

Aus dem Pathologischen Institut  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Prof. Dr. med. H. K. Müller-Hermelink

Molekulare Analyse der variablen Immunglobulin-  
Schwerkettengene der intramukosalen B-Zellen von Patienten mit  
*Helicobacter pylori* Gastritis und Autoimmungastritis

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Otto J. Zimmermann  
aus Füssen

Würzburg, Mai 2004

**Referent:** Priv.-Doz. Dr. med. M. Eck

**Koreferent:** Prof. Dr. med. M. Scheurlen

**Dekan:** Prof. Dr. med. S. Silbernagl

**Tag der mündlichen Prüfung: 13.04.2005**

**Der Promovend ist Arzt**

# Inhaltsverzeichnis

|   | Seite |
|---|-------|
| 1. Einleitung   | 1     |
| 1.1. Einteilung der Gastritis   | 1     |
| 1.2. Helicobacter pylori Gastritis / Typ B-Gastritis                              | 1     |
| 1.2.1. Pathologie der Helicobacter pylori Gastritis                               | 1     |
| 1.2.2. Immunologie der Helicobacter pylori Gastritis                              | 3     |
| 1.3. Autoimmungastritis / Typ A-Gastritis   | 5     |
| 1.3.1. Pathologie der Autoimmungastritis  | 5     |
| 1.3.1. Immunologie der Autoimmungastritis   | 5     |
| 1.4. Rearrangement der B-Zell-Schwerketten-Gene                                   | 6     |
| 1.5. Fragestellung  | 7     |
| 2. Material und Methoden  | 9     |
| 2.1. Material   | 9     |
| 2.1.1. Arbeitsgeräte  | 9     |
| 2.1.2. Arbeitskits  | 9     |
| 2.1.3. Puffer und Lösungen  | 9     |
| 2.1.4. Nährmedien für Bakterien   | 10    |
| 2.1.5. Oligonukleotide  | 10    |
| 2.2. Methoden   | 11    |
| 2.2.1. DNA-Isolierung   | 11    |
| 2.2.2. DNA-Amplifikation durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)                 | 11    |
| 2.2.2.1. Optimierung der PCR  | 11    |
| 2.2.2.2. PCR mit VH-Familien Mix  | 12    |
| 2.2.2.3. VH-Familien-spezifische PCR  | 13    |
| 2.2.2.4. DNA-Fragmentextraktion aus dem Agarosegel                                | 14    |
| 2.2.2.5. Transformation und Klonierung  | 15    |
| 2.2.2.6. Minipräparation der Plasmid-DNA  | 15    |
| 2.2.2.7. Testverdau der Plasmid-DNA   | 16    |
| 2.2.2.8. DNA-Sequenzierung  | 16    |
| 2.3. Auswertungsprinzipien der Gensequenz der variablen Immunglobulin-Schwerkette | 18    |

|      |   |    |
|------|---|----|
| 3.   | Ergebnisse  | 19 |
| 3.1. | Histologische und immunhistochemische Charakterisierung der Gewebeprobe aus der Magenschleimhaut                                  | 19 |
| 3.2. | Analyse der variablen Immunglobulin-Schwerkettengene  | 22 |
| 3.3. | Aufstellung von genealogischen Stammbäumen der B-Zellklone in der <i>Helicobacter pylori</i> Gastritis und der Autoimmungastritis | 27 |
| 4.   | Diskussion  | 30 |
| 5.   | Zusammenfassung   | 33 |
| 6.   | Literaturverzeichnis  | 35 |

## 1. Einleitung

### *1.1. Einteilung der Gastritiden*

Die Gastritis ist ein häufiges und vielgestaltiges Krankheitsbild, das mit Abdominalschmerzen, Völlegefühl, Übelkeit und Erbrechen einhergehen kann. Dabei korreliert die klinische Symptomatik meist nicht mit den histologischen Gewebeeränderungen. So erfolgt die ätiologische Einteilung des Krankheitsbildes in Typ A, Typ B und Typ C Gastritis nicht nach klinischen Kriterien, sondern entsprechend des histologischen Befundes nach entnommener Magenbiopsie [1].

Die Typ A Gastritis oder auch Autoimmungastritis genannt ist auf das Corpus beschränkt und relativ symptomarm. Autoantikörper zerstören dort die Belegzellen und verursachen dadurch einen Mangel an Intrinsic Factor. Dies führt zu einem Vitamin B12 Mangel mit nachfolgender Ausbildung einer megaloblastären Anämie.

Die Typ B Gastritis wird durch eine Infektion mit *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) verursacht. Bakterielle Virulenzfaktoren und die Immunantwort des Wirtes bedingen eine chronische Entzündung, die zu einer Schädigung der Magenschleimhaut führen kann. Die Erkrankung kann lange asymptomatisch bleiben; kommt es jedoch zu Beschwerden, reichen diese von dyspeptischen Beschwerden bis hin zur Ulkuskrankheit oder Entstehung von Malignomen ( Magenkarzinom, MALT-Lymphom).

Die Typ C Gastritis ist eine durch Noxen verursachte Irritation der gastralen Schleimhaut oft mit begleitender oberflächlicher Erosion. Dabei gelten Alkoholabusus, nicht-steroidale Antiphlogistika, Nikotin und Streß sowie Reflux von Galle oder Pankreassekret als hauptsächliche Ursachen.

### *1.2. Helicobacter pylori Gastritis ( Typ B Gastritis )*

#### *1.2.1. Pathologie der chronisch aktiven Helicobacter pylori Gastritis*

Die durch *Helicobacter pylori* ( *H. pylori* ) ausgelöste Entzündungsreaktion führt zu einer chronisch aktiven Gastritis. Mit über 60 % ist die *H. pylori* Gastritis die häufigste

Form aller Gastritiden. Meist beginnt sie im Antrum und breitet sich mit zunehmender Dauer ins Corpus aus. Dabei korreliert das histopathologische Bild mit dem Grad der *H. pylori* Kolonisation [2].

Durch die bakterielle Besiedelung sezernieren die Epithelzellen und Makrophagen in der Magenmukosa die Chemokine Gro  $\alpha$  (growth-related oncogene  $\alpha$ ), IL8 sowie IP10 (IFN $\gamma$ -inducible protein 10) und MIG (monokine induced by IFN $\gamma$ ), die eine Chemotaxis weiterer inflammatorischer Zellen bewirken. So wird mit zunehmender Infektionsdauer die gesamte Schleimhaut in Form von Follikeln durchsetzt. Auch im Bereich der Basis der Foveolae, der Regenerationszone der Schleimhaut, befindet sich meist eine große Anzahl an Lymphozyten [12,13].

Sowohl Proteasen, Lipidmediatoren und freie Radikale der Entzündungszellen als auch die bakteriellen Toxine des *H. pylori* schädigen dann das Magenepithel. Dabei wird die Schleimhaut durch Regeneratepithel ersetzt, da die foveoläre Regeneration durch die Zellschädigung gestört ist. Dieser Prozeß führt zu einer Erosion und Ulzeration der Magenschleimhaut und erhöht die Häufigkeit einer intestinalen Metaplasie [3,12]. Nach und nach schwindet der Drüsenkörper und es kommt zur Schleimhautatrophie. Folge hiervon ist unter anderem eine Reduktion der Schleimproduktion.

*H. pylori* wird wahrscheinlich fäkal-oral oder oral-oral übertragen. Trotz einer oftmals hohen Durchseuchungsrate der über 50-jährigen Patienten bleiben die meisten Keimträger jedoch symptomlos [1,2].

*H. pylori* ist ein gramnegatives, begeißeltes Bakterium, welches im Magenumen der Schleimhaut aufsitzt. Durch die selbst produzierte Urease bildet das Bakterium Ammoniak und schafft sich somit im extrem sauren Milieu des Magens eine alkalische Mikro-Umgebung, in der es dauerhaft existieren kann.

Ein weiterer Virulenzfaktor des Bakteriums sind die Adhäsine, welche *H. pylori* befähigen, sich an das Epithel anzuheften. Von hier aus werden nun Zytotoxine freigesetzt [3,4]:

Vacuolisierendes Zytotoxin A (VacA) führt als eines der bedeutendsten Toxine zur Vakuolenbildung im Zytoplasma der Magenschleimhautzellen, als Ausdruck von gestörten intrazellulären Membranumbauvorgängen (membrane trafficking) [3,5].

Ein weiteres bedeutendes Toxin ist das Zytotoxin-assoziierte Protein A (CagA). Die genaue funktionelle Bedeutung des Proteins ist bisher noch nicht hinreichend erforscht. Jedoch scheint gesichert, daß CagA ein starkes Immunogen ist. Es wird daher als Marker in serologischen Untersuchungen zur Unterscheidung von CagA+ und CagA- Stämmen, die unterschiedliche Virulenz besitzen, eingesetzt. CagA ist an der Produktion von Interleukin 8 (IL8) beteiligt und steigert über die Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten die Gastritisaktivität [3,6].

Diese Zytotoxine werden jedoch nicht von allen *H. pylori* Stämmen gebildet, sodaß VacA+, VacA-, CagA+ und CagA- Stämme unterschieden werden können. Hinsichtlich der Virulenz spielen diese Toxine jedoch eine entscheidende Rolle, da VacA+ und CagA+ Stämme viel häufiger mit einer Ulkuskrankheit, der Entstehung von Magenkarzinomen oder MALT-Lymphomen verbunden sind als negative Stämme [7, 8].

### ***1.2.2. Immunologie der Helicobacter pylori Gastritis***

Wie bei jeder Infektion mit einem Bakterium reagiert der Wirt zunächst mit einer unspezifischen Immunantwort:

Die Adhäsion von *H. pylori* am Magenepithel führt zur Sekretion von H.P.-NAP (*H. pylori* neutrophil activating protein) und IL8 durch das Magenepithel. Diese Interleukine aktivieren die Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten. Die aktivierten neutrophilen Granulozyten exprimieren daraufhin CD11b und CD18, wodurch die Adhäsion an das Endothel der mukosalen Gefäße und der Austritt in die Magenmukosa beschleunigt wird.

Zusätzlich bewirken VacA und LPS in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten die Produktion von IL1 und TNF $\alpha$ , die über IL8 weitere Makrophagen und Granulozyten rekrutieren und somit die Immunantwort verstärken. Diese Immunreaktion regt nun TH1-Zellen an, TNF $\alpha$  und IL12 zu produzieren. TNF $\alpha$  führt dann zu einer unspezifischen Aktivierung von Phagozyten und zur spezifischen Aktivierung von TH1 Zellen, wohingegen IL12 die Differenzierung zu CD4+ T-Zellen anregt und die Aktivität der Natürlichen Killerzellen (NK) steigert [9,11,12].

Der unspezifischen Immunabwehr folgt die spezifische Abwehr. Jedoch handelt es sich bei *H. pylori* um einen Keim, der der Magenschleimhaut aufsitzt und keinen direkten Kontakt mit antigenpresentierenden Zellen (APZ) hat. Da es dennoch zu einer spezifischen Immunreaktion kommt, ist davon auszugehen, daß bakterielle Antigene entweder durch passive Absorption, Endozytose oder Passage durch „tight junctions“ in Kontakt mit den APZ treten. So konnte eine Aufnahme von bakterieller Urease in die Mukosa bereits nachgewiesen werden. Treten bakterielle Antigene vom Lumen in die Schleimhaut über, exprimieren die APZ das Molekül MHCII. Dies wird von TH1-Zellen erkannt, die daraufhin Zytokine wie Interferon  $\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ ) und Interleukine ausschütten. Diese Aktivierung geschieht ebenso direkt über die gastralen Epithelzellen, welche durch den direkten Kontakt zu den Bakterien und deren Virulenzfaktoren IL 12 und Interferon  $\gamma$  exprimieren und somit ohne Umwege über die klassischen APZ die Aktivierungskaskade der B-Zellen einleiten können.

Über IL 12,  $\text{IFN}\gamma$  sowie  $\text{TNF}\beta$  aus den  $\text{CD4}^+$  TH1-Zellen werden nun vor allem B-Zellen rekrutiert. Plasmazellen differenzieren aus und beginnen mit der Produktion von spezifischen Antikörpern des Typs IgA, IgG und IgM [9,11,12].

Dabei scheint *H. pylori* eine prädominante TH1-Antwort auszulösen, die nur unzureichend von der TH1-hemmenden TH2-Antwort kontrolliert wird. In Folge kommt es zu einer vermehrten  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion, was wiederum zu einer verstärkten Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten beiträgt. Deren Produkte wie Proteasen und Sauerstoffradikale führen dann zu einer nachhaltigen Schädigung der Magenschleimhaut [10].

Die zuvor beschriebenen Reaktionsabfolgen führen sowohl zur unspezifischen und spezifischen Abwehr von *H. pylori* als auch zur Entzündungsreaktion. Daß das Immunsystem im Falle der *H. pylori* Infektion jedoch nicht in der Lage ist, die Infektion wirksam zu bekämpfen, zeigt die folgende chronische Entzündung und die jahrelange Persistenz des Erregers. Dabei profitiert *H. pylori* zum einen von seiner exponierten Lage, welche eine direkte „Konfrontation“ mit immunkompetenten Zellen erschwert, sowie von der Entzündungsreaktion, welche das Nährstoffangebot durch die Hyperämie in der Magenschleimhaut erhöht [12].

Weiterhin wird diskutiert, ob *H. pylori*-spezifische Faktoren wie LPS eine Immunsuppression bewirken. So ist bereits ein zytoplasmatisches Protein beschrieben worden, das die mukosalen Monozyten inhibiert [3].

### *1.3. Autoimmungastritis ( Typ A Gastritis )*

#### *1.3.1. Pathologie der Autoimmungastritis*

Die Autoimmungastritis entwickelt sich als autoimmune Entzündung meist im 60. bis 70. Lebensjahr und macht 3-4 % aller Gastritiden aus. Im Corpus kommt es durch eine Entgleisung des Immunsystems zur Infiltration von Lymphozyten, die zur Atrophie des Drüsenkörpers mit gleichzeitiger Ausbildung einer intestinalen Metaplasie führt. In bis zu 90 % der Fälle können Antikörper gegen die Protonenpumpe der Belegzellen und in bis zu 70 % Antikörper gegen den Intrinsic Factor nachgewiesen werden. So entsteht meist rasch eine Achlorhydrie mit reaktiver Hypergastrinämie und perniziöser Anämie. Die Hypergastrinämie regt die in der Magenschleimhaut verteilten enterochromaffinen Zellen zur Proliferation an. Auf diese Weise kommt es bei ca. 5 % der Patienten mit Autoimmungastritis zur Entstehung von Karzinoiden.

Bei zusätzlichem Mangel an Vitamin B<sub>12</sub> sind neurologische Störungen möglich. Eine Assoziation kann mit anderen Autoimmunkrankheiten wie Thyreoiditis Hashimoto, Morbus Addison oder Diabetes mellitus bestehen [1,2].

#### *1.3.2. Immunologie der Autoimmungastritis*

Grundsätzlich läuft eine Autoimmunreaktion nach dem gleichen Schema ab wie eine Reaktion gegen ein exogenes Antigen. Jedoch scheint die hemmende Kontrolle des Thymus über die dort gereiften Lymphozyten gestört zu sein. So wurde bei am dritten Lebenstag thymektomierten Mäusen eine signifikant erhöhte Inzidenz für Autoimmun-erkrankungen festgestellt. Gründe hierfür können genetischer oder hormoneller Natur sein. Kreuzreagierende Antikörper oder ein Defekt im Idiotyp-Anti Idiotyp Netzwerk spielen ebenfalls eine Rolle. Im Falle der Autoimmungastritis, bei der die H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-

ATPase der Belegzellen das Autoantigen darstellt, wird folgendes Szenarium diskutiert [1,14]:

Spezifische Th<sub>1</sub>-Effektor Zellen mit zytotoxischem Potential werden aktiviert, die durch Sekretion von IFN $\gamma$  Makrophagen NK-Zellen und B-Lymphozyten aktivieren und letztere zur Produktion von IgM, IgG und IgA gegen die mukosale Protonenpumpe anregen. Ebenso wurde gezeigt, daß diese Autoimmunzellen die spezielle Fähigkeit besitzen IFN $\gamma$  zu sezernieren. Dies wiederum fördert die Expression von MHCII Molekülen auf den Epithelzellen der Magenmukosa. Hierdurch differenzieren weitere T-Zellen zu T-Effektor-Zellen aus, die wiederum über eine Stimulation der B-Zellen die Produktion von Immunglobulinen gegen Autoantigene der Epithelzellen bewirken [15].

#### *1.4. Grundlagen des Rearrangements der B-Zell-Schwerketten*

Sowohl die variable Region der schweren als auch der leichten Ketten eines Immunglobulinmoleküls wird durch die Rekombination auf genomischer Ebene erzeugt. Das Grundprinzip besteht darin, daß unterschiedliche Gensegmente des Typs V<sub>H</sub>, D und J<sub>H</sub>, die gemeinsam auf Chromosom 14 lokalisiert sind, durch genomische Rekombination zu einer sogenannten variablen Region verbunden werden. Alle drei Segmenttypen liegen als Cluster in der Reihenfolge V<sub>H</sub>, D und J<sub>H</sub> im Bereich 14q23. Dieser Abschnitt umfaßt ungefähr 2 Mb. Der Mensch besitzt neben 51 funktionellen V<sub>H</sub>-Gensegmenten, die sich in sieben verschiedene V<sub>H</sub>-Familien auf Grund ihrer Homologien unterteilen lassen, 27 D- und 6 J<sub>H</sub>-Segmente. Jedes Segment eines Typs kann nun mit jedem beliebigen Segment der beiden anderen Segmenttypen rekombiniert werden. Dies hat zur Folge, daß viele, in ihrer variablen Region unterschiedlichen, Immunglobulinmoleküle ( $10^{23}$ ) generiert werden können, und somit die Voraussetzung geschaffen ist, daß eine sehr große Anzahl unterschiedlicher Antigene von B-Zellen über ihren Rezeptor erkannt werden.

Dabei wird im ersten Schritt mit Hilfe des Enzyms VDJ-Rekombinase, welches einen Komplex aus Schneide- und Reparaturenzymen darstellt, ein D-Fragment an ein J<sub>H</sub>-Fragment rekombiniert [25,26,27]. Daraus entsteht ein DJ<sub>H</sub>-Fragment, wobei die verbleibenden D- und J<sub>H</sub>-Fragmente verloren gehen. Daraufhin wird das DJ<sub>H</sub>-Fragment mit einem V<sub>H</sub>-Fragment verknüpft und die B-Zelle erhält somit eine fertige variable

Region der schweren Kette. Bei beiden Rekombinationsvorgängen werden auf Grund des Rekombinationsmechanismus noch sogenannte N-Nukleotide eingefügt, welche die Diversität der Antigenbindungsstelle zusätzlich erhöhen. Dieser  $V_HDJ_H$ -Bereich stellt den sogenannten „Fingerabdruck“ einer jeden B-Zelle dar. Nur B-Zellen, die sich aus dieser Zelle entwickeln, weisen dieselbe Sequenz auf.

Das bei der Rekombination entstandene  $V_HDJ_H$ -Exon unterteilt sich auf DNA-Sequenzebene in vier Framework-Regionen FR I – FR IV und drei CDR-Regionen (complementary determining region) [28]. Dabei kodieren die FR-Regionen für das Gerüst der variablen Region der schweren Kette und die CDR-Regionen für die Antigenbindungsstelle. Dies wird auch deutlich, wenn in der fortschreitenden B-Zell-Entwicklung somatische Mutationen und Hypermutationen in der variablen Region auftreten. Diese Mutationen und die damit verbundenen Änderungen in der Aminosäuresequenz akkumulieren sich in den CDR-Regionen, was eine Veränderung in der Antigenbindungsspezifität des jeweiligen Immunglobulinmoleküls zur Folge hat. Die Framework-Regionen hingegen mutieren meist nur unwesentlich. Anhand der Mutationsanalysen der variablen Region der schweren Kette kann man den Differenzierungsgrad einer B-Zelle bestimmen. Liegt die variable Region, v.a. das  $V_H$  – Segment noch in der Keimbahnkonfiguration vor, so hat noch keine Affinitätsreifung der B-Zelle im Keimzentrum auf Grund von Antigenkontakt stattgefunden. Mutationen in der CDR-Region deuten auf vergangenen Antigenkontakt hin, wobei es sich um eine Keimzentrums-B-Zelle oder eine Post-Keimzentrums-B-Zelle handeln kann. Bei ersteren ist der Mutationsprozeß noch im Gang, wohingegen dieser bei der letzteren abgeschlossen ist.

### *1.5. Fragestellung*

Bisher wurden Typ A- und Typ B-Gastritis für zwei verschiedene Krankheitsentitäten mit unterschiedlicher Pathogenese gehalten. In letzter Zeit gibt es einige Hinweise auf eine Überschneidung der Pathogenese dieser Gastritis-Entitäten. So wurden in 50 – 90 % der Autoimmungastritiden Antikörper gegen *Helicobacter pylori* gefunden. Daraus könnte man schließen, daß ein Großteil der Typ A-Gastritis Patienten mit *H. pylori* infiziert war, bevor die Atrophie der Schleimhaut zur Elimination der Erreger geführt

hat [16,17,18,19]. Auch konnte in einer Studie gezeigt werden, daß Patienten mit jahrelang bestehender *H. pylori* Gastritis Anti-Parietalzellantikörper entwickelten [20]. Folgende Hypothesen für eine Überschneidung der Pathomechanismen zwischen Typ A- und Typ B-Gastritis werden diskutiert:

1. Die *H. pylori* Infektion verursacht ein molekulares Mimikry der Antikörper, die sich gegen den Wirt richtet. Diese Theorie beruht auf der Beobachtung, daß die Blutgruppenantigene Lewis x und y sowohl bei den meisten *H. pylori* Stämmen als auch bei gastralen Muzinen sowie bei der  $H^+/K^+$ -ATPase vorhanden sind. Jedoch konnte diese Theorie nur im Tierversuch bestätigt werden, wohingegen beim Menschen diese Immunreaktion unabhängig von *H. pylori* zu sein scheint [21,22].
2. Die lymphatischen Infiltrate der *H. pylori* Gastritis lösen über Zytokine eine Expression von MHCII Molekülen an den gastralen Epithelzellen und von CD80 und CD86 an T-Lymphozyten aus. Dies geschieht durch bakterielle Toxine, die in der Schleimhaut eine vermehrte Sekretion von IL8 hervorrufen. Dadurch werden Granulozyten und Makrophagen aktiviert, die nun IL2, IL12 und  $IFN\gamma$  ausschütten. IL2 rekrutiert weitere Granulozyten und Lymphozyten, IL12 stimuliert TH1-Lymphozyten, während  $IFN\gamma$  die Expression von MHCII-Molekülen auf den Magenepithelzellen induziert. Zusammen mit den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 der T-Lymphozyten könnte somit eine Stimulation von autoreaktiven T- und B-Lymphozyten erfolgen [11,16,23,24].

Ausgehend von der überschneidenden Rolle der B-Zellen bei diesen beiden Krankheitsbildern, soll in der nachfolgenden Arbeit eine molekulare Analyse der variablen Immunglobulin-Schwerkettengene der intramukosalen B-Zellen von Patienten mit *H. pylori* Gastritis und Autoimmungastritis erfolgen. So soll die Hypothese, wonach eine durch *H. pylori* getriggerte Supermutation der B-Zellen im Laufe einer *H. pylori* Infektion zur Autoimmungastritis führt, auf molekulargenetischer Ebene überprüft werden. Dabei ist es Ziel, genealogische Stammbäume der B-Zellklone in diesen beiden Erkrankungen zu finden. Der intraindividuelle Vergleich der B-Lymphozytenklone zwischen Antrum und Corpus soll zusätzlich Aufschlüsse über die Kompartimentierung der B-Zellreifung und somit über eine mögliche Migration der Lymphozyten in der Magenmukosa geben.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Arbeitsgeräte:

|                          |                                 |
|--------------------------|---------------------------------|
| Thermoblock:             | Eppendorf Thermomixer compact   |
| Thermoschüttler:         | Eppendorf Thermomixer compact   |
| PCR-Maschine:            | Eppendorf Mastercycler gradient |
| Zentrifuge:              | Eppendorf Centrifuge 5415 C     |
| Pipetten:                | Eppendorf                       |
| Videoauswerteeinheit:    | MWG                             |
| UV-Schirm:               | UVT 20M/W                       |
| Gelelektrophoresekammer: | GNA 100 und GNA 200             |
| Powersupply:             | EPS 200 und GPS 200/400         |
| Waage:                   | Satorius excellence             |

#### 2.1.2. Arbeitskits

Quiagen II Gelextraction Kit 150 for TAE  
 Invitrogen TOPO TA Cloning Kit for sequencing Version E  
 Invitrogen „One shot“ pre aliquoted competent E.coli  
 PE Biosystems DNA-Sequencing Kit Dye Terminator Cycle Sequencing  
 Amersham Pharmacia Sephadex™ G 25

#### 2.1.3. Allgemeine Puffer und Lösungen

|                 |   |
|-----------------|---|
| Proteinase K:   | Solution in 10 mM Tris HCl; pH 7,5 von Rochè  |
| Higushi Puffer: | 50 mM KCl; 10 mM Tris HCl, pH 8,3; 25 mM MgCl <sub>2</sub> ;<br>0,1 mg/ml Gelatine; 0,45 % Nonided P40; 0,55 % Tween 20 |
| Taq Polymerase: | Ampli Taq Gold™; 5 U/μl von Applied Biosystems  |

|                 |   |
|-----------------|---|
| 10x TBE:        | 0,9 M Tris-Cl; 20 mM EDTA pH 8,0; 0,9 M Borsäure  |
| 10x TAE:        | 2 M Tris-acetat; 0,1 M EDTA pH 7,7  |
| Ethidiumbromid: | 40 mg/ml in H <sub>2</sub> O  |
| Blaupuffer:     | 100 mM EDTA pH 8,0; 50 % (w/v) Glycerin; 1 % (w/v) SDS;<br>0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,2 % (w/v) Xylencyanol |
| GET:            | 50 mM Glukose; 10 mM EDTA pH 8,0; Tris pH 8,0   |
| Lysispuffer:    | 0,2 M Na OH; 1% SDS   |
| K-Acetat:       | pH 4,8  |
| Low TE:         | 10 mM Tris HCl; pH 8.0; 0,1 mM EDTA   |
| Auftragspuffer: | Formamid und 50 mM EDTA im Verhältnis 5:1   |

#### ***2.1.4. Nährmedien für Bakterien***

|                            |   |
|----------------------------|---|
| Miller`LB-Boullion Basis:  | 10 g/l SelectPepton (GIBCO BRL, Eggstein)<br>5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl |
| Ampicillin:                | 50 mg/ml in H <sub>2</sub> O  |
| LB <sub>amp</sub> -Agar:   | LB-Medium mit 1,2 % Agar mit 100 µg/ml Ampicillin                           |
| LB <sub>amp</sub> -Medium: | LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin  |

#### ***2.1.5. Oligonukleotide***

V<sub>H</sub> 1-6 nach Campbell [29]

V<sub>H</sub> 1-6 nach Küppers [30]

J<sub>H</sub> a

J<sub>H</sub> b

T3

M13 forward

Eco RI

## *2.2. Methoden*

### *2.2.1. DNA-Isolierung aus Kryostat- Gewebe*

Von den jeweiligen Kryomaterialien der Magenschleimhautbiopsien wurden bei einer Schnitttemperatur von  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Kryotom 10 je  $5\text{ }\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt und in ein  $2\text{ ml}$  Reaktionsgefäß gebracht. Anschließend wurden  $5\text{ }\mu\text{l}$  Proteinase K sowie  $50\text{ }\mu\text{l}$  Higushi-Puffer hinzugegeben und über Nacht bei  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Schüttler inkubiert. Die Proteinase wurde dann bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$   $10\text{ min}$  im Thermoblock deaktiviert. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei  $10000\text{ U/min}$ ; die flüssige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß zur Weiterverarbeitung abpipettiert.

Die DNA-Probe wurde nun bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### *2.2.2. DNA-Amplifikation durch die Polymerasenkettenreaktion*

#### *2.2.2.1. Optimierung der PCR*

Zur Einstellung des Programms und der optimalen Reagenzkonzentrationen sowie zur späteren Positiv-Kontrolle wurde eine frisch entnommene, in flüssigem Stickstoff und später in Tissue-Tek eingebettete Tonsille verwendet. Die Tonsille war deutlich vergrößert, chronisch entzündet und tumorfrei. Die Isolierung der DNA erfolgte wie in 2.2.1. beschrieben, jedoch wurde auf Grund der hohen B-Zell-Dichte eine Verdünnungsreihe von 1:10, 1:30, 1:90, 1:270 und 1:840 hergestellt.

Vor der PCR der spezifischen  $V_{\text{H}}$ -Familien ( $V_{\text{H}}\ 1-6$ ) der schweren Immunglobulinkette wurden zunächst zur Funktionskontrolle die  $V_{\text{H}}$ -Primer als Mix verwendet, wobei sich die DNA-Konzentration von 1:270 als am günstigsten erwies. In beiden Fällen wurde eine PCR im „Nested“-Verfahren gewählt. Dieses Prozedere wurde in allen untersuchten Fällen durchgeführt.

### 2.2.2.2. PCR mit V<sub>H</sub>-Familien Mix

Zunächst mit V<sub>H</sub> 1- V<sub>H</sub> 6 Primern nach Campbell bei 61 °C sowie mit J<sub>H</sub> a Primer:

5 µl DNA  
 2,4 µl 10x PCR Puffer ohne MgCl<sub>2</sub>  
 4,5 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM  
 3,2 µl dNTP 10 mM (jedes dNTP 2,5 mM)  
 2,5 µl V<sub>H</sub> Primermix nach Campbell V<sub>H</sub> 1-6, je 2,5 pmol/µl  
 2,5 µl J<sub>H</sub> a Primer 15 pmol/µl  
 0,15µl Taq-Polymerase 5 U/µl  
 4,8 µl H<sub>2</sub>O

Die PCR erfolgte mit einer „Eppendorf Mastercycler gradient“ PCR-Maschine unter der Funktion Tube Control:

94 °C, 15:00  
 (94 °C, 1:00 / 61 °C, 1:00 / 72 °C, 1:50 ) x 34  
 72 °C, 10:00  
 4 °C, ∞

Aus diesem PCR-Produkt wurde nun 1µl entnommen und für die Nested-PCR verwendet. Nun wurden die etwas kürzeren V<sub>H</sub>-Primer nach Küppers im V<sub>H</sub>-Familien-Mix V<sub>H</sub> 1-6 verwendet sowie der J<sub>H</sub> b Primer.

5 µl DNA  
 2,4 µl 10x PCR Puffer ohne MgCl<sub>2</sub>  
 4,5 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM  
 3,2 µl dNTP 10 mM (jedes dNTP 2,5 mM)  
 2,5 µl V<sub>H</sub> Primermix nach Küppers V<sub>H</sub> 1-6, je 2,5 pmol/µl  
 2,5 µl J<sub>H</sub> b Primer 15 pmol/µl  
 0,15µl Taq-Polymerase 5 U/µl  
 4,8 µl H<sub>2</sub>O

Das Programm der PCR lautete:

94 °C, 15:00  
 (94 °C, 1:00 / 65 °C, 1:00 / 72 °C, 1:50 ) x 34  
 72 °C, 10:00  
 4 °C, ∞

Das fertige DNA-Produkt wurde nun, auf ein TBE-Gel mit 2,4 % Agarose aufgetrennt. Nach ca. 15 min bei 100-120 V in der Gelkammer wurden die Banden mit einer UV-Videoauswerteeinheit beurteilt. Als Größenstandard wurde eine 100 bp Leiter verwendet. Das erhaltene PCR-Produkt mit Küppers-Primern sollte eine Größe von ca. 300 bp aufweisen.

### 2.2.2.3. *V<sub>H</sub>-Familienspezifische PCR*

Der V<sub>H</sub>-Primer Mix durch die fallspezifischen V<sub>H</sub>-Familien Primer V<sub>H</sub> 1-6 ersetzt.

5 µl DNA  
 2,4 µl 10x PCR Puffer ohne MgCl<sub>2</sub>  
 4,5 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM  
 3,2 µl dNTP 10 mM (jedes dNTP 2,5 mM)  
 2,5 µl V<sub>H</sub> 1 (/2 /3 /4 /5 /6) nach Küppers, je 2,5 pmol/µl  
 2,5 µl J<sub>H</sub> a Primer 15 pmol/µl  
 0,15µl Taq-Polymerase 5 U/µl  
 4,8 µl H<sub>2</sub>O

Die Reaktion erfolgte mit folgendem Programm:

94 °C, 15:00  
 (94 °C, 1:00 / 61 °C, 1:00 / 72 °C, 1:50 ) x 34  
 72 °C, 10:00  
 4 °C, ∞

Aus diesem PCR-Produkt wurden nun wiederum 1  $\mu\text{l}$  in den Nested-Ansatz übertragen:

5  $\mu\text{l}$  DNA  
 2,4  $\mu\text{l}$  10x PCR Puffer ohne  $\text{MgCl}_2$   
 4,5  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  25 mM  
 3,2  $\mu\text{l}$  dNTP 10 mM (jedes dNTP 2,5 mM)  
 2,5  $\mu\text{l}$   $V_H$  1 (/2 /3 /4 /5 /6) nach Küppers, je 2,5 pmol/ $\mu\text{l}$   
 2,5  $\mu\text{l}$   $J_H$  b Primer 15 pmol/ $\mu\text{l}$   
 0,15  $\mu\text{l}$  Taq-Polymerase 5 U/ $\mu\text{l}$   
 4,8  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$

Die Annealingtemperatur variierte nun von 61 °C bei den  $V_H$  1 /2 /5 /6 Primern zu 65 °C bei den  $V_H$  3 /4 Primern:

94 °C, 15:00  
 (94 °C, 1:00 / 61 °C bzw. 65 °C, 1:00 / 72 °C, 1:50 ) x 34  
 72 °C, 10:00  
 4 °C,  $\infty$

Die Produktkontrolle geschah wie in 2.1.2.2., wobei sich nur bei  $V_H$  3 und  $V_H$  4 reproduzierbare Banden zeigten.

#### 2.2.2.4. DNA-Fragmentextraktion aus dem Agarosegel

Zur weiteren Verarbeitung wurden die PCR-Produkte von  $V_H$  3 und  $V_H$  4 über ein TAE-Gel bei 60V ca. 3h aufgetrennt und ausgeschnitten.

Für die Extraktion aus dem TAE-Gel wurde das „Quiagen II Gel-Extraktionskit 150 für TAE“ verwendet.

Zum ausgeschnittenen Gelstück wurde ca. das dreifache Gewicht Puffer QX1 zugegeben und bis zur Auflösung des Gels gevortext. Es wurden nun 10  $\mu\text{l}$  Quiagen II hinzupipettiert und 10 min bei 50 °C im Thermoblock inkubiert, wobei regelmäßig geschüttelt wurde.

Nach einer 30 sek Zentrifugation mit 14 000 U/min wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 500  $\mu\text{l}$  Puffer QX 1 resuspendiert. Nach erneuter 30 sek Zentrifugation mit 14000 U/min und Verwerfung des Überstandes wurde nun mit 500  $\mu\text{l}$  Puffer PE

resuspendiert, 30 sek zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die abwechselnde Suspension mit Puffer QX 1 und Puffer PE wurde insgesamt zweimal durchgeführt.

Nach dem Trocknen des Pellets wurde es in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, gevortext sowie 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Erneut wurde 30 sek bei 14 000 U/min zentrifugiert und der Überstand, in dem die DNA gelöst ist, in ein neues Reaktionsgefäß übertragen.

Die DNA wurde nun bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.2.5. Transformation und Klonierung in kompetenten *Escherichia coli* (*E. coli*)

Zur Klonierung wurde das „TOPO TA Cloning Kit for Sequencing Version E“ von Invitrogen verwendet.

Während die zu transformierenden *E. coli* auf Eis auftauten, wurde folgender TOPO-Mastermix erstellt und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert:

- 4 µl PCR-Produkt
- 1 µl Salzlösung
- 1 µl TOPO-Vektor

2 µl des Mastermix wurden dann zu den Bakterien pipettiert und vorsichtig suspendiert. Es folgte eine abwechselnde Inkubation von 10 min auf Eis, 30 sek im 42 °C Wasserbad und weiteren 2 min auf Eis. Nachdem 250µl SOC-Medium hinzugegeben wurden, wurde der Transformationsansatz 1h bei 37°C und 300 U/min geschüttelt.

10-20 µl der Lösung wurde anschließend auf zwei LB<sub>Amp</sub>-Agarplatten ausgestrichen und 17h bei 37 °C inkubiert.

Neun der so entstandenen Klonkolonien wurden nun mit einem sterilen Zahnstocher sowohl auf eine Sicherheits-LB<sub>Amp</sub>-Platte als auch in 3 ml LB<sub>Amp</sub>-Medium übertragen und wiederum bei 37 °C inkubiert und geschüttelt.

#### 2.2.2.6. Minipräparation der Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Aufreinigung wurden 2 ml aus der Übernachtskultur des LB<sub>Amp</sub>-Mediums entnommen und eine Minute bei 10 000U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen. Die Bakterien wurden in 100 µl GET aufgenommen und suspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lysispuffer

und mehrmaliger Invertierung ruhte die Lösung 5 min auf Eis. Nun wurden 150  $\mu\text{l}$  Kalium-Acetat hinzugegeben, erneut inkubiert und auf Eis 5 min inkubiert.

Nach zehnminütiger Auftrennung bei 14 000 U/min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß abgekippt. Dazu wurden nun 700  $\mu\text{l}$  100 % EtOH p.a. gegeben um die Plasmid-DNA auszufällen. Dies geschah bei mehrmaliger Invertierung und 10 min Inkubation bei Raumtemperatur. Nun wurde erneut 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das weitere Waschen erfolgte mit 400  $\mu\text{l}$  70 % EtOH p.a. bei Invertierung.

Im Thermoblock wurde das erhaltene DNA-Pellet bei 65 °C getrocknet und in 40  $\mu\text{l}$  Low TE mit RNase gelöst.

Die entstandene Lösung ist bei -20 °C lagerbar.

#### 2.2.2.7. Testverdau der Plasmid-DNA

Für den Testverdau aus der Minipräparation wurden 2  $\mu\text{l}$  aus der Low TE Lösung entnommen. Pro Ansatz wurde pipettiert:

|                     |                  |
|---------------------|------------------|
| 1 $\mu\text{l}$     | 10x Puffer       |
| 0,25 $\mu\text{l}$  | RNase            |
| 0,17 $\mu\text{l}$  | Eco RI           |
| 2 $\mu\text{l}$     | DNA              |
| ad 10 $\mu\text{l}$ | H <sub>2</sub> O |

Die Reaktion erfolgte in der PCR Maschine bei 37 °C für 3 h.

Zur anschließenden Sequenzierung wurden diejenigen Proben verwendet, bei denen sich im 2,4 % TBE Kontrollgel eindeutige Banden zeigten.

#### 2.2.2.8. Cyclesequencing der DNA

Zur Sequenzierreaktion wurde das „Dye Terminator Cycle Sequencing DNA Sequencing Kit“ von PE Biosystems verwendet und nachstehender Mix pipettiert:

6  $\mu$ l DNA  
6  $\mu$ l Sequenzierkitt  
0,2  $\mu$ l 10 pmol Primer  
7,8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Jede Probe wurde zwei Sequenzierreaktionen mit unterschiedliche Primern unterzogen, die das gewünschte DNA-Stück in entgegengesetzter Richtung ablesen. Diese Primer benötigten unterschiedliche Temperaturen:

T<sub>3</sub>-Primer 52 °C  
Primer M<sub>13</sub> forward 49 °C

Die beiden Reaktionsansätze durchliefen in der Eppendorf PCR-Maschine das Programm

(96 °C, 15s / 52 °C bzw. 49 °C, 15s / 60 °C, 4 min ) x 29  
4 °C,  $\infty$

Zur Aufreinigung des entstandenen Produkts wurde in einer Pipettenspitze eine Sephadex G25 in Low TE Säule erstellt. Diese Säule durchlief das Produkt in 3 min bei 3000 U/min, bevor es mit 2,5  $\mu$ l 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 130  $\mu$ l 100 % EtOH p.a. gemischt wurde. Die Probe ruhte nun 10 min auf Eis. Nach 20 min Pelletierung bei 14000 U/min wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 60  $\mu$ l 70 % EtOH p.a. gewaschen. Dieser Überstand wurde nach erneuter Zentrifugierung bei 14 000 U/min für 5 min entfernt und das Pellet bei 50 °C im Thermoblock gut getrocknet.

Die DNA wurde zum Auftragen auf das Sequenziergel in 3  $\mu$ l Auftragspuffer für Sequenziergel zur Denaturierung gelöst und bei 90 °C für 2 min inkubiert. Bis zum Laden des Sequenziergels stand die denaturierte Probe auf Eis.

### *2.3. Auswertung der variablen Immunglobulin-Schwerkettensequenzen*

Die aus der Sequenzierung erhaltenen  $V_H$ DJ-Sequenzen wurden mit Hilfe des Computerprogramms „DNAMAN“ Version 4.0 mit den bekannten Keimbahngenen verglichen und den entsprechenden Genloci zugeteilt. Das Segment mit der größten Homologie wurde für die weitere Auswertung verwendet. Anhand des genetischen Codes wurden nun die Mutationen der erhaltenen Sequenz gegenüber dem ähnlichsten Genlocus ermittelt und in „Silent-“ und „Replacement“-Mutation unterteilt.

Replacement-Mutationen sind Nucleotidaustausche innerhalb eines Triplets, die während der Proteinbiosynthese zur Anlagerung einer falschen Aminosäure führen. Findet sich jedoch eine Punktmutation bei einem Nucleotid eines Triplets, das nicht determinierend für eine korrespondierende Aminosäure ist, kommt es nicht zur Änderung der Aminosäuresequenz. Diese Mutation nennt man „silent“ [31].

Wie bereits im Absatz 1.5. erwähnt, kodieren die CDR-Regionen für die Bindungsstellen des Antigens und die FR-Regionen für das Gerüst der Antikörper. Da das Verhältnis zwischen Replacement- und Silent-Mutationen und dessen Verteilung innerhalb des  $V_H$ DJ-Exons eine Aussage über die Antigenselektion der B-Zelle und die daraus folgende Antikörperstruktur zulässt [27], wurde in dieser Arbeit der Quotient „replacement“ zu „silent“-Mutations (R/S) getrennt nach den verschiedenen CDR- und FR-Regionen erstellt. Dabei wurden die Mutationen einer jeden Region der einzelnen Klone einer Klongruppe addiert und dann das Verhältnis gebildet. Da die Division durch „0“ mathematisch nicht definiert ist, wurde, um ein breiteres Klonspektrum zur Verfügung zu haben, diese mathematische Operation mit „1“ gleichgesetzt. Dieses Vorgehen ist in der Literatur etabliert [32]. Ein interklonaler Vergleich aller R/S-Quotienten soll Unterschiede zwischen Antrum und Corpus sowie zwischen den Krankheitsbildern darlegen.

Das  $V_H$ -Gen-Repertoire unterschiedlicher Erkrankungen scheint nicht homogen zu sein. So beschreibt Hensel 1999 [33] eine Präferenz von  $V_{H3}$ -Genen in Milzresektaten von Patienten mit Magenkarzinomen, und Souto-Carneiro beschränkt sich in der Auswertung der  $V_H$ -Familien bei rheumatoider Arthritis auf  $V_{H1}$  und  $V_{H4}$  [34]. Ebenso

zeigt sich in unserer Arbeit eine starke Prädominanz der Familien V<sub>H</sub>3 und V<sub>H</sub>4, auf die sich in dieser Arbeit die weitere Auswertung beschränken soll.

In einigen Fällen gelang es Sequenzen des gleichen Genlocus in Antrum und Corpus zu isolieren und daraus genealogische Stammbäume eines B-Zell-Klons zu erstellen, wobei die Keimbahnklone aus Antrum und Corpus zusammengesetzt wurden. So konnte ein Migrationsverhalten der B-Zellen innerhalb der Magenschleimhaut untersucht werden.

### 3. Ergebnisse

#### *3.1. Histologische und immunhistochemische Charakterisierung der Gewebeproben aus der Magenschleimhaut*

Die beiden Patienten mit *H. pylori* Gastritis (2507/99 und 5270/99) zeigten sowohl im Antrum als auch im Corpus ein dichtes chronisches Entzündungsinfiltrat mit Nachweis von zahlreichen Plasmazellen und Lymphozyten. Als Ausdruck der Gastritisaktivität fanden sich neutrophile Granulozyten, die herdförmig auf das Magenepithel übergreifen. *Helicobacter pylori* war in der durchgeführten modifizierten Giemsa-Färbung reichlich nachweisbar.

Tab. 1: Klinische Daten der Studienpatienten

| Klon-Nr. | Patientenr. | Alter | Diagnose           | Geschlecht | Parietalzell-AK | sonstiges              |
|----------|-------------|-------|--------------------|------------|-----------------|------------------------|
| 1-6      | 2507/99     | 72    | H.p.-Gastritis     | weiblich   | negativ         |                        |
| 7-10     | 5270/99     | 53    | H.p.-Gastritis     | weiblich   | negativ         |                        |
| 11-17    | 2639/99     | 57    | Autoimmungastritis | weiblich   | positiv         | Hashimoto-Thyreoiditis |
| 18-22    | 23057/01    | 61    | Autoimmungastritis | weiblich   | positiv         | Karzinoid              |
| 23-24    | 23058/98    | 37    | Autoimmungastritis | männlich   | positiv         |                        |

Bei Patient 2507/99 zeigte sich das Bild einer gering antrumprädominanten *H. pylori* Gastritis, während es sich bei Patient 5270/99 um eine *H. pylori* assoziierte Pangastritis handelt. In der durchgeführten Immunhistochemie fanden sich sowohl im Antrum als auch im Corpus CD20+ B-Lymphozyten. Fig. 1a zeigt exemplarisch die *H. pylori*

Gastritis der Corpusschleimhaut des Patienten 2507/99. Die CD20-Immunhistochemie ist in Fig. 1b dargestellt.

Die Patienten 2639/99, 23057/01 und 23058/98 mit Typ A-Gastritis zeigten ein lichtmikroskopisch nahezu entzündungsfreies Antrum, das jedoch in der immunhistochemischen Färbung mit anti-CD20 ganz vereinzelt B-Lymphozyten erkennen lässt. Im Corpus fand sich hingegen eine mäßig bis deutliche chronische lymphozytenreiche Gastritis mit nahezu kompletter Atrophie des Drüsenkörpers, zum Teil mit intestinaler Metaplasie. Es handelt sich hierbei jeweils um eine corpusprädominante atrophische Gastritis. So zeigt exemplarisch Fig. 2a eine hochgradige Schleimhautatrophie der Magencorpusschleimhaut nahezu ohne nachweisbaren Drüsenkörper des Patienten 23057/01. Die Immunhistochemie mit den CD20-Antikörpern stellt die CD20+ B-Zellen in Fig. 2b dar.

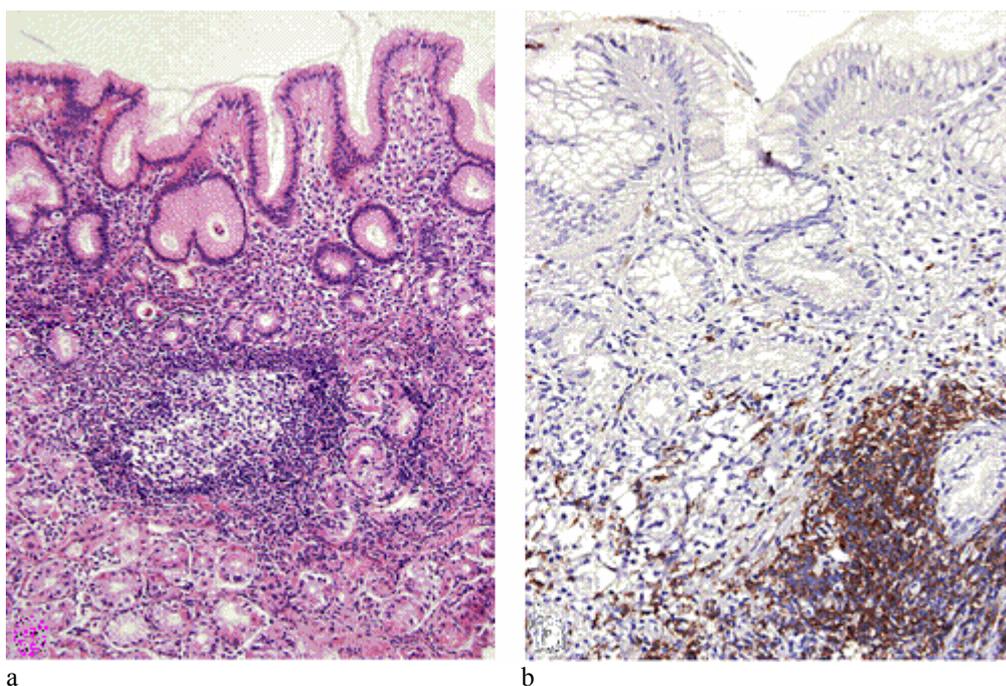


Fig. 1 (Patientennr: 2507/99) Abb. a: HE-Färbung der Magencorpusschleimhaut mit deutlicher lymphoplasmazellulärer Infiltration der Magenschleimhaut. Abb. b zeigt eine CD20-Immunhistochemie mit zahlreichen CD20+ B-Zellen in der Magenschleimhaut.

Alle drei Patienten zeigten im Serum Autoantikörper gegen Parietalzellen. Bei einem Patienten hatte sich bereits ein Karzinoid ausgebildet und Pat. 2639/99 wies als weiteres

Autoimmunphänomen eine Hashimoto Thyreoiditis auf. Bei Pat. 23058/01 wurde klinisch ein Vitamin-B12-Mangel mit Anämie nachgewiesen. Es handelt sich somit bei allen drei Patienten um eine Typ A-Gastritis.

Die genaue Graduierung der Entzündung mit histopathologischer Einteilung der Gastritis erfolgte gemäß der Sydney Klassifikation [35] (Tab. 2).

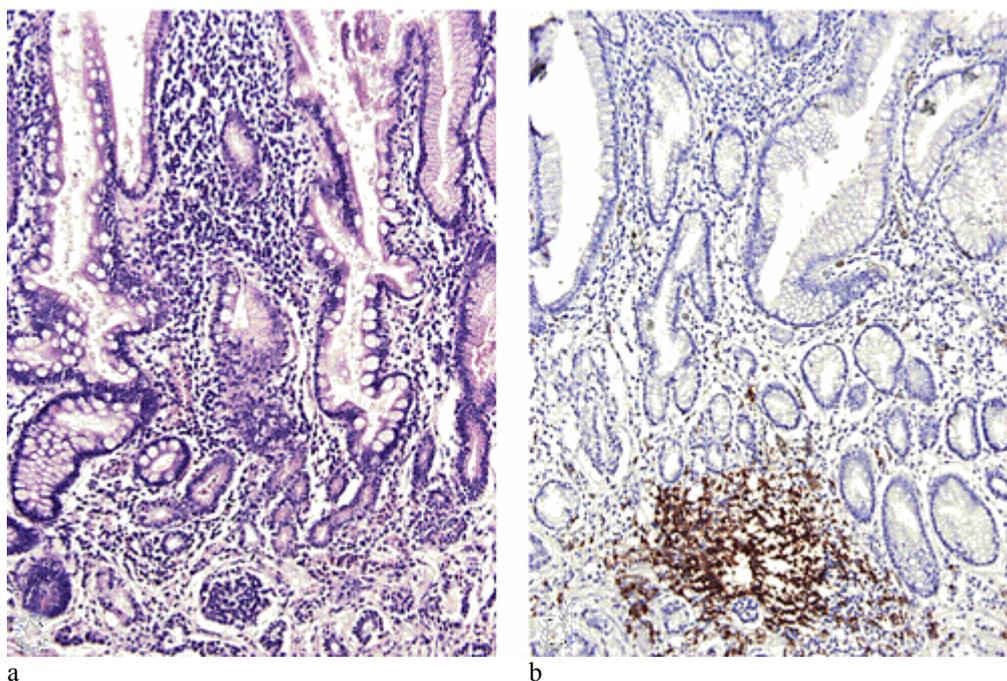


Fig. 2 ( Patientennr. 23057/01) Abb a: HE-Färbung mit deutlich chronischer Gastritis und Atrophie des Drüsenkörpers im Corpus. Abb. b: CD20-Immunhistochemie zum Nachweis von CD20+ B-Zellen. H. pylori ist nicht nachweisbar.

Tab. 2: Histopathologie der Magenschleimhautbiopsien nach der Sydney Klassifikation

| H.p.-Gastritis     |        | Chronizität | Aktivität | Atrophie | H.p. Besiedelung |
|--------------------|--------|-------------|-----------|----------|------------------|
| 2507/99            | Antrum | ++          | ++        | -        | +++              |
|                    | Corpus | +           | +         | -        | ++               |
| 5270/99            | Antrum | ++          | +         | -        | +++              |
|                    | Corpus | ++          | +         | -        | +++              |
| Autoimmungastritis |        |             |           |          |                  |
| 2639/99            | Antrum | (+)         | -         | -        | -                |
|                    | Corpus | ++          | -         | +++      | -                |
| 23057/01           | Antrum | (+)         | -         | -        | -                |
|                    | Corpus | ++          | -         | +++      | -                |
| 23058/98           | Corpus | +++         | -         | +++      | -                |

### 3.2. Analyse der variablen Immunglobulin-Schwerkettengene

Sowohl in der *H. pylori* Gastritis als auch in der Typ A-Gastritis findet sich im Antrum und im Corpus ein polyklonales Entzündungsinfiltrat mit Nachweis von Klonen sowohl aus der V<sub>H</sub>3- als auch aus der V<sub>H</sub>4-Familie. Die Homologie der B-Zellklone mit den bekannten Keimbahnsequenzen liegt bei der Typ B-Gastritis zwischen 89 % und 99,7%, bei der Typ A-Gastritis zwischen 88,9 % und 99,4 %.

Das Repertoire innerhalb der VH-Familien ist jedoch eingeschränkt. Vor allem in der Typ B-Gastritis findet sich eine Prädominanz der Genloci V<sub>H</sub>3 23\*01 und V<sub>H</sub>4 34\*02 im Antrum sowie im Corpus. Von den erhaltenen 33 Einzelklonen der Familie V<sub>H</sub>3 weisen 19 den Genlocus 23\*01 auf, bei V<sub>H</sub>4 enthalten 11 von 16 Einzelklonen den Genlocus 34\*02. Aus dem Rahmen fällt in dieser Betrachtung der Fall 5270/99, dessen Genloci V<sub>H</sub>3 15\*02 und V<sub>H</sub>4 31\*01 bei den anderen *H. pylori* Gastritiden nicht anzutreffen waren. V<sub>H</sub>4 31\*01 ist jedoch bei Patienten mit Autoimmungastritis vorhanden. In der Typ A-Gastritis ist ebenfalls der Genlocus V<sub>H</sub>3 23\*01 mit 17 von 26 Einzelklonen im Antrum wie im Corpus vorherrschend. Jedoch trifft sich hier in V<sub>H</sub>4 in allen Fällen und Biopsieorten der Genlocus 31\*01 (14 von 22 Einzelklonen). V<sub>H</sub>3 30.5\*01 ist in Fall 2639/99 im Antrum und Corpus zu finden. V<sub>H</sub>4 34\*03 ist im Fall 2639/99 im Corpus präsent und im Fall 23057/01 im Antrum präsent (siehe Tab. 3, 4).

Diese Restriktion auf relativ wenige Genloci ließe sich durch die von uns gewählte Methodik der DNA-Selektion erklären. So wurden nach der DNA-Amplifikation das DNA-Produkt auf einem TEA-Agarosegel aufgetrennt. Hier wurden nun zur Klonierung und anschließenden Sequenzierung nur die deutlich erkennbaren und reproduzierbaren Banden ausgewählt und entnommen. Diese Selektionskriterien könnten zur Unterdrückung anderer Genloci geführt haben.

In den Tabellen 3 und 4 wurde nun die Anzahl der Mutationen einer Klongruppe durch die Anzahl der Einzelklone dividiert, um den durchschnittlichen Wert der Mutationen der Einzelklone zu erhalten. Dieser bewegt sich bei der *H. pylori* Gastritis zwischen 0,5 und 28,5 Mutationen pro Einzelklon. Mit 1,3 bis 23,6 Mutationen pro Einzelklon ist die maximale Anzahl der Mutationen in der Autoimmungastritis niedriger als in der *H. pylori* Gastritis. Ebenso verhält es sich, wenn man isoliert die durchschnittlichen

Mutationen der CDR-Regionen betrachtet. So haben 70 % der Klongruppen in der *H. pylori* Gastritis über 10 Mutationen im Einzelklon, dem stehen 35 % in der Autoimmungastritis gegenüber. Somit ist die Mutationsanzahl in der Typ A Gastritis niedriger als in der Typ B Gastritis.

Desweiteren fällt auf, daß sich das hauptsächliche Mutationsgeschehen in den FR-Regionen abspielt, während die CDR-Regionen oftmals mutationsfrei bleiben. Hierbei fällt insbesondere die FR3-Region mit konstant hohen Mutationsraten bei beiden Krankheitsbildern auf.

Das Verhältnis von Replacement- zu Silent-Mutationen (R/S-ratio) innerhalb einer VH-Sequenz kann als Indikator für eine Antigenselektion angesehen werden. R/S-Werte über 2,9 in der CDR-Region werden dabei als Hinweis auf eine Antigenselektion interpretiert. Durch die Mutationen der CDR-Region erfährt die Antigenbindungsstelle der Antikörper eine Anpassung an das Antigen, was zur B-Zellreifung führt. Dadurch wird die Affinität erhöht. Das R/S-Verhältnis ist in der Regel in der FR-Region niedriger als in der CDR-Region. Diese werden als zufällige Mutationen diskutiert, die die Antikörperstruktur erhalten sollen [32].

Bei den *H. pylori* Gastritis Patienten stellte sich dementsprechend folgendes Bild dar: Addiert man die durchschnittliche Anzahl der Replacement- und Silent-Mutationen der Einzelklone getrennt nach CDR- und FR-Regionen und bildet den Quotienten R/S, findet man in der CDR-Region einen Quotienten von 1,1, in der FR-Region einen Quotienten von 2,7, also ein niedrigeres R/S-Verhältnis als 2,9 (Tab. 5, Fig. 3).

Betrachtet man die einzelnen VH-Regionen bei *H. pylori* Gastritis-Patienten, findet sich in der FR3-Region bei 5 von 11 Klongruppen (45,5 %) eine R/S-Ratio von über 2,9. In den Regionen CDR1, FR2 und CDR2 dagegen liegen die Werte meistens unterhalb des Grenzwertes 2,9. Vereinzelt jedoch sind auch hier Überschreitungen zu finden: Die Patientin 2507/99 (Klongruppe 4-6) entwickelte dabei im Corpus in CDR1 und CDR2 sowie in FR3-Region erhöhte R/S-Verhältnisse; im Antrum bewegte sich die R/S-Rate hingegen im allgemeinen auf niedrigerem Niveau. Vornehmlich mit Werten über 2,9 präsentiert sich die Patientin 5270/99 in den FR1- und FR2-Regionen [Tab. 3].

Auch bei der Autoimmungastritis findet sich bei den R/S-Verhältnissen im Bereich der FR-Regionen ein höherer Wert als in den CDR-Regionen. Werte über 2,9 kommen auch hier fast ausschließlich in der FR3-Region vor. Der Grenzwert von 2,9 wird in 33 % der

Fälle in der FR3-Region überschritten. Die Mutationsrate v.a. in der CDR2-Region erscheint niedrig. Einzige Ausnahme macht bei Patient 2639/99 die Klongruppe 17, die in CDR1 ein R/S von 6 aufweist [Tab. 4].

Tab. 3: B-Zell-Mutationen der H. pylori Gastritis dargestellt nach VH-Regionen.

| Patient            | Klongruppe<br>(Einzelklone) | Genlocus | Homologie % n ges. |     | CDR1  |        |      |      | CDR2  |        |      |      |     |
|--------------------|-----------------------------|----------|--------------------|-----|-------|--------|------|------|-------|--------|------|------|-----|
|                    |                             |          |                    |     | repl. | ø repl | sil. | R/S  | repl. | ø repl | sil. | R/S  |     |
| 2507/99 Antr. VH 3 | 1 (6)                       | 23*01    | 89,8               | 155 | 9     | 1,5    | 20   | 0,45 | 3     | 0,5    | 11   | 0,25 |     |
| 2507/99 Antr. VH 3 | 2 (2)                       | 30*01    | 99,7               | 1   | 0     | 0      | 0    | 1    | 0     | 0      | 0    | 1    |     |
| 2507/99 Antr. VH 4 | 3 (4)                       | 34*02    | 94,3               | 44  | 8     | 2      | 0    | 1    | 4     | 1      | 0    | 1    |     |
| 2507/99 Corp. VH3  | 4 (4)                       | 23*01    | 89,7               | 80  | 5     | 1,25   | 12   | 0,42 | 5     | 1,25   | 32   | 1,25 |     |
| 2507/99 Corp. VH3  | 5 (4)                       | 30.5*01  | 84                 | 136 | 16    | 4      | 4    | 4    | 20    | 5      | 4    | 5    |     |
| 2507/99 Corp. VH4  | 6 (4)                       | 34*02    | 88,8               | 86  | 0     | 0      | 0    | 1    | 24    | 6      | 4    | 6    |     |
| 5270/99 Antr. VH3  | 7 (8)                       | 15*02    | 89,6               | 180 | 24    | 3      | 16   | 0,75 | 32    | 4      | 8    | 4    |     |
| 5270/99 Antr. VH4  | 8 (5)                       | 31*01    | 98                 | 21  | 0     | 0      | 0    | 1    | 0     | 0      | 5    | 0    |     |
| 5270/99 Corp. VH3  | 9 (9)                       | 23*01    | 89,1               | 198 | 9     | 1      | 27   | 0,33 | 7     | 0,7    | 12   | 0,5  |     |
| 5270/99 Corp. VH4  | 10 (3)                      | 34*02    | 93,8               | 36  | 5     | 1,6    | 0    | 1    | 4     | 1,3    | 0    | 1    |     |
|                    |                             |          |                    |     | Σ     | 76     |      | 79   | 0,96  | 99     |      | 76   | 1,3 |

| Patient            | Klongruppe<br>(Einzelklone) | Genlocus | FR2   |        |      |      | FR3   |        |      |     | FR2+FR3    |              |             |
|--------------------|-----------------------------|----------|-------|--------|------|------|-------|--------|------|-----|------------|--------------|-------------|
|                    |                             |          | repl. | ø repl | sil. | R/S  | repl. | ø repl | sil. | R/S | repl. ges. | ø repl. ges. | ø ges. Mut. |
| 2507/99 Antr. VH 3 | 1 (6)                       | 23*01    | 26    | 4,3    | 13   | 2    | 59    | 9,8    | 14   | 4,2 | 97         | 16,1         | 25,8        |
| 2507/99 Antr. VH 3 | 2 (2)                       | 30*01    | 0     | 0      | 0    | 1    | 1     | 0,5    | 0    | 1   | 1          | 0,5          | 0,5         |
| 2507/99 Antr. VH 4 | 3 (4)                       | 34*02    | 8     | 2      | 0    | 1    | 24    | 6      | 0    | 1   | 44         | 11           | 11          |
| 2507/99 Corp. VH3  | 4 (4)                       | 23*01    | 12    | 3      | 8    | 1,5  | 32    | 8      | 8    | 4   | 54         | 13,5         | 28,5        |
| 2507/99 Corp. VH3  | 5 (4)                       | 30.5*01  | 4     | 1      | 12   | 0,33 | 52    | 13     | 24   | 2,2 | 92         | 23           | 34          |
| 2507/99 Corp. VH4  | 6 (4)                       | 34*02    | 8     | 2      | 9    | 0,9  | 33    | 8,25   | 8    | 4,2 | 65         | 16,3         | 84          |
| 5270/99 Antr. VH3  | 7 (8)                       | 15*02    | 24    | 3      | 8    | 3    | 37    | 4,6    | 31   | 1,8 | 127        | 14,6         | 23,7        |
| 5270/99 Antr. VH4  | 8 (5)                       | 31*01    | 0     | 0      | 5    | 0    | 11    | 2,2    | 0    | 1   | 11         | 2,2          | 4,2         |
| 5270/99 Corp. VH3  | 9 (9)                       | 23*01    | 30    | 3,3    | 12   | 2,5  | 80    | 8,9    | 19   | 4,1 | 126        | 14           | 21,7        |
| 5270/99 Corp. VH4  | 10 (3)                      | 34*02    | 7     | 2,3    | 1    | 7    | 17    | 5,6    | 2    | 9,3 | 43         | 14,3         | 15,3        |
|                    |                             |          | Σ     | 119    |      | 68   | 1,75  | 346    |      | 106 | 3,3        |              |             |

„n ges.“ steht für die Gesamtmutationsanzahl der Klongruppe, wobei mehrfache Mutationen pro Triplet als mehrfach gezählt wurden, „ø ges. Mut.“ steht für die durchschnittliche Mutationszahl pro Einzelklon. „repl.“ und „sil.“ repräsentieren die Replacementmutationen und Silentmutationen pro Klongruppe, „repl. ges.“ die Anzahl der Replacementmutationen in CDR und FR einer Klongruppe, „ø repl. ges.“ die durchschnittlichen Replacementmutationen pro Einzelklon.

Tab. 4: B-Zell-Mutationen der Autoimmungastritis dargestellt nach VH-Regionen.

| Patient            | Klongruppe<br>(Einzelklone) | Genlocus | Homologie % | n ges. | CDR1  |        |      |      | CDR2  |        |      |      |     |
|--------------------|-----------------------------|----------|-------------|--------|-------|--------|------|------|-------|--------|------|------|-----|
|                    |                             |          |             |        | repl. | ø repl | sil. | R/S  | repl. | ø repl | sil. | R/S  |     |
| 2639/99 Antr. VH3  | 11 (3)                      | 23*01    | 90          | 64     | 0     | 0      | 12   | 0    | 0     | 0      | 6    | 0    |     |
| 2639/99 Antr. VH3  | 12 (3)                      | 30.5*01  | 99,4        | 4      | 4     | 1,3    | 0    | 1    | 0     | 0      | 0    | 1    |     |
| 2639/99 Antr. VH4  | 13 (3)                      | 31*01    | 98          | 13     | 0     | 0      | 0    | 1    | 0     | 0      | 3    | 0    |     |
| 2639/99 Corp. VH3  | 14 (2)                      | 23*01    | 89,9        | 41     | 0     | 0      | 8    | 0    | 0     | 0      | 2    | 0    |     |
| 2639/99 Corp. VH3  | 15 (6)                      | 30.5*01  | 99,4        | 8      | 6     | 1      | 0    | 1    | 0     | 0      | 0    | 1    |     |
| 2639/99 Corp. VH4  | 16 (2)                      | 31*01    | 97,5        | 11     | 0     | 0      | 0    | 1    | 0     | 0      | 3    | 0    |     |
| 2639/99 Corp. VH4  | 17 (3)                      | 34*03    | 93,3        | 39     | 6     | 2      | 1    | 6    | 0     | 0      | 0    | 1    |     |
| 23057/01 Antr. VH3 | 18 (5)                      | 23*01    | 89,6        | 117    | 5     | 1      | 16   | 0,31 | 2     | 0,4    | 8    | 0,25 |     |
| 23057/01 Antr. VH4 | 19 (2)                      | 31*01    | 97,4        | 11     | 0     | 0      | 1    | 0    | 0     | 0      | 2    | 0    |     |
| 23057/01 Antr. VH4 | 20 (5)                      | 34*03    | 94,2        | 61     | 11    | 2,2    | 0    | 1    | 0     | 0,2    | 0    | 1    |     |
| 23057/01 Corp. VH3 | 21 (3)                      | 23*01    | 88,9        | 71     | 4     | 1,3    | 9    | 0,5  | 4     | 3      | 3    | 1,6  |     |
| 23057/01 Corp. VH4 | 22 (3)                      | 31*01    | 98,7        | 10     | 0     | 0      | 0    | 1    | 1     | 0,3    | 1    | 1    |     |
| 23058/98 Corp. VH3 | 23 (7)                      | 23*01    | 89,8        | 148    | 7     | 1      | 21   | 0,33 | 2     | 0,3    | 11   | 0,16 |     |
| 23058/98 Corp. VH4 | 24 (4)                      | 31*01    | 98,1        | 16     | 0     | 0      | 0    | 1    | 0     | 0      | 4    | 0    |     |
|                    |                             |          |             |        | Σ     | 43     |      | 46   | 0,93  | 9      |      | 43   | 0,2 |

| Patient            | Klongruppe | Genlocus<br>(Einzelklone) | FR2   |        |      |      | FR3   |        |      |      | ø repl. ges. ø ges. Mut. |      |      |
|--------------------|------------|---------------------------|-------|--------|------|------|-------|--------|------|------|--------------------------|------|------|
|                    |            |                           | repl. | ø repl | sil. | R/S  | repl. | ø repl | sil. | R/S  |                          |      |      |
| 2639/99 Antr. VH3  | 11 (3)     | 23*01                     | 9     | 3      | 6    | 1,5  | 23    | 7,6    | 8    | 2,1  | 32                       | 10,6 | 21,3 |
| 2639/99 Antr. VH3  | 12 (3)     | 30.5*01                   | 0     | 0      | 0    | 1    | 0     | 0      | 0    | 1    | 4                        | 1,3  | 1,3  |
| 2639/99 Antr. VH4  | 13 (3)     | 31*01                     | 0     | 0      | 3    | 0    | 7     | 2,3    | 0    | 1    | 7                        | 2,3  | 4,3  |
| 2639/99 Corp. VH3  | 14 (2)     | 23*01                     | 7     | 3,5    | 4    | 1,75 | 16    | 8      | 4    | 4    | 23                       | 11,5 | 20,5 |
| 2639/99 Corp. VH3  | 15 (6)     | 30.5*01                   | 2     | 0,3    | 0    | 1    | 0     | 0      | 0    | 1    | 8                        | 1,3  | 1,3  |
| 2639/99 Corp. VH4  | 16 (2)     | 31*01                     | 0     | 0      | 2    | 0    | 5     | 2,5    | 1    | 5    | 5                        | 2,5  | 5,5  |
| 2639/99 Corp. VH4  | 17 (3)     | 34*03                     | 9     | 3      | 0    | 1    | 11    | 3,6    | 12   | 0,9  | 26                       | 8,6  | 13   |
| 23057/01 Antr. VH3 | 18 (5)     | 23*01                     | 25    | 5      | 10   | 2,5  | 42    | 8,4    | 10   | 4,2  | 74                       | 14,8 | 23,6 |
| 23057/01 Antr. VH4 | 19 (2)     | 31*01                     | 0     | 0      | 2    | 0    | 6     | 3      | 0    | 1    | 6                        | 3    | 5,2  |
| 23057/01 Antr. VH4 | 20 (5)     | 34*03                     | 15    | 3      | 0    | 1    | 14    | 2,8    | 21   | 0,67 | 40                       | 8    | 12,2 |
| 23057/01 Corp. VH3 | 21 (3)     | 23*01                     | 9     | 3      | 7    | 1,3  | 25    | 8,3    | 10   | 2,5  | 42                       | 14   | 23,6 |
| 23057/01 Corp. VH4 | 22 (3)     | 31*01                     | 0     | 0      | 1    | 0    | 6     | 2      | 1    | 6    | 7                        | 2,3  | 3,1  |
| 23058/98 Corp. VH3 | 23 (7)     | 23*01                     | 21    | 3      | 14   | 1,5  | 58    | 8,2    | 14   | 4    | 88                       | 12,6 | 21,1 |
| 23058/98 Corp. VH4 | 24 (4)     | 31*01                     | 0     | 0      | 4    | 0    | 8     | 2      | 0    | 1    | 8                        | 2    | 4    |
|                    |            |                           | Σ     | 97     |      | 52   | 1,86  | 221    |      | 81   | 2,73                     |      |      |

„n ges.“ steht für die Gesamtmutationsanzahl der Klongruppe, wobei mehrfache Mutationen pro Triplet als mehrfach gezählt wurden, „ø ges. Mut.“ steht für die durchschnittliche Mutationszahl pro Einzelklon. „repl.“ und „sil.“ repräsentieren die Replacementmutationen und Silentmutationen pro Klongruppe, „repl. ges.“ die Anzahl der Replacementmutationen in CDR und FR einer Klongruppe, „ø repl. ges.“ die durchschnittlichen Replacementmutationen pro Einzelklon.

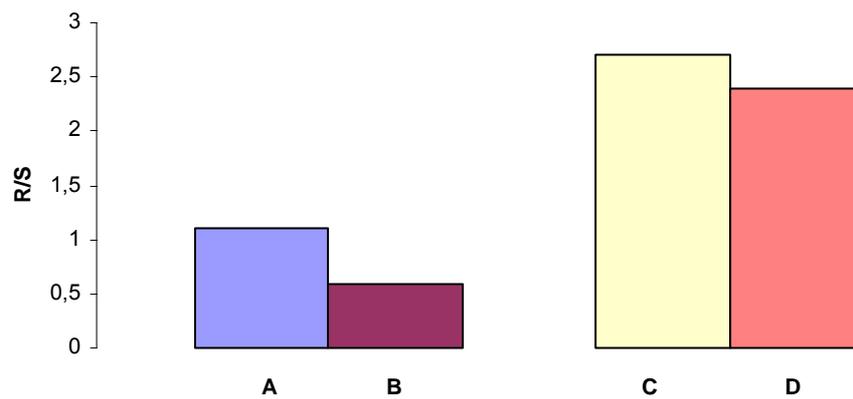
Tab. 5, Fig. 3: Mutationsanzahl und R/S-Quotient der B-Zellklone in den CDR1+2- sowie FR2+3-Regionen in *H. pylori* Gastritis und Typ A-Gastritis

Durchschnittliche Anzahl der Mutationen pro Klon in den CDR-Regionen

|                      |                |             |          |
|----------------------|----------------|-------------|----------|
| H. pylori Gastritis: | - Replacement: | 3,5         | <b>A</b> |
|                      | - Silent:      | 3,2         |          |
|                      | - R/S:         | <b>1,1</b>  |          |
| Autoimmungastritis:  | - Replacement: | 1           | <b>B</b> |
|                      | - Silent:      | 1,7         |          |
|                      | - R/S:         | <b>0,59</b> |          |

Durchschnittliche Anzahl der Mutationen pro Klon in den FR-Regionen

|                      |                |            |          |
|----------------------|----------------|------------|----------|
| H. pylori Gastritis: | - Replacement: | 9,5        | <b>C</b> |
|                      | - Silent:      | 3,5        |          |
|                      | - R/S:         | <b>2,7</b> |          |
| Autoimmungastritis:  | - Replacement: | 6,2        | <b>D</b> |
|                      | - Silent:      | 2,6        |          |
|                      | - R/S:         | <b>2,4</b> |          |



### 3.3. *Genealogische Stammbäume der B-Zellklone in H. pylori Gastritis und Autoimmungastritis*

Um Aufschlüsse über eine klonale Beziehung der B-Zellklone im Magenantrum und Corpus zu finden, wurde versucht die einzelnen Klone durch Stammbäume in Beziehung zu setzen. Zuerst wurde eine getrennte Auswertung von Antrum und Corpus vorgenommen. Dies war hier jedoch nur bedingt möglich, da einige intermediäre B-Zellklone fehlten. Deshalb wurden unter der Annahme der Wanderung der B-Zellen im Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT-System) bei der Aufstellung der Stammbäume alle Klone aus Antrum und Corpus eines Patienten berücksichtigt.

Bei einigen Patienten konnten zwei Klongruppen derselben Keimbahn in Antrum und Corpus ermittelt werden, so daß Klonbäume für die Autoimmungastritis und die *H. pylori* Gastritis erstellt werden konnten. Die zwei eindrucksvollsten Beispiele werden im Folgenden nun näher erläutert:

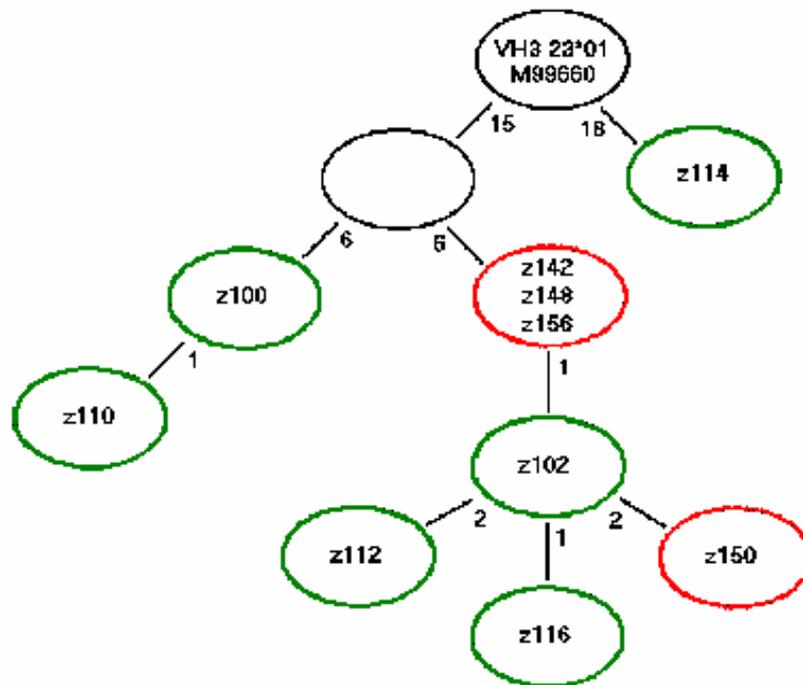
So entstammten beim Patienten 2507/99 mit *H. pylori* Gastritis die Klongruppen 1 und 4 aus der Keimbahn VH3 23\*01 (EMBL M99660) und setzen sich aus den Einzelklonen z100, z102, z110, z112, z114 und z116 (aus Corpus isoliert), bzw. aus z142, z148, z150 und z156 (aus Antrum isoliert) zusammen und bildeten zusammen einen komplexen Stammbaum (Fig. 4, Tab. 6). So scheinen hier die Klone z100, sowie z142, z148 und z156 von einem nicht isolierten gemeinsamen hypothetischen Mutterklon zu stammen, da sie ein sehr ähnliches Mutationsmuster aufweisen. Z100 unterscheidet sich von z142, z148 und z156 hauptsächlich in der CDR2-Region, wobei z100 bei Base 96 Thymin an Stelle von Cytosin steht. Diese Mutation ist bei z142, z148 und z156 nicht vorhanden. Umgekehrt verhält es sich bei Base 92. Hier wurde Guanin durch Adenin ersetzt. Bei z100 ist dort jedoch keine Veränderung zu erkennen.

Z102 scheint aus z142, z148 und z156 hervorzugehen. Dieser Klon wurde wiederum im Antrum gefunden und weist in FR3 an Base 131 den Basenaustausch Guanin gegen Cytosin auf. Dieser Klon dient als „Mutterklon“ für z112, z116 und den im Corpus isolierten Klon z150, die sich durch wenige verschiedene punktuelle Veränderungen gegenüber z102 auszeichnen (Fig. 4, Tab. 6).

Dieses Beispiel zeigt deutlich, daß B-Zellklone im Laufe ihrer Reifung durch die verschiedenen Kompartimente der Magenschleimhaut wandern.

Analog verhält es sich in der Autoimmungastritis im Fall 23057/01 (Klongruppe 19 und 22), wo aus dem Keimbahnklon VH4 31\*01 (EMBL: L10098) der im Corpus gefundene Klon z259 entspringt. Aus ihm entwickelte sich der Klon z266, der Nucleotidaustäusche am Basenpaar 173 und 189 aufweist. Ein weiterer Tochterklon ist z226, der bei Base 42 und 102 Cytosin mit Thymin, bei 163 Thymin mit Guanin ersetzte und bei Base 175 Guanin statt Thymin aufweist. Dabei wanderte Klon z226 in das Antrum. Seine zwei Tochterklone, z228 und z268, haben jeweils eine weitere Mutation in Position 3 und 98. z228 verblieb im Antrum, während z268 zurück ins Corpus wanderte (Fig. 5, Tab. 7). Ebenso konnten im Fall 23057/01 Klone des Genlocus VH3 23\*01 und im Fall 2507/99 Klone von VH4 34\*02 sowohl im Antrum als auch im Corpus isoliert werden. Auch dort ergibt sich das Bild eines systematischen Stammbaumes, wobei jedoch die kompartimentelle Verteilung der Klone weniger ausgeprägt ist.

Fig. 4: Klonaler Stammbaum des Falles 2507/99 VH3.



Der oberste schwarze, nummerierte Kreis stellt dabei die naive B-Zelle mit der Keimbahnconfiguration dar. Der leere schwarze Kreis steht für einen hypothetischen Klon. Die grün gekennzeichneten Klone stammen aus dem Antrum. Die Corpusklone sind rot markiert. In den Kreisen sind die Nummern der Einzelklone angegeben. Die Zahlen neben den Verbindungslinien geben die Anzahl der Nucleotidaustäusche an.

Tab. 6: Gensequenzen im Fall 2507/99 VH3 der Keimbahn VH3 23\*01.

|                           | CDR1        |            |             |             |             |             |             |             |             |    | FR2 |    |    |    |    |    |    |    |    |    | CDR 2 |    |    |    |    |    |    |  |  |  |
|---------------------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|----|----|--|--|--|
|                           | 10          | 20         | 30          | 40          | 50          | 60          | 70          | 80          | 90          | 10 | 20  | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 10 | 20 | 30    | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |  |  |  |
| EMBL : M99660 IGVH3-23*01 | GGATTCACCT  | TTAGCAGCTA | TGCCATGAGC  | TGGGTCCGCC  | AGGCTCCAGG  | GAAGGGGCTG  | GAGTGGGTCT  | CAGCTATTAG  | TGGTAGTGGT  |    |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |  |  |  |
| z100                      | -----T--T-  | -----T--A- | -----T----- |    |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |  |  |  |
| z110                      | -----T--T-  | -----T--A- | -----T----- |    |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |  |  |  |
| z114                      | -----T--T-  | -----T--A- | -----T----- |    |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |  |  |  |
| z142                      | -----T--T-  | -----T--A- | -----T----- |    |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |  |  |  |
| z148                      | -----T--T-  | -----T--A- | -----T----- |    |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |  |  |  |
| z156                      | -----T--T-  | -----T--A- | -----T----- |    |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |  |  |  |
| z102                      | -----CT--T- | -----T--A- | -----T----- |    |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |  |  |  |
| z112                      | -----CT--T- | -----T--A- | -----T----- |    |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |  |  |  |
| z116                      | -----T--T-  | -----T--A- | -----T----- |    |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |  |  |  |
| z150                      | A-----T--T- | -----T--A- | -----T----- |    |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |  |  |  |

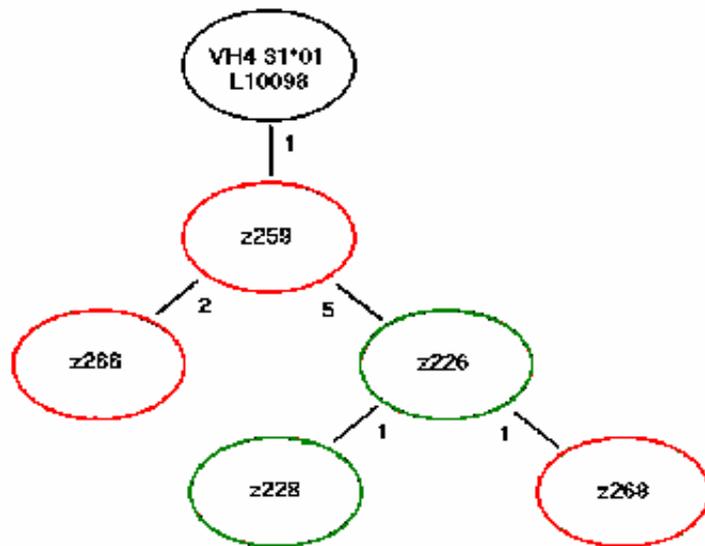
|                           | FR3        |            |            |             |             |             |            |            |             |  |
|---------------------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|--|
|                           | 100        | 110        | 120        | 130         | 140         | 150         | 160        | 170        | 180         |  |
| EMBL : M99660 IGVH3-23*01 | GGTAGCACAT | ACTACGCAGA | CTCCGTGAAG | GGCCGGTTCA  | CCATCTCCAG  | AGACAATTCC  | AAGAACACGC | TGTATCTGCA | AATGAACAGC  |  |
| z100                      | -----T--G  | -----T--G  | -----T--G  | -----A----- | -----T----- | -----T----- | -----C--G  | -----A--T  | -----T----- |  |
| z110                      | -----T--G  | -----T--G  | -----T--G  | -----A----- | -----G--T   | -----T----- | -----C--G  | -----A--T  | -----T----- |  |
| z114                      | -----T--G  | -----T--G  | -----T--G  | -----A----- | -----T----- | -----T----- | -----C--G  | -----A--T  | -----T----- |  |
| z142                      | -----A--G  | -----T--G  | -----T--G  | -----A----- | -----T----- | -----T----- | -----C--G  | -----A--T  | -----T----- |  |
| z148                      | -----A--G  | -----T--G  | -----T--G  | -----A----- | -----T----- | -----T----- | -----C--G  | -----A--T  | -----T----- |  |
| z156                      | -----A--G  | -----T--G  | -----T--G  | -----A----- | -----T----- | -----T----- | -----C--G  | -----A--T  | -----T----- |  |
| z102                      | -----A--G  | -----T--G  | -----T--G  | -----A----- | -----G--T   | -----T----- | -----C--G  | -----A--T  | -----T----- |  |
| z112                      | -----A--G  | -----T--G  | -----T--G  | -----A----- | -----G--T   | -----T----- | -----C--G  | -----A--T  | -----T----- |  |
| z116                      | -----A--G  | -----T--G  | -----T--G  | -----A----- | -----G--T   | -----T----- | -----C--G  | -----A--T  | -----T----- |  |
| z150                      | -----A--G  | -----T--G  | -----T--G  | -----A----- | -----G--T   | -----T----- | -----C--G  | -----A--T  | -----T----- |  |

|                           | 190        | 200        | 210        |          |
|---------------------------|------------|------------|------------|----------|
| EMBL : M99660 IGVH3-23*01 | CTGAGAGCCG | AGGACACGGC | CGTATATTAC | TGT      |
| z100                      | -----A--T  | -----T--T  | -----T--T  | -----T-- |
| z110                      | -----A--T  | -----T--T  | -----T--T  | -----T-- |
| z114                      | -----A--T  | -----T--T  | -----T--T  | -----T-- |
| z142                      | -----A--T  | -----T--T  | -----T--T  | -----T-- |
| z148                      | -----A--T  | -----T--T  | -----T--T  | -----T-- |
| z156                      | -----A--T  | -----T--T  | -----T--T  | -----T-- |
| z102                      | -----A--T  | -----T--T  | -----T--T  | -----T-- |
| z112                      | -----A--T  | -----T--T  | -----T--T  | -----T-- |
| z116                      | -----A--T  | -----T--T  | -----T--T  | -----T-- |
| z150                      | -----A--T  | -----T--T  | -----T--T  | -----T-- |

Die erste Zeile entspricht dem durch Sequenzvergleich identifizierten Keimbahnen. Die nachfolgenden Gensequenzen entsprechen den untersuchten Klonen. Die Nummern zu Beginn stehen für die Keimbahnbezeichnung und Bezeichnung der Einzelklone. Die Orte der Mutationen sind durch die entsprechenden Nukleotide gekennzeichnet.

Fig. 5: Klonaler Stammbaum des Falles 23057/01 VH4.



Der oberste schwarze, nummerierte Kreis stellt dabei die naive B-Zelle mit der Keimbahnconfiguration dar. Die grün gekennzeichneten Klone stammen aus dem Antrum. Die Corpusklone sind rot markiert. In den Kreisen sind die Nummern der Einzelklone angegeben. Die Zahlen neben den Verbindungslinien geben die Anzahl der Nukleotidaustausche an.

Tab. 7: Gensequenzen der Einzelklone im Fall 23057/01 VH4 der Keimbahn VH4 31\*01.

|               |             | CDR1        |            |            |            |             |            |            |            |            |    | FR2 |    |    |    |    |    |    |    |  |  |
|---------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|--|--|
|               |             | 10          | 20         | 30         | 40         | 50          | 60         | 70         | 80         | 90         | 10 | 20  | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |  |  |
| EMBL : L10098 | IGVH4-31*01 | GGTGGCTCCA  | TCAGCAGTGG | TGGTTACTAC | TGGAGCTGGA | TCCGCCAGCA  | CCCAGGGAAG | GGCCTGGAGT | GGATTGGGTA | CATCTATTAC |    |     |    |    |    |    |    |    |    |  |  |
|               | 2259        | -----       | -----      | -----      | -----      | -----       | -----      | -----      | -----      | -----      |    |     |    |    |    |    |    |    |    |  |  |
|               | 2266        | -----       | -----      | -----      | -----      | -----       | -----      | -----      | -----      | -----      |    |     |    |    |    |    |    |    |    |  |  |
|               | 2226        | -----       | -----      | -----      | -----      | -----       | -----      | -----      | -----      | -----      |    |     |    |    |    |    |    |    |    |  |  |
|               | 2228        | -----C----- | -----      | -----      | -----      | -----       | -----      | -----      | -----      | -----      |    |     |    |    |    |    |    |    |    |  |  |
|               | 2268        | -----       | -----      | -----      | -----      | -----T----- | -----      | -----      | -----      | -----      |    |     |    |    |    |    |    |    |    |  |  |

|               |             | CDR2        |             |            |             |            |            |            |             |             |     | FR3 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|---------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
|               |             | 100         | 110         | 120        | 130         | 140        | 150        | 160        | 170         | 180         | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |  |  |
| EMBL : L10098 | IGVH4-31*01 | AGTGGGAGCA  | CCTACTACAA  | CCCGTCCCTC | AAGAGTCTAG  | TTACCATATC | AGTAGACACG | TCTAAGAACC | AGTTCCTCCCT | GAAGCTGAGC  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|               | 2259        | -----       | -----       | -----      | -----G----- | -----      | -----      | -----      | -----       | -----       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|               | 2266        | -----       | -----       | -----      | -----G----- | -----      | -----      | -----      | -----       | -----G----- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|               | 2226        | -----       | -----       | -----      | -----G----- | -----      | -----      | -----      | -----G----- | -----A----- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|               | 2228        | -----       | -----T----- | -----      | -----G----- | -----      | -----      | -----      | -----G----- | -----A----- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|               | 2268        | -----A----- | -----T----- | -----      | -----G----- | -----      | -----      | -----      | -----G----- | -----A----- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |

|               |             | 190         | 200        | 210               |
|---------------|-------------|-------------|------------|-------------------|
| EMBL : L10098 | IGVH4-31*01 | TCTGTGACTG  | CCGCGGACAC | GGCCGTGTAT TACTGT |
|               | 2259        | -----       | -----      | -----             |
|               | 2266        | -----C----- | -----      | -----             |
|               | 2226        | -----       | -----      | -----             |
|               | 2228        | -----       | -----      | -----             |
|               | 2268        | -----       | -----      | -----             |

Die erste Zeile entspricht dem durch Sequenzvergleich identifizierten Keimbahngen. Die nachfolgenden Gensequenzen entsprechen den untersuchten Klonen. Die Nummern zu Beginn stehen für die Keimbahnbezeichnung und Bezeichnung der Einzelklone. Die Orte der Mutationen sind durch die entsprechenden Nukleotide gekennzeichnet.

## 4. Diskussion

Eine Analyse der  $V_H$ -Regionen der B-Zellen in der Magenschleimhaut bei Patienten mit *H. pylori* Gastritis und Autoimmungastritis ist in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Bisher wurde die molekulare Analyse der variablen Immunglobuline ( $V_H$ -Analyse) überwiegend bei Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis oder dem Morbus Sjögren der Speicheldrüse durchgeführt, wo sich zum Teil Hinweise auf eine klonale B-Zell-Selektion als Hinweis auf einen Antigen-getriggerten Prozeß

fanden [32,34,35]. Im Magen wurden die V<sub>H</sub>-Regionen bisher nur in neoplastischen B-Zellen wie dem MALT-Lymphom untersucht [36,38].

In der H. pylori Gastritis und der Autoimmungastritis besteht ein polyklonales B-Zellinfiltrat mit Nachweis der Familien V<sub>H</sub>3 und V<sub>H</sub>4 in Antrum sowie im Corpus, wie dies bei entzündlichen Prozessen im Gegensatz zum Magenlymphom zu erwarten ist. In beiden Erkrankungen fand sich eine Prädominanz der Genloci V<sub>H</sub>3 23\*01 und V<sub>H</sub>4 34\*02 in der H. pylori Gastritis sowie V<sub>H</sub>3 23\*01 und V<sub>H</sub>4 31\*01 in der Autoimmungastritis. Wesentliche Unterschiede im Verteilungsmuster der prädominanten Genloci zwischen Autoimmungastritis und H. pylori Gastritis waren nicht nachweisbar. Die Prädominanz bestimmter Genloci könnte methodisch bedingt sein: So könnte die Auswahl der erhaltenen Banden nach elektrophoretischer Auftrennung des DNA-Produktes nach der PCR-Amplifikation zu einer Selektion bestimmter Genloci geführt haben. Jedoch erleichtert dieser Ansatz das Aufstellen genealogischer Stammbäume.

Bei der Mutationsmuster-Analyse beider Krankheitsbilder fällt auf, daß jeweils die Anzahl der Mutationen in den FR-Regionen höher ist als in den CDR-Regionen. Insbesondere das R/S-Verhältnis ist in FR-Regionen höher als in CDR-Regionen. Mutationen in der FR-Regionen betreffen die Antikörperstruktur und nur Mutationen in den CDR-Regionen haben Einfluß auf die Antikörperbindungsstruktur. Dies lässt den Schluß zu, daß in beiden Gastritistypen zahlreiche zufällige Mutationen zur Modifikation der Antikörpertertiärstruktur stattfinden und nur relativ wenige Mutationen die Antigenbindungsstelle selbst betreffen.

Ist die R/S Ratio größer als 2,9, wird dies als Hinweis auf einen Antigen-getriggerten immunologischen Prozesses gedeutet [32]. Sowohl in der H. pylori Gastritis als auch in der Typ A-Gastritis ist die gesamte R/S-Ratio aller Klongruppen bezogen auf die Gesamtheit der untersuchten CDR-Regionen (CDR1 und CDR2) kleiner als 2,9. Eine Antigen-getriggerte Affinitätsreifung von B-Zellen in den beiden Gastritistypen lässt sich somit nicht beweisen. Dies ist auf den ersten Blick ein erstaunlicher Befund, da sowohl in der Pathogenese der H. pylori Gastritis als auch insbesondere der Autoimmungastritis Antigen- bzw. Autoantigen getriggerte Prozesse eine Rolle spielen sollen. Als Antigen bzw. Autoantigen werden H. pylori selbst bzw. die H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase der Belegzellen im Magenkorpus diskutiert [12,15]. Bei Betrachtung der R/S-

Quotienten der einzelnen Klongruppen jedoch findet sich vornehmlich in den B-Zellen der *H. pylori* Gastritis, seltener auch in den B-Zellen der Typ A-Gastritis, eine R/S-Ratio über 2,9. Die R/S-Ratio hat in einzelnen Klongruppen Werte bis zu 6 in der CDR2-Region, und 9,3 in der FR3-Region.

Zusätzlich ließ sich durch die Aufstellung genealogischer Stammbäume eine Verwandtschaft der B-Zellklone demonstrieren.

Diese beiden Tatsachen sind ein Hinweis dafür, daß trotz des niedrigen Gesamt R/S Quotienten eine Antigen-getriggerte B-Zellreifung zumindest einzelner Klone in beiden Gastritistypen stattfindet.

Im Vergleich zur *H. pylori* Gastritis ist sowohl die Anzahl der Replacement-Mutationen als auch das R/S Verhältnis in der Autoimmungastritis niedriger. Für den Fall, daß die Autoimmungastritis aus der *H. pylori* Gastritis durch eine Antigen-getriggerte Supermutation der mukosalen B-Zellen entsteht, müsste jedoch die Mutationsrate in der Autoimmungastritis höher liegen als in der *H. pylori* Gastritis. Es scheint somit sehr unwahrscheinlich, daß sich die *H. pylori* Gastritis durch einen Antigen- bzw. Autoantigen-getriggerten autoreaktiven Prozeß, der gegen die Belegzellen der Magenschleimhaut gerichtet ist, zu einer atrophischen Typ A-Gastritis weiterentwickeln kann. Unsere molekularen Befunde sprechen dafür, daß diese beiden Gastritisformen trotz mancher Überschneidungen (siehe Einleitung) zwei unterschiedliche Krankheitsbilder sind. Damit sind unsere Daten im Einklang mit neuen tierexperimentellen Studien, bei denen kein fördernder, sondern ein inhibitorischer Effekt von *H. pylori* auf die Ausbildung einer Autoimmungastritis gezeigt werden konnte [39].

In weiteren Analysen wurden nun klonale Verwandtschaftsbeziehungen der mukosalen B-Zellen untersucht. So fand sich in zumindest zwei Patienten eine eindeutig erkennbare klonale Verwandtschaft der B-Zellen.

Betrachtete man die B-Zellen getrennt nach Antrum und Corpus, zeigten sich bereits gewisse Klonverwandtschaften, wobei aber immer wieder wesentliche intermediäre B-Zellklone fehlen. Diese fehlenden B-Zellklone konnten jedoch im anderen Magenkompartiment nachgewiesen werden. Unsere Daten zeigen somit deutliche genealogische Verwandtschaften zwischen B-Zellklonen im Antrum und Corpus der Magenschleimhaut. Da die Magenbiopsien aus eindeutig definierten und getrennten

Regionen im Antrum und Corpus entnommen wurden, lässt sich eine solche Klonverwandtschaft nur durch eine Migration der B-Zellklone zwischen Antrum und Corpus erklären. So scheinen diese beiden anatomischen Regionen trotz der unterschiedlichen Physiologie und des unterschiedlichen histopathologischen Bildes immunologisch als ein einheitliches Kompartiment zu funktionieren. Das Mukosa-assoziierte lymphatische System (MALT) der Magenschleimhaut scheint also keine anatomische Kompartimentierung in Antrum- und Corpusschleimhaut zu kennen.

Es wäre zukünftig interessant zu untersuchen, ob B-Zellen in der benachbarten Duodenalschleimhaut oder in den regionalen Lymphknoten auch derartige B-Zell-Klonverwandtschaften mit der Magenschleimhaut zeigen. Dies ließe weitergehende Schlüsse über die Migration und das Homingverhalten der B-Zellen im Mukosa-assoziierten lymphatischen System (MALT-System) des Magens zu.

## *5. Zusammenfassung*

Die Infektion der Magenschleimhaut mit *H. pylori* führt zur Ausbildung der chronisch aktiven *H. pylori* Gastritis. Diese wird durch Virulenzfaktoren des Erregers und die durch die Immunantwort des Wirtes freigesetzten Proteasen und Lipidmediatoren hervorgerufen.

Für die Pathogenese der Autoimmungastritis werden autoreaktive T-Zellen und Autoantikörper verantwortlich gemacht. Als Autoantigen wurde in diesem Fall die  $H^+/K^+$ -ATPase in den Belegzellen der Magenschleimhaut ermittelt. Der Mechanismus der Autoreaktivierung gegen die körpereigenen Zellen ist im einzelnen noch unklar.

Die hohe Präsenz von Antikörpern gegen *H. pylori* in Patienten mit Autoimmungastritis sowie das Neuaufreten einer Autoimmungastritis bei einigen Patienten mit jahrelanger *H. pylori* Persistenz führten neuerdings zu der Hypothese, daß sich die Autoimmungastritis aus der *H. pylori* Gastritis durch einen Antigen-getriggerten autoreaktiven Prozeß, der gegen die Belegzellen des Magens gerichtet ist, entwickelt.

Um diese Hypothese näher zu untersuchen wurde in der vorliegenden Arbeit eine molekulare Analyse der variablen Immunglobulin-Region ( $V_H$  Region) in B-Zellen der Magenschleimhaut von Patienten mit *H. pylori* Gastritis und Autoimmungastritis

vorgenommen. Dabei war die Anzahl der Mutationen in der Autoimmungastritis allgemein niedriger als in der *H. pylori* Gastritis. Die Mutationen der Immunglobulin-Schwerketten befanden sich bei beiden Erkrankungen hauptsächlich in den FR-Regionen, die für die Antikörperstruktur, und weniger in den CDR-Regionen, die für die Antigenbindungsstelle kodieren. In den CDR-Regionen fand sich nur in einzelnen Klongruppen ein Verhältnis von Replacement zu Silent-Mutationen von größer als 2,9. Ein Wert über 2,9 gilt als ein Hinweis auf einen Antigen-getriggerten Prozeß.

Die höhere Mutationsrate in der *H. pylori* Gastritis im Vergleich zur Autoimmungastritis spricht gegen die Hypothese, daß sich die Autoimmungastritis aus der *H. pylori* Gastritis über eine Supermutation der mukosalen B-Zellen entwickelt. Vielmehr machen diese Daten wahrscheinlich, daß diese beiden Krankheitsbilder zumindest auf B-Zellebene einen unterschiedlichen Pathomechanismus zeigen. Dem entspricht auch eine neue tierexperimentelle Studie, die zeigte, daß *H. pylori* einen inhibitorischen Effekt auf die Entwicklung einer Autoimmungastritis haben kann.

Weiterhin gelang es in dieser Arbeit sowohl in der *H. pylori* Gastritis als auch in der Autoimmungastritis durch Aufstellen von genealogischen Stammbäumen eine enge klonale Verwandtschaft zwischen den mukosalen B-Zellen in den Magenkompartimenten Antrum und Corpus herzustellen. Das Mukosa-assoziierte lymphatische System des Magens (MALT-System) scheint somit trotz der unterschiedlichen Physiologie und Histopathologie von Antrum und Corpus als ein einheitliches immunologisches Kompartiment zu funktionieren.

## 6. Literaturverzeichnis

- (1) Basislehrbuch Innere Medizin; H. Renz-Polster, J. Braun; Urban & Fischer Verlag; 2. Auflage 2001
- (2) Spezielle Pathologie; C. Thomas; Schattauer Verlag, 1996
- (3) S. Suerbaum, C. Josenhans; Virulence factors of Helicobacter pylori: Implications for vaccine development; Mol Med Today 1999; 5:32-39
- (4) D. Ilver, A. Arnquist; Helicobacter pylori adhesin fucosylated histo-blood group antigens related by retagging. Science 1998; Jan 16; 279(5349):373-7
- (5) E. Papini; Cellular vacuoles induced by Helicobacter pylori originate from the late endosomal compartments; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1994; 91:9720-9724
- (6) S. Censini; Cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1993; 14648-14653
- (7) M. Eck, B. Schmaußer; MALT-type lymphoma of the stomach is associated with Helicobacter pylori strains expressing the CagA protein. Gastroenterol. 1997; 113 (6):2023
- (8) Z. Xiang, S. Censini; Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of Helicobacter pylori reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. Infect. Immun. 1995; 63:94-98
- (9) M. D'Elia, L. Anderson; Inflammation and host response; Curr Opin Gastroenterol 1998; 15 (Suppl 1): S15-S19
- (10) K. Wolle, A. Loedolter; Epidemiologie und Pathogenese der Helicobacter pylori-Infektion; Wien. Med. Wschr. 2002; 152: 117-122
- (11) K. Bamford, X. Fan; Lymphocytes in the human gastric mucosa during Helicobacter pylori infection have a T helper cell 1 phenotype; Gastroenterology 1998; 114:482-492
- (12) Helicobacter pylori – Von der Grundlage zur Therapie; P. Malfertheiner; Thieme Verlag; 3. Auflage 2000
- (13) M. Eck, B. Schmausser; CXC chemokines Gro $\alpha$ /IL 8 and IP-10/MIG in Helicobacter pylori gastritis; Clin Exp Immunol 2000; 122:192-199

- (14) E Shevach, R McHugh; Control of t-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells; *Immunol Rev.* 2001 Aug; 182:58-67
- (15) M D'Elios, M Bergman; H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>atpase (proton pump) is the target autoantigen of TH1 type cytotoxic T cell in autoimmune gastritis; *gastroenterology* 2001 Feb; 120(2):377-86
- (16) G Faller, T Kirchner; Helicobacter pylori und antigastrale Autoimmunität; *Pathologe* 2001; 22:25-30
- (17) R Negrini, L Lisato; Helicobacter pylori infection induces antibodies cross-reaction with human gastric mucosa; *Gastroenterology* 1991 101:437-445
- (18) J Ma, K Borch; Positive correlation between H,K-adenosine triphosphate autoantibodies and Helicobacter pylori antibodies in patients with pernicious anemia; *Scand J Gastroenterol* 1994; 29:961-965
- (19) WE Karnes, IM Samloff; Positive serum antibody and negative tissue staining for Helicobacter pylori in subjects with atrophic body gastritis. *Gastroenterol.* 1991; 101:167-174
- (20) J Valle, M Kekki; Long term course and consequences of Helicobacter pylori gastritis. Results of a 32-year follow-up study; *Scand J Gastroenterol.* 1996; 31:546-550
- (21) B Appelmelk, J Simoons-Smit; Potential role of molecular mimicry between Helicobacter pylori lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity; *Infect Immun* 1996; 64:2031-2040
- (22) B Appelmelk, R Negrini; Molecular mimicry between Helicobacter pylori and the host; *Trend Microbiol* 1997; 5:70-73
- (23) H Heaberle, M Kubin; Differential stimulation of Interleukin 12 (IL12) and IL 10 by living and killed Helicobacter pylori in vitro and association of IL 12 production with gamma interferon inducing T-cells in the human gastric mucosa; *Infect Immun.* 1997; 65:4229-4235
- (24) G Ye, C Barrera, Expression of B7-1 and B7-2 costimulatory molecules by human gastric epithelial cells. *J Clin Invest.* 1997; 99:1628-1636
- (25) S. Tonegawa; Somatic generation of antibody diversity; *Nature* 1983; 302 (5909): 575-81

- (26) T Waldmann; The arrangement of immunoglobulin and T cell receptor genes in human lymphoproliferative disorders, *Adv Immunol* 1987; 40: 247-321
- (27) S. Tonegawa; The Nobel lectures in Immunology. The nobel prize for Physiology or Medicine 1987. Somatic generation of immune diversity (classic article); *Scand J Immunol* 1993; 38(4): 303-19
- (28) E. Padlan; Anatomy of the antibody molecule; *Mol Immunol* 1994; 31(3):169-217
- (29) M. Campbell, A. Zelenetz; Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region gene repertoire; *Mol Immunology* 1992; Vol 29. No.2. pp 193-203
- (30) R. Küppers, M Zhao; Tracing B cell development in human germinal centers by molecular analysis of single cells picked from histological sections; *The Embo Journal* 1993; vol. 12 no 13 pp. 4955-4967
- (31) *Molekularbiologie der Zelle*; Alberts, Johnson; Wiley-VCH-Verlag; 4. Auflage 2004
- (32) V. Krenn, A. König; Molecular analysis of rheumatoid factor (RF)-negative B cell hybridomas from rheumatoid synovial tissue: evidence for an antigen-induced stimulation with selection of high mutated IgVH<sub>H</sub> and low mutated IgV<sub>L</sub>/λ genes; *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 168-175
- (33) F. Hensel, C. Knörr; Mitogenic autoantibodies in Helicobacter pyloric-associated stomach cancerogenesis; *Int J Cancer* 1999; 81(2):229-35
- (34) M. Souto-Carneiro, V. Krenn; IgVH genes from different anatomical regions, with different histopathological patterns, of a rheumatoid arthritis patient suggest cyclic re-entry of mature synovial B-cells in the hypermutation process; *Arthritis Res* 2000; 2:303-314
- (35) A. Price; The Sydney System: Histological division; *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1991; 6:209-222
- (36) D. Scott, F. Hiepe; Antigen-driven clonal proliferation of B Cells within the target tissue of an autoimmune Disease; *J. Clin. Invest.* 1998 102: 938-946
- (37) S. Nakamura, K. Aoyagi; B-cell monoclonality precedes the development of gastric MALT Lymphoma in Helicobacter pylori associated chronic gastritis; *Am J. of Path.* 1998; 152 No.5 1271-1279

- (38) C. Hallas, A. Greiner; Immunoglobulin VH genes of high-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas show a high load of somatic mutations and evidence of antigen-dependent affinity maturation; 1998; *Lab. Invest.* 78(3): 277-287
- (39) M. Ohana, K. Okazaki; Inhibitory effects of *Helicobacter pylori* infection on murine autoimmune gastritis; *Gut.* 2003 Aug; 52(8): 1102-10

Am Ende dieser Arbeit ist es nun Zeit, den Personen zu danken, die mich in der Zeit meines Medizinstudiums begleitet und unterstützt haben:

An erster Stelle sind hier natürlich meine Eltern  
**Karlheinz und Margarete Zimmermann**  
zu nennen, die mir mein Studium ermöglicht hatten und immer mit Sorge und Verständnis zur Seite standen.

Besonderer Dank gilt auch meinem Doktorvater  
**Priv.- Doz. Dr. med. Matthias Eck.**  
Er hatte zu jeder Zeit ein offenes Ohr für die Probleme seines Doktoranden und setzte sich stets in hohem Maße für die Weiterentwicklung der Arbeit ein.

Weiterhin sei auch dem Leiter des Pathologischen Institutes  
**Prof. Dr. med. H.K. Müller-Hermelink**  
für die großzügige Überlassung des Laborplatzes  
und die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien gedankt.

Ganz allgemein möchte ich nun auch an dieser Stelle meinem Corpsbruder und Freund  
**Dr. med. Martin Bockmeyer**  
danken, der mich all die Jahre hindurch an seinem Erfahrungsschatz teilhaben ließ und mir dadurch den richtigen Weg in meiner beruflichen Laufbahn wies.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name, Vorname: Zimmermann, Otto Josef  
Geburtstag: 8. Februar 1977  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig,  
Adresse: Zwölferkopfweg 16  
D - 87629 Füssen / See  
Telefon: +49 (0)8362 / 921099  
E-Mail: ottozimmermann@web.de

## Berufsausbildung

1983 – 1987 Grundschule Schwangau, Schwangau  
1987 – 1996 Gymnasium Hohenschwangau, Hohenschwangau  
1996 – 1997 Wehrdienst in der Marine, Kiel  
seit 1997 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg  
Mai 2003 – März 2004: PJ in HNO, Chirurgie und Innerer Medizin im allgemeinen  
Regionalkrankenhaus Bozen

## Promotion:

Seit Juni 2000  
Würzburg  
Promotion im Pathologischen Institut der Universität  
„Analyse der Immunglobulin VH-Gene in H.p.-Gastritis und  
autoimmuner Gastritis“

## Sprachen

Deutsch: Muttersprache  
Englisch: fließend in Wort und Schrift  
Italienisch: ausreichend in Wort und Schrift  
Latein: Grundkenntnisse