus der *cag* Pathogenitätsinsel

Bei der *cag* Pathogenitätsinsel handelt es sich um eine Gruppe von Genen, die über horizontalen Gentransfer zwischen *H. pylori* Subspecies übertragen werden können. Die Pathogenitätsinsel codiert für 27 verschiedene Proteine. Sie beinhaltet die Information für die Ausbildung eines Typ IV Sekretionsmechanismus. Über diesen wird ein als *cagA* bezeichnetes Protein, sowie ein Pepti-

doglycan in die Wirtszelle injiziert (116, 117). Das Gen für *cagA* wird als Marker der Pathogenitätsinsel angesehen. Das *cagA* Protein ist das bislang einzige bekannte Effektorprotein der *cag* Pathogenitätsinsel. *CagA* besitzt mehrere Tyrosinreste, die in der Wirtszelle von Kinasen der Src Familie phosphoryliert werden (118). Phosphoryliertes *cagA* induziert unter anderem die Tyrosinphosphataseaktivität eines als SHP-2 bezeichneten Proteins. Dieses bewirkt über den ras-raf-MAP-Kinase Weg die Aktivierung von NFκB, wodurch es konsekutiv zur Expression des IL-8 Gens kommt (119).

Das Vorhandensein der *cag* Pathogenitätsinsel wird mit vermehrtem Auftreten schwererer Gastritisformen, Ulzera und mit erhöhter Karzinogenität assoziiert. (14, 120-123). Zu erklären ist dies teilweise durch den oben beschriebenen Mechanismus der zur Freisetzung von IL-8 und folglich zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten führt.

Daneben kommt es durch die Übertragung von *cagA* zur Änderung der Zellmorphologie durch Einflussnahme auf Zytoskelett und Zell-Zell Kontakte, sowie zur Änderung der Mitoserate (124).

1.3.2. Das Magenkarzinom

Neben den entzündlichen Erkrankungen chronisch aktive Gastritis und Magen-, bzw. Duodenalulkus, entstehen sekundär auch neoplastische Erkrankungen auf dem Boden der *H. pylori* Gastritis. Sowohl MALT Lymphome des Magens (89, 95, 125), als auch das Adenokarzinome sind hier zu nennen (15-17). Es findet sich bei 64 – 94% der Patienten mit Magenkarzinom eine *H. pylori* Gastritis (15, 93, 126). Das Risiko, für Patienten mit *H. pylori* Gastritis an einem Magenkarzinom zu erkranken wird als drei- bis sechsfach erhöht beschrieben. Von der WHO wird *H. pylori* deshalb als definitives Karzinogen der Klasse 1 eingestuft (18).

Der Weg der Karzinogenese führt dabei vom nicht entzündeten Magen über die *H. pylori* Gastritis zur intestinalen Metaplasie, weiter zur Dysplasie und schließlich zum Adenokarzinom (19).

Zu erwähnen ist hier, dass *cag* positive *H.pylori* Stämme eine erhöhte Karzinogenität aufweisen. (14, 120-123)

1.4. Zentrale Fragestellung der Dissertation

In der chronisch aktiven Gastritis führen verschiedene Wege zur Sekretion von IL-8 und Gro- α , die wiederum neutrophile Granulozyten rekrutieren. Die Konzentration von IL-8 und Gro- α spielt dabei eine zentrale Rolle in der Modulation der Entzündungsaktivität (7, 24, 30, 37–39). Neutrophile Granulozyten sind durch die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 in der Lage durch Chemotaxis auf die Cytokinsignale zu reagieren.

Daneben besitzen Chemokine und Chemokinrezeptoren eine entscheidende Funktion in der Biologie des Magenepithels und des Magenkarzinoms.

In mehreren Studien wurde die Expression von CXCR4 und von CCR7 auf Magenkarzinomen nachgewiesen (20-25, 27-29).

Beide Rezeptoren werden mit Lymphknotenmetastasierung und schlechter Prognose, CXCR4 mit der Entwicklung einer Peritonealkarzinose assoziiert (22).

Die zentrale Fragestellung der nachfolgenden Arbeit lautet: Kommt es unter dem Einfluss von *H.pylori* neben der Modulation der Chemokinfreisetzung, auch zu einer Änderung der Expression von Chemokinrezeptoren?

Hierzu wurde zunächst mittels Immunhistochemie die Expression von CCR7, sowie CXCR1, -2 und -4 an Gewebeschnitten von normalem und entzündetem Magenepithel, sowie an Magenkarzinomen und intestinaler Metaplasie und Dysplasie getestet. Die Auswahl der Rezeptoren erfolgte anhand des beschriebenen Vorkommens von CXCR1 und CXCR2 auf neutrophilen Granulozyten, sowie von CCR7 und CXCR4 auf Magenkarzinomen. Nicht bekannt war bislang, ob auch die entzündete Magenschleimhaut, oder die präkanzerösen Läsionen intestinale Metaplasie und Dysplasie, CCR7 und CXCR4 exprimieren.

Danach wurden verschiedene Magenzelllinien auf ihre Chemokinrezeptorexpression mittels fluoreszenzaktivierter Durchflusszytometrie untersucht.

Ausgehend davon folgten Koinkubationsexperimente von neutrophilen Granulozyten, sowie Magenepithelzelllinien mit *H.pylori*. Von besonderem Interesse war die Frage, ob die *cag* – Pathogenitätsinsel von *H.pylori*, die Rezeptorexpression beeinflusst.

Die Rezeptorexpression wurde auf Proteinebene sowohl durch fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie, als auch mit konfokaler Mikroskopie nach vorheriger Färbung mittels monoklonalen Antikörpern untersucht. Zur Messung des Expressionsniveaus auf RNA Ebene, diente eine semiquantitative reverse Transcriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

15 ml Röhrchen steril	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
50 ml Röhrchen steril	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Auswertungseinheit mit Software (Cellquest PRO)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Einmalpipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Elektrophoreseapparatur	Mod. A2, Owl Separation Systems (Portsmouth, Niederlande)
FACScan® (Argonlaser 488nm)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Heizblock	Type 50126101, Liebisch (Bielefeld)
Insulinspritzen	U-40 Microfine, Becton Dickinson (Heidelberg)
Kanülen	Neoject® 21 und 26 G Dispomed (Gelnhausen)
Mikroskop	Type 4317521, Carl Zeiss (Jena)
konfokales Mikroskop TCS SP2	Leica, (Heidelberg)
Neuberger Zählkammer, Tiefe 100 µm, 0,0025 mm ²	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Pasteur Pipetten Glas	Hartenstein (Würzburg)
PCR Maschine:	Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer (Waltham, Mass.)
pH – Meter	pH 537, WTW (Weilheim)
Pipette 0,1 – 10 µl	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Pipette 10 – 100 µl	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Pipette 100 – 1000 µl	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Pipettus	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Spannungsquelle	Consort E835, Owl Separation Systems (Portsmouth, Niederlande)
Tuberkulinspritzen 1 ml	Dispomed (Gelnhausen)
Zellkulturflaschen	Cell Star 200 ml Greiner Bio-One, (Frickenhausen)
Zentrifugen:	Hettich Mikro 12-24

2.1.2. Chemikalien

Accutase™	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Agarose	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
Borsäure	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
Chloroform	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
Columbia Agar base II	Oxoid (Wesel)
DAPI Kernfärbung	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
Dextran T500	Carl Roth (Karlsruhe)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
DMSO steril	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
EDTA	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
Eichlösung für pH – Meter	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
embryonales Kälberserum (FCS)	Linaris (Bettingen am Main)
Ethanol 96% vergällt	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
Ethylendiamintetracetat	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
Ficoll	Linaris (Bettingen am Main)
Gel Elution Kit Qiaex	Qiagen (Hilden)
Glutamin	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
Glycogen	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Größenstandard für DNA Gele: 123 bp Größenstandard	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp Größenstandard	MBI fermentas (St. Leon-Rot)
Isopropanol	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
Lymphoprep™	Axis Shield PoC AS (Oslo, Norwegen)
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
Natriumazid	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
Natriumchlorid	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
OptEIA IL-8 ELISA Set	BD Pharmingen (San Diego, USA)
Pamer Block universal blocking reagent	Bio Genex (San Ramon, USA)
Penicillin / Streptomycin 100 x Stammlösung mit 10.000 IE / ml Penicillin und 10 mg / ml Streptomycin	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Rinderserumalbumin (BSA)	Linaris (Bettingen am Main)
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Sephadex™ G – 50 fine grade	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Super Sensitive Multilink HRP detection system	Bio Genex (San Ramon, USA)
TNFα Immunoassay	R&D Systems (Wiesbaden)

TRIS – Base	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
TRIS HCl	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
TRIzol®	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)
Trypanblau	Sigma-Aldrigh (Taufkirchen)

2.1.3. Verwendete Lösungen

1 x PBS	8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 0,2 g/l K ₂ HPO ₄ ; 0,1 g / l MgCl ₂ x 6H ₂ O; Einstellen auf pH 7,4 mit NaOH / HCl
5 x TBE	270 g TRIS – Base; 100 ml 0,5M EDTA pH 8,0; 137,5 g Borsäure; H ₂ O ad 5 l
DEPC H ₂ O	1 ml DEPC (Diethylpyrocarbonat) auf 1 l H ₂ O über Nacht schütteln, autoklavieren
DNA – Auftragepuffer, Gelladepuffer	je eine Spatelspitze Bromphenolblau und Xylencyanol, 8 ml Glycerin, 2 ml 0,5 M EDTA
Einfriermedium	20% DMSO, 80% FCS
FACS Färbepuffer	FACS Puffer mit 0,5% BSA
FACS Puffer	1 x PBS mit 0,01% NaN ₃ , Lösung durch 0,1 µm Nitrocellulosemembran filtriert
low TE	10 mM TRIS/HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA
Trypanblau	5 g/l Trypanblau, 9 g/l NaCl in H ₂ O gelöst

2.1.4. Antikörper für die FACS Analyse

Antikörper	Isootyp	Herkunftstier	Verdünnung für FACS	Bezugsquelle
Anti – CCR1	IgG 2b	Maus	1:100	R&D Systems Clone 53504.111 MAB 145 (Minneapolis, USA)
Anti – CCR2	IgG 2b	Maus	1:100	R&D Systems Clone 48602.121 MAB 150 (Minneapolis, USA)
Anti – CCR5	IgG 2b	Maus	1:100	R&D Systems Clone 45523.111 MAB 181 (Minneapolis, USA)
Anti – CCR6	IgG 2b	Maus	1:100	R&D Systems Clone 53504.111 MAB 195 (Minneapolis, USA)
Anti – CCR7	polyklo-nal	Kaninchen	1:75	Charles River Lab. (Kißlegg)
Anti – CCR8	polyklo-nal	Kaninchen	1:500	Phi ProSci Inc. Cat. No. 2097 (Poway, USA)
Anti – CCR9	polyk-lonal	Kaninchen	1:100	Immunisierungs- Code 569/01 Charles River Lab. (Kißlegg)
Anti – CXCR1	IgG 2b	Maus	1:500	R&D Systems Clone 42705.111 (Minneapolis, USA)
Anti – CXCR2	IgG1	Maus	1:250	BD Pharmingen Clone 6C6 (Heidelberg)
Anti – CXCR3	IgG1	Maus	1:500	R&D Systems Clone 49801.111 MAB 160 (Minneapolis, USA)
Anti – CXCR4	IgG 2b	Maus	1:250	Sigma Prod. Nr. C 6598 (Taufkirchen)
Anti – CXCR5	IgG 2b	Maus	1:100	Biologo BL-MCA 1835 (Kronshagen)
IgG1	IgG1	Maus	1:1000	BD Pharmingen Clone 107.3 (Heidelberg)
IgG2b	IgG2b	Maus	1:300	Sigma Prod. Nr. M 5534 (Taufkirchen)
Anti – Maus IgG PE markiert		Ziege	1:2000	Jackson IR Code 715-175-151 (Suffolk, UK)
Anti – Kaninchen Fab FITC markiert		Schwein	1:20	Dako Code F0054 (Hamburg)

2.1.5. Enzyme

Taq – DNA Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
RNAse freie DNase I	MBI fermentas (St. Leon-Rot)
M – MuLV Reverse Transkriptase ohne intrinsische RNAse H Aktivität Superscript II	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.6. Oligonukleotide

Die Synthese der Oligonukleotide wurde bei der Firma biomers.net (Ulm) nach entsprechender Auswahl der Sequenzen in Auftrag gegeben. Die Auswahl der Sequenzen erfolgte unter zu Hilfenahme der online verfügbaren Software „Primer3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) durch Eingabe der cDNA Sequenz in die Suchmaske des Programms. Die entsprechend gefundenen möglichen Primerpaare wurden über die Funktion des Nukleotid Blast (http://www.swbic.org/origin/proc_man/Blast/tutorial_blastn.html) mit den Sequenzen des menschlichen Genoms verglichen, um mögliche Bindung an andere cDNA Sequenzen als die gesuchte, im Vorfeld auszuschließen. Zusätzlich wurden die PCR Produkte der jeweiligen Primerpaare sequenziert und die gefundenen Sequenzen über Nukleotid Blast, mit bekannten menschlichen cDNA Datenbanken verglichen.

Die Sequenzen der verwendeten Primerpaare sind die folgenden:

CCR1 Forward 5' CCT GCA GCC TTC ACT TTC CTC AC 3'
CCR1 Reverse 5' TAG GCG ATC ACC TCC GTC ACT TG 3'
Sequenzlänge: 329 Basenpaare

CCR2 Forward 5' CCA ACT CCT GCC TCC GCT CTA C 3'
CCR2 Reverse 5' CCG CCA AAA TAA CCG ATG TGA TAC 3'
Sequenzlänge: 255 Basenpaare

CCR5 Forward 5' TGC TAC TCG GGA ATC CTA AAA ACT 3'
CCR5 Reverse 5' TTC TGA ACT TCT CCC CGA CAA AG 3'
Sequenzlänge: 280 Basenpaare

CCR6 Forward 5' TGA ATC GTA ATG AAG TTG GGG TTT 3'
CCR6 Reverse 5' TTC CAT CAC AAA TTT CAG ACC CCT 3'
Sequenzlänge: 273 Basenpaare

CCR7 Forward 5' ACT CCA TCA TTT GTT TCG TGG GC 3'
CCR7 Reverse 5' GCT AGT ATC CAG ATG CCC ACA C 3'
Sequenzlänge: 364 Basenpaare

CCR8 Forward 5' CAC AGT CAC ATC TTG GAT GG 3'
CCR8 Reverse 5' TGT AGT CTA CGC TGG AGG AAC G 3'
Sequenzlänge: 271 Basenpaare

CCR9 Forward 5' GGC AAA GTC TTC CTC CCA GTC T 3'
CCR9 Reverse 5' CTC ACC AAG ACA CAA CCA ATA CG 3'
Sequenzlänge: 584 Basenpaare

CXCR1 Forward 5' AGG GGC CAC ACC AAC CTT CTG 3'
CXCR1 Reverse 5' AGT GCC TGC CTC AAT GTC TCC A 3'
Sequenzlänge: 365 Basenpaare

CXCR2 Forward 5' CAG TTA CAG CTC TAC CCT GCC C 3'
CXCR2 Reverse 5' CCA GGA GCA AGG ACA GAC CCC 3'
Sequenzlänge: 451 Basenpaare

CXCR3 Forward 5' GCT CCA CCT AGC TGT AGC AGA C 3'
CXCR3 Reverse 5' GCC GAC AGG AAG ATG AAG TCT GG 3'
Sequenzlänge: 300 Basenpaare

CXCR4 Forward 5' CGC TTC TAC CCC AAT GAC TTG TG 3'
CXCR4 Reverse 5' CCA ATG TAG TAA GGC AGC CAA CAG 3'
Sequenzlänge: 212 Basenpaare

CXCR5 Forward 5' GCA TCT TCT TCC TCT GCT GGT 3'
CXCR5 Reverse 5' GTT CCT CTA GCT ACC CAA AAT GA 3'
Sequenzlänge: 467 Basenpaare

GAP-DH Forward 5' AAG GTC GGA GTC AAC GGA TTT 3'
GAP-DH Reverse 5' AGA TGA TGA CCC TTT TGG CTC 3'
Sequenzlänge: 425 Basenpaare

Nach Erhalt der Primer in lyophilisiertem Zustand, wurden die Pellets entsprechend der angegebenen Stoffmenge in Wasser aufgelöst, sodass eine Stocklösung von 200 pmol/µl entsteht. Für die Verwendung in der PCR wurde die Primerstocklösung 1:10 verdünnt.

Für die jeweiligen Primerpaare wurden Test PCRs mit sicher positiver cDNA bei verschiedenen Annealing Temperaturen im Schmelzbereich der Primer und MgCl₂ Konzentrationen im PCR Ansatz durchgeführt. Diejenige Kombination mit der kräftigsten und gleichzeitig schärfsten Bande wurde für die PCR ausgewählt.

Die ermittelten optimalen Bedingungen der jeweiligen PCR sind die folgenden:

cDNA	Annealing Temperatur	MgCl ₂ Konzentration im PCR Ansatz
CXCR1	65°C	2,5 mM
CXCR2	65°C	2,5 mM
CXCR3	65°C	2,5 mM
CXCR4	65°C	2,5 mM
CXCR5	65°C	2,5 mM
CCR1	65°C	2,5 mM
CCR2	65°C	2,5 mM
CCR5	63°C	3,5 mM
CCR6	63°C	3,5 mM
CCR7	63°C	2,5 mM
CCR8	63°C	2,5 mM
CCR9	63°C	1,25 mM

2.1.7. Verwendete Zellen

2.1.7.1. Neutrophile Granulozyten des peripheren Blutes

Die Zellen wurden entsprechend der unten stehenden Protokolle isoliert. Die jeweiligen Zellen wurden zur Titration der optimalen Antikörperkonzentration in der FACS Analyse benutzt. Die cDNA der isolierten Primärzellen diente als Positivkontrolle in der RT-PCR. Neutrophile Granulozyten wurden darüber hinaus für die Koinkubationsexperimente mit *H. pylori* benutzt.

2.1.7.2. Zelllinien von Magenkarzinomen

Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um adhärente Zelllinien, die aus Karzinomen des Magens etabliert wurden. Die verwendeten Zelllinien sind namentlich KATO III, HM02, 23132, 4433, 3051, 2957, 2474. KATO III stammt von einem Siegelringzellkarzinom ab, die übrigen von Adenkarzinomen. HM02 wurde von Prof. Dr. med. S. Suerbaum, med. Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt, KATO III wurde käuflich erworben, die anderen Zelllinien wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. H.P. Vollmers des pathologischen Instituts der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt, bzw. etabliert (23132).

2.1.8. Proben von Magengewebe

Gewebeproben aus Magenantrum und Corpus wurden von chirurgischen Operationspräparaten gewonnen, formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Fünf Präparate zeigten keine H.pylori Gastritis (1 Patient mit Oesophaguskarzinom, 4 Patienten mit Pankreaskarzinom). Hier ließ sich H.pylori durch modifizierte Giemsa Färbung nicht nachweisen und das Gewebe zeigte keine entzündliche Infiltration.

17 Patienten zeigten eine H.pylori Gastritis, davon waren in 10 Fällen intestinale Metaplasie und in 3 Fällen niedriggradige Dysplasie nachzuweisen. Die chronisch aktive Gastritis zeigte ein moderat bis starkes chronisch entzündliches Infiltrat aus B- und T-Lymphozyten, Plasmazellen und Monozyten. Die Aktivität, gemessen an der Infiltration der Lamina Propria, des Epithels und den Drüsenlumina mit neutrophilen Granulozyten war moderat bis stark. In allen Gewebeproben wurde H.pylori sicher durch modifizierte Giemsa Färbung identifiziert. Zusätzlich wurden 24 Magenkarzinome untersucht. Diese wurden histopathologisch entsprechend der Lauren Klassifikation als intestinaler oder diffuser Typ eingeteilt.

Die Untersuchung an menschlichem Gewebe aus Operationspräparaten erfolgte mit Erlaubnis der örtlichen Ethikkommission.

2.2. Methoden

2.2.1. Immunhistochemie von Chemokinrezeptoren auf Magengewebe

Für die Immunhistochemische Analyse, wurden monoklonale Maus-anti-Mensch Antikörper mit spezifischem Bindungsverhalten gegen CXCR1, CXCR2, CXCR4 und CCR7 verwendet. Für die Anfärbung der Chemokinrezeptoren wurden Formalin fixierte Gewebeschnitte entparaffiniert und in 0,01 M Citrat Puffer für 3 x 5 Minuten im Mikrowellenherd inkubiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch die Zugabe von Kasein Lösung (Power Block universal blocking reagent, Bio Genex, San Ramon, Kalifornien) und Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur blockiert.

Die Schnitte wurden mit dem Primärantikörper in der zuvor experimentell ermittelten optimalen Verdünnung (CXCR1 und CXCR2 (R&D Systems) 1:200, CCR7 (BD Pharmingen) 1:200, CXCR4 (Sigma) 1:100) über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Sekundärfärbung wurde ein Biotin-Streptavidin-Peroxidase System, entsprechend dem Herstellerprotokoll mit 3,3'-Diaminobenzidin – Tetrahydrochlorid als Reaktionssubstrat verwendet (Super Sensitive Multilink HRP detection System; Bio Genex, San Ramon, USA) (127). Um unspezifisch Färbung auszuschließen, wurde eine Kontrollfärbung mit einer Isotypkontrolle anstatt dem Primärantikörper durchgeführt.

2.2.2. Methoden in der Zellkultur

2.2.2.1. Kultivieren von Tumorzelllinien

Die oben beschriebenen, durchweg adhärenenten Tumorzelllinien wurden nach dem Auftauen in eine Kulturflasche mit RPMI 1640, welches mit 10% FCS, 5% Glutamin und 1% 100 x Stammlösung Penicillin / Streptomycin versetzt war überführt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Sobald die Kulturflasche zu ca. 70% konfluent mit den Zellen bewachsen war, wurden diese passagiert.

Hierzu wurde das Medium mit einer Pasteur Pipette abgesaugt und die Zellen anschließend mit 5 ml Accutase® überschichtet. Es folgte eine Inkubationsphase von ca. 10 Minuten bei 37°C. Nach erfolgtem Ablösen der Zellen unter mikroskopischer Kontrolle, wurde die Zellsuspension zusammen mit 10 ml RPMI 1640 nach vorherigem Überführen in sterile 50 ml Zellkulturröhrchen, 5 Minuten bei 480 g zentrifugiert. Das dem Zellpellet überstehende Medium wurde verworfen. Nach Waschen mit 10 ml RPMI 1640 und Abzentrifugieren, wurden die Zellen in Medium aufgenommen und ein Zehntel der Suspension in eine neue Kulturflasche mit 30 ml Medium überführt.

2.2.2.2. Kryokonservierung von Tumorzelllinien

Die einzufrierenden Zellen wurden in RPMI 1640 + 5% FCS + Glutamin + Pen/Strep aufgenommen und auf Eis vorgekühlt. Die gekühlte Zellsuspension mit ca. 10⁶ Zellen wurde 1:1 mit Einfriermedium vermischt und in 2 ml Kryoröhrchen verteilt und sofort bei -80°C eingefroren. Nach ca. 2 – 3 Wochen wurden die eingefrorenen Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.3. Isolation von Primärzellen

2.2.3.1. Isolation von neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden von drei gesunden Freiwilligen unter Zuhilfenahme eines Sedimentationsgradienten, der Natriumdiatrizoat und Dextran 500 enthält, isoliert.

In ein 50 ml Zellkulturröhrchen wurde 25 ml 0,9% NaCl Lösung, welche 3% Dextran enthielt überführt. In das Röhrchen wurde nachfolgend 25 ml Blut überführt. Nach 20-30 Minuten Inkubation kam es zur Phasentrennung. Im Überstand fanden sich die Leukozyten, die Erythrozyten sedimentierten. Der Überstand wurde in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt und für 15 Minuten bei 480 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in RPMI 1640 resuspendiert und abermals zentrifugiert. Das Pellet, welches die gewaschenen Leukozyten enthielt wurde mit Lymphoprep™ weiter aufgearbeitet. Es wurde hierzu das Protokoll des Herstellers befolgt.

Nach Resuspension des gewaschenen Pellet in 20 ml RPMI 1640 wurde dieses vorsichtig in 50 ml Röhrchen überführt, in die 20 ml Lymphoprep™ vorgelegt wurden. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 550 g, ohne Bremsung der Zentrifuge, enthielt das Pellet die Granulozytenfraktion, sowie einige Erythrozyten. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet nochmals mit 20 ml RPMI gewaschen und abzentrifugiert, um die Reste des Lymphoprep™ zu entfernen. Das vom Medium befreite Zellpellet wurde anschließend in 20 ml 0,2% eiskaltem NaCl suspendiert und sofort im Anschluss mit weiteren 20 ml eiskaltem 1,6% NaCl suspendiert. Hierdurch kam es zur Lyse der Erythrozyten in hypoosmolarer Lösung.

Nach 8 Minuten Zentrifugation bei 480 g wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in RPMI resuspendiert.

Die Überlebensrate der Zellen wurde durch Trypanblaufärbung kontrolliert und die Suspension für die weiteren Experimente verwendet.

2.2.4. Kultivierung von *Helicobacter pylori*

Die beiden verwendeten *H. pylori* Stämme NQ351 und NQ1712 wurden sequentiell von einem bolivischen Patienten isoliert (128).

Bei NQ1712 handelt es sich um eine Deletionsmutante der *cag* Pathogenitätsinsel (Suerbaum et al., med. Hochschule Hannover, unveröffentlichte Daten).

Die *H. pylori* Kulturen wurden vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universitätsklinik Würzburg als Suspensionen in RPMI 1640 mit Zusatz von 10% FCS freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Kultur erfolgte dort auf Blutagarplatten (Columbia Agar base II, Oxoid, Wesel, Deutschland). Dem Nährmedium wurde 10% Pferdeblut, 10 mg/l Vancomycin, 2.500 U/l PolymyxinB, 5 mg/l Trimethoprim und 4 mg/l Amphotericin B zugesetzt. Die *H. pylori* Stämme wurden für 24 Stunden unter mikroaeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden daraufhin geerntet, mit RPMI 1640 gewaschen und abzentrifugiert und in RPMI 1640 mit Zusatz von 10% FCS suspendiert. Die Bakterienkonzentration wurde photometrisch bestimmt. Für die Koinkubation mit neutrophilen Granulozyten oder Magenkarzinomzelllinien wurde den Kulturen eine entsprechende Menge der Suspension zugesetzt, sodass sich etwa 50 Bakterien pro Zelle im Medium befanden (bacteria at a multiplicity of infection, MOI).

2.2.5. Koinkubation von Epithelzelllinien mit *Helicobacter pylori*

Die wie oben stehend in Kultur gehaltenen Zelllinien wurden, nach dem zu ca. 70% konfluentes Wachstum in der Kulturflasche vorhanden war, mit Accutase™ abgelöst, in Medium gewaschen und in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen in neuen Kulturflaschen mit 30ml RPMI + 10% FCS, ohne Zusatz von Antibiotika ausgesät. Am Folgetag erfolgte, bei inzwischen wieder erreichter Adhärenz der Zellen Mediumwechsel und Zusatz von *H. pylori* in Konzentration von 50

MOI. Für jeden zur Messung vorgesehenen Zeitpunkt wurden drei Flaschen in Kultur genommen. Eine als Kontrollgruppe, bei der dem Medium beim Wechsel kein *H. pylori* zugesetzt wurde, eine mit Zusatz von NQ351, sowie eine mit Zusatz von NQ1712. Zum jeweiligen Messzeitpunkt wurden die Zellen abgelöst, gewaschen, in Medium resuspendiert, mit Trypanblaufärbung auf Vitalität geprüft und anschließend für die Antikörperfärbung und nachfolgende FACS Analyse, bzw. für die RNA Isolation verwendet.

Als Messzeitpunkte wurden 0 (Kontrollgruppe vor Stimulation mit *H. pylori*), 24 und 48 Stunden gewählt.

Gemessen wurde jeweils die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR1-5, CCR1, CCR2, sowie CCR5-9 auf Proteinebene mittels FACS, auf mRNA Ebene mittels RT – PCR.

2.2.6. Koinkubation von neutrophilen Granulozyten mit *Helicobacter pylori*

Von den entsprechend des oben stehenden Protokolls isolierten neutrophilen Granulozyten wurden ca. 1 bis 3×10^7 Zellen mit 30 ml RPMI 1640 + 10% FCS in eine Zellkulturflasche überführt. Je Versuchsansatz wurden auch hier für jeden Messzeitpunkt drei Flaschen ausgesät, die Kontrollgruppe ohne *H. pylori* Zusatz, und je eine Flasche für die Koinkubation mit dem *cag* positiven, bzw. *cag* negativen *H. pylori* Stamm. Als Messzeitpunkte wurden 0 (Kontrollgruppe vor Stimulation mit *H. pylori*), 0,5 und 3 Stunden gewählt. Die zugesetzte *H. pylori* Menge wurde hierbei mit 25 MOI gewählt.

Zum Messzeitpunkt wurden die neutrophilen Granulozyten vom Medium für 5 Minuten bei 480 g abzentrifugiert, in RPMI 1640 gewaschen, neuerlich zentrifugiert und in Medium resuspendiert. Die so gewonnenen Zellen wurden entsprechend der Protokolle mit Trypanblaufärbung auf Vitalität geprüft und anschließend für die Antikörperfärbung und nachfolgende FACS Analyse, bzw. für die RNA Isolation verwendet.

Gemessen wurde jeweils die Expression von CXCR1- und CXCR2- Protein mittels FACS, sowie die Expression von CXCR1 und CXCR2 mRNA mittels semi-quantitativer RT-PCR.

2.2.7. Durchflusszytometrie mit FACS Analyse

Ausgangsprodukt für die Antikörperfärbung und nachfolgende FACS Analyse sind durch zweimaliges Waschen in PBS + 0,5% BSA vom Medium befreite Zellkulturzellen oder Primärzellen. Ein Aliquot von 10 µl der Zellsuspension wurde mit 90 µl Trypanblaulösung in einem 2 ml Reaktionsgefäß versetzt und durch vortexen gemischt. Die gefärbte Zellsuspension wurde anschließend in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt und auf Vitalität geprüft.

Von der ungefärbten Zellsuspension wurde anschließend die errechnete Menge für 3×10^5 Zellen in ein FACS Röhrchen überführt.

Nach der Zentrifugation bei 480 g für 5 Minuten und Entfernung des Überstandes, wurden 100 µl des entsprechend verdünnten Primärantikörpers zum Zellpellet pipettiert und durch vortexen darin suspendiert. Anschließend erfolgte 30 Minuten Inkubation bei 4°C.

Durch Zugabe von 2 ml Waschpuffer und nachfolgender Zentrifugation bei 480 g für 5 Minuten wurden die Zellen neuerlich pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und 100 µl des entsprechend verdünnten, farbstoffkonjugierten Sekundärantikörpers zum Pellet pipettiert. Nach Vortexen erfolgte 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit. Es erfolgte nochmaliges Waschen der Zellen in 2 ml Waschpuffer und nach der Pelletierung bei 480 g für 5 Minuten und Verwerfen des Überstands die Resuspendierung in 300 µl FACS Ladepuffer.

In entsprechender Weise wurde für jeden der zur Färbung verwendeten Antikörper-Untergruppen ein Zellpellet mit einem entsprechenden standardisierten Antikörperisotyp als Negativkontrolle und zur Herausfilterung unspezifischer Antikörperbindung inkubiert.

Die so gefärbten Zellen wurden anschließend mittels Durchflusszytometer eingelesen. Es erfolgte beim Einlesen die Auswahl der registrierten Zellen mittels Gate nach Zellgröße und Granularität, so dass nach Möglichkeit nur die Daten lebender Zellen gewonnen werden.

Die Daten von $1,5 \times 10^4$ Zellen wurden gespeichert und nachfolgend durch Überlagerung der Fluoreszenzintensitätskurven der gefärbten Zellen und der Isotypkontrolle mit der entsprechenden Software (Win MDI, Cellquest Pro) ausgewertet.

Die für die Färbung benutzten Antikörperverdünnungen wurden an Tonsillenzellen, bzw. PBLs unter Verwendung des gleichen Färbeprotokolls titriert, da von diesen Zellspezies die Expression von Chemokinrezeptoren bekannt ist.

2.2.8. Konfokale Mikroskopie

Zytospin Präparationen der mit *H.pylori* koinkubierten neutrophilen Granulozyten, wurden mit Aceton fixiert und mit monoklonalen Antikörpern Maus – anti CXCR1 und – CXCR2 mit passenden Verdünnungen gefärbt (R&D Systems). Nachfolgend erfolgte die Antikörperfärbung mit Cy3 konjugiertem Esel anti Maus Immunglobulin. Die Kerne wurden mit DAPI (Sigma, Hannover) gegen gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden unter dem konfokalen Mikroskop (TCS SP2, Leica, Heidelberg) betrachtet.

2.2.9. Messung von IL-8 und TNF α Protein in den Zellkulturüberständen mittels enzyme linked immunoassay (ELISA)

IL-8 und TNF wurden in den Zellkulturüberständen mittels enzyme linked immunoassay nachgewiesen. Die Zellkulturüberstände wurden durch Zentrifugation bei 10000 g für 1 Minute von Zelldetritus und Bakterienresten gereinigt. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -20°C bis zur Messung.

Die Zytokinkonzentration (IL-8 und TNF α) in den Zellkulturüberständen wurde unter Verwendung von käuflichen Kits unter Einhaltung des Herstellerprotokolls bestimmt (IL-8: OPTEIA IL-8 ELISA Set BD Pharmingen, San Diego Kalifornien; TNF α : R&D Systems, Wiesbaden).

Die Zellüberstände wurden in passenden Verdünnungen verwendet. Die Messung von IL-8 wurde dreifach durchgeführt, die von TNF α doppelt. Es wurden Mittelwerte und Standardabweichung bestimmt.

2.2.10. Molekularbiologische Methoden zur Durchführung der semiquantitativen reverse Transkriptase – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

2.2.10.1. Methoden zur Aufreinigung und Konzentrierung von Nucleinsäurelösungen

2.2.10.1.1. Präzipitation mit Alkohol

Die Präzipitation mit Alkohol erfordert die Anwesenheit monovalenter Kationen. Zu der Lösung wurde hinzu pipettiert:

1/10 des Volumens an 3 M NaCH₃COO (Natriumacetat)
für RNA pH 4,6; für DNA pH 5,2,

sowie das 3 fache des Volumens 96% Vol. Ethanol

Die nach 30 Minuten bei –20°C ausgefallene Nucleinsäure wurde durch 20 Minuten Zentrifugation bei 16000 g und 4°C als Pellet gesammelt. Die überstehende Flüssigkeit wurde durch Aspiration entfernt, das Pellet anschließend mit 70% Vol. Ethanol gewaschen, um verbleibende Salze zu entfernen, und schließlich im Heizblock bei 65°C für ca. 5 Minuten getrocknet. Das erneute Auflösen erfolgte entweder in ddH₂O oder low TE.

2.2.10.1.2. Gelfiltrationschromatographie

Zur Entfernung von niedermolekularen Verunreinigungen, wie z.B. dNTP oder Oligonucleotiden, aus einer DNA Lösung, wurde eine Gelfiltrationschromatographie mit Sephadex™ G50 durchgeführt.

Sephadex™ G50 wurde zu 25 g/l mit ddH₂O gemischt, über Nacht quellen lassen und anschließend autoklaviert. Zur Vorbereitung der Chromatographiesäu-

len wurde 200 µl der aufgeschüttelten Suspension in eine 2 – 20 µl Eppendorf Filterspitze gegeben. Diese befand sich in dem mit einem Loch versehenen Deckel eines 1,5 ml Schraubdeckelreaktionsgefäßes.

Die so beladenen Pipettenspitzen wurden zusammen mit den 1,5 ml Röhrchen für 1 Minute bei 720 g zentrifugiert, um die gebrauchsfertigen Reinigungssäulen zu erhalten. Diese wurden, nachdem sie mitsamt dem Schraubdeckel auf ein neues Röhrchen gesetzt wurden, mit der zu reinigenden DNA Lösung beladen. Nach 3 Minuten Zentrifugation bei 720 g befand sich die gereinigte DNA im E-luat in dem 1,5 ml Auffanggefäß.

2.2.10.1.3. Präparative Gelelektrophorese von PCR Produkten

Die Gelelektrophorese selbst wurde wie unten beschrieben mit einem 2% Agarose Gel in 0,5 x TBE durchgeführt. Das Gel wurde nach erfolgter Größenfragmentierung jedoch mit langwelligem UV Licht (Wellenlänge 320 nm) betrachtet. Die Bande wurde mit einem sterilen Skalpell möglichst eng aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Zur Abtrennung der Agarose wurde das Qiagen Kit QiaexII entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet.

2.2.10.2. Isolation von RNA

Ein Aliquot der gleichen Zellen, die in der FACS Analyse verwendet wurden (1×10^6 bei Epithelzellen; 5×10^6 bei neutrophilen Granulozyten), wurde zunächst in einem RNase freien 1,5 ml Röhrchen bei 13000 RPM für 20 Minuten pelletiert. Das überstehende Medium wurde ab pipettiert und verworfen. Das Zellpellet wurde in 800 μ l TRIzol® aufgenommen. Um eine komplette Lyse der Zellen und ein Auflösen der Zellbestandteile herbeizuführen, wurde das durch auf- und abpipettieren, in TRIzol® zerkleinerte Zellpellet, je zehn mal auf eine Tuberkulinspritze durch Kanülen vom Durchmesser 21 und 26 G und zuletzt drei Mal auf eine Insulinspritze (40 G) aufgezogen. Die Lösung wurde mit 0,5 μ l Glykogen versetzt und anschließend mit 160 μ l Chloroform überschichtet, 30 Sekunden gevortext, für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, und schließlich 15 Minuten bei 13000 RPM bei 4°C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation kommt es im Röhrchen zu einer Schichtung: Von oben nach unten, wässrige Phase mit gelöster RNA, Interphase, bestehend aus ausgefallener DNA und organische Phase mit gelösten Proteinen und Lipiden. Die wässrige Phase wurde zu ca. 2/3 vorsichtig in ein RNase freies 1,5 ml Reaktionsgefäß, in welchem 400 μ l Isopropanol vorlagen, überführt. Dabei wurde peinlich darauf geachtet, dass es zu keiner Kontamination mit Bestandteilen der Interphase kam. Nach dem Invertieren der Röhrchen hatte die RNA 10 Minuten Zeit um bei Raumtemperatur auszufallen. Zur Pelletierung der ausgefallenen RNA, wurden die Proben für 10 Minuten bei 4°C und 13000 RPM zentrifugiert. Die entstandenen RNA Pellets wurden nach Abkippen des Überstandes, mit 70% Ethanol gewaschen, um Reste von Bestandteilen des TRIzol®, wie z.B. monovalenten Kationen oder Phenol, zu entfernen. Nach einem erneuten Zentrifugieren für 5 Minuten bei 4°C und 13000 RPM, wurde der Überstand, soweit als möglich, abpipettiert, und die Pellets anschließend für 5 – 10 Minuten im Heizblock bei 65°C getrocknet. Das Auflösen der RNA erfolgte in 20 μ l DEPC H₂O, beschleunigt durch 5 Minuten Erwärmen auf 65°C.

Gelagert wurde die RNA entweder in wässriger Lösung oder noch als Pellet in 70% Ethanol bei -70°C.

2.2.10.3. Aufreinigung der isolierten RNA durch DNase-I Verdau

Da es nicht möglich war für die Chemokinrezeptoren Primerpaare zu finden, deren PCR Produkt die Splicing-Stelle zwischen zwei Exons überspannt, war es unbedingt notwendig, mögliche Kontaminationen der isolierten RNA mit genomischer DNA zu eliminieren. Dazu wurde ein Enzymverdau mit RNase freier DNase-I durchgeführt.

15 µl RNA wurden mit 2 µl 10 x Reaktionspuffer (500 mM TRIS-HCl pH 7,5; 100 mM MgCl₂; 10mM DTT), 2 µl DNase-I und 1 µl RNasin versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die DNase wurde durch Zugabe von EDTA 25 mM und Erhitzen auf 65°C für 10 Minuten inaktiviert.

2.2.10.4. Qualitätskontrolle der RNA

Die so erhaltene RNA wurde auf die Anwesenheit von Resten genomischer DNA geprüft, indem ein Aliquot von 1 µl als Template in einer PCR (siehe unten) mit einem für die Glycerinaldehyd (3) Phosphat Dehydrogenase spezifischen Primerpaar eingesetzt wurde. Unter den entsprechenden Bedingungen wurden 40 Zyklen gefahren. 10 µl des PCR Produktes wurden auf einem 2% Agarose Gel analysiert. Nur wenn keine Bande sichtbar war, wurde die RNA Probe für die reverse Transkription verwendet. Andernfalls wurde eine erneute TRIzol® Extraktion durchgeführt, bzw. die Probe verworfen.

2.2.10.5. Reverse Transkription der mRNA in cDNA

Die reverse Transkription erfolgte mit einer rekombinanten mMuLV Reversen Transkriptase mit fehlender RNase H Aktivität (Superscript II, Invitrogen).

Dazu wurden in ein nukleasefreies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt:

- 10 µl (ca. 5 µg) aufgereinigte DNA freie RNA,
- 1 µl Oligo dT (15 – 18) (0,5 µg),
- 1 µl Desoxyribonukleotid – Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP jeweils zu 10 mM bei neutralem pH Wert)

Das Reaktionsgefäß wurde 5 Minuten bei 65°C inkubiert, sofort danach für ca. 1 Minute auf Eis gekühlt, und der Inhalt durch Zentrifugation bei 13.000 RPM für 10 Sekunden gesammelt. Hinzugefügt wurde:

- 4 µl des mitgelieferten 5 x Reaktionspuffers
(250 mM TRIS – HCl ph 8,3 bei RT; 27,5 mM KCl; 15 mM MgCl₂)
- 2 µl 100 mM DTT
- 1 µl RNAsin

Nach Mischen der Proben durch Vortexen, Abzentrifugieren, und anschließendem Inkubieren bei 42°C für 2 Minuten, wurden die Proben im Heizblock mit 1 µl (200 units) Superscript II versetzt, durch auf- und abpipettieren gemischt und 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Die Polymerase wurde durch zehnmütiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert.

Die cDNA wurde sofort in einer PCR eingesetzt oder bei –20°C gelagert.

2.2.10.6. Standard Polymerasekettenreaktion mit cDNA als Template

Je Ansatz wurde in einem 0,1 ml Reaktionsgefäß zusammenpipettiert:

1 – 2 µl cDNA

2,5 µl 10 x PCR Puffer (200 mM TRIS-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl)

0,5 – 2,5 µl 50 mM MgCl₂

5 µl dNTP Mix (jedes dNTP zu 10 mM)

0,5 µl FORWARD Primer (10 pmol)

0,5 µl REVERSE Primer (10 pmol)

0,1 µl rekombinante Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)

ad 25 µl H₂O

Die Polymerasekettenreaktion wurde der PCR Maschine „Gene Amp PCR System 2400“ von Perkin Elmer, Weiterstadt durchgeführt. Die Reaktion begann mit 5 Minuten denaturieren bei 94°C, gefolgt von einer wiederholten Abfolge von 30 Sekunden Denaturierung bei 94°C, 30 Sekunden Hybridisierung von Primer und cDNA bei der ermittelten, für das Primerpaar spezifischen Annealing Temperatur, und 30 Sekunden DNA Synthese bei 72°C. Beendet wurde die PCR durch einen letzten, 5 Minuten dauernden Syntheseschritt, und anschließendem Abkühlen auf 4°C.

Die genauen Bedingungen der PCR mit den einzelnen Primerpaaren finden sich im Materialteil.

2.2.10.7. Analyse von PCR Produkten mittels Elektrophorese

Die Analyse der PCR Produkte erfolgte durch elektrophoretische Größenfraktionierung auf 2% Agarose Gel in 0,5 x TBE unter der Anwesenheit von 0,8 µg/ml Ethidiumbromid.

In die Auftragesaschen des Gels wurden 10 µl einer 1:6 Verdünnung aus Gelladepuffer und PCR Produkt eingebracht. Daneben wurde in jedem Gel eine Bahn mit 10 µl, des mit 4 Volumenteil low TE und 1 Volumenteil Gelladepuffer verdünnten, 100 bp Fragmentlängenstandards beladen.

Die Größenauftrennung erfolgte bei 130 Volt für ca. 1 Stunde. Das Gel wurde anschließend unter Durchleuchtung mit ultraviolettem Licht betrachtet und mit der Videoauswerteeinheit photographiert.

2.2.10.8. Qualitätssicherung und -kontrolle in der PCR

Zur Vermeidung von Kontaminationen durch probenfremde DNA, wurden alle stabilen, für die PCR benötigten Substanzen, ebenso wie alle verwendeten Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Pipetten vor Gebrauch ca. 15 Minuten mit UV Licht bestrahlt. Außerdem wurden alle Proben und Reagenzien, vor jedem Öffnen der Aufbewahrungsgefäße, durch Zentrifugation, am Boden der Röhrchen gesammelt.

Eine PCR Probe mit einem Äquivalent an Wasser, anstatt einer Template DNA, und eine andere mit einem Template, bei dem ein sicher positiver Produktnachweis gelang, sorgte bei jedem Ansatz für den Nachweis einwandfreier, unverschmutzter Reagenzien.

Des Weiteren wurden das PCR Produkt jedes Primerpaares einmal vollständig sequenziert, und das Ergebnis mit dem Standard Nukleotid Blast (http://www.swbic.org/origin/proc_man/Blast/tutorial_blastn.html) auf mögliche Homologien zu anderen Sequenzen des menschlichen Genoms hin analysiert.

Durch die oben aufgeführten Maßnahmen ist die Richtigkeit der Ergebnisse aufs möglichste gesichert.

2.2.10.9. Durchführung der Semiquantifizierung

Der semiquantitative Nachweis spezifischer cDNA Kopien, aus dem Pool der gesamten cDNA verschiedener Zellpopulationen einer Zellart, beruht auf dem visuellen Vergleich der Intensitäten der Elektrophoresebanden, der durch PCR amplifizierten DNA Fragmente.

Die Fluoreszenzintensitäten der Elektrophoresebanden erlauben Rückschlüsse auf die in der Lösung vorliegenden Konzentration der jeweiligen cDNA, da die Zyklenzahl so gewählt wurde, dass die Amplifikation noch im Proportionalbereich der Konzentrationszunahme, und nicht schon im Sättigungsbereich liegt. Zur Vergleichbarkeit der einzelnen Proben untereinander wurde zunächst eine PCR mit einem GAP-DH spezifischen Primerpaar angesetzt. Bei cDNA von Epithelzellkulturen wurden 25 Zyklen wiederholt, bei der von neutrophilen Granulozyten waren es 35 Zyklen.

Die Genexpression der GAP-DH liegt, als „housekeeping gene“, in allen Zellen gleicher Art, ungefähr auf gleichem Niveau. Bei gleicher Fluoreszenzintensität der Banden der GAP-DH ist folglich die Annahme gerechtfertigt, dass Konzentrationen der jeweiligen cDNA Kopien in den Proben untereinander vergleichbar sind.

Wenn die unter UV Licht erscheinenden Banden, im Gel, bei den zu vergleichenden Proben nicht die Gleiche Intensität hatten, wurde die in die GAP-DH PCR eingesetzte cDNA Menge so variiert, dass die im Gel sichtbaren Banden die gleiche Intensität hatten.

Die auf diesem Weg ermittelte cDNA Menge wurde dann ebenso bei der PCR für die Chemokinrezeptoren eingesetzt.

2.2.10.10. Sequenzierung von PCR – Produkten

Die Sequenzierung von PCR Produkten erfolgte mit der fluoreszenzgestützten Didesoxyribonukleotid - Kettenabbruchmethode mit einem käuflichen Kit. Das PCR Produkt wurde unter Zuhilfenahme einer präparativen Gelelektrophorese in möglichst reiner Form isoliert. Die Qualität der Reinigung wurde mit einer abermaligen Gelelektrophorese eines 2 µl Aliquots der gereinigten Probe in einem Mini Gel überprüft. Gleichzeitig war es möglich, die ungefähre DNA Konzentration der Probe abzuschätzen, indem als Vergleichsmaßstab die Intensitäten der Banden des Größenstandards mit bekannter Konzentration herangezogen wurde.

Ca. 30 – 50 ng der DNA Probe wurde mit 0,5 µl (10 pmol) eines Oligonukleotids des zur Generierung des DNA Fragments verwendeten Primerpaares versetzt, und mit Wasser auf 7 µl aufgefüllt. Hinzupipettiert wurden weiter 7 µl des Sequenzier Mastermixes aus dem verwendeten Kit.

Die Sequenzierung des Produktes eines neuen Primerpaares wurde jeweils mit beiden Oligonukleotiden als Primer in einer Sequencing-PCR durchgeführt. In einem Thermocycler wurden 35 Zyklen unter folgenden Bedingungen wiederholt:

15 Sekunden Denaturierung der DNA bei 96°C

15 Sekunden Annealing bei der Generierung des PCR Produktes verwendeten Annealing Temperatur; falls diese höher als 60°C war, wurden hier 60°C benutzt.

4 Minuten Synthese bei 60°C

Nach erfolgter Sequenzierreaktion, wurden die Proben durch Gelfiltrationschromatographie mit Sephadex G50 gereinigt und mit Hilfe von Ethanolpräzipitation pelletiert. Bis zur Gelanalyse wurden die Pellets bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

3. Ergebnisse

3.1. Chemokinrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten unter dem Einfluss von *H.pylori*

3.1.1. neutrophile Granulozyten verlieren die Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 in der chronisch aktiven Gastritis

In vivo ist durch immunhistochemische Darstellung von CXCR1 und CXCR2 auf Paraffinschnitten von Gastritiden eine Expression von CXCR2 nur sporadisch auf neutrophilen Granulozyten nachzuweisen. CXCR1 hingegen wird auf den neutrophilen Granulozyten der Lamina propria regelmäßig exprimiert, wohingegen in den Drüsenlumina gelegene neutrophilen Granulozyten keine CXCR1 Expression aufweisen (siehe Abb.1 S.44). CXCR1 ist also auf neutrophilen Granulozyten in Arealen, in denen ein direkter Kontakt zu *H.pylori* möglich ist, herunter reguliert. Im Nachfolgenden haben wir durch *in vitro* Experimente untersucht, ob *H.pylori* selbst zur Herunterregulation von CXCR1 und CXCR2 auf neutrophilen Granulozyten führt.

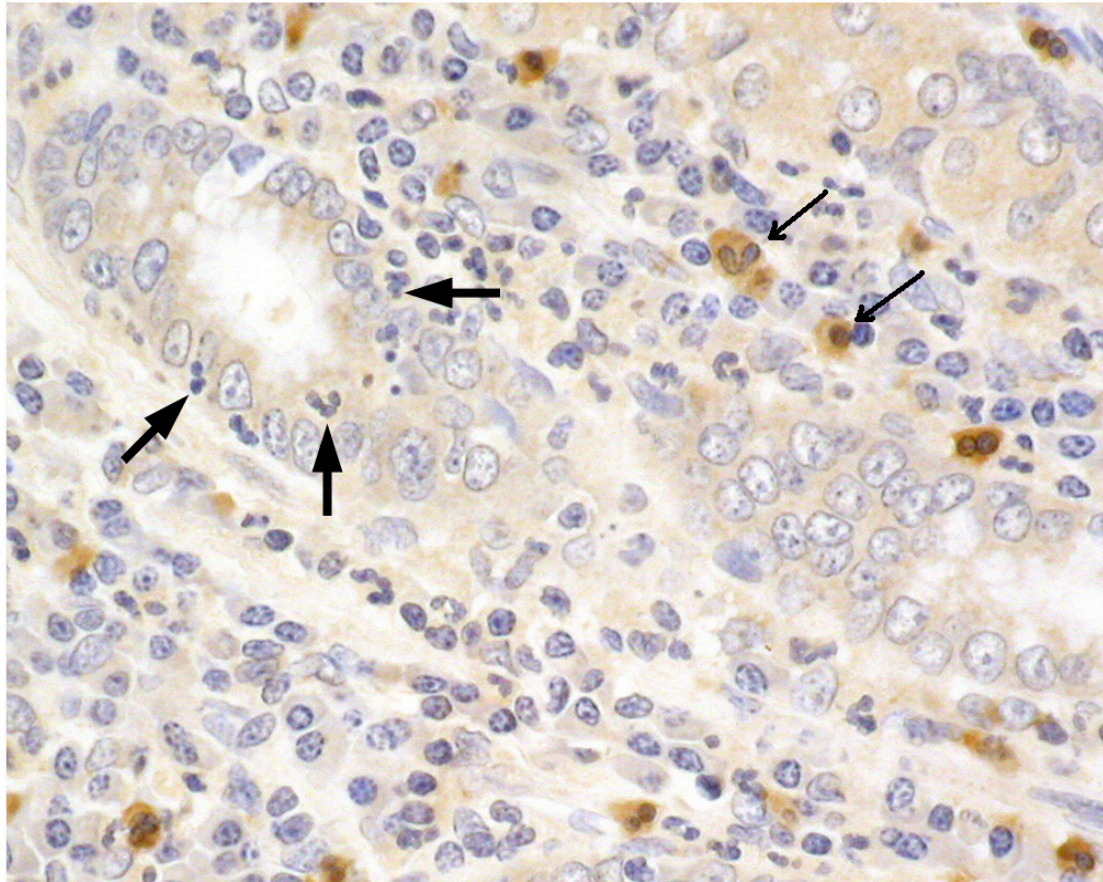


Abb. 1: Immunhistochemische Färbung von CXCR1 in der *H. pylori* Gastritis(129): Die zwei Pfeile rechts im Bild zeigen eingewanderte neutrophile Granulozyten abseits der Drüsenlumina mit kräftiger Färbung von CXCR1. Die drei Pfeile links zeigen den nahezu vollständigen Verlust von CXCR1 auf den neutrophilen Granulozyten in den Drüsenlumina.

3.1.2. Induktion einer schnellen Herunterregulation von CXCR1- und CXCR2- Protein auf neutrophilen Granulozyten durch *Helicobacter pylori* in vitro, unabhängig vom *cag* Status

Um den Einfluss von *H. pylori* auf die Expression von CXCR1 und CXCR2 auf neutrophilen Granulozyten zu untersuchen, wurden isolierte neutrophile Granulozyten des peripheren Blutes mit *H. pylori* koinkubiert. Es wurden zwei isogene *H. pylori* Stämme, NQ315 und NQ1712 die sich durch das Vorhandensein der *cag* Pathogenitätsinsel unterscheiden, verwendet. NQ315 ist *cag* positiv, NQ1712 ist *cag* negativ. Die Expression von CXCR1 und CXCR2 wurde durch FACS Analyse untersucht.

Bei allen Experimenten (n=3) war nach 0,5 h eine vollständige Herunterregulation von CXCR1- und CXCR2- Protein nachzuweisen. Die Herunterregulation war dabei unabhängig vom *cag* Status des verwendeten *H. pylori* Stammes. Nach 3 Stunden war kein Nachweis von CXCR1 und CXCR2 mehr möglich.

Abb. 2.1.: 0 Stunden, Kontrolle:

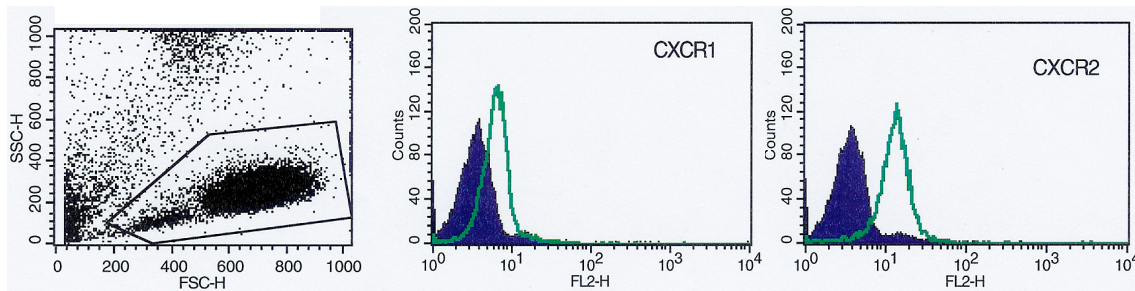
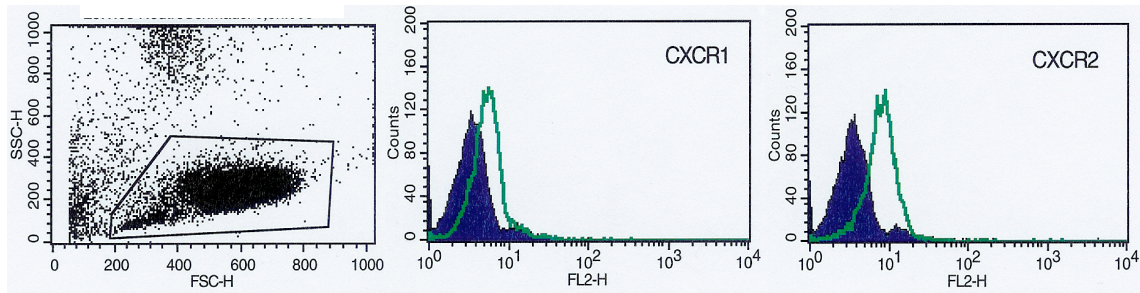
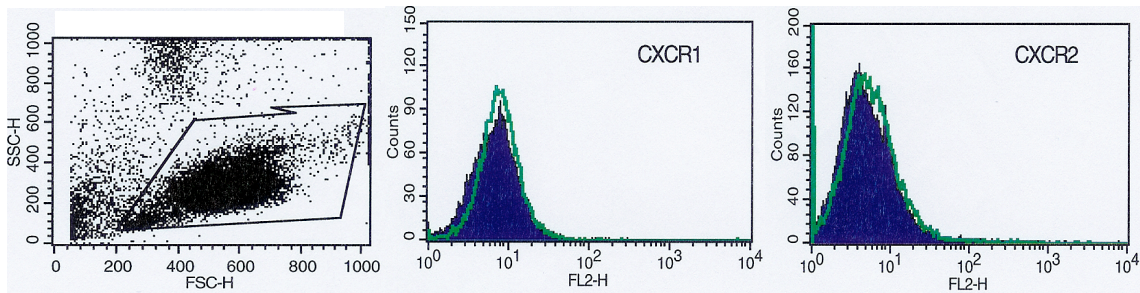


Abb. 2.2.: 0,5 Stunden, Kontrolle:



0,5 Stunden, *cag* positiver *H. pylori* Stamm:



0,5 Stunden, *cag* negativer *H. pylori* Stamm:

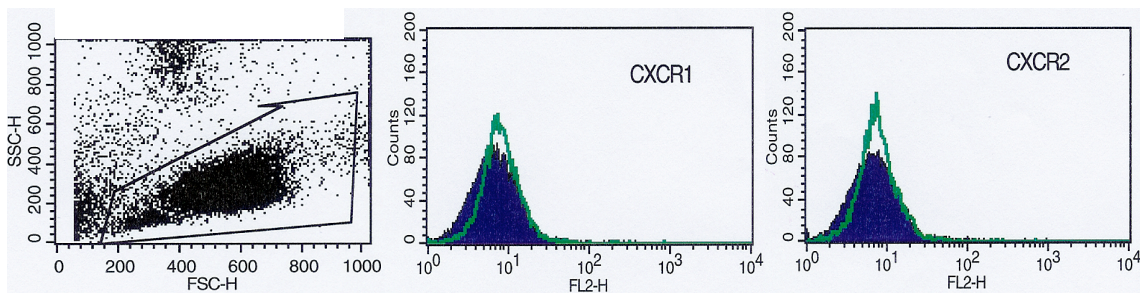
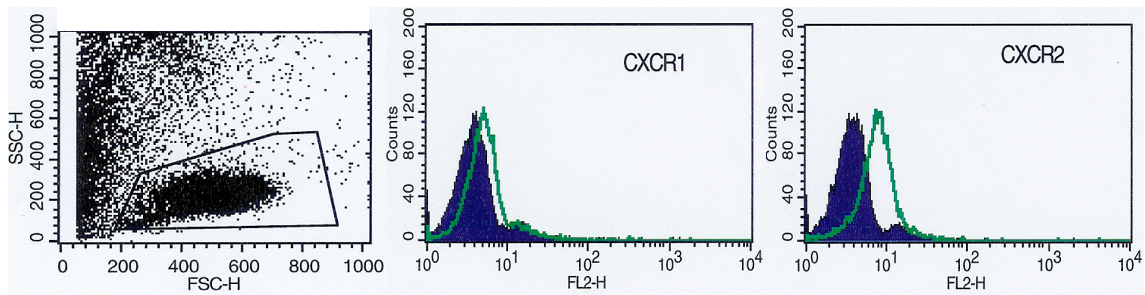
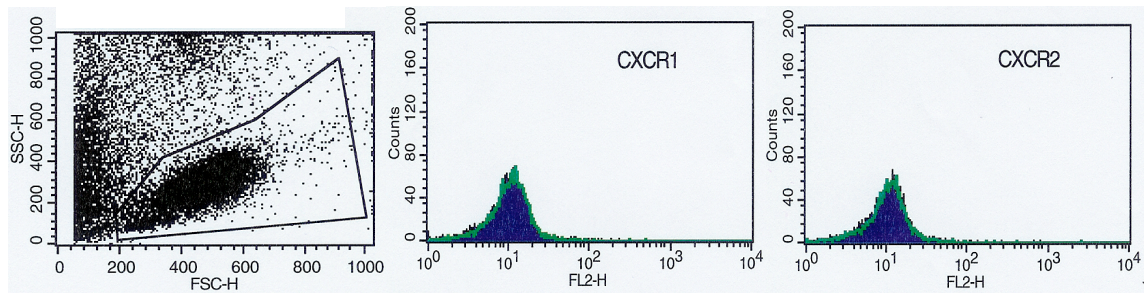


Abb. 2.3.: 3 Stunden, Kontrolle:



3 Stunden, *cag* positiver *H. pylori* Stamm:



3 Stunden, *cag* negativer *H. pylori* Stamm:

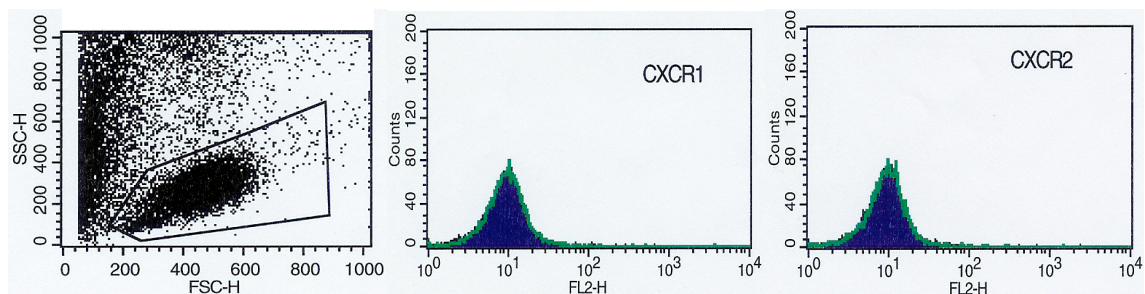


Abb. 2.1-3.: Ergebnisse der FACS-Analyse bei Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit *H. pylori*.

Das Diagramm links im Bild zeigt die Zellen im Dotplot und das verwendete Aufzeichnungsgate. Die gefüllte blaue Kurve entspricht der Isotypkontrolle, die grüne Kurve entspricht der Färbung von CXCR1, bzw. CXCR2.

Die Kontrollmessung nach 0; 0,5 und 3 Stunden ohne Stimulation mit *H. pylori* zeigt eine kräftige Expression von CXCR1, bzw. CXCR2.

Nach 0,5 und nach 3 Stunden kann CXCR1 oder CXCR2 auf Proteinebene nicht mehr nachgewiesen werden. Ein Unterschied zwischen dem *cag* positiven und *cag* negativen *H. pylori* Stamm konnte nicht gefunden werden.

3.1.3. Der Verlust von CXCR1 und CXCR2 Protein unter dem Einfluss von *H.pylori* scheint auf Rezeptorinternalisation und proteolytischen Abbau zurückzuführen

Frisch isolierte neutrophile Granulozyten zeigten unter dem confokalen Mikroskop starke Fluoreszenzsignale für CXCR1 und CXCR2 auf der Zellmembran und im Zytoplasma. Die gleiche Fluoreszenzintensität und ein gleiches Verteilungsmuster des Signals konnte nach 0,5 und 3 Stunden Inkubationszeit der neutrophile Granulozyten mit Zellkulturmedium ohne *H. pylori* beobachtet werden. Die Koinkubation mit *H. pylori* führte hingegen, unabhängig davon, ob es sich um *cag* positive oder *cag* negative *H. pylori* Stämme handelte, bereits nach 0,5 Stunden zum vollständigen Verlust des Fluoreszenzsignals von CXCR1 und CXCR2 auf der Zellmembran. Fluoreszenzsignale finden sich dann nur noch punktuell im Zytoplasma, was auf eine Internalisierung des Rezeptors in Vesikel und anschließenden Abbau hinweist (siehe Abb.3 S. 49).

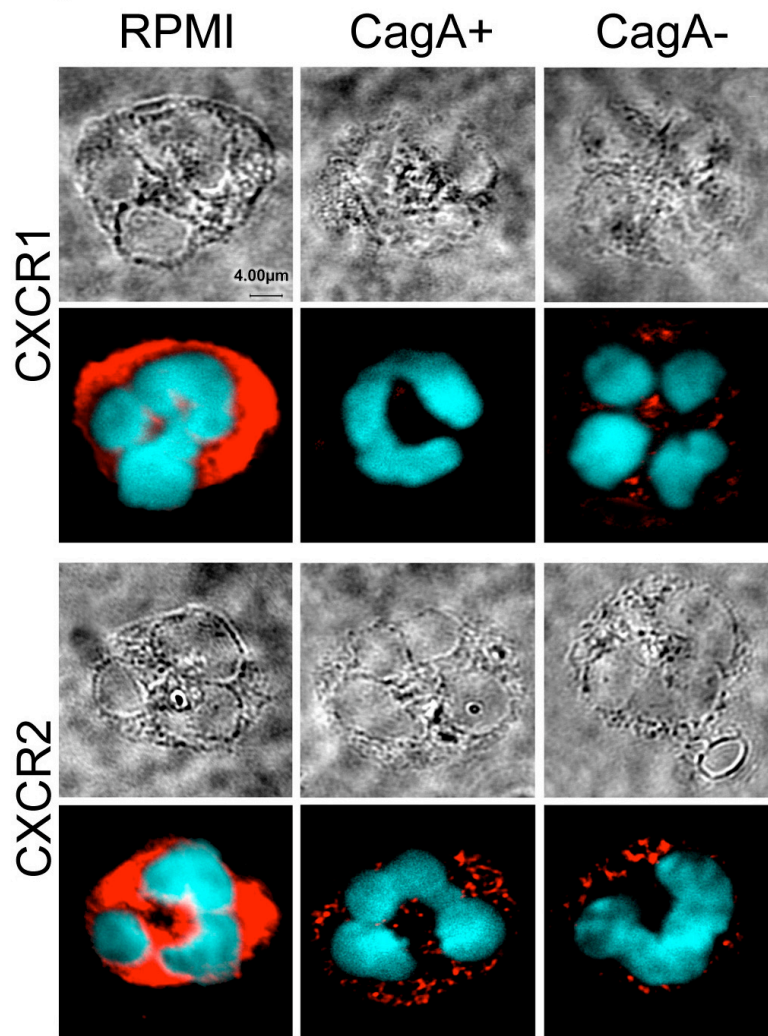


Abb. 3: confokale Färbung von CXCR1 und CXCR2 auf neutrophilen Granulozyten (rote Fluoreszenz: CXCR1, bzw. CXCR2; grüne Fluoreszenz: Kernfärbung):

Bei der Kontrollgruppe nach 0,5 Stunden Stimulation ist, erkennbar an der roten Fluoreszenz eine kräftige Expression von CXCR1 und CXCR2 nachzuweisen. Bei Koinkubation mit *H.pylori* findet sich die rote Fluoreszenz nur noch schwach und punktuell im Zytosol.

3.1.4. Die Regulation von CXCR1 und CXCR2 mRNA auf neutrophilen Granulozyten ist abhängig vom *H.pylori* *cag* A Status

Zur Untersuchung des Expressionsniveaus von CXCR1 und CXCR2 auf mRNA Ebene wurde die RNA der mit *H. pylori* koinkubierten Zellen isoliert und die Expression der mRNA durch semiquantitative RT-PCR bestimmt. Die Ergebnisse der Expression von CXCR1 und CXCR2 auf mRNA Ebene unterscheiden sich hierbei von denen der Expression auf Proteinebene.

Nach 0,5 Stunden Koinkubation mit *H. pylori* ist – unabhängig vom *cag* Status des verwendeten *H. pylori* Stammes – keine Änderung des Expressionsniveaus der mRNA von CXCR1 oder CXCR2 festzustellen.

Nach 3 Stunden führt die Koinkubation mit *H. pylori* zu einer verringerten Expression der CXCR1- und CXCR2 mRNA. Der *cag* positive *H. pylori* Stamm führt dabei zu einer erheblich stärkeren Herunterregulation der mRNA von CXCR1 und CXCR2 (siehe Abb. 4 S. 51).

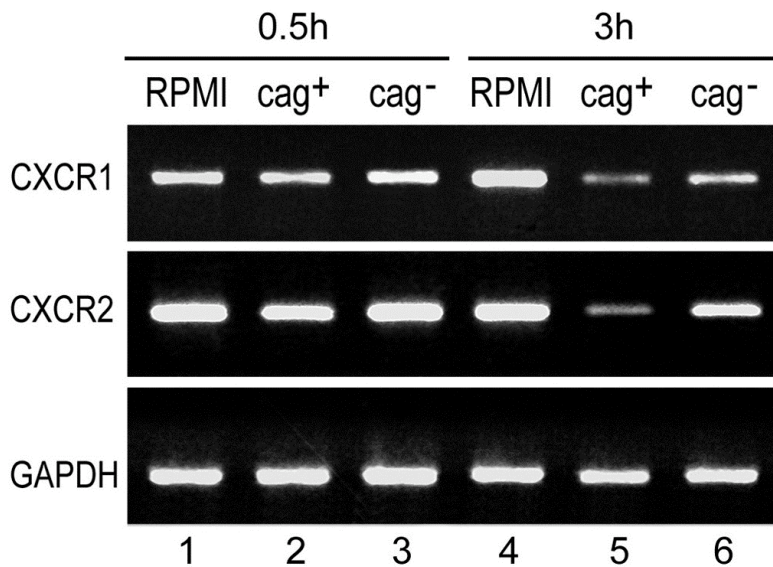


Abb. 4: Gelelektrophorese der PCR-Produkte bei Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit *H. pylori*.

GAP-DH 35 Zyklen, CXCR1 und CXCR2 40 Zyklen

Nach 0,5 Stunden ist keine wesentliche Änderung der Expression von CXCR1 und CXCR2 mRNA bei Stimulation mit *H.pylori*, unabhängig von dessen *cag* Status im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar (Spalte 1-3).

Nach 3 Stunden kommt es zur signifikanten Herunterregulation der CXCR1 und CXCR2 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der *cag* positive *H.pylori* Stamm bewirkt eine stärkere Schwächung des CXCR1 und CXCR2 Signals bei gleicher Expression der GAP-DH (Spalte 4-6).

3.1.5. TNF α und IL-8 sind nicht verantwortlich für die schnelle Herunterregulation von CXCR1 und CXCR2 bei der Koinkubation von neutrophilen Granulozyten mit *H.pylori*

Für die Internalisierung und den schnellen Abbau von CXCR1- und CXCR2-Protein, sind zwei unterschiedliche Mechanismen bekannt. Zum Einen ist die Internalisierung des Komplexes aus Rezeptor und Ligand für IL-8 und CXCR1, bzw. CXCR2 beschrieben worden (130, 131). Dieser Mechanismus ist unabhängig von Tyrosinkinasen und funktioniert über die klassischen "clathrin coated pits".

Zum Anderen ist ein Tyrosinkinasen abhängiger Weg beschrieben, der durch TNF- α hervorgerufen werden kann (132, 133).

Beide Mechanismen wurden überprüft, da bekannt ist, dass *H. pylori* die Freisetzung von IL-8 und TNF- α induziert.

Nach 0,5 Stunden Koinkubation mit *H. pylori* kommt es nicht zum signifikanten Anstieg der Konzentration von TNF- α oder IL-8. Die Daten wurden in der Studie durch ELISA der Kulturüberstände gewonnen (siehe Abb. 5 a und b S.53). Die Freisetzung von IL-8 oder TNF- α scheinen somit nicht ursächlich für die schnelle Herunterregulation von CXCR1 und CXCR2 zu sein.

Erst nach 3 Stunden ist ein signifikanter Anstieg der Konzentration von TNF α und IL-8 nachzuweisen. Bei der nicht infizierten Kontrollgruppe ist kein Konzentrationsanstieg von TNF α oder IL-8 nachzueisen. Bei Verwendung des *cag* positiven *H.pylori* Stammes kommt es zu einem geringgradig stärkeren Anstieg der Zytokinkonzentrationen.

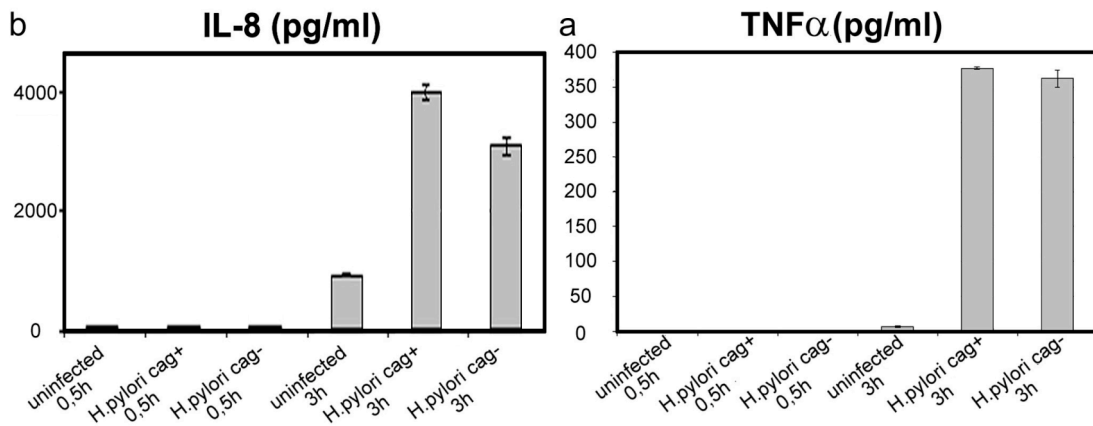


Abb. 5:

- ELISA für TNF α im Zellkulturüberstand bei Koinkubation von neutrophilen Granulozyten mit *H. pylori*
- ELISA für IL-8 im Zellkulturüberstand bei Koinkubation von neutrophilen Granulozyten mit *H. pylori*

Nach 0,5 Stunden ist weder bei der Kontrollgruppe, noch bei den mit *H.pylori* stimulierten neutrophilen Granulozyten, unabhängig vom *cag* Status, ein signifikanter Anstieg der Konzentration von IL-8 oder TNF- α nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen: In vivo kann CXCR1 und CXCR2 in Arealen, in denen neutrophilen Granulozyten in Kontakt zu *H.pylori* treten, nicht nachgewiesen werden. In vitro kommt es bei direktem Kontakt *H.pylori* zu neutrophilen Granulozyten, zur Herunterregulation von CXCR1 und CXCR2 Protein und mRNA. Dies scheint für das Rezeptorprotein dabei durch Internalisierung und intrazellulären Abbau zu erfolgen und unabhängig von TNF α und IL-8 zu sein. Die herunter Regulation der mRNA erfolgt zeitverzögert und ist anders als der Verlust des Rezeptorproteins, bei *cag* positivem *H.pylori* stärker ausgeprägt.

3.2. Expression von CXCR4 und CCR7 auf epithelialen Zellen des Magens

3.2.1. Expression von CXCR4 und CCR7 auf normaler Magenschleimhaut, intestinaler Metaplasie und Dysplasie, sowie Magenkarzinomen

Immunhistochemische Untersuchungen an Paraffinschnitten von Magenkarzinomen zeigen, dass CXCR4 in der Entwicklung des Adenokarzinoms ab dem Stadium intestinale Metaplasie und Dysplasie zunehmend exprimiert wird. Normale Schleimhaut und das Epithel der *H. pylori* Gastritis zeigen nur eine schwache Expression von CXCR4. In der intestinalen Metaplasie und Dysplasie ist die Stärke der Expression von CXCR4 höher als in nicht entzündlicher Magenschleimhaut. Von den untersuchten Magenkarzinomen exprimieren nahezu alle kräftig CXCR4. Auf Metastasen ist ebenfalls CXCR4 nachzuweisen. Ein Unterschied in der Expressionsstärke zwischen Primärtumor und Metastase findet sich nicht (Bilder nicht gezeigt).

CCR7 wird in vivo auf den Magenepithelzellen aller untersuchten Patienten des gleichen Kollektivs mit nicht entzündlicher Magenmucosa und *H. pylori* Gastritis exprimiert.

Die Expression war bei Patienten mit *H. pylori* Gastritis eindeutig stärker, als bei Patienten mit nicht entzündeter Magenschleimhaut. Ebenfalls wird CCR7 in allen Bereichen mit intestinaler Metaplasie und Dysplasie, sowie von den meisten Magenkarzinomen exprimiert. Die Intensität der Färbung bei CCR7 positiven Zellen von intestinaler Metaplasie, Dysplasie und Magenkarzinomen unterscheidet sich hierbei nicht von derjenigen der *H. pylori* Gastritis (siehe Abb.6 S. 59).

Diese Daten veranlassten uns, die Chemokinrezeptor Expression auf Magenkarzinom Zelllinien zu testen. Insbesondere sollte untersucht werden, ob möglicherweise *H.pylori* selbst zu der beobachteten, vermehrten Expression von CCR7 auf den Magenkarzinomen führt.

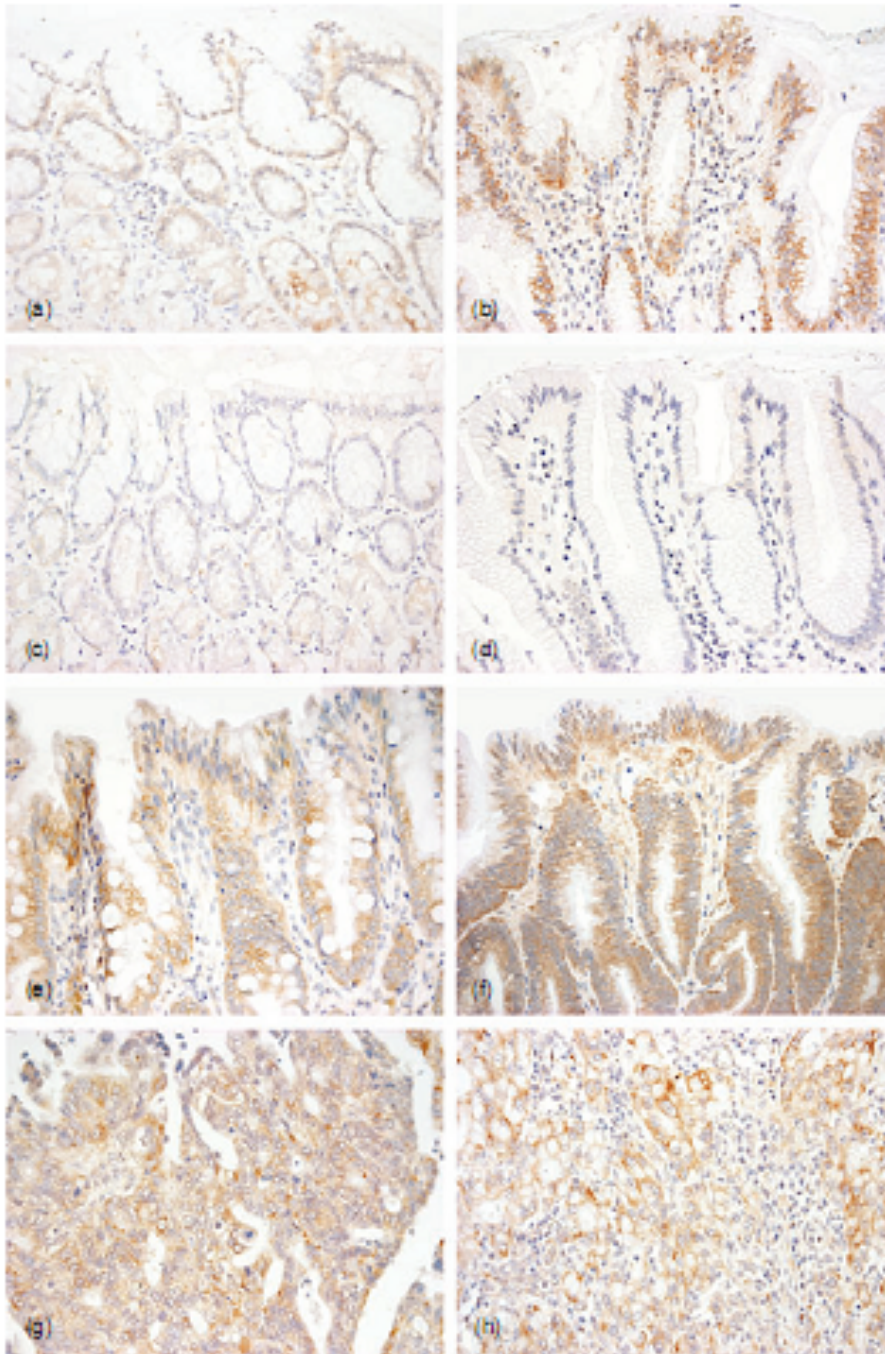


Abb.6: CCR7 wird vom Epithel nicht entzündeter Magenschleimhaut (a), *H.pylori* Gastritis (b), intestinaler Metaplasie (e), Dysplasie (f) und Magenkarzinomen (g, h) exprimiert. Die Isotyp – Kontrollfärbung war negativ auf normaler (c) und entzündeter Magenschleimhaut (d). Das Epithel der *H.pylori* Gastritis exprimiert CCR7 eindeutig stärker als die nicht entzündete Magenschleimhaut. Originalvergrößerung (a-h) x400.

3.2.2. Expression von Chemokinrezeptoren auf Magenepithelzelllinien

Bei den verwendeten Magenzelllinien (n= 7) konnte die Expression von Chemokinrezeptoren auf Proteinebene mittels FACS Analyse nachgewiesen werden. Dabei zeigten alle untersuchten Zelllinien (7 von7) die Expression von CCR7 und CXCR4. Prinzipiell scheint zumindest ein Teil der Zelllinien auch in der Lage zu sein, unter bestimmten Bedingungen weitere Chemokinrezeptoren zu exprimieren (siehe Tabelle).

Nachfolgend eine tabellarische Aufführung der Rezeptorexpression auf den verwendeten Zelllinien. Die Rezeptorexpression wurde als vorhanden gewertet, wenn die Zellen regelmäßig zum Zeitpunkt der Messung das entsprechende Chemokinrezeptor Signal aufwiesen. Die Kennzeichnung in der Tabelle erfolgte dann durch „+“. Gelegentliche Expression wurde mit „(+)" gekennzeichnet.

Bei Wiederholung der FACSmessung zeigten die Zelllinien teilweise einen Verlust der Rezeptorexpression. Die Chemokinrezeptor-Expression scheint somit ein dynamischer Prozess zu sein, der unter anderem von den Kulturbedingungen abhängig ist. Dies wurde so interpretiert, dass die entsprechende Zelllinie prinzipiell in der Lage ist, den entsprechenden Rezeptor zu synthetisieren, ohne dass jedoch eine konstante Expression des Rezeptors vorliegt.

Zelllinie	CXCR1	CXCR2	CXCR3	CXCR4	CXCR5	CCR1	CCR2	CCR5	CCR6	CCR7	CCR8	CCR9
23132	0	(+)	(+)	+	(+)	0	0	0	(+)	(+)	0	0
2474	(+)	0	0	+	0	0	0	0	0	(+)	0	(+)
3051	(+)	0	0	+	(+)	0	0	0	0	+	0	(+)
4433	0	0	(+)	(+)	0	0	0	0	0	(+)	0	(+)
2957	0	0	+	+	(+)	0	(+)	0	(+)	+	0	(+)
Kato III	0	0	(+)	(+)		0	0	0	0	+	0	0
HM02	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0

3.2.3. Die CCR7 Expression auf Magenkarzinom - Zelllinien wird durch *H.pylori* hoch geregelt

Wie sich in den Vorversuchen gezeigt hatte, sind alle sieben verwendeten Magenzelllinien in der Lage CCR7 zu exprimieren. Fünf der sieben Zelllinien exprimieren CCR7 gehäuft bei Nachweis mittels FACS (KATO III, HM02, 2957, 3051, 2474). Bei zwei der sieben Zelllinien findet sich CCR7 nur sporadisch (4433, 23132).

Bei drei der fünf Zelllinien, bei denen es gehäuft zur Expression von CCR7 kommt, kommt es bei der Koinkubation mit *H.pylori* zur Hochregulation von CCR7 (HM02, 2474, 3051). Das Phänomen tritt dabei unabhängig vom *cag* Status des für die Koinkubation verwendeten *H.pylori* Stammes auf (siehe Abb. 7.3. S. 59).

Bei KATO III und 2957 ist eine Regulation von CCR7 unter dem Einfluss von *H.pylori* nicht nachzuweisen, hier findet die Expression von CCR7 jedoch auch in der Kontrollgruppe ohne Einfluss von *H.pylori* auf hohem Niveau statt (siehe Abb. 7.2. S.59).

Im Falle von völlig fehlender CCR7 Expression bleibt diese auch bei Anwesenheit von *H. pylori* negativ, wie bei zwei der sieben Zelllinien gezeigt werden konnte (4433, 23132) (siehe Abb. 7.1. S.59).

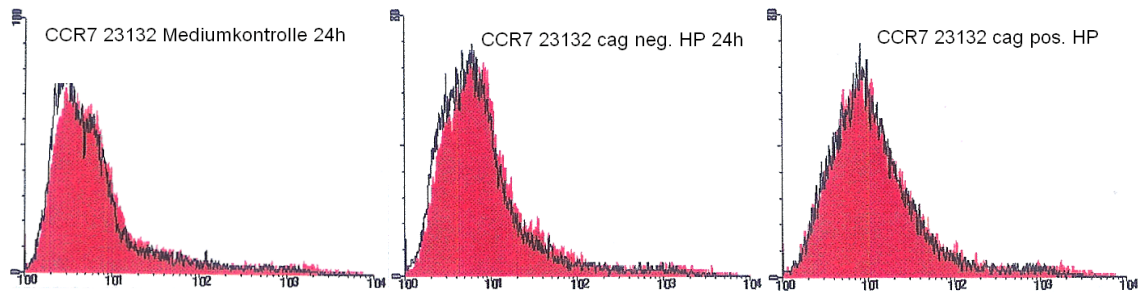


Abb. 7.1.

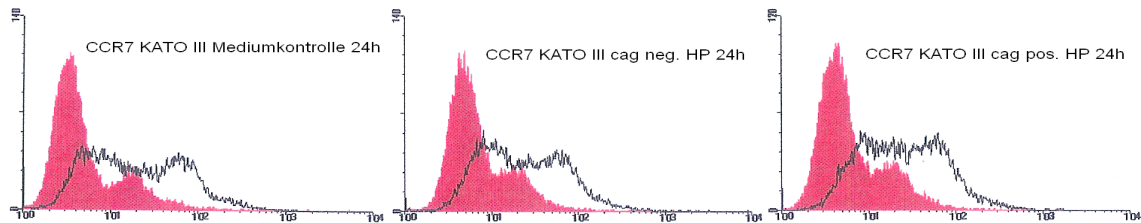


Abb. 7.2.

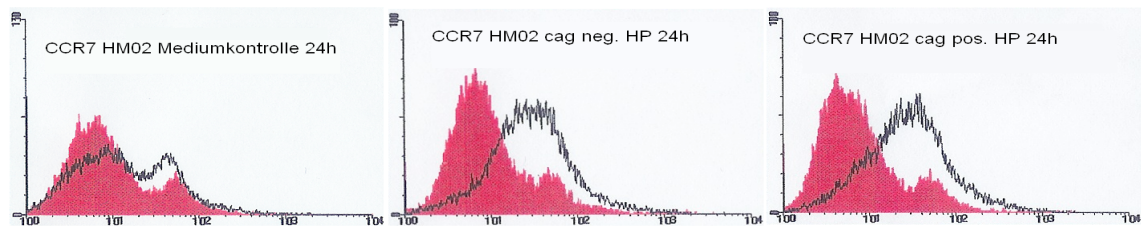


Abb. 7.3.

Abb. 7.1-3: Ergebnisse der FACS-Analyse bei Stimulation von Magenzelllinien mit *H. pylori*. Rote Kurve: Isotypkontrolle, schwarze Kurve: Färbung von CCR7.

Bei der Messung der CCR7 Expression auf den Magenzelllinien unter dem Einfluss von *H. pylori* ergeben sich drei unterschiedliche Verhaltensweisen der Zellen:

Die erste Gruppe (4433, 23132) exprimiert CCR7 bei wiederholter Messung nur selten. Hier ist keine Regulation der Rezeptorexpression unter dem Einfluss von *H. pylori* festzustellen. Hier wird exemplarisch 23132 gezeigt (Abb. 7.1.).

Die zweite Gruppe (KATO III, 2957) exprimiert bei wiederholter Messung zu verschiedenen Zeitpunkten CCR7 in hohem Niveau. Hier bleibt die Expression von CCR7 unter dem Einfluss von *H. pylori* konstant. Exemplarisch wird hier KatolIII gezeigt. (Abb. 7.2).

Die dritte Gruppe (HM02, 2474, 3051) exprimiert bei wiederholter Messung zu verschiedenen Zeitpunkten CCR7 in mäßig starkem Niveau. Hier kommt es bei der Koinkubation mit *H. pylori* zur Hochregulation von CCR7 unabhängig vom *cag* Status des verwendeten *H. pylori* Stammes. Exemplarisch wird hier HM02 gezeigt (Abb. 7.3.)

3.2.4. Die CXCR4 Expression auf Magenkarzinom – Zelllinien ist unabhängig von *Helicobacter pylori*

In vitro kommt es bei Koinkubation von Zelllinien mit *H. pylori*, unabhängig vom *cag* Status, des für die Koinkubation verwendeten *H.pylori* Stammes, zu keiner Änderung der Expressionsstärke von CXCR4. Weder mittels FACS, noch mittels RT-PCR konnte ein Unterschied in der Expression von CXCR4 bei Inkubation mit *H. pylori* im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden werden (siehe Abb. 8 S. 60).

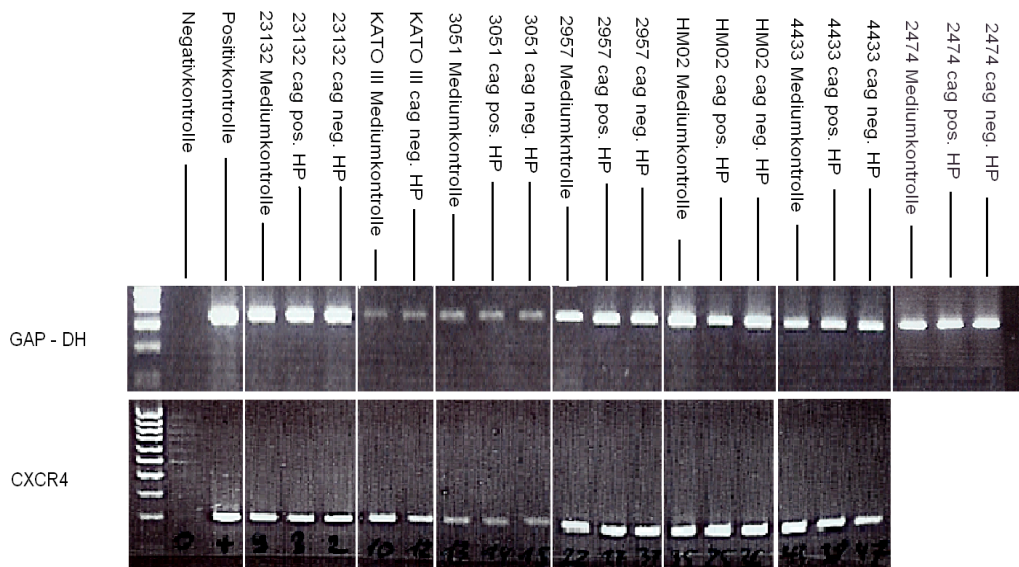


Abb. 8: Gelelektrophorese der PCR-Produkte bei Stimulation von Magenzelllinien mit *H. pylori*. GAP-DH 25 Zyklen, CXCR4 40 Zyklen:

CXCR4 mRNA wird von allen untersuchten Zelllinien kräftig exprimiert. Ein Unterschied des Expressionsniveaus bei Stimulation mit *H.pylori* ist nicht festzustellen.

4. Diskussion:

4.1. Regulation der Expression von CXCR1 und CXCR2 auf neutrophilen Granulozyten durch *Helicobacter pylori*

In den durchgeführten Koinkubationsexperimenten kommt es *in vitro* zum Verlust der Expression von CXCR1- und CXCR2- Protein bei Kontakt der neutrophilen Granulozyten zu *H. pylori*, sowie zeitverzögert zur Herunterregulation der mRNA.

Da immunhistochemisch, die die Magenmucosa infiltrierenden neutrophilen Granulozyten ebenfalls keine Expression der CXCR1 und CXCR2 Proteine zeigen (siehe Abb.1 S. 44), hat dieses Phänomen offenbar auch *in vivo* eine Bedeutung.

Die schnelle Regulation des CXCR1- und CXCR2- Proteins findet unabhängig von der *cag* Pathogenitätsinsel von *H. pylori* statt.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die schnelle Herunterregulation von CXCR1 und CXCR2 bei Kontakt zu *H. pylori* über Rezeptorinternalisation und schnellen Abbau geschieht (siehe Abb. 2 S.45-47 und Abb. 3 S.49).

Im Zellkulturüberstand konnten mittels Immunoblot, keine spezifischen Rezeptorproteinfragmente von CXCR1 und CXCR2 gefunden werden, sodass nicht von einem schnellen, extrazellulärem proteolytischen Abbau über Rezeptorshedding auszugehen ist (129, 134).

Molekularbiologisch sind in der Literatur zwei unterschiedliche Mechanismen für die Internalisierung und den schnellen Abbau von CXCR1- und CXCR2- Protein bekannt. Zum Einen ist die Internalisierung des Komplexes aus Rezeptor und Ligand für IL-8 und CXCR1, bzw. CXCR2 beschrieben worden (130, 131). Dieser Mechanismus ist unabhängig von Tyrosinkinase und funktioniert über die

klassischen "clathrin coated pits".

Zum Anderen ist ein Tyrosinkinasen abhängiger Weg beschrieben, der sowohl durch TNF- α , als auch durch die Lipopolysaccharide gram negativer Bakterien hervorgerufen werden kann (132, 133).

Beide Mechanismen wurden überprüft, da bekannt ist, dass *H. pylori* die Freisetzung von IL-8 und TNF- α induziert. Nach 0,5 Stunden Koinkubation mit *H. pylori* kommt es nicht zum signifikanten Anstieg der Konzentration von TNF- α oder IL-8. Die Freisetzung von IL-8 oder TNF- α sind somit nicht ursächlich für die schnelle Herunterregulation von CXCR1 und CXCR2 (siehe Abb.5 S.53).

Ein möglicher Weg, der zu der Herunterregulation der Chemokinrezeptoren infolge des Kontaktes zu *H. pylori* führen könnte, ist die Interaktion bakterieller Antigene mit „toll-like Rezeptoren“ (TLRs). TLRs sind Rezeptoren der unspezifischen Immunabwehr, die von Leukozyten, sowie von Epithelien gebildet werden. Sie erkennen spezifische molekulare Strukturen, die charakteristisch für Pathogene sind und lösen eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die zur Zellaktivierung und Freisetzung von Zytokinen führt (135, 136).

Eine schnelle Herunterregulation von CXCR1 und CXCR2 in vitro wurde beschrieben über die Aktivierung von TLR 2 und TLR4 (137, 138). TLR2 bindet Lipo- und Glycoproteine verschiedener Bakterien, TLR4 bindet die Lipopolysaccharide gram negativer Bakterien.

Für *H. pylori* sind verschiedene Interaktionspartner für beide genannten TLRs beschrieben worden. TLR2 bindet z.B. das „*H. pylori* neutrophil activating protein“ (HP-NAP) oder das Hitzeschockprotein 60 (HSP-60), beides relevante Pathogenitätsfaktoren (139-141). Die Interaktion mit TLR4 ist ebenfalls beschrieben, wenn es auch so scheint, als ob der Keim als Ganzes betrachtet, vorrangig über die Interaktion mit TLR2 agiert (142, 143).

Der genaue Mechanismus, bzw. der Auslöser der schnellen Chemokinrezeptorprotein-Regulation bleibt anhand der durchgeführten Experimente unklar. Er lässt sich nicht auf die für die Modulation von CXCR1/2 bekannten Mechanis-

men zurückführen. Denkbar wäre eine Beteiligung der TLRs, oder eine sehr rasche autokrin vermittelte Rezeptorinternalisation.

Neben der schnellen Herunterregulation der Expression der CXCR1- und CXCR2- Proteine, kommt es nachfolgend ebenso zur Herunterregulation der mRNA von CXCR1 und CXCR2. Dieser Prozess findet erst später als die Regulation auf Proteinebene statt und ist in den durchgeführten Experimenten nach 3 Stunden nachweisbar. Hier ist im Gegensatz zu der Regulation der Proteine ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem *cag* Status des für die Koinkubation verwendeten *H. pylori* Stammes nachzuweisen. Bei Verwendung des *cag* positiven *H. pylori* Stammes kommt es zum deutlich stärkeren Rückgang der mRNA Expression, als bei Verwendung der Deletionsmutante. Hieraus wird geschlossen, dass die Herunterregulation der CXCR1 und CXCR2 mRNA ein *cag* abhängiger Prozess ist.

Der Mechanismus der Herunterregulation von CXCR1 und CXCR2 mRNA könnte beispielsweise über die oben beschriebene Induktion der IL-8 Freisetzung, durch die Aktivierung von NF κ B infolge der Injektion von *cagA* in die Zelle erfolgen. Gestützt wird diese Hypothese durch die ELISA Daten. Nach 3 Stunden Koinkubation der neutrophilen Granulozyten mit *H. pylori* ist ein signifikanter Anstieg der TNF- α und IL-8 Konzentration im Medium zu verzeichnen. Die Konzentration von IL-8 ist hierbei bei der Verwendung des *cag* positiven *H. pylori* Stammes signifikant höher, als bei Verwendung des *cag* negativen Stammes. Bei der Konzentration von TNF- α ist kein Unterschied in der Konzentration bei *cag* positivem oder *cag* negativem *H. pylori* Stamm nachzuweisen (129).

Die in der Arbeit dargestellten Daten zeigen, dass die Wanderung der neutrophilen Granulozyten in der *H. pylori* Gastritis auch in vivo nicht nur über die Modulation der Chemokine, IL-8 und Gro- α reguliert wird, sondern auch über die Modulation der korrespondierenden Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2.

Der Kontakt zu *H. pylori* führt zur Herunterregulation von CXCR1 und CXCR2 in vitro und in vivo. Dies könnte ein möglicher wesentlicher Schritt in der Pathogenese der *H. pylori* Gastritis sein. Nach der Anlockung der neutrophilen Granulozyten durch Freisetzung der chemotaktischen Zytokine Gro- α und IL-8 kommt es zur Einwanderung der neutrophilen Granulozyten ins Gewebe. Bei Kontakt zu *H. pylori* in den foveolae gastricae führt die Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und *H. pylori* zum Verlust der Chemokinrezeptoren. Dadurch sind die neutrophilen Granulozyten am Ort der Entzündung fixiert und sind nicht mehr in der Lage auf chemotaktische Reize reagieren. Es kommt zur Gewebeschädigung infolge der Akkumulation der neutrophilen Granulozyten in den Drüsenlumina und der dortigen Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale. Die eigentliche Infektion wird dabei nur ineffektiv bekämpft und durch die Persistenz von *H. pylori* werden weitere neutrophile Granulozyten angelockt.

4.2. Chemokinrezeptorexpression von Magenepithelzelllinien

Die Biologie der Chemokine und Chemokinrezeptoren wurde deutlich komplizierter, als der Nachweis von funktionellen Chemokinrezeptoren auf epithelialen Zellen und malignen Tumoren gelang, und gezeigt wurde, dass diese auf Chemokinsignale reagieren können. Eine besondere Rolle für Karzinome scheint die Expression von CCR7 und CXCR4 zu spielen.

Bislang war nicht bekannt, ob *H. pylori*, als eines der hauptsächlichen Pathogene des Magenkarzinoms, auch die Expression der Chemokinrezeptoren auf epithelialen Zellen beeinflusst.

Zunächst wurde der Status der Chemokinrezeptorexpression auf Magentumorzelllinien untersucht.

Die verwendeten Magenzelllinien sind in der Lage Chemokinrezeptoren zu exprimieren. Reproduzierbar ist die Expression der Chemokinrezeptoren nachzuweisen für CXCR4, sowie für CCR7. Von den anderen Chemokinrezeptoren wurden einige sporadisch exprimiert.

Die Expression von CXCR4 (20-25) und CCR7 (20, 24, 27-29) auf den Tumorzelllinien von Magenkarzinomen deckt sich mit den Beobachtungen anderer Untersucher. Beide Rezeptoren wurden sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* auf Magenkarzinomzellen gefunden.

Unter Berücksichtigung des Ursprungs einer Zelllinie aus einer einzelnen Tumorzelle eines Magenkarzinoms, sowie der Annahme, dass wesentliche Merkmale der Ursprungszelle auch während der Kultur erhalten bleiben, ist die Expression der Chemokinrezeptoren durch die Zelllinien nicht unerwartet.

Sowohl für CCR7, als auch für CXCR4, wurde eine Rolle in der Gewebemöostase, die eng mit Wachstum und Zelldifferenzierung assoziiert ist, beschrieben. Ähnliche Prozesse spielen auch *in vitro* bei der Kultivierung der Zellen eine Rolle.

CXCR4 wird insbesondere mit der Regulation des Zellwachstums am intestinalen Epithel in Verbindung gebracht. CCR7 wird beispielsweise beschrieben als homöostatischer Faktor in der Niere (46, 144-147). Beide Chemokinrezeptoren sind zudem eng verknüpft mit der Pathogenese maligner Tumoren und werden mit Tumorprogression und Metastasierung assoziiert (49-51).

4.2.1. CXCR4 Expression auf epithelialen Zellen des Magens unter dem Einfluss von *Helicobacter pylori*

Die Expression von CXCR4 konnte *in vitro* und *in vivo* auf Magenkarzinomzellen nachgewiesen werden.

Eigene immunhistochemische Untersuchungen zeigen, dass nicht entzündete Magenschleimhaut und das Epithel der *H. pylori* Gastritis nur eine schwache Expression von CXCR4 zeigen.

Karzinome exprimieren nahezu alle kräftig CXCR4. Auf Metastasen ist ebenfalls CXCR4 nachzuweisen. Ein Unterschied in der Expressionsstärke ist zwischen Primärtumor und Metastase nicht zu finden.

In der vorliegenden immunhistochemischen Untersuchung wird CXCR4 in der Entwicklung des Adenokarzinoms ab dem Stadium intestinale Metaplasie und Dysplasie zunehmend exprimiert (Daten nicht gezeigt).

Die Expression von CXCR4 kann somit molekularbiologisch als fester Bestandteil in der Pathogenese des Magenkarzinoms angenommen werden. Dies wurde bereits in anderen Studien thematisiert, in denen mittels cDNA Microarrays nach auffälligen Genexpressionsmustern bei Magenkarzinomen gesucht wurde (21, 23). Nicht bekannt war bislang jedoch, dass CXCR4 bereits in den Vorstadien intestinale Metaplasie und Dysplasie überexprimiert wird.

Beim Magenkarzinom wird die Expression von CXCR4 klinisch mit der Neigung zur Metastasierung und mit schlechter Prognose korreliert.

Nicht bekannt war bislang, ob *H. pylori* als karzinogener Faktor selbst die Expression der Chemokinrezeptoren beeinflusst. Basierend auf den Literaturdaten sowie den eigenen immunhistologischen Untersuchungen wurde unter Verwendung von FACS-Analyse und RT-PCR, in Koinkubationsexperimenten mit Magenkarzinom-Zelllinien und *H. pylori* die Expression von Chemokinrezeptoren auf den Zelllinien untersucht.

Aufgrund der Bedeutung der *cag* Pathogenitätsinsel für die Auslösung schwererer Gastritiden und des gehäufteten Auftretens beim Karzinom, wurden für die Koinkubationsexperimente *cag* positive und *cag* negative *H. pylori* Stämme herangezogen.

Bei den durchgeführten Koinkubationsexperimenten kommt es unter dem Einfluss von *H. pylori* nicht zur Änderung des Expressionsmusters von CXCR4. Weder der *cag* positive, noch der *cag* negative *H. pylori* Stamm ändert die Intensität der CXCR4 Expression auf Protein- oder mRNA-Ebene. Dieses Ergebnis ist kohärent zu den immunhistochemisch gefundenen Befunden.

Die Expression von CXCR4 scheint somit nicht primär mit der *H. pylori* Infektion assoziiert zu sein, sondern eher bedingt durch die allgemeine Änderung der Genexpression im Rahmen der Tumorgenese.

Die Expression von CXCR4 auf den Zellen der Magenkarzinomzelllinien scheint daher im Rahmen der Entdifferenzierung der malignen Zellen zu geschehen.

Die Infektion mit *H. pylori* spielt dabei wohl eine untergeordnete Rolle. Die These ist kongruent zu den in vivo Befunden der Immunhistochemie. Hier kommt es im Zuge der Karzinogenese zur zunehmenden Expression von CXCR4 ab dem Stadium der intestinalen Metaplasie und Dysplasie. Die stärkere Expression von CXCR4 durch die Karzinome und Metastasen im Vergleich zur Metaplasie und Dysplasie könnte als Folge der weiteren Entdifferenzierung in einen stammzellähnlichen Zustand gedeutet werden.

4.2.2. CCR7 Expression auf epithelialen Zellen des Magens unter dem Einfluss von *Helicobacter pylori*

CCR7 ist inzwischen auf zahlreichen Karzinomen gefunden worden und wird meist mit lymphatischer Metastasierung und klinisch schlechter Prognose assoziiert (76-84).

Über einen Mechanismus, der analog zur Einwanderung dendritischer Zellen in den Lymphknoten abläuft, wird die Einwanderung und Ansiedelung der Tumorzellen in den Lymphknoten über die Interaktion von CCL21 in den Lymphknotensinus mit CCR7 beschrieben. Auch der Einbruch der Tumorzellen in die Lymphbahnen findet via CCR7 statt (49).

Insbesondere beim Magenkarzinom wurde die Expression von CCR7 mit Lymphknotenmetastasierung und schlechter Prognose assoziiert (26, 27).

In vivo kommt es bei der *H.pylori* Gastritis zur vermehrten Expression von CCR7 Protein, wie durch Immunhistochemie gezeigt werden konnte (siehe Ergebnisse).

Auf den Magenepithelzellen aller untersuchten Patienten mit nicht entzündlicher Magenmucosa und *H. pylori* Gastritis wird CCR7 in vivo exprimiert. Die Expression war bei Patienten mit *H. pylori* Gastritis eindeutig stärker, als bei Patienten mit nicht entzündeter Magenschleimhaut. Ebenfalls wird CCR7 in allen Bereichen mit intestinaler Metaplasie und Dysplasie, sowie von den meisten Magen-

karzinomen exprimiert. Die Intensität der CCR7 - Färbung in Arealen mit intestinaler Metaplasie, Dysplasie und Magenkarzinomen unterscheidet sich hierbei nicht von derjenigen der *H. pylori* Gastritis.

Auch in vitro kommt es bei den Karzinomzelllinien zur Induktion der CCR7-Expression bei Kontakt zu *H. pylori*, wobei der Effekt unabhängig vom *cag* Status zu sein scheint.

Die in vitro Ergebnisse der Kostimulationsexperimente können als Indiz gewertet werden, dass die vermehrte Expression von CCR7 in der *H. pylori* Gastritis durch die Magenmucosa in vivo als Effekt des Kontakts der Epithelzellen zu *H. pylori* zustande kommt.

Ein ähnlicher Effekt von *H. pylori* wurde bereits für dendritische Zellen beschrieben. Diese exprimieren im Zuge der Ausreifung CCR7, was ihnen die Einwanderung in die Lymphgefäße und den Lymphknoten ermöglicht, sodass diese als antigenpräsentierende Zellen in Kontakt zu den T-Zellen treten können (148). Agenzien, die in vitro zur Ausreifung der dendritischen Zellen führen, sind die Lipopolysaccharide und das Flagellin von *H. pylori* (149, 150).

Der Weg der Signaltransduktion, der zur Ausreifung der dendritischen Zellen führt, läuft unter anderem über die Stimulation der „toll-like receptors“ (TLRs) durch bakterielle Antigene ab. Die Expression von TLRs als Rezeptoren der unspezifischen Immunabwehr durch dendritische Zellen ist bekannt. Auch bekannt ist eine Induktion der CCR7 Expression durch die dendritischen Zellen bei Stimulation der TLRs (151-153).

Für das Magenepithel wurde die Expression von TLR4, TLR5 und TLR9 nachgewiesen (154). Die Induktion der CCR7 Expression könnte dementsprechend ähnlich dem Modellsystems der dendritischen Zellen via Aktivierung der TLRs ablaufen.

Ein anderer, möglicher Signalweg der Induktion von CCR7 auf den Epithelzellen könnte die Modulation der intrazellulären Signaltransduktion durch die Akti-

vierung von NFκB in Folge der Adhäsion mit *H. pylori* darstellen.

Eine Induktion der Expression von CCR7 durch Aktivierung von NFκB wurde beschrieben (155).

Bekannt ist, dass es durch die Injektion von *H.pylori cagA* via Typ IV Sekretionsapparat in die Epithelzelle zur Aktivierung von NFκB kommt. Bei den Koinkubationsexperimenten war die Regulation von CCR7 jedoch unabhängig vom *cag* Status des verwendeten *H. pylori* Stammes. Dennoch könnte der Signalweg mit der Aktivierung von NFκB einhergehen, da neben der *cag* Pathogenitätsinsel noch andere Wege der NFκB Aktivierung durch *H. pylori* bekannt sind. Beispielsweise führt die Interaktion der Urease Untereinheit B mit CD74 zur Aktivierung von NFκB (113).

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass eine direkte Interaktion von *H.pylori* mit der Magenepithelzelle, zu einer Hochregulation des CCR7 Rezeptors führt. Der Signaltransduktionsweg bleibt jedoch unklar.

5. Zusammenfassung:

Bekanntermaßen führt die *H. pylori* Infektion des Magens über eine komplexe Modulation des Chemokinsystems zur Ausbildung der *H. pylori* Gastritis. Die Chemokinrezeptorexpression in der *H. pylori* Gastritis ist jedoch bisher noch fast nicht untersucht. Das Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der Chemokinrezeptorexpression im Magen und die Testung eines Einfluss von *H. pylori* auf die Expression von Chemokinrezeptoren.

In vitro führt die Inkubation von neutrophilen Granulozyten mit *H. pylori* zu einer schnellen Herunterregulation von CXCR1 und CXCR2 auf Proteinebene durch Rezeptorinternalisation und intrazellulären Abbau. Der Effekt ist unabhängig vom *cag* Status von *H. pylori*, sowie von TNF- α - oder IL-8. Als möglicher Signaltransduktionsmechanismus für diesen Effekt wäre die direkte Interaktion von *H. pylori* mit „toll-like receptors“ (TLRs) denkbar.

Auf mRNA Ebene kommt es in vitro bei der Inkubation von neutrophilen Granulozyten mit *H. pylori* zu einer Herunterregulation von CXCR1 und CXCR2 mRNA nach 3 Stunden. Dieser Effekt tritt bei Inkubation mit einem *cag* positiven *H. pylori* Stamm verstärkt auf und könnte bedingt sein durch autokrine Herunterregulation der Expression von CXCR1 und CXCR2 durch IL-8.

In vivo exprimieren neutrophile Granulozyten in der *H. pylori* Gastritis in den Krypten ebenfalls vermindert CXCR1 und CXCR2.

Sowohl die Expression der Chemokine als auch der korrespondierenden Chemokinrezeptoren wird somit durch *H. pylori* beeinflusst.

Es lässt sich somit der folgende Pathomechanismus postulieren:

Nach dem Eintritt der neutrophilen Granulozyten in die Schleimhaut, kommt es über den direkten Kontakt mit *H. pylori* zum Verlust der Chemokinrezeptoren.

Die neutrophilen Granulozyten können somit nicht mehr auf Chemokinsignale reagieren und werden in der Magenschleimhaut immobilisiert. Dort setzen sie reaktive Sauerstoffradikale, proinflammatorische Zytokine und Chemokine frei, die zur Schleimhautschädigung führen.

Magenkarzinome exprimieren die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7. Die Expression wird mit der Neigung zur Metastasierung und einer schlechten klinischen Prognose assoziiert.

In unseren Untersuchungen wird CXCR4 in vivo während des Prozess der Karzinogenese im Magen ab dem Stadium der intestinalen Metaplasie exprimiert. Bei Inkubation der Zelllinien mit *cagA* positiven und *cagA* negativen *H. pylori* – Stämmen, kommt es zu keiner Änderung der Expression von CXCR4. Die Infektion mit *H. pylori* ist zwar die Voraussetzung für die Genese der intestinalen Metaplasie, scheint jedoch nicht ursächlich an der Expression von CXCR4 beteiligt zu sein.

CCR7 tritt in vivo auf den Magenepithelien der *H. pylori* Gastritis, der intestinalen Metaplasie, Dysplasie und Magenkarzinomen auf. In vitro führt die Koinkubation von CCR7 tragenden Magenzelllinien mit *H. pylori* zur Hochregulation von CCR7 kommt. Die Expression von CCR7 auf Karzinomzellen wird ebenfalls möglicherweise durch eine begleitende Infektion mit *H. pylori* begünstigt.

Der Effekt der CCR7 Induktion durch *H. pylori* in vitro ist unabhängig vom *cag* Status des für die Infektion verwendeten *H. pylori* Stammes. Die Hochregulation von CCR7 ist möglicherweise bedingt durch die intrazelluläre Aktivierung von NFκB infolge der *H. pylori* Infektion. Denkbar wäre auch eine Induktion der Expression von CCR7 in den Magenepithelzellen in TLR abhängiger Weise, äquivalent zu Mechanismen, die in dendritischen Zellen beschrieben wurden.

Es lässt sich abschließend feststellen, dass die *H.pylori* Infektion nicht nur die Freisetzung von Chemokinen, sondern auch die Expression von Chemokinrezeptoren wesentlich beeinflusst. Neutrophile Granulozyten verlieren in direktem Kontakt zu *H.pylori* die Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2. Auf Epithelzellen führt der direkte Kontakt zu *H.pylori* zur vermehrten Expression von CCR7. Die direkte Regulation von Chemokinrezeptoren durch *H.pylori* scheint also sowohl bei der *H.pylori* Gastritis, als auch bei der Entstehung und Progression von Magenkarzinomen eine Rolle zu spielen.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>cag</i>	cytotoxicity associated gene
CCL19	EBI1 ligand chemokine (ELV)
CCL21	secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC)
CCR	CC-Chemokin Rezeptor
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CXCL12	stromal cell-derived factor-1 (sdf-1)
CXCR	CXC-Chemokin Rezeptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
EDTA	Ethylendiamintetrazetat
FACS	fluorescence activated cell sorting
g	Gravitationskonstante, $9,81 \text{ m/s}^2$
GRO- α	growth related oncogene α
<i>H. pylori</i>	Helicobacter pylori
IL-8	Interleukin 8
MALT	mucosa associated lymphatic tissue
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NF κ B	nuclear factor κ B
OIPA	outer inflammatory proteine A
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	phosphate buffered saline

PCR	polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI -1640	Zellkulturmedium, entwickelt am Rosswell Park Memorial Institute
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
S.	Seite
SDF1	stromal cell-derived factor-1
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA Puffer
TE	TRIS-EDTA Puffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TLR	toll-like receptor
TNA- α	tumor necrosis factor α

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Immunhistochemische Färbung von CXCR1 auf <i>H. pylori</i> Gastritis....	44
Abb. 2: Ergebnisse der FACS-Analyse bei Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit <i>H. pylori</i>	45-47
Abb. 3: confokale Färbung von CXCR1 und CXCR2 auf neutrophilen Granulozyten	49
Abb. 4: Gelelektrophorese der PCR-Produkte bei Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit <i>H. pylori</i>	51
Abb. 5: ELISA für TNF α und IL-8 im Zellkulturüberstand bei Koinkubation von neutrophilen Granulozyten mit <i>H. pylori</i>	53
Abb.6: Immunhistochemische Färbung von CCR7 auf Paraffinschnitten von Magengewebe mit normaler Schleimhaut, <i>H.pylori</i> Gastritis, intestinaler Metaplasie und Dysplasie, sowie Magenkarzinomen	55
Abb. 7: Ergebnisse der FACS-Analyse bei Stimulation von Magen-zelllinien mit <i>H. pylori</i> (CCR7)	59
Abb. 8: Gelelektrophorese der PCR-Produkte bei Stimulation von Magen-zelllinien mit <i>H. pylori</i> (CXCR4)	60

8. Referenzen:

1. Jaworski, W., *Podręcznik chorób żołądka (handbook of gastric diseases) Wydawnictwa Dziel Lekarskich Polskich*. 1899. 30 – 47
2. Freedberg AS, B.L., *The presence of spirochaetes in human gastric mucosa*. Am J Dig Dis, 1940. **38**: p. 443-445.
3. Doenges, J., *Spirochaetei in gastric glands of macaccus rhesus and humans without definite historxy of related disease*. Proc Soc Exp Biol Med, 1938. **38**: p. 536 – 538.
4. Kreinitz, W., *Ueber das Auftreten von Spirochaetne verschiegner Form in Magen - inhalt bei Carcinoma ventriculi*. Deutsche medizinische Wochenschrift 1905. **32**: p. 772.
5. Marshall, B.J. and J.R. Warren, *Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration*. Lancet, 1984. **1**(8390): p. 1311-5.
6. Marshall, B.J., et al., *Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric Campylobacter*. Med J Aust, 1985. **142**(8): p. 436-9.
7. Nobelförsamlingen, *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2005*. 2005.
8. Hauke, C.e.a., *Zur Frage nach der Lymphfollikelbildung und der Entstehung der intestinalen Metaplasie in der Antrumschleimhaut als Reaktion auf eine H. pylori Besiedelung*. Leber Magen Darm, 1990. **4**: p. 156-160.
9. Stolte, M. and S. Eidt, *Lymphoid follicles in antral mucosa: immune response to Campylobacter pylori?* J Clin Pathol, 1989. **42**(12): p. 1269-71.
10. Wyatt, J.I. and B.J. Rathbone, *Immune response of the gastric mucosa to Campylobacter pylori*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1988. **142**: p. 44-9.
11. Mukaida, N., et al., *Properties of pro-inflammatory cell type-specific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemoatctic and activating factor (MCAF)*. Microbiol Immunol, 1992. **36**(8): p. 773-89.

12. Schall, T.J. and K.B. Bacon, *Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation*. *Curr Opin Immunol*, 1994. **6**(6): p. 865-73.
13. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, *Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines*. *Adv Immunol*, 1994. **55**: p. 97-179.
14. Peek, R.M., Jr., et al., *Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ Helicobacter pylori strains*. *Lab Invest*, 1995. **73**(6): p. 760-70.
15. Parsonnet, J., et al., *Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma*. *N Engl J Med*, 1991. **325**(16): p. 1127-31.
16. Forman, D., Eurogast Study Group, *An international association between Helicobacter pylori infection and gastric cancer. The EUROGAST Study Group*. *Lancet*, 1993. **341**(8857): p. 1359-62.
17. Forman, D., et al., *Association between infection with Helicobacter pylori and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation*. *Bmj*, 1991. **302**(6788): p. 1302-5.
18. IARC-Group, *Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*. *IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994*. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 1994. **61**: p. 1-241.
19. Correa, P., *A human model of gastric carcinogenesis*. *Cancer Res*, 1988. **48**(13): p. 3554-60.
20. Pituch-Noworolska, A., et al., *Immunophenotype of isolated tumour cells in the blood, bone marrow and lymph nodes of patients with gastric cancer*. *Pol J Pathol*, 2007. **58**(2): p. 93-7.
21. Sun, X.J., et al., *Gene expression patterns in gastric cancer*. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2006. **23**(2): p. 142-6.
22. Yasumoto, K., et al., *Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer*. *Cancer Res*, 2006. **66**(4): p. 2181-7.
23. Li, S., S. Huang, and S.B. Peng, *Overexpression of G protein-coupled receptors in cancer cells: involvement in tumor progression*. *Int J Oncol*, 2005. **27**(5): p. 1329-39.

24. Kwak, M.K., et al., *Expression of chemokine receptors in human gastric cancer*. *Tumour Biol*, 2005. **26**(2): p. 65-70.
25. Mitra, P., et al., *CXCR4 mRNA expression in colon, esophageal and gastric cancers and hepatitis C infected liver*. *Int J Oncol*, 1999. **14**(5): p. 917-25.
26. Ishigami, S., et al., *Prognostic value of CCR7 expression in gastric cancer*. *Hepatogastroenterology*, 2007. **54**(76): p. 1025-8.
27. Mashino, K., et al., *Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma*. *Cancer Res*, 2002. **62**(10): p. 2937-41.
28. Schmausser, B., et al., *The chemokine receptor CCR7 is expressed on epithelium of non-inflamed gastric mucosa, Helicobacter pylori gastritis, gastric carcinoma and its precursor lesions and up-regulated by H. pylori*. *Clin Exp Immunol*, 2005. **139**(2): p. 323-7.
29. Yan, C., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor C and chemokine receptor CCR7 in gastric carcinoma and their values in predicting lymph node metastasis*. *World J Gastroenterol*, 2004. **10**(6): p. 783-90.
30. Baggiolini, M., B. Moser, and I. Clark-Lewis, *Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. The Giles Filley Lecture*. *Chest*, 1994. **105**(3 Suppl): p. 95S-98S.
31. Baggiolini, M. and P. Loetscher, *Chemokines in inflammation and immunity*. *Immunol Today*, 2000. **21**(9): p. 418-20.
32. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, *Human chemokines: an update*. *Annu Rev Immunol*, 1997. **15**: p. 675-705.
33. Laing, K.J. and C.J. Secombes, *Chemokines*. *Dev Comp Immunol*, 2004. **28**(5): p. 443-60.
34. Fernandez, E.J. and E. Lolis, *Structure, function, and inhibition of chemokines*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002. **42**: p. 469-99.
35. Gerard, C. and N.P. Gerard, *The pro-inflammatory seven-transmembrane segment receptors of the leukocyte*. *Curr Opin Immunol*, 1994. **6**(1): p. 140-5.

36. Bourne, H.R., *Signal transduction. Team blue sees red.* Nature, 1995. **376**(6543): p. 727-9.
37. Bokoch, G.M., *Chemoattractant signaling and leukocyte activation.* Blood, 1995. **86**(5): p. 1649-60.
38. Luster, A.D., *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation.* N Engl J Med, 1998. **338**(7): p. 436-45.
39. Forster, R., et al., *A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen.* Cell, 1996. **87**(6): p. 1037-47.
40. Ansel, K.M., et al., *A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles.* Nature, 2000. **406**(6793): p. 309-14.
41. Campbell, J.J. and E.C. Butcher, *Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing.* Curr Opin Immunol, 2000. **12**(3): p. 336-41.
42. Moser, B. and P. Loetscher, *Lymphocyte traffic control by chemokines.* Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 123-8.
43. Muller, G., U.E. Hopken, and M. Lipp, *The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity.* Immunol Rev, 2003. **195**: p. 117-35.
44. Gillitzer, R. and M. Goebeler, *Chemokines in cutaneous wound healing.* J Leukoc Biol, 2001. **69**(4): p. 513-21.
45. Dwinell, M.B., et al., *Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells.* Gastroenterology, 1999. **117**(2): p. 359-67.
46. Jordan, N.J., et al., *Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells.* J Clin Invest, 1999. **104**(8): p. 1061-9.
47. Zhang, J., L.J. Lathbury, and L.A. Salamonsen, *Expression of the chemokine eotaxin and its receptor, CCR3, in human endometrium.* Biol Reprod, 2000. **62**(2): p. 404-11.
48. Oyamada, H., et al., *CCR3 mRNA expression in bronchial epithelial cells and various cells in allergic inflammation.* Int Arch Allergy Immunol, 1999. **120 Suppl 1**: p. 45-7.

49. Zlotnik, A., *Chemokines in neoplastic progression*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(3): p. 181-5.
50. Burger, J.A. and T.J. Kipps, *CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment*. Blood, 2006. **107**(5): p. 1761-7.
51. Kakinuma, T. and S.T. Hwang, *Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(4): p. 639-51.
52. Schmid, B.C., et al., *CXCR4 is expressed in ductal carcinoma in situ of the breast and in atypical ductal hyperplasia*. Breast Cancer Res Treat, 2004. **84**(3): p. 247-50.
53. Phillips, R.J., et al., *The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(12): p. 1676-86.
54. Retz, M.M., et al., *CXCR4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells*. Int J Cancer, 2005. **114**(2): p. 182-9.
55. Arya, M., et al., *The importance of the CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor interaction in prostate cancer metastasis*. J Exp Ther Oncol, 2004. **4**(4): p. 291-303.
56. Schrader, A.J., et al., *CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer*. Br J Cancer, 2002. **86**(8): p. 1250-6.
57. Zeelenberg, I.S., L. Ruuls-Van Stalle, and E. Roos, *The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases*. Cancer Res, 2003. **63**(13): p. 3833-9.
58. Wang, N., et al., *Expression of chemokine receptor CXCR4 in nasopharyngeal carcinoma: pattern of expression and correlation with clinical outcome*. J Transl Med, 2005. **3**: p. 26.
59. Koshiba, T., et al., *Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(9): p. 3530-5.

60. Geminder, H., et al., *A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma*. J Immunol, 2001. **167**(8): p. 4747-57.
61. Libura, J., et al., *CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2597-606.
62. Bradstock, K.F., et al., *Effects of the chemokine stromal cell-derived factor-1 on the migration and localization of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells within bone marrow stromal layers*. Leukemia, 2000. **14**(5): p. 882-8.
63. Shen, W., et al., *The chemokine receptor CXCR4 enhances integrin-mediated in vitro adhesion and facilitates engraftment of leukemic precursor-B cells in the bone marrow*. Exp Hematol, 2001. **29**(12): p. 1439-47.
64. Nagasawa, T., et al., *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 635-8.
65. Tachibana, K., et al., *The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 591-4.
66. Zou, Y.R., et al., *Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 595-9.
67. Ma, Q., et al., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9448-53.
68. Dorshkind, K., *Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products*. Annu Rev Immunol, 1990. **8**: p. 111-37.
69. Fuchs, E., T. Tumber, and G. Guasch, *Socializing with the neighbors: stem cells and their niche*. Cell, 2004. **116**(6): p. 769-78.

70. Wright, D.E., et al., *Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines*. J Exp Med, 2002. **195**(9): p. 1145-54.
71. Aiuti, A., et al., *The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood*. J Exp Med, 1997. **185**(1): p. 111-20.
72. Peled, A., et al., *Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4*. Science, 1999. **283**(5403): p. 845-8.
73. Broxmeyer, H.E., et al., *Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist*. J Exp Med, 2005. **201**(8): p. 1307-18.
74. Ma, Q., D. Jones, and T.A. Springer, *The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment*. Immunity, 1999. **10**(4): p. 463-71.
75. Egawa, T., et al., *The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor*. Immunity, 2001. **15**(2): p. 323-34.
76. Andre, F., et al., *Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer*. Ann Oncol, 2006. **17**(6): p. 945-51.
77. Kodama, J., et al., *Expression of the CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in human endometrial cancer*. Eur J Gynaecol Oncol, 2007. **28**(5): p. 370-5.
78. Kodama, J., et al., *Association of CXCR4 and CCR7 chemokine receptor expression and lymph node metastasis in human cervical cancer*. Ann Oncol, 2007. **18**(1): p. 70-6.
79. Masai, K., et al., *[mRNA expression of chemokine receptors in hepatic and pancreatic tumor cell lines]*. Gan To Kagaku Ryoho, 2004. **31**(8): p. 1261-3.

80. Schimanski, C.C., et al., *Chemokine receptor CCR7 enhances intrahepatic and lymphatic dissemination of human hepatocellular cancer*. *Oncol Rep*, 2006. **16**(1): p. 109-13.
81. Ding, Y., et al., *Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(9): p. 3406-12.
82. Gunther, K., et al., *Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expression of chemokine receptor CCR7*. *Int J Cancer*, 2005. **116**(5): p. 726-33.
83. Heresi, G.A., et al., *Expression of the chemokine receptor CCR7 in prostate cancer presenting with generalized lymphadenopathy: report of a case, review of the literature, and analysis of chemokine receptor expression*. *Urol Oncol*, 2005. **23**(4): p. 261-7.
84. Mori, T., et al., *Epigenetic up-regulation of C-C chemokine receptor 7 and C-X-C chemokine receptor 4 expression in melanoma cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(5): p. 1800-7.
85. Baekkevold, E.S., et al., *The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment*. *J Exp Med*, 2001. **193**(9): p. 1105-12.
86. Graham, D.Y., et al., *Epidemiology of Campylobacter pylori infection*. *Gastroenterol Clin Biol*, 1989. **13**(1 Pt 1): p. 84B-88B.
87. Graham, D.Y., et al., *Epidemiology of Campylobacter pylori infection: ethnic considerations*. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1988. **142**: p. 9-13.
88. Kist, M., *[Epidemiology and diagnosis of Helicobacter pylori infection]*. *Z Gastroenterol Verh*, 1991. **26**: p. 286-9.
89. Parsonnet, J., et al., *Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma*. *N Engl J Med*, 1994. **330**(18): p. 1267-71.
90. Dixon, M.F., *Helicobacter pylori and peptic ulceration: histopathological aspects*. *J Gastroenterol Hepatol*, 1991. **6**(2): p. 125-30.
91. Marshall, B.J., *Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis*. *Lancet*, 1983. **i**: p. 1273-1275.

92. Rauws, E.A., et al., *Campylobacter pyloridis-associated chronic active antral gastritis. A prospective study of its prevalence and the effects of antibacterial and antiulcer treatment.* Gastroenterology, 1988. **94**(1): p. 33-40.
93. Nomura, A., et al., *Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii.* N Engl J Med, 1991. **325**(16): p. 1132-6.
94. Wotherspoon, A.C., et al., *Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma.* Lancet, 1991. **338**(8776): p. 1175-6.
95. Eck, M., et al., *MALT-type lymphoma of the stomach is associated with Helicobacter pylori strains expressing the CagA protein.* Gastroenterology, 1997. **112**(5): p. 1482-6.
96. Marshall, B.J., et al., *Urea protects Helicobacter (Campylobacter) pylori from the bactericidal effect of acid.* Gastroenterology, 1990. **99**(3): p. 697-702.
97. Hessey, S.J., et al., *Bacterial adhesion and disease activity in Helicobacter associated chronic gastritis.* Gut, 1990. **31**(2): p. 134-8.
98. Cover, T.L. and M.J. Blaser, *Purification and characterization of the vacuolating toxin from Helicobacter pylori.* J Biol Chem, 1992. **267**(15): p. 10570-5.
99. Suzuki, H., et al., *Enhanced levels of chemiluminescence and platelet activating factor in urease-positive gastric ulcers.* Free Radic Biol Med, 1996. **20**(3): p. 449-54.
100. Eck, M., et al., *CXC chemokines Gro(alpha)/IL-8 and IP-10/MIG in Helicobacter pylori gastritis.* Clin Exp Immunol, 2000. **122**(2): p. 192-9.
101. Lee, J., et al., *Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors.* J Biol Chem, 1992. **267**(23): p. 16283-7.
102. Schumacher, C., et al., *High- and low-affinity binding of GRO alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10542-6.
103. Holmes, W.E., et al., *Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor.* Science, 1991. **253**(5025): p. 1278-80.

104. Crabtree, J.E., et al., *Interleukin-8 expression in Helicobacter pylori infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa*. J Clin Pathol, 1994. **47**(1): p. 61-6.
105. Yamaoka, Y., et al., *Helicobacter pylori cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa*. Gastroenterology, 1996. **110**(6): p. 1744-52.
106. Yamaoka, Y., et al., *Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive Helicobacter pylori strains*. Gut, 1997. **41**(4): p. 442-51.
107. Yamaoka, Y., et al., *Chemokines in the gastric mucosa in Helicobacter pylori infection*. Gut, 1998. **42**(5): p. 609-17.
108. Shimoyama, T., et al., *Chemokine mRNA expression in gastric mucosa is associated with Helicobacter pylori cagA positivity and severity of gastritis*. J Clin Pathol, 1998. **51**(10): p. 765-70.
109. Rokita, E., et al., *Purification of surface-associated urease from Helicobacter pylori*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2000. **737**(1-2): p. 203-12.
110. Phadnis, S.H., et al., *Surface localization of Helicobacter pylori urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis*. Infect Immun, 1996. **64**(3): p. 905-12.
111. Barrera, C., et al., *Expression of cathepsins B, L, S, and D by gastric epithelial cells implicates them as antigen presenting cells in local immune responses*. Hum Immunol, 2001. **62**(10): p. 1081-91.
112. Fan, X., et al., *The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of Helicobacter pylori and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage*. J Exp Med, 1998. **187**(10): p. 1659-69.
113. Beswick, E.J., et al., *The Helicobacter pylori urease B subunit binds to CD74 on gastric epithelial cells and induces NF-kappaB activation and interleukin-8 production*. Infect Immun, 2006. **74**(2): p. 1148-55.

114. Sharma, S.A., et al., *Activation of IL-8 gene expression by Helicobacter pylori is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells*. J Immunol, 1998. **160**(5): p. 2401-7.
115. Yamaoka, Y., D.H. Kwon, and D.Y. Graham, *A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 7533-8.
116. Odenbreit, S., et al., *Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1497-500.
117. Backert, S., et al., *Translocation of the Helicobacter pylori CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus*. Cell Microbiol, 2000. **2**(2): p. 155-64.
118. Selbach, M., et al., *Src is the kinase of the Helicobacter pylori CagA protein in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2002. **277**(9): p. 6775-8.
119. Higashi, H., et al., *Helicobacter pylori CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17205-16.
120. Crabtree, J.E., et al., *Mucosal IgA recognition of Helicobacter pylori 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology*. Lancet, 1991. **338**(8763): p. 332-5.
121. Xiang, Z., et al., *Helicobacter pylori: host responses in peptic ulceration*. Lancet, 1993. **341**(8849): p. 900-1.
122. Xiang, Z., et al., *Detection in an enzyme immunoassay of an immune response to a recombinant fragment of the 128 kilodalton protein (CagA) of Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1993. **12**(10): p. 739-45.
123. Covacci, A., et al., *Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of Helicobacter pylori associated with cytotoxicity and duodenal ulcer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(12): p. 5791-5.
124. Guillemin, K., et al., *Cag pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to Helicobacter pylori infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 15136-41.

125. Eck, M., et al., *Evaluation of Helicobacter pylori in gastric MALT-type lymphoma: differences between histologic and serologic diagnosis*. Mod Pathol, 1999. **12**(12): p. 1148-51.
126. Talley, N.J., et al., *Gastric adenocarcinoma and Helicobacter pylori infection*. J Natl Cancer Inst, 1991. **83**(23): p. 1734-9.
127. biogenex. [cited; Available from:
http://www.biogenex.com/int_doc/DS_English/932-IHCMANE.pdf.
128. Falush, D., et al., *Recombination and mutation during long-term gastric colonization by Helicobacter pylori: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15056-61.
129. Schmausser, B., et al., *Downregulation of CXCR1 and CXCR2 expression on human neutrophils by Helicobacter pylori: a new pathomechanism in H. pylori infection?* Infect Immun, 2004. **72**(12): p. 6773-9.
130. Samanta, A.K., J.J. Oppenheim, and K. Matsushima, *Interleukin 8 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils*. J Biol Chem, 1990. **265**(1): p. 183-9.
131. Chuntharapai, A. and K.J. Kim, *Regulation of the expression of IL-8 receptor A/B by IL-8: possible functions of each receptor*. J Immunol, 1995. **155**(5): p. 2587-94.
132. Khandaker, M.H., et al., *CXCR1 and CXCR2 are rapidly down-modulated by bacterial endotoxin through a unique agonist-independent, tyrosine kinase-dependent mechanism*. J Immunol, 1998. **161**(4): p. 1930-8.
133. Khandaker, M.H., et al., *Metalloproteinases are involved in lipopolysaccharide- and tumor necrosis factor-alpha-mediated regulation of CXCR1 and CXCR2 chemokine receptor expression*. Blood, 1999. **93**(7): p. 2173-85.
134. Doroshenko, T., et al., *Phagocytosing neutrophils down-regulate the expression of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2668-71.

135. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
136. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition*. Cell, 1997. **91**(3): p. 295-8.
137. Sabroe, I., et al., *Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span*. J Immunol, 2003. **170**(10): p. 5268-75.
138. Sabroe, I., et al., *Regulation of human neutrophil chemokine receptor expression and function by activation of Toll-like receptors 2 and 4*. Immunology, 2005. **115**(1): p. 90-8.
139. Amedei, A., et al., *The neutrophil-activating protein of Helicobacter pylori promotes Th1 immune responses*. J Clin Invest, 2006. **116**(4): p. 1092-101.
140. Zhao, Y., et al., *Helicobacter pylori heat-shock protein 60 induces interleukin-8 via a Toll-like receptor (TLR)2 and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway in human monocytes*. J Med Microbiol, 2007. **56**(Pt 2): p. 154-64.
141. Takenaka, R., et al., *Helicobacter pylori heat-shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured human gastric epithelial cells*. Microbiology, 2004. **150**(Pt 12): p. 3913-22.
142. Smith, M.F., Jr., et al., *Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for Helicobacter pylori-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 32552-60.
143. Mandell, L., et al., *Intact gram-negative Helicobacter pylori, Helicobacter felis, and Helicobacter hepaticus bacteria activate innate immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4*. Infect Immun, 2004. **72**(11): p. 6446-54.
144. Smith, J.M., et al., *CXCL12 activation of CXCR4 regulates mucosal host defense through stimulation of epithelial cell migration and promotion of*

- intestinal barrier integrity*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **288**(2): p. G316-26.
145. Powell, D.W., et al., *Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **289**(1): p. G2-7.
146. Le, Y., et al., *Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease*. Cell Mol Immunol, 2004. **1**(2): p. 95-104.
147. Banas, B., et al., *Roles of SLC/CCL21 and CCR7 in human kidney for mesangial proliferation, migration, apoptosis, and tissue homeostasis*. J Immunol, 2002. **168**(9): p. 4301-7.
148. Sallusto, F., et al., *Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation*. Eur J Immunol, 1998. **28**(9): p. 2760-9.
149. Means, T.K., et al., *The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells*. J Immunol, 2003. **170**(10): p. 5165-75.
150. Jarrossay, D., et al., *Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(11): p. 3388-93.
151. Amati, L., et al., *Toll-like receptor signaling mechanisms involved in dendritic cell activation: potential therapeutic control of T cell polarization*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(32): p. 4247-54.
152. Lehner, M., et al., *Efficient chemokine-dependent migration and primary and secondary IL-12 secretion by human dendritic cells stimulated through Toll-like receptors*. J Immunother (1997), 2007. **30**(3): p. 312-22.
153. Nencioni, A., et al., *Proteasome inhibitor bortezomib modulates TLR4-induced dendritic cell activation*. Blood, 2006. **108**(2): p. 551-8.
154. Schmausser, B., et al., *Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in Helicobacter pylori infection*. Clin Exp Immunol, 2004. **136**(3): p. 521-6.
155. Remoli, M.E., et al., *NF- κ B is required for STAT-4 expression during dendritic cell maturation*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 355-63.

Anhang 1: Chemokine und die zugehörigen Rezeptoren

Chemokin ^α	Systematischer Name ^α	Chromosome ^α	Zielzelle ^α	Rezeptor ^α
ELR-CXC^α				
IL-8 ^α	8 ^α	4 ^α	Neutrophil, basophil, T-cell ^α	CXCR1, 2 ^α
GRO ^α	1 ^α	4 ^α	Neutrophil ^α	CXCR2->>1 ^α
GROβ ^α	2 ^α	4 ^α	Neutrophil ^α	CXCR2 ^α
GROγ ^α	3 ^α	4 ^α	Neutrophil ^α	CXCR2 ^α
ENA-78 ^α	5 ^α	4 ^α	Neutrophil ^α	CXCR2 ^α
LDGF-PBP ^α	7 ^α	4 ^α	Fibroblast, neutrophil ^α	CXCR2 ^α
GCP-2 ^α	6 ^α	4 ^α	Neutrophil ^α	CXCR2 ^α
ELR-CXC^α				
PF4 ^α	4 ^α	4 ^α	Fibroblast ^α	Unknown ^α
Mig ^α	9 ^α	4 ^α	Activated T-cell ^α	CXCR3 ^α
IP-10 ^α	10 ^α	4 ^α	Activated T-cell (T _H 1 > T _H 2) ^α	CXCR3 ^α
SDF-1α/β ^α	12 ^α	10 ^α	CD34+ bone marrow cell, T-cell, dendritic cell, B-cell, naive B-cell, activated CD4 T-cell ^α	CXCR4 ^α
BUNZO/STRC33 ^α	16 ^α	17 ^α	T-cell, NK T-cell ^α	CXCR6 ^α
I-TAC ^α	11 ^α	4 ^α	Activated T-cell ^α	CXCR3 ^α
BLC/BCA-1 ^α	13 ^α	4 ^α	Naive B-cells, activated CD4 T-cells ^α	CXCR5 ^α
CC^α				
MIP-1α ^α	3 ^α	17 ^α	Monocyte/macrophage, T-cell (T _H 1 > T _H 2), NK-cell, basophil, immature dendritic cell, bone marrow cell ^α	CCR1, 5 ^α
MIP-1β ^α	4 ^α	17 ^α	Monocyte/macrophage, T-cell (T _H 1 > T _H 2), NK-cell, basophil, immature dendritic cell, bone marrow cell ^α	CCR1, 5 ^α
MDC ^α	22 ^α	16 ^α	Immature dendritic cell, IA-NK-cell, T-cell (T _H 2 > T _H 1), thymocyte ^α	CCR4 ^α
TECK ^α	25 ^α	19 ^α	Macrophage, thymocytes, dendritic cell ^α	CCR9 ^α
TARC ^α	17 ^α	16 ^α	T-cell (T _H 2 > T _H 1), immature dendritic cell, IA-NK-cell, T-cell (T _H 2 > T _H 1), thymocyte ^α	CCR4 ^α
RANTES ^α	5 ^α	17 ^α	Monocyte/macrophage, T-cell (memory T-cell > T-cell, T _H 1 > T _H 2), NK-cell, basophil, eosinophil, dendritic cell ^α	CCR1, 3, 5 ^α
HCC-1 ^α	14 ^α	17 ^α	Monocyte ^α	CCR1 ^α
HCC-4 ^α	16 ^α	17 ^α	Monocyte ^α	CCR1 ^α
DC-CK1 ^α	18 ^α	17 ^α	Naive T-cell > T-cell ^α	Unknown ^α
MIP-3α ^α	20 ^α	2 ^α	T-cell (memory T-cell > T-cell), peripheral blood mononuclear cell, bone marrow cell-dendritic cell ^α	CCR6 ^α
MIP-3β ^α	19 ^α	9 ^α	Naive T-cell, mature dendritic cell, B-cell ^α	CCR7 ^α
MCP-1 ^α	2 ^α	17 ^α	T-cell, monocyte, basophil ^α	CCR2 ^α
MCP-2 ^α	8 ^α	17 ^α	T-cell, monocyte, eosinophil, basophil ^α	CCR2 ^α
MCP-3 ^α	7 ^α	17 ^α	T-cell, monocyte, eosinophil, basophil, dendritic cell ^α	CCR2 ^α
MCP-4 ^α	13 ^α	17 ^α	T-cell, monocyte, eosinophil, basophil, dendritic cell ^α	CCR2, 3 ^α
° None ^α	12 ^α	(11) ^α	Eosinophil, monocyte, T-cell ^α	CCR2 ^α
Eotaxin ^α	11 ^α	17 ^α	Eosinophil ^α	CCR3 ^α
Eotaxin-2/MPIF-2 ^α	24 ^α	? ^α	T-cell (?), eosinophil, basophil ^α	CCR3 ^α
I-309 ^α	1 ^α	17 ^α	Neutrophil (TCA-3-only), T-cell ^α	CCR8 ^α
MIP-5/HCC-2 ^α	15 ^α	17 ^α	T-cell, monocyte, neutrophil (?), dendritic cell ^α	CCR1, 3 ^α
MPIF-1 ^α	23 ^α	17-(?) ^α	Monocyte, T-cell (resting), neutrophil (?) ^α	Unknown ^α
6CKine ^α	21 ^α	9 ^α	Naive T-cell, B-cell, mesangial cells (?) ^α	CCR7 ^α
CTACK ^α	27 ^α	9 ^α	T-cell ^α	CCR10 ^α
MEC ^α	28 ^α	5 ^α	T-cell, eosinophil ^α	CCR10, 3 ^α
C-and-CX3C^α				
Lymphotactin ^α	XCL-1 ^α	1-(1) ^α	T-cell, NK-cell ^α	XCR1 ^α
Fractalkine ^α	CX3CL-1 ^α	16 ^α	T-cell, monocyte, neutrophil (?) ^α	CX3CR1 ^α

^f ELR refers to the three amino-acids that precede the first-cysteine residue of the CXC motif. If these amino-acids are Glu-Leu-Arg (ie ELR*), then the chemokine is chemotactic for neutrophils while if they are not (ELR-) then the chemokine is chemotactic for lymphocytes.¶

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Matthias Eck für die Fragestellung, sowie für die Korrektur und Begutachtung der Arbeit. Bedanken möchte ich mich auch für die zuverlässige und vor allem geduldige Betreuung und Unterstützung während jeder Phase der Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Bernd Schmausser für die Einarbeitung in die Methoden, sowie die stete Bereitschaft für kreative Diskussion.

Besonderer Dank gilt Eva Bachmann, die mir durch ihren reichhaltigen Erfahrungsschatz durch die Tücken der Laborarbeit half.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Rosenwald für die Erstellung des Koreferats, sowie bei Frau Prof. Dr. Stopper für die Abhaltung der mündlichen Prüfung bedanken.

Bei allen anderen, nicht namentlich genannten Kollegen bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und das stets angenehme Betriebsklima.

Bei meinen Eltern, meinen Freunden, Robert Goldstein und meinem Bruder Jürgen möchte ich mich für die moralische Unterstützung bedanken.

Publikationen:

Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, Lee SK, Josenhans C, Müller-Hermelink HK, Eck M.:

Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection.

Clin Exp Immunol. 2004 Jun;136(3):521-6:

Schmausser B, Josenhans C, Endrich S, Suerbaum S, Sitaru C, Andrulis M, Brandlein S, Rieckmann P, Müller-Hermelink HK, Eck M.:

Downregulation of CXCR1 and CXCR2 expression on human neutrophils by *Helicobacter pylori*: a new pathomechanism in *H. pylori* infection?

Infect Immun. 2004 Dec;72(12):6773-9.

Schmausser B, Endrich S, Brändlein S, Schär J, Beier D, Müller-Hermelink HK, Eck M.

The chemokine receptor CCR7 is expressed on epithelium of non-inflamed gastric mucosa, *Helicobacter pylori* gastritis, gastric carcinoma and its precursor lesions and up-regulated by *H. pylori*.

Clin Exp Immunol. 2005 Feb;139(2):323-7.

Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, Müller-Hermelink HK, Eck M.:

Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*.

Int J Med Microbiol. 2005 Jun;295(3):179-85.

Schmaußer B, Endrich S, Beier D, Moran AP, Burek CJ, Rosenwald A, Rieckmann P, Müller-Hermelink HK, Eck M

Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) expression on gastric epithelium: implication for a role of TREM-1 in Helicobacter pylori infection.

Clin Exp Immunol. 2008 Apr;152(1):88-94.

Schollbrunn, den 20.09.2010

Simon Endrich