
Die jeweiligen Bakterienstämme (vgl. 2.9) wurden mit einem sterilen Wattestab geerntet in sterilem PBS resuspendiert, ihre Dichte bei OD₅₆₀ bestimmt und dann mit einer MOI von 50 auf die Zellen gegeben. Die Cokultur erfolgte für weitere 8 - 24 h bei 37 °C, 5% CO₂, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Danach wurden die Kulturüberstände bzw. Zellen zur Analyse geerntet (vgl. 3.5, 3.6, 3.8, 3.11 und 3.12).

3.4 Stimulation/Manipulation von Zellen

Magenepithelzellen (primäre Epithelzellen bzw. AGS) wurden in entsprechender Zellzahl (ca. 40 - 70% Konfluenz) in Kulturgefäßen ausgesät. Vor Zugabe der Reagenzien wurden die Zellen 24 h lang serumverarmt (RPMI 1640 ohne FCS und Antibiotika).

<u>Zytokine/Chemokine</u>: 7 x 10⁵ Zellen/35 mm Kulturschale wurden mit jeweils 50 ng/ml der Faktoren IL-1ß, IL-6, IL-8, TNF- α und TGF-ß für 24 h bei 37 °C, 5% CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

<u>Neutralisierende Zytokin-/Chemokin-Antikörper:</u> 7 x 10^5 Zellen/35 mm Kulturschale wurden mit *H. pylori* infiziert (MOI=50, vgl. 3.3) und gleich darauf mit anti-IL-1ß (1,0 µg/ml), anti-IL-6 (3,0 µg/ml), anti-TNF- α (0,08 µg/ml) und anti-TGF-ß (1,2 µg/ml) versetzt. Die Inkubationsdauer betrug 24 h bei 37 °C, 5% CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit.

<u>Inhibitoren:</u> 4 -7 x 10^5 Zellen/35 mm Kulturschale wurden mit *H. pylori* infiziert (MOI=50, vgl. 3.3). Gleich darauf erfolgte der Zusatz von SN50, IKK-NBD, APDT (NF-κB-Inhibitoren), SB203580 (p38 Inhibitor), U0126 (MEK 1/2 Inhibitor) SP600125 (JNK Inhibitor) in einer Konzentration von jeweils 10 µM. Die Ansätze wurden 8 h - 24 h bei 37 °C, 5% CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

<u>Antisense Oligonukleotide:</u> 7 x 10^5 Zellen/35 mm Kulturschale bzw. 1,5 x 10^5 Zellen/Transwellchamber (vgl. 3.12) wurden mit asMMMP-1 / nsODN in einer Konzentration von jeweils 10 μ M - mit oder ohne Cokultur von *H. pylori* - für 24 h bei 37 °C, 5% CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Kulturüberstände bzw. Zellen zur Analyse geerntet (vgl. 3.5, 3.6, 3.8, 3.11 und 3.12).

3.5 RNA-Analytik

3.5.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Zellmonolayern (AGS 5x10⁶ c/100 mm Kulturschale; primäre Epithelzellen 3x10⁵ c/35 mm Kulturschale) wurde pegGold TriFast[™] (pegLab, Erlangen) verwendet. Diese Einphasenlösung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat ermöglicht die Extraktion von RNA in einem Schritt. Die Zellen wurden direkt auf den Platten mit 1 ml TriFast[™] lysiert. Das Lysat wurde mit der Pipette mehrmals auf und ab gesogen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,2 ml Chloroform pro ml Lysat zugegeben, die Mischung 15 s stark geschüttelt und anschließend 15 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Hierbei trennen sich 3 Phasen. Die rote, untere organische Phenol/Chloroform Phase, die Interphase und die farblose wässrige Phase, welche die RNA enthält. Diese wird vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zusatz von 0,5 ml Isopropanol pro ml Probe innerhalb von 10 min ausgefällt. Nach Zentrifugation (10 min, 12000 x g, 4 °C) wurde das erhaltene RNA-Pellet mit 75%igen Ethanol gewaschen, für 10 - 20 min luftgetrocknet und anschließend in einer entsprechenden Menge RNAse-freiem Wasser (DEPC-Wasser) aufgenommen. Um die RNA vollständig zu lösen wurde sie für 10 min bei 55 °C inkubiert. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -80 °C.

Alle Arbeiten mit RNA wurden unter RNAse-freien Bedingungen durchgeführt. Es wurden grundsätzlich Handschuhe getragen. Das verwendete Wasser wurde mit 0,1% DEPC versetzt, 24 h bei RT inkubiert und autoklaviert. Alle verwendeten Puffer wurden mit DEPC-Wasser angesetzt. Glasgeräte wurden 8 h bei 180 °C sterilisiert, Elektrophoresekammern mit 3%-igem H_2O_2 und anschließend mit DEPC-Wasser gespült.

3.5.2 RNA-Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von RNA erfolgte in 1,5%-igen denaturierenden Formamidgelen (1,5 g Agarose, 10 ml 10x MOPS, 17 ml Formaldehyd (37%), 73 ml DEPC-Wasser). Vor Auftragung wurden 5 μ g RNA-Probe mit 12,5 μ l Formamid; 2,5 μ l 10x MOPS und 4 μ l Formaldehyd gemischt, für 5 min bei 65 °C denaturiert und mit 2,5 μ l Probenpuffer (50% Glycerin, 0,05 M EDTA, 0,25% Bromphenolblau) versetzt. Als Laufpuffer diente 1x MOPS-Puffer (10x MOPS-Puffer: 0,2 M 3-N-Morpholino-propane-sulfonic acid [MOPS], 0,05 M Na-acetat, 0,01 M EDTA). Der Lauf der Gele erfolgte bei 20-100 V bis max. 8 V/cm Laufstrecke.

3.5.3 Reverse Transkription

In der reversen Transkription (RT) wird RNA durch das Enzym reverse Transkriptase zu cDNA umgeschrieben.

Reaktionsansatz: 5 µl 5x Reaktionspuffer 1,25 µl dNTPs (10mM) 2 µl Oligo(dT)₁₅-Primer 1 µl M-MLV-Reverse Transkriptase 2 µg RNA ad 25 µl DEPC-H₂O

RNA und Oligo(dT)₁₅-Primer werden 10 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt, bevor der restliche Reaktionsansatz dazupipettiert wird. Der Ansatz wird für 1 h bei 37 °C inkubiert und die Reaktion durch 10-minütiges Erhitzen auf 70 °C beendet. Die cDNA kann direkt in die PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden.

3.6 DNA-Analytik

3.6.1 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die 1985 von Mullins entwickelte PCR ermöglicht eine schnelle *in-vitro* Vermehrung geringer DNA-Ausgangsmengen mit Hilfe von DNA-Polymerasen. Dabei wird ein spezifisches, von zwei Primern begrenztes cDNA-Fragment durch die *Taq*-Polymerase zyklisch amplifiziert.

Reaktionsansatz: 2 µl cDNA 1 µl MgCl₂ (50mM) 5 µl 10x Puffer 1 µl dNTPs (10 mM) 1µl sense Primer (10 pmol) 1µl anti-sense Primer (10 pmol) 0,25 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl) ad 50 µl dH₂O

Die Reaktionsansätze (inkl. einer Negativkontrolle ohne cDNA) wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und die cDNA mit Hilfe eines Thermocyclers amplifiziert. Jeder Zyklus besteht aus Denaturierung, Primeranlagerung (Annealing) und Primerextension:

Prädenaturierung	5 min	94 °C
Denaturierung Annealing Extension	30 sec 60 sec 60 sec	94 °C T _m -5 °C 72 °C - 30x
Abschlusssynthese	10 min	72 °C

Die optimalen Schmelztemperaturen und Elongationsphasen wurden für das jeweilige Primerpaar bzw. die Länge des zu amplifizierenden cDNA-Fragments ausgetestet. Die Schmelztemperaturen wurden nach folgender Formel berechnet: T_m = 4x GC + 2x AT (GC, AC= Anzahl der Nukleotide in der Primersequenz). Die Zyklenzahl richtet sich nach der cDNA-Konzentration des zu amplifizierenden Fragments und variiert zwischen 28 und 40 Zyklen. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und densitometrisch ausgewertet.

3.6.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 0,8-2%-igen Agarosegelen mit Zusatz von Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg/ml, Endkonzentration: 0,5 μ g/ml). Als Gel- und Laufpuffer wurde 1x TBE (5x TBE (pH 8,3): 54 g Tris, 27,5 g Borsäure (Na-Salz), 20 ml 0,5M EDTA, ad 1I dH₂O) verwendet. Die Auftragung der DNA Proben erfolgte nach Zusatz von 0,2 Vol Probenpuffer (50% Glyzerin, 1mM EDTA, 0,4% Bromphenolblau). Die Elektrophorese erfolgte bei 50-100 V.

3.6.2 Quantitative real-time-PCR am LightCycler

Der LightCycler gehört zu den schnellsten Thermocyclern und ist mit einem Microvolumen-Fluorimeter kombiniert. Unter Einsatz des LightCyclers sind PCRs mit 30 - 40 Zyklen in weniger als 30 min möglich. Außerdem wird durch Einbau eines Flurophores in das entstehende PCR-Produkt und Fluoreszens-Monitoring die Analyse und Quantifizierung der Ergebnisse bei laufender Amplifikation (realtime- oder auch sog. Echtzeit-PCR) möglich. Es gibt zwei Arten von Fluophoren, die bei dieser PCR verwendet werden können: SYBR Green I, ein sequenzunabhängiger interkalierender Farbstoff, der sich während der Amplifikation in die dsDNA des PCR-Produktes einbaut und in dieser Arbeit ausschließlich verwendet wurde oder Fluophore wie LightCyclerRed 640 und Fluoreszin, die gekoppelt an Oligonukleotide (Hybridization Probes) sequenzspezifisch an die PCR-Produkte binden.

Das Fluoreszenz-Signal von *SYBR Green I* wird bei 530 nm gemessen und steigt proportional zur Menge des PCR-Produktes. Eine abschließende Schmelzkurvenanalyse erlaubt die exakte Schmelzpunktbestimmung und somit die Charakterisierung des PCR-Produktes.

Reaktionsansatz: 10 µl SYBR Green I MasterMix 1 µl sense Primer (10 pmol) 1 µl anti-sense Primer (10 pmol) 1,6 µl MgCl₂ (25mM) 2 µl cDNA ad 20 µl dH₂O

Das PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten:

Prädenaturierung	30 sec	94 °C	20 °C/sec
Amplifikation:	0 sec	94 °C	20 °C/sec
40 Zyklen,	10 sec	T _m	20 °C/sec
Synthesegeschwindigkeit: 23 b/sec	t	72 °C	20 °C/sec
Schmelzkurve	0 sec	95 °C	20 °C/sec
	15 sec	(T _m +5-10°C)	20 °C/sec
	0 sec	95 °C	0,1°C/sec
Abkühlen	30 sec	40 °C	20 °C/sec

Die Annealing-Temperaturen der Primer wurden mit der Formel T_m = 4x GC + 2x AT berechnet (GC, AC= Anzahl der Nukleotide in der Primersequenz). Die optimale Schmelztemperatur, die MgCl₂-Konzentration sowie die Synthesezeit t (t in sec =Größe des PCR-Produktes / 23 Basen pro Sekunde) wurde für das jeweilige Primerpaar bzw. die Länge des zu amplifizierenden cDNA-Fragments in Vorversuchen ermittelt. Die Mitführung einer Standardverdünnungsreihe mit bekannter Konzentration an eingesetzten DNA-Molekülen ermöglicht eine genaue Quantifizierung der cDNA-Moleküle jeder Probe. Zur Herstellung eines spezifischen Standards kloniert man im Vorfeld das zu analysierende PCR-Fragment in einen geeigneten Plasmidvektor (pCR2.1 TOPO-Vektor des TOPO TA Cloning Kits, Invitrogen, Karlsruhe) und lässt mindestens 3 Verdünnungsstufen des Plasmids als Standard bei jedem Lauf mitamplifizieren.

Der Abgleich der mRNA-Mengen untereinander erfolgt durch Amplifikation eines Haushaltsgens (z. B. 18S rRNA) mit entsprechendem Standard im Parallelansatz. Durch die Bildung des Quotienten aus der Molekülzahl der zu analysierenden cDNA und der Molekülzahl des Haushaltsgens lassen sich die einzelnen Proben untereinander vergleichen.

3.6.2.1 Klonierung mit TOPO TA Cloning[®]

TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) enthält das Enzym DNA Topoisomerase I, welches an beiden 3'-Phosphatresten der Tymidinenden des linearisierten TOPO Vektors kovalent gebunden ist. Dadurch sind Ligationen kompatibler DNA-(mit Moleküle einem 3'-A-Überhang) innerhalb von 5 min möglich. Reaktionsansatz und Inkubation erfolgten nach Angaben des Herstellers. Für jede Transformation wurde 100 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 µl des Ligationsansatzes zu den Zellen wurden die Ansätze vorsichtig durchmischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem 30-sekündigen Hitzeschock im 42 °C warmen Wasserbad, wurden 250 ml vorgewärmtes (37 °C) SOC-Medium zu den transformierten Zellen gegeben. Die Ansätze wurden 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 50 µl der Transformation wurden auf vorgewärmten (37 °C) LB-Platten ausgestrichen, die IPTG und X-gal enthielten und zur Selektion mit Ampicillin versetzt waren (vgl. 3.1.1.1). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C ÜN.

3.6.2.2 Plasmid-Minipräparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA bis zu 20 µg aus *E. coli*-Kulturen (vgl. 3.1.1.1) wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit, basierend auf der Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) verwendet. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.6.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers ermittelt. Dazu wurde die aus der Plasmid-Minipräparation (vgl. 3.6.2.2) gewonnene DNA-Lösung 1:50 mit dH2O verdünnt und die Extinktion bei 260 nm bestimmt. Die Konzentration ergab sich nach folgender Gleichung:

1 E260 = 50 µg/ml dsDNA

Durch zusätzliche Messung der Extinktion bei 280nm, dem Absorptionsmaximum der meisten Proteine, konnte der Quotient E_{260}/E_{280} berechnet werden, der ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung ist und dessen Werte im Bereich von 1,6 - 2,0 lagen.

3.6.2.4 Berechnung der Kopienzahl

Wie bereits erwähnt ermöglicht die Mitführung einer Standardverdünnungsreihe mit bekannter Konzentration an eingesetzten DNA-Molekülen die genaue Quantifizierung der cDNA-Moleküle jeder Probe. Die Kopienzahl (Moleküle/µl) der klonierten spezifischen Standards berechnet sich nach folgender Formel:

1 DNA-Mononukleotid hat ein MG von durchschnittlich 326,96 g.

1 Basenpaar hat also ein MG von etwa 660 g.

1 Mol eines beliebigen Plasmids X bp (inkl. Insert) wiegt X mal 660 g.

1 Mol enthält 6,02 x 10²³ Moleküle (Avogadro´sche Zahl)

X x 660 g= Y g/MoleküleZ g/µl= Kopienzahl $6,02 x 10^{23}$ MoleküleYg/MoleküleYg/Moleküle

X = Länge des Plasmids mit Insert in bp

Z = Plasmid-Konzentration in g/µl

4 Plasmid-Verdünnungsstufen wurden (10⁻³ - 10⁻⁶) als Standard bei jedem Lauf mitamplifiziert.

3.7 cDNA-Array Analyse

Der GEArray Q-Series Human Tumor Metastasis Array (Superarray Bioscience Corp., Bethesda, USA) ermöglicht die Ermittlung der Expressionsprofile von 96 Genen, die in der Tumormetastasierung eine Rolle spielen (vollständige Genliste unter <u>http://www.superarray.com</u>). Die Isolation der Gesamt-RNA und ihre reverse Transkription erfolgte wie oben beschrieben (vgl. 3.5.1, 3.5.3). Die cDNA wurde mit Hilfe des AmpoLabeling LRP Kits (Superarray Bioscience Corp., Bethesda, USA) nach Angaben des Herstellers markiert. Die nachfolgenden Schritte (Prähybridisierung, Wasch-Schritte, Hybridisierung und Chemilumineszenz-Detektion) wurden ebenfalls nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Für die Chemilumineszenz-Detektion wurden gleiche Teile der Lösungen 1 und 2 des SuperSignal[®] Chemilumineszenz Substrates (Pierce, Rockford, USA) gemischt (0,125 ml/cm²) und auf die Membran gegeben. Die Lumineszenz-Detektion erfolgte für 15 - 40 min im GeneGnome (Syngene, Cambridge, UK). Abschließend erfolge die densitometrische Auswertung mit Hilfe des Programms GeneTools (Syngene, Cambridge, UK).

3.8 Western Blot

3.8.1 **Proteinextraktion**

Zellkulturüberstände wurden abgenommen und mit Hilfe von Centricon[™] Filtern (VIVA Science, Hannover) 10-fach aufkonzentriert.

Zellen wurden direkt auf den Kulturgefäßen mit 1 ml eiskaltem Tripledetergent-Lysispuffer (50 mM Tri-HCL, pH 8,0, 150 mM NaCl₂, 0,1% SDS, 1 % (v/v) NP40, 0,5% Na-desoxycholat; vor Gebrauch wurden 20 μ l Proteasen-Inhibitor-Cocktail, Roche, Mannheim pro ml Lysispuffer hinzugefügt) lysiert. Das Lysat wurde anschließend 10 min bei 13.000 x g (4 °C) zentrifugiert. Die zellulären Proteine befanden sich im Überstand. Zur Proteinextraktion aus Biopsien wurde das Gewebe zunächst mit 5 Vol eiskaltem Lysispuffer versetzt und mit dem Ultraturrax homogenisiert (10 s). Das Lysat wurde anschließend 60 min auf Eis inkubiert und abschließend 10 min bei 10.000 x g (4 °C) abzentrifugiert. Die Überstände wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.8.2 Proteinquantifizierung

Basierend auf der Proteinbestimmung nach Lowry wurde der Proteingehalt der Zell- bzw. Gewebeextrakte colorimetrisch unter Verwendung des DC Protein Assay (BIO-RAD, München) bestimmt. Dazu wurden auf einer Mikrotiterplatte jeweils 5 µl Probe bzw. Standard (BSA) mit 25 µl Reagenz A (alkalische Kupfertartatlösung) und 200 µl Reagenz B (Folin-Reagenz) gemischt und unter Schütteln 15 min inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers die Absorption der Proben bei 750 nm bestimmt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt anhand einer Eichkurve der mitgeführten BSA-Standard-Verdünnungsreihe (0 - 3 mg/ml).

3.8.3 SDS-Polyacryamidgelelektrophorese (PAGE)

Homogenate wie Überstände wurden durch Zugabe von 5-fach konzentrierten Probenpuffer (250 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% (w/v) SDS, 0,5% Bromphenolblau, 50% Glyzerin, 0,2 M DTT) reduziert.

Die analytische Trennung von Proteinen in Abhängigkeit vom Molekulargewicht erfolge nach der Methode von Laemmli (1970). Die Proteingemische wurden in einer elektrisch neutralen, festen Gelmatrix aus Polyacrylamid in vertikalen Gelkammern (BioRad, München) unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE). SDS-Polyacrylamidgele bestehen aus zwei verschiedenen Schichten: dem 13%igen Trenngel in welchem die Separation der Proteine erfolgt, und dem 4%igen Sammelgel, in dem sich die Probentaschen befinden.

Stammlösungen	Sammelgel (4%)	12% Trenngel
dH ₂ O	6,33 ml	3,52 ml
40% Acrylamid/Bis (37,5:1)	1,65 ml	4,34 ml
Sammelgelpuffer: 1,875 M Tris-	2 ml	-
HCI (pH 6,8), 0,5% (w/v) SDS		
Trenngel: 1,875 M Tris-HCI (pH	-	2 ml
8,8), 1% (w/v) SDS		
TEMED	8 µl	8 µl
10% (w/v) APS	150 µl	75 µl

Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele (Angaben für 2 Gele):

3.8.4 Protein-Transfer

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden unter Einsatz der *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (BIO-RAD) nach Angaben des Herstellers auf eine Nitrocellulose-Membran (Roth) übertragen. Die Membran wurde zusammen mit dem Gel für 30 - 60 min in gekühltem Transfer-Puffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20% Methanol, ad 1 I dH₂O) äquilibriert. Das Blotting erfolgte 2 h bei 70 V nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die Membran 3 - 5 min in dH₂O gespült. Sie kann bei RT getrocknet bei 4 °C gelagert werden.

3.8.5 Antikörperinkubation und Chemilumineszenz-Detektion

Zur Blockierung aller unspezifischen Bindungen wurde die Membran 2 h bei RT in 20 ml Blockierungslösung (1% Milchpulver in TBS; 10x TBS: 12,1 g Tris-Base, 87 g NaCl₂, ad 1 l dH₂O, pH 7,4) inkubiert. Anschließend wird die Membran 4 mal unter Schütteln in TBS-0,1% Tween 20 (1 ml Tween 20 auf 1000 ml 1x TBS) gewaschen (jeweils 20 min bei RT). Die Inkubation mit den spezifischen primären Antikörper erfolgte in den entsprechenden Verdünnungen (s. Tabelle und 2.11) bei 4 °C ÜN.

Primärantikörper	Verdünnung
Anti-human MMP-1	1:100
Anti-human ERK 1/2	1:1000
Anti-human Phospho-p44/42 MAPK	1:1000
Anti-human ß2-Mikroglobulin	1:10.000

Nach erneutem Waschen (s.o.) wurde die Membran mit einem gegen den primären AK gerichteten HRP(Meerrettichperoxidase, horseradish peroxidase)markiertem sekundären AK (mit einer Verdünnung von 0,1-1 µg/ml Blockierungslösung) 2 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschritt (s.o.). Abschließend wird die Membran 5 min in TBS geschwenkt. Für die Chemilumineszenz-Detektion wurden gleiche Teile der Lösungen 1 und 2 des SuperSignal[®] Chemilumineszenz Substrates (Pierce, Rockford, USA) gemischt und auf die Proteinseite der Membran gegeben (0,125 ml/cm²). Die Lumineszenz-Detektion erfolgte für 15-40 min im GeneGnome (Syngene, UK Merck, Darmstadt). Abschließend Cambridge. über erfolate die densitometrische Auswertung mit Hilfe des Programms GeneTools (Syngene). Die Membran kann nach Inkubation mit Strip-Puffer (15 min, RT, Pierce, Rockford, USA) und anschließender Spülung in 1x TBS (10 min) für eine erneute AK-Inkubation verwendet oder wie beschrieben gelagert werden.

3.9 Immunhistochemische Untersuchung von Paraffinschnitten

Die immunhistochemische Analyse erfolgte an Schnittpräparaten formalinfixierter, paraffineingebetteter Biopsien. Die Schnittpräparate mit einer Schichtdicke von 3-4 µm wurden in Xylol entparaffiniert und schließlich in einer absteigenden Alkoholreihe dehydriert.

Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit PBA (Protein Blocking Agent, Immunotech, Marseille, Frankreich) blockiert und mit dem polyklonalen anti-*H. pylori* AK (1:50, DAKO, Glostrup, Dänemark) sowie dem monoklonalen anti-MMP-1 AK (1:100, Merck, Darmstadt) 16 h lang bei 4 °C inkubiert. Nach einem Wasch-Schritt mit PBS wurden die Primärantikörper durch die fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper (anti-Kaninchen-Fitc 1:100, Anti-Maus-TexasRed 1:100,

40

Vektor Laboratories, Burlingame, USA) detektiert. Nach einem weiteren Wasch-Schritt mit PBS wurden die Schnitte mit VECTASHIELD[®] Mounting Medium mit DAPI (Vektor Laboratories, Burlingame, USA) eingedeckt und unter dem mit einer CCD Kamera (Spot RT, Diagnostic Instruments, Bourroughs, USA) und einem 20/1,25 Objektiv ausgerüsteten Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRE7, Wetzlar) analysiert.

3.10 Immunhistochemische Untersuchung von Zellen

Magenepithelzellen (AGS, primäre Epithelzellen) wurden auf zellkulturbeschichteten Objektträgern (Falcon[®] über Becton Dickinson, Le Point de Claix, Frankreich) in einer Dichte von 2 x 10⁴ ausgesät und 24 h bei 37 °C, 5% CO₂, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in RPMI 1640, (10% FCS, 1% Penizillin/Streptomyzin) bzw. Q286 (1% Penizillin/Streptomyzin) kultiviert.

Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen 3 Mal mit PBS gewaschen, bevor sie mit 3,7% PFA in PBS für 10 min bei RT fixiert wurden. Nach 3 weiteren PBS-Waschschritten erfolgte die Permeabilisierung der Zellen (0,1% Triton X-100/PBS). Die Zellen wurden erneut gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch PBA (Protein Blocking Agent, Immunotech, Marseille, Frankreich, 20 min, RT) bzw. 3%iges H₂O₂ (nur ABC-Peroxidase Methode, 15 min, RT) abgesättigt. Schließlich erfolgte die Inkubation und mit den entsprechenden Primärantikörpern (s. Tabelle und 2.11) für 2 h bei 37 °C. Nach 3 Wasch-Schritten mit PBS erfolgte die Detektion der Primärantikörper durch die fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper (anti-Kaninchen-Fitc 1:100, Anti-Maus-TexasRed 1:100, Vektor Laboratories, Burlingame, USA, 1,5 h, 37 °C in PBS, 0,5 % BSA) bzw. durch biotinylierte Sekundärantikörper (1:200, 30 min, RT in PBS, 0,5 % BSA).

Primärantikörper	Verdünnung
Anti-human Ber-EP4, Maus monoklonal	1:50
Anti-human ß-Catenin, Kaninchen polyklonal	1:200
Anti-human E-Cadherin, Maus monoklonal	1:50
Anti- <i>H. pylori</i> , Kaninchen polyklonal	1:50
Anti-human MMP-1, Maus monoklonal	1:100
Anti-human p120 Catenin, Maus monoklonal	1:400
Anti-human Okkludin, Kaninchen polyklonal	1:200
Anti-human Vimentin, Maus monoklonal	1:400
Anti-human ZO-1, Kaninchen polyklonal	1:200

Die Objektträger zur Fluoreszenzanalyse wurden nach einem weiteren Wasch-Schritt mit PBS in VECTASHIELD[®] Mounting Medium mit DAPI (Vektor Laboratories, Burlingame, USA) eingedeckt und unter dem mit einer CCD Kamera (Spot RT, Diagnostic Instruments, Bourroughs, USA) und einem 20/1,25 Objektiv ausgerüsteten Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRE7, Wetzlar) analysiert.

Für die Entwicklung nach der ABC-Methode, bei der ein Streptavidin-Biotin-Komplex mit dem biotinylieten Sekundärantikörper reagiert, wurden Kits verwendet und nach Angaben der Hersteller verfahren (roter Farbstoff: Vectastain ABC-Alkalische Phosphatase Kit; brauner Farbstoff: Vectastain ABC-Peroxidase, Vector, Burlingham, UK). Die Zellkerne wurden zum Schluss mit Hämalaun gegengefärbt und mit Gelatine bzw. Balsam eingedeckt.

<u>Methode der Hämalaunfärbung:</u> Für die Hämalaunfärbung wird Mayer's saures Hämatoxilin verwendet: 1g Hämalaun in 1000ml H₂O schütteln, 0.2g NaJO₃, 50g Kalialaun, 50g Chloralhydrat, 1g Zitronensäure.

Fixierte Zellen wurden für 2 Minuten in der Hämalaun-Lösung gefärbt. Anschließend werden die Zellen unter laufendem Leitungswasser für 10 Minuten "gebläut".

<u>PAS (Periodic-Acid-Schiff) -Färbung:</u> Zum Nachweis neutraler Muzine wurden Magenepithelzellen (AGS, primäre Epithelzellen) wie beschrieben kultiviert und fixiert. Die Objektträger wurden 10 min in Perjodsäure inkubiert und zweimal in

75% EtOH gespült. Danach folgte eine Inkubation in Schiff'schem Reagenz für 15 min gefolgt von einer Inkubation in S₂-Lösung. Nach dreimaligem Spülen mit dH₂O wurden die Zellkerne mit Hämalaun (nach Mayer) gegengefärbt und die Schnitte mit Balsam eingedeckt.

3.11 Fluorokine[®] E, Human active MMP-1 Fluorescent Assay

In den gewonnenen Kulturüberständen wurden der Gehalt an aktivem MMP-1 quantitativ mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Kit bestimmt.

Die Quantifizierung der Antigene erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Das Testsystem enthielt bereits mit primärem Antikörper (monoklonaler anti-human MMP-1 Antikörper) vorbeschichtete Mikrotest-Strips. Die Messung der Standardreihe (MMP-1 0-25 ng/mL) sowie der unverdünnten Proben erfolgte als Doppelbestimmung. Alle Inkubationen fanden auf einem ELISA-Schüttler statt. Die Absorption als Maß der Antigenkonzentration wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA-Lesegerät bestimmt.

3.12 Invasionsassay

Der 1989 von Repesh *et al.* vorgestellte Invasionstest stellt *in vivo* die Situation der Tumorzellen an der Basalmembran nach. Es fanden Filterkulturgefäße Anwendung, die aus zwei durch einen Polycarbonatfilter (8,0 µm Porengröße) voneinander getrennten Zellkammern bestehen, sogenannte Transwell-Chamber[®]. Die Beschichtung der Filter bestand aus Matrigel[®]. Dieses enthält Extrakte wie Laminin, Kollagen IV und Proteoglykane, welche zu den Hauptbestandteilen der Basalmembran zählen. In den kommerziell erhältlichen 24 well Invasionskammern (Costar, New York, USA) wurde zunächst die Matrigelmatrix (100 µg/cm²) durch zweistündige Inkubation mit Kulturmedium rekonstituiert. Die Zellmonolayer wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung geerntet, gezählt und in einer Dichte von 1 x 10⁵ Zellen pro well in den oberen Teil der Kammern auf die vorbereitete Matrix gegeben. Die unteren Kammern des Systems wurden mit 500 µl Kulturmedium gefüllt. Die Kulturdauer betrug 24 - 72 h. Die invasiven Zellen konnten

anschließend von der Unterseite der Filter geerntet werden. Die Filter wurden hierzu 3 mal mit PBS-Lösung gewaschen, für 5 min mit Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert und die gelösten Zellen mit 500 µl PBS-Lösung von der Filterunterseite abgespült. Die Messung erfolgte nach Zugabe von 9,5 ml isotonischer Salzlösung (Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich) im Coulter Counter ZII. Das Verhältnis zur Gesamtzellzahl (48-well Kontrollplatte) liefert den prozentualen Anteil invasiver Zellen. Alle Bestimmungen wurden dreifach ausgeführt.



Abbildung 3.1: Querschnitt eines Transwellchambers.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung eines *in vitro*-Modells zum Studium der Interaktion zwischen *H. pylori* und Magenepithelzellen

4.1.1 Vergleich der einzelnen Präparationsmethoden

Die meisten Studien zur *H. pylori*-Infektion verwenden die Magenkarzinomlinie AGS. Diese Zellen bilden jedoch kein polarisiertes Epithel aus. Die häufig verwendeten MDCK-Zellen, bilden zwar ein polarisiertes Epithel aus, sind jedoch aus einem anderen Gewebe (Niere) isoliert bzw. nicht-humanen Ursprungs. Die Verwendung primärer Epithelzellen aus dem Magen entspricht eher der *in vivo*-Situation. Bisher sind solche Zellen nicht käuflich zu erwerben. Deshalb wurde eine geeignete Isolationsmethode für primäre Epithelzellen aus Magenbiopsien/-resektaten gesucht.



Abbildung 4.1: Einzelne Präparationsmethoden von primären Epithelzellen aus Magenbiopsien/-resektaten im Vergleich. A: Mechanische Dissoziation des Gewebes: Passieren des Materials durch ein 400 µm-Sieb, B: Inkubation in EDTA/DTT-Lösung und anschließendes Schütteln, C-E: enzymatische Dissoziation (C: Inkubation in EDTA/DTT und Dispase, D und E: Inkubation in Dispase/Collagenase). Die Aufnahmen erfolgten 24 h nach Präparation. Vergrößerung: 100x.

Das Prinzip der mechanischen Dissoziation (Methode A, vgl. 3.2.1.1) erwies sich als wenig erfolgreich. Auch die enzymatischen Isolationsmethoden B und C zeigten sehr geringe Ausbeuten an epithelialen Zellen. Methode E erwies sich als einfach in der Handhabung und brachte die höchste Ausbeute an epithelialen Zellen. Außerdem traten bei dieser Methode seltener bakterielle Kontaminationen auf. Die Präparation nach Methode D lieferte auch relativ gute Ergebnisse, jedoch war die Ausbeute an primären Zellen um einiges geringer als bei Methode E. Deshalb wurde das Gewebe (Resektate, Biopsien) nach dem Protokoll der Methode E aufgearbeitet.

4.1.2 Charakterisierung der isolierten Primärzellen

Die isolierten primären Zellen wurden immunhistochemisch hinsichtlich ihres epithelialen Ursprungs sowie auf intakte Zell-Zell-Verbindungen überprüft und mit der am häufigsten in *H. pylori*-Infektionsexperimenten verwendeten Magenkarzinom-Zelllinie AGS verglichen.

Im Phasenkontrast weisen beide Zellen die typische polyedrische Epithelmorphologie auf. Während die AGS-Zellen eher vereinzelt wachsen (Abb.4.2la), bilden die Primärzellen kompakte Kolonien (Abb.4.2lla). Ferner wurden beide Zellen auf die Expression epithelialer Marker, wie Zytokeratine und Ber-EP4 untersucht. Zytokeratine gehören zu den Intermediärfilamenten, die hauptsächlich in Epithelzellen zu finden sind. Sie fixieren den Zellkern und halten die Zellmorphologie aufrecht. Es existieren 20 verschiedene Subtypen, deren Expression sowohl vom Zelltyp als auch dem Differenzierungsgrad abhängt (Tot, 2002). Ber-EP4 ist ein Glykoprotein der Zelloberfläche und auf fast allen Epithelzellen vorhanden (Latza et al., 1990). Sowohl AGS-Zellen als auch isolierte Primärzellen waren positiv für Zytokeratin 18, Zytokeratin 20 (Ergebnisse nicht gezeigt) und Ber-EP4 (Abb.4.2lb/Ilb) und folglich epithelialen Ursprungs.

Primäre Zellisolationen enthalten oftmals Fibroblasten. Färbungen gegen den Fibroblasten-Marker Vimentin erwiesen sich als hauptsächlich negativ, was den epithelialen Ursprung der Zellen bestätigt. Nur eine sehr geringe Anzahl spindelförmiger Zellen an der Peripherie der Kolonien ließ sich mit diesem Marker nachweisen (Ergebnisse nicht gezeigt).

46



Abb. 4.2: Immunhistochemische Charakterisierung von primären Magenepithel-zellen und AGS-Zellen in Hinblick auf epitheliale Marker.

I: AGS-Zellen

- II: primäres Magenepithel
- a:Phasenkontrast (100x)
- b: Ber-EP4 (100x)
- c: Muc5AC (200x)
- d: Muc6 (200x)
- e: PAS (100x).

Der Gastrointestinaltrakt ist mit einer Schleimschicht bedeckt, die von spezialisierten Epithelzellen sekretiert wird, um die oberste Zellschicht gegen Pathogene, Mutagene und chemische wie mechanische Schädigung zu schützen (Neutra und Forstner, 1987). Die zum Nachweis neutraler Muzine dienende PAS-Färbung fiel bei beiden Zellen positiv aus (Abb.4.2le/IIe). Diese Hauptbestandteile der Schleimschicht, sind hochmolekulare Glykoproteine von denen bislang zehn verschiedene Mitglieder identifiziert wurden (Gendler und Spicer, 1995). Die Muzine MUC5AC und MUC6 werden hauptsächlich im Magen exprimiert (Duperat *et al.*, 1995), wobei MUC5AC vom Oberflächenepithel und MUC6 von den tiefen Drüsen sekretiert wird. Sowohl AGS- als auch primäre Zellen zeigen eine positive Farbreaktion bei MUC5AC (Abb.4.2lc/IIc); die Färbung für MUC6 fiel dagegen negativ aus (Abb.4.2ld/IId).

Der zelluläre Verbindungskomplex setzt sich aus einem Netzwerk von Transmembran-, Gerüst- und Signalproteinen zusammen. Er übt Barrieren-, Verbindungs- und Signaltranduktionsfunktionen aus, um Polarität, Proliferation und Differenzierung der Zellen zu steuern. Viele Krankheiten, darunter Karzinogenese, sind durch Störungen der Zell-Zell-Verbindungen gekennzeichnet (Knust und Bossinger, 2002, Bilder und Perrimon, 2000). *H. pylori* bindet bevorzugt an Stellen in unmittelbarer Nähe der apikalen Zell-Zell-Verbindungen (Steer, 1984, Hazell *et al.*, 1986). Deshalb wurden beide Zelltypen auf die Expression und zelluläre Verteilung einiger Zell-Zell-Verbindungsproteine auf Protein- (Immunhistochemie) und RNA-Ebene (RT-PCR, Ergebnisse nicht gezeigt) untersucht.

In Bezug auf die Zell-Zell-Verbindungsproteine ZO-1 (Abb.4.3lc/Ilc), Occludin (Abb.4.3lb/llb), ß-Catenin (Abb.4.3ld/lld) und p120-Catenin (Abb.4.3le/lle) zeigten sowohl AGS- als auch primäre Zellen positive Reaktionen. E-Cadherin ließ sich bei Primärzellen nachweisen (Abb.4.3la/lla). dagegen nur den Die Verbindungsproteine weisen zudem bei AGS-Zellen eine andere Verteilung auf als die primären Magenepithelzellen. Occludin, ZO-1 und E-Cadherin liegen in den primären Zellen relativ homogen verteilt an der Peripherie. Die Proteine ß- und p120-Catenin sind daneben auch im Zytoplasma zu finden. Bei AGS-Zellen sind deutliche Abweichungen von der natürlichen membranständigen Lokalisation zu sehen. Vor allem die beiden Catenine sind hauptsächlich im Zytoplasma und im Zellkern zu finden.

48



Abb. 4.3: Immunhistochemische Charakterisierung von primären Magenepithel-zellen und AGS-Zellen in Hinblick auf Zell-Zell-Verbindungsproteine.

- I: AGS-Zellen,
- II: primäres Magenepithel
- a: E-Cadherin
- b: Occludin
- c: ZO-1
- d: ß-Catenin
- e: p120-Catenin
- Vergrößerung: 200x.

4.2 Analyse der differentiellen mRNA-Expression von Tumorassoziierten Markern in humanen Magenepithelzellen nach Cokultur mit *H. pylori*

Viele bereits beschriebene Gene zeigen in der *H. pylori*-Infektion eine Erhöhung ihrer Expression (Maeda *et al.*, 2001, Aihara *et al.*, 1997). Die Nukleinsäurearray-Technologie ermöglicht die gleichzeitige Expressionsanalyse zahlreicher Gene eines bestimmten Signalweges in einem Experiment. *H. pylori* ist eng mit Magenkarzinomen assoziiert. Infizierte Patienten weisen gegenüber nichtinfizierten ein 3-6-fach erhöhtes Krebsrisiko auf (Krejs, 2000). Um herauszufinden, wie sich das mRNA-Expressionsmuster von AGS-Zellen unter Einfluss von *H. pylori* verändert, wurde ein cDNA-Microarray (GEArray Q Series Human Tumor Metastasis Array, Biomol, Hamburg) zur Analyse von 96 Genen, die in Prozessen wie zellulärem Wachstum, extrazellulärem Matrixumbau und Signaltransduktion involviert sind, durchgeführt (Abb.4.4).



Abb. 4.4: cDNA-Microarray Analyse. A Nicht infizierte AGS-Zellen (Negativkontrolle). B Mit *H.p. wt P1* (MOI=50) infizierte AGS-Zellen. Der GEArray Q-Series Human Tumor Metastasis Array (Superarray Bioscience Corp., Bethesda, USA) ermöglicht die Ermittlung der Expressionsprofile von 96 Genen, die in der Tumormetastasierung eine Rolle spielen. Aus infizierten und nicht infizierten AGS-Zellen wurde RNA präpariert, in cDNA revers transkripiert und schließlich mit den auf dem Array befindlichen cDNA-Sonden hybridisiert. Die einzelnen Felder wurden densitometrisch ausgewertet. Nach Subtraktion des Leerwertes erfolgte der Abgleich der mRNA beider Ansätze durch das ribosomale Protein L13a. Durch die Bildung des Quotienten (Ratio) aus der Signalintensität des Haushaltsgens und der einzelnen Tumormarker des Arrays ließ sich das Expressionsprofil der beiden Ansätze miteinander vergleichen.

Die mRNA aus *H. pylori* infizierten sowie nicht-infizierten (Negativkontrolle) AGS-Zellen wurde präpariert, mit Biotin markiert, mit den Sonden auf dem Array hybridisiert und die einzelnen Felder nach chemilumineszenter Entwicklung densitometrisch ausgewertet. Alle Infektionsexperimente wurden mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 50 durchgeführt, dass heißt eine AGS-Zelle wurde durchschnittlich von 50 *H. pylori*-Zellen infiziert. Dabei wurden die AGS-Zellen in direktem Kontakt mit *H. pylori wt P1* für einen Zeitraum von 24 h cokultiviert.

Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die genetischen Alterationen der mRNA Expression von AGS-Zellen nach Infektion mit *H. pylori*. Nach Normalisierung und Korrektur der Array-Daten ergaben sich bei AGS-Zellen 36 differentiell regulierte Gene. Einbezogen wurden nur Gene, die mindestens um den Faktor 2 im Vergleich zur Kontrolle hoch- oder herunterreguliert wurden.

Die Mehrzahl der in sieben Gruppen unterteilten 96 Gene des cDNA Arrays zeigte ein unverändertes Expressionsmuster. Lediglich 17 Gene wurden signifikant hochund 19 Gene wurden signifikant herunterreguliert (vgl. Tab. 4.1 und Abb 4.5).



Abb. 4.5: Quantifizierung der Über- (A) und Unterexpression (B) von Tumor-Metastasierungs-Markern in AGS- Zellen nach Cokultur mit *H.p. wt* P1. Die Werte der 17 hochregulierten Gene infizierter AGS-Zellen reichen von 25- bis 2-facher Überexpression im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen. Dagegen sind 19 Gene unterexprimiert und zwar im Bereich von 21,7 bis 2.

	Überexpression	Unterexpression	Genbank ID
Proteasen			
Caspase 8		21,7	NM_001228
Caspase 9		13,0	NM_001229
Cathepsin B		2,4	NM_001908
Cathepsin D		11,0	NM_001909
Cathepsin L		6,5	NM_001912
MGEA 5		2,4	NM_012215
MMP-1	25,0		NM_002421
MMP-3	14,3		NM_002422
MMP-7	4,0		NM_002423
MMP-8	7,2		NM_002424
MMP-10	3,5		NM_002425
MMP-14		5,4	NM_004995
MMP-15		2,0	NM_002428
u-PA	3,1		NM_002658
Protease-Inhibitoren			
PAI-1	7,9		NM_000602
Maspin	4,5		NM_002639
Timp-1	2,8		NM_003254
Timp-3		5,0	NM_000362
Wachstumsfaktoren und -inhibitoren			
csf-1	2,0		NM_000757
NGF-ß	6,1		NM 002506
TGF-ß	2,0		 NM_000660
VEGF		2,3	
Signaltransduktionsmoleküle			_
Rac1	2.0		NM 006908
uPAR	5.8		NM 002659
Zell-Zell Zell-Matrix- Verbindungsmoleküle	-,-		
Caveolin-1		5.4	NM 001846
Integrin $\alpha 5$		3.0	NM 002205
		2.1	NM_000210
NCom 1	3.5	_,.	NM_000615
Onkogono	0,0		
		15.8	NM 005239
0-615-2		5.5	NM_005252
	22	0,0	NM 005417
	2,2	6.5	NM_001986
		0,0	14012001200
		11.0	NM 015300
		13.0	NM 000610
		13,0	
NM 23		4,3	14IVI_000269

Tab. 4.1: Auswertung der mRNA-Expression von Tumor-Metastasierungs-Markern von AGS-Zellen nach Cokultur mit *H.p. wt* P1. Berücksichtigt wurden nur Veränderungen ab einem Faktor von zwei. Die vollständige Liste des GEArray Q Series Human Tumor Metastasis Array ist unter http://www.superarray.com zu finden. Aus der Gengruppe der Tumorsupressoren wurden drei Vertreter herunterreguliert CD44, SNCG und NM 23. Von der Gruppe der Onkogene wurden c-ets, PEA 3, cfos hoch- und c-src herunterreguliert. Eine Unterexpression lag im Experiment ebenfalls bei den Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungsmolekülen Caveolin-1, Integrin α 5 und Integrin α 6 vor. N-Cam-1 wurde überexprimiert. Von den vier auf dem Array vertretenen Signaltransduktionsmolekülen wurde die Expression von Rac1 uPAR signifikant hochhreguliert. und Aus der Gruppe der Wachstumsfaktoren und -inhibitoren lag im H. pylori-infizierten Ansatz bei NGF-ß, csf-1 und TGF-ß eine Überexpression, bei VEGF eine Unterexpression vor.

Auffällig viele Vertreter der Gruppen der <u>Proteasen</u> bzw. <u>Protease-Inhibitoren</u> zeigten eine deutliche Genregulation durch *H. pylori*. In der Gruppe der <u>Protease-Inhibitoren</u> wurden PAI-1, Maspin und TIMP-1 hoch- TIMP-3 herunterreguliert. In der Gruppe der <u>Proteasen</u> wurden die Cathepsine (Cathepsin B, D, L) sowie die beiden Apoptose-assoziierten Proteasen herunterreguliert. Caspase 8 ist insgesamt betrachtet das am stärksten herunterregulierte Gen (21,7-fach geringere Expression im Vergleich zur Negativkontrolle).

Eine Überexpression ist neben uPA vor allem unter den Mitgliedern der Matrix-Metalloproteinasen (MMP-1, -3, -7, -8, -10) zu finden. Bei MMP-1 handelt es sich das am stärksten überexprimierten Gen (25-fach erhöhte Expression im Vergleich zur Negativkontrolle).

4.3 Übertragung der Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation

4.3.1 Vergleich der Genexpressionsmuster von AGS und primären Epithelzellen

Um zu überprüfen, ob die aus dem Array erhaltenen Daten auch für die aus Resektaten bzw. Biopsien isolierten primären Magenepithelzellen gelten, wurden diese mit *H. pylori* unter den gleichen Bedingungen wie die AGS-Zellen infiziert. Anschließend wurde auch hier gesamt-RNA aus infizierten wie nicht-infizierten Ansätzen isoliert, in cDNA umgeschrieben und per semiquantitativer PCR auf die differentielle Regulation der oben genannten Gene (MMP-1, -3, -7, -14, Timp-1, -3,

und Caveolin) hin untersucht. Diese Ergebnisse wurden dann mit den Daten aus den Experimenten mit den AGS-Zellen verglichen. Die Experimente wurden unabhängig voneinander dreimal bei gleichen Bedingungen durchgeführt.

Abbildung 4.6 zeigt das Expressionsmuster einiger differentiell exprimierter Gene von AGS- und primären Magenepithelzellen unter *H. pylori* Einfluss. In Bezug auf die AGS-Zellen stimmen die Ergebnisse der quantitativen PCR mit denen des Microarrays überein. Außerdem weisen die primären Magenepithelzellen ein ähnliches differentielles Expressionsmuster wie bei den AGS auf.



Abb. 4.6: Vergleich der Expressionsmuster von AGS- und primären Magenepithelzellen. Die gesamt-RNA von *H.p.* wt *P1* (MOI=50) infizierten bzw. nicht infizierten (Negativkontrolle=NK) Epithelzellen wurde präpariert. Die Expression von MMP-1, -3, -7, -14, Timp-1, -3 und Caveolin-1 der beiden Zelltypen wurde per quantitativer RT-PCR analysiert. Der Abgleich erfolgte über das Haushaltsgen 18S rRNA. Sowohl AGS- als auch primäre Epithelzellen weisen dabei bis auf zwei Ausnahmen ein ähnliches Expressionsmuster auf.

Hochreguliert wurden die Proteasen MMP-1 (10-fach), -3 (AGS: 3-fach, Primärzellen: 2-fach), -7 (AGS: 4-fach, Primärzellen: 2-fach), uPA (AGS: 3-fach, Primärzellen: 2-fach) sowie der Protease-Inhibitor Timp-3 (2-fach). Herunterreguliert wurde MMP-14 (AGS: 5-fach, Primärzellen: 2,5-fach). Interessanterweise unterschieden sich die beiden Zellen im Expressionsmuster zweier Proteine: Timp-1 (AGS: 3-fach hochreguliert, Primärzellen: 2-fach herunterreguliert) und Caveolin-1 (AGS: 5-fach herunterreguliert, Primärzellen: 3-fach hochreguliert).

Am herausragendsten bei beiden Zellen ist die unter *H. pylori* stark erhöhte MMP-1 Expression, so dass die weiteren Untersuchungen auf diese Protease fokussiert wurden.

4.3.2 Vergleichende MMP-1 Expression in *H. pylori*-negativen und - positiven Magenbiopsien

H. pylori induziert in primären Magenepithelzellen ebenso wie in der etablierten Zelllinie AGS die MMP-1 Expression. Bislang wurde jedoch nur ein Zelltyp isoliert betrachtet. Um den Effekt der *H. pylori*-induzierten Entzündungsreaktion der Magenmukosa auf die MMP-1 Expression *in vivo* zu untersuchen wurden zunächst 15 Magenbiopsien, davon sechs mit positiven und neun mit negativem *H. pylori* Status, immunhistochemisch untersucht. Die Färbungen erfolgten nach 3.9.

Die Fluoreszenz-Doppelfärbung zeigte eine verstärkte MMP-1 Expression (rote Fluoreszenz) in epithelialen Zellen der *H. pylori*-infiltrierten (grüne Fluoreszenz) Foveolen im Veraleich zu den Н. *pylori*-negativen Proben. Der immunhistochemische Nachweis der MMP-1 Expression erfolgte beim Epithel hautsächlich an Stellen bakterieller Adhäsion. Überdies wurde MMP-1 auch in Fibroblasten nachgewiesen. Somit scheint die MMP-1 Überexpression in den Epithelzellen der Magenschleimhaut auch in vivo, auf Proteinniveau, mit einer H. pylori Infektion assoziiert zu sein.



Abb. 4.7: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von MMP-1 und *H. pylori* in der Magenmukosa. Detektion von MMP-1- (rot) und *H.p.*-Immunreaktivität (grün) in *H.p.*-negativen (A, B und E) und positiven (C, D und F) Antrumbiopsien durch Immunfluoreszenzmikroskopie. Im Vergleich zur gesunden Mukosa wies die *H.p.*-positive eine signifikant stärkere epitheliale MMP-1-Färbung auf, speziell an den *H.p.* Kontaktstellen der infiltrierten Foveolen (F). Außer den Epithelzellen zeigten auch einzelne Fibroblasten des Stromas eine positive Immunreaktion (B, E). Die Kernfärbung erfolgte durch 4', 6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI). Vergrößerung: A und C, 100x; B und D, 200x; E und F, 600x. Ery: Erythrozyten, Fb: Fibroblasten; FE: Foveolarepithel; Hp: *H. pylori* Um das Ergebnis zu überprüfen, wurde aus weiterem Biopsiematerial mRNA und Protein (vgl. 3.5.1 und 3.8.1) extrahiert und die MMP-1 Expression in Bezug auf den *H. pylori* Status der Patienten durch quantitative RT-PCR (Ergebnisse nicht gezeigt) bzw. Western Blot analysiert.



Abb. 4.8: MMP-1 Expression in Magenbiopsien (Antrum) in Abhängigkeit vom *H. pylori*-Status. *H.p.*-positive (+) und -negative (-) Antrumbiopsien wurden homogenisiert (vgl. 3.8.1) und die MMP-1 Expression im Western Blot analysiert. Als Kontrolle diente das Haushaltsgen ß2-Mikroglobulin (ß2-MG). Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und gegeneinander abgeglichen. Im Vergleich zu den *H.p.*-negativen Biopsien ist bei den *H.p.*-positiven Proben eine deutliche (5 - 20-fache) Erhöhung der MMP-1 Expression zu sehen.

Abbildung 4.8 zeigt, dass die *H. pylori*-positiven eine fünf- bis zwanzigfache Erhöhung der MMP-1 Expression im Vergleich zu den *H. pylori*-negativen Proben zeigen. Die zwei Patienten mit sehr hoher MMP-1 Expression waren mit CagApositiven *H. pylori*-Stämmen infiziert. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchung überein.

H. pylori induziert somit eine erhöhte MMP-1 mRNA und Proteinexpression epithelialer Zellen *in vitro* und *in vivo*.

4.4 Analyse der MMP-1 Expression von Magenepithelzellen nach Cokultur mit *H. pylori* in Abhängigkeit von Stromazellen

Die zelluläre Interaktion von Epithelzellen mit den Zellen des Stromas spielt eine wesentliche Rolle bei Prozessen wie Morphogenese und Proliferation von Organen. Zahlreiche Studien belegen eine Korrelation zwischen der Expression proteolytischer Enzyme durch Tumorzellen und ihrer Invasivität (Noel et al., 1997). Jedoch leisten auch nicht-maligne Zelltypen, wie Fibroblasten und gewebeinflitrierende Makrophagen, ihren Beitrag Degradation der zur Extrazellulären Matrix (Koyama 2005, Tyagi et al., 1996). Die immunhistochemischen Untersuchungen des Antrumbiopsiematerials (vgl. 4.3.2 und Abb. 4.7) ergaben, dass neben Epithelzellen auch Fibroblasten eine Quelle der MMP-1 Expression sind.

Die beiden Zelltypen wurden in nicht-Kontakt-Kultur mit und ohne *H. pylori* zusammen für 24 h cokultiviert (MOI=50). Die Kultivierung beider Zellen erfolgte in einer Boyden-Chamber-Platte, wobei sich die AGS-Zellen (mit oder ohne *H. pylori*) im unteren, die Fibroblasten im oberen Kompartiment befanden. Beide Kompartimente waren durch eine Membran von 0,4 µm Porengröße getrennt, welche die freie Diffusion von Botenstoffen usw. ermöglicht, die Bakterien jedoch im unteren Bereich zurückhält. Diese Anordnung entspricht in etwa der *in vivo* Situation, bei der die Fibroblasten auch nicht in direkten Kontakt mit *H. pylori* gelangen. Als vergleichende Kontrolle dienten infizierte und nicht-infizierte Monokulturen der einzelnen Zelltypen.

Wie in Abbildung 4.9 zu sehen ist, zeigen monokultiverte Epithelzellen eine verstärkte MMP-1 Expression nach Infektion mit *H. pylori.* Die MMP-1 Expression monokultivierter Fibroblasten bleibt dagegen relativ unbeeinflusst von der *H. pylori*-Infektion. Beide Zelltypen zeigen jedoch in Cokultur unter *H. pylori*-Einfluss insgesamt eine höhere MMP-1 Expression als die jeweilige Monokultur.



Abb. 4.9: Gegenseitige Beeinflussung von Epithelzellen und Fibroblasten hinsichtlich ihrer jeweiligen H. pylori-induzierten MMP-1 mRNA- und Proteinexpression. AGS-Zellen und primäre Fibroblasten (Fb) wurden im 6-well Transwellchamber (0,4 µm Porengröße) im unteren (AGS) bzw. oberen Kompartiment (Fb) (co-)kultiviert. Nach 24 h serumfreier (Co-) Kultur erfolgte die Zugabe von H.p. wt P1 (MOI=50) in das untere Kompartiment für einen Zeitraum von 24 h (37 °C, 5% CO₂). Als Kontrollen dienten nicht-infizierte Zellen (Mono- und Cokultur). Die 10-fach konzentrierten Überstände der Ansätze wurden im Western Blot analysiert (A) und densitometrisch ausgewertet. Als interne Kontrolle diente ß2-Mikroglobulin. Die MMP-1 mRNA Level von AGS-Zellen (B) und Fibroblasten (C) in Mono- bzw. Cokultur wurden per quantitativer RT-PCR bestimmt. Abgleich erfolgte gegen das Haushaltsgen 18S rRNA. Fehlerindikator: Ein +/-Standardabweichung. Asterisk: p < 0.05 versus monokultivierte Zellen.

4.5 Auswirkung der MMP-1 Inhibition auf die *H. pylori*-vermittelte Degradation der extrazellulären Matrix

Proteasen werden seit längerem mit gesteigerter zellulärer Motilität und invasivem Verhalten von Tumorzellen in Zusammenhang gebracht. Die Beziehung zwischen einer *H. pylori*-Infektion und der Zerstörung der extrazellulären Matrix ist bislang unklar (Iwamoto *et al.*, 2005).



Abb. 4.10: Einfluss von *H. pylori* auf die Morphologie und zelluläre Migration von primären humanen Magenepithelzellen. Aus Biopsien isolierte primäre Magenepithelzellen (auf 35 mm \emptyset Kulturschalen) wurden mit *H.p.* wt P1 (MOI=50) infiziert und über einen Zeitraum von 20 h mikroskopisch im Phasenkontrast beobachtet. Startpunkt der Infektion t = 0 h (A). Endpunkt t = 20 h (B).

H. pylori induziert einen Elongations-Phänotyp und steigert die Motilität von AGSund primären humanen Magenepithelzellen (Abb. 4.10) sowie ihre MMP-1 Expression. Deshalb wurde der Einfluss der MMP-1-Überexpression auf die Migration von AGS-Zellen durch Matrigel[™]-beschichtete Polycarbonfilter mit einer Porengröße von 0,8 µm (Transwellchamber) untersucht. Matrigel[™] enthält Extrakte wie Laminin, Kollagen IV und Proteoglykane, welche zu den Hauptbestandteilen der Basalmembran zählen.

AGS-Zellen wurden mit den Wildtypstämmen *HpP1* und *Hp26695* infiziert (MOI = 50). Zusätzlich erfolge die Zugabe von einem antisense MMP-1 Oligonukleotid bzw. einem nonsense Oligonukleotid (Kontrolle), welche in einem Vorversuch getestet wurden, sowie einem neutralisierenden MMP-1 Antikörper.



Abb. 4.11: Einfluss der *H. pylori* induzierten MMP-1 Expression auf die zelluläre Migration. Der Einfluss von antisense MMP-1 Oligonukleotiden auf die Migration von 1,5 x 10^5 AGS-Zellen (infiziert mit *H.p.* wt *P1* [schwarze Balken] und *Hp26695* [graue Balken], MOI=50; uninfizierte Zellen = Negativkontrolle) wurde im Boyden Chamber Experiment analysiert (A). Die Inkubationsdauer auf der rekonstruierten Basalmembran der 24-well Transwell Platte (Porengröße 8 µm) betrug 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Als Kontrolle fungierte ein Ansatz mit einem nonsense-Oligonukleotid. Die Hemmung der MMP-1 Expression durch die antisense Oligonukleotide wurde auf mRNA (B) und Proteinebene (C) in Vorversuchen getestet. Fehlerindikator: +/-Standardabweichung. Asterisk: p < 0,05 versus mit *H.p.* infizierte AGS-Zellen.

In Abbildung 4.11 ist gezeigt, dass die, durch das antisense MMP-1 Oligonukleotid, reduzierte MMP-1 Expression in signifikant verminderter Invasivität resultierte. Die Zahl der invasiven Zellen lies sich bei beiden H. pylori-Wildtypstämmen (P1 und Hp26695) um mehr als die Hälfte - also fast auf das Niveau nicht-infizierter Zellen - reduzieren. Das als Kontrolle dienende nonsense-Oligonukleotid hatte keinen Einfluss auf Invasivität. Die Verwendung des neutralisierenden Antikörpers gegen MMP-1 führte ebenfalls zu einer verminderten Invasivität von AGS-Zellen. Auch hier ließ sich die durch Infektion mit H. pylori gesteigerte Invasivität um die Hälfte reduzieren (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.6 Kinetik der *H. pylori* induzierten MMP-1 Expression von Magenepithelzellen

Um den zeitlichen Verlauf der Induktion der verstärkten MMP-1 Expression bzw. -Sekretion in infizierten Magenepithelzellen zu untersuchen, wurden Überstände von *H.p.* wt *P1* infizierten (MOI=50) und nicht-infizierten AGS-Zellen zu definierten Zeiten abgenommen (0, 4, 8, 12, 20, 24 und 28 h) und im Western Blot und MMP-1 Aktivitäts-ELISA untersucht.



Abb. 4.12: Effekt der *H. pylori* Infektion auf die MMP-1 Expression und Sekretion von AGS-Zellen im Zeitverlauf. Nach 24 h serumfreier Kultur der AGS-Zellen erfolgte die Zugabe von *H.p.* wt *P1* (MOI=50) bzw. PBS (Negativkontrolle). Die Probenentnahme beider Ansätze erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Die 10-fach konzentrierten Überstände wurden im Western Blot densitometrisch ausgewertet (+H.p.: ▲. NK: ■), die unkonzentrierten Überstände der infizierten Zellen im MMP-1 Aktivitäts-ELISA analysiert (●). Fehlerindikator: +/- Standardabweichung.

Wie in Abbildung 4.12 zu sehen, konnte eine signifikante Erhöhung der MMP-1 Expression *H. pylori*-infizierter AGS-Zellen bereits nach etwa 4 h, das Auftreten der aktiven Protease nach etwa 20 h festgestellt werden. Nach 24 h geht die MMP-1 Expression in die Sättigung über, während die Aktivität noch etwas zunimmt.

Bei dem nicht-infizierten Ansatz kam es erst nach 24 h zu einer detektierbaren Anreicherung von MMP-1 im Überstand, die jedoch immer noch unter dem Wert lag, der bei *H. pylori*-infizierten Zellen nach 4 h gemessen wurde.

4.7 Abhängigkeit der MMP-1 Expression von bakteriellen Virulenzfaktoren

Die Folgen einer *H. pylori*-Infektion sind neben Wirts- und Umweltfaktoren auch von pathogenen Faktoren des Bakteriums abhängig (Odenbreit *et al.,* 2000). Dazu zählt vor allem die 40 kb große Pathogenitätsinsel (pathogenicity island, PAI), welche unter anderem das 128 kDa große cytotoxin-assoziierte Protein (CagA) und membran-assoziierte Proteine des bakteriellen Typ IV-Sekretions Systems (T4SS), welche das CagA Protein in die Wirtszelle einschleusen, codiert. *H. pylori* Stämme werden daher, je nach Vorhandensein dieses Pathogenitätsfaktors in zwei Gruppen unterteilt: Typ I und Typ II. Stämme vom Typ I sind virulenter und besitzen Krankheits-assoziierte Komponenten wie CagA.



Abb. 4.13: Die Induktion der MMP-1 Expression in Abhängigkeit bakterieller Virulenzfaktoren. AGS-Zellen wurden mit verschiedenen *H.p.*-Wildtypstämmen (*P1, Hp26695*) und den dazugehörenden isogenen Mutanten (*P1* Δ *CagA, P1* Δ *VIRB7; HpPAI, Hp0539, Hp0543*) infiziert (MOI=50). Die 10-fach konzentrierten Überstände wurden im Western Blot analysiert und densitometrisch ausgewertet. Als Kontrolle diente das Haushaltsgen ß2-Mikroglobulin (ß2-MG). Fehlerindikator: +/- Standardabweichung. Asterisk: p < 0,05 versus H.p. wt-infizierte AGS-Zellen.

Um zu sehen, in wieweit sich verschiedene Komponenten der Pathogenitätsinsel von *H. pylori* auf die MMP-1 Expression auswirken, wurden AGS-Zellen mit den unter 2.9 aufgeführten Wildtyp- und isogenen Mutantenstämmen von *H. pylori* für einen Zeitraum von 24 h bei einer MOI=50 cokultiviert. Die MMP-1 Expression wurde auf mRNA- (Ergebnisse nicht gezeigt) und auf Proteinebene untersucht.

Eine signifikante Erhöhung der MMP-1 Expression bzw. Aktivität induzierten die beiden Wildtypen (*P1, Hp26695*), sowie die isogenen Mutanten *P1* Δ *CagA* und *Hp0543*. Die Mutante *P1* Δ *CagA* zeigt keine Expression des CagA Proteins und die Mutante *Hp0543* besitzt einen CagA Translokationsdefekt. Jedoch sind beide Mutanten in der Lage, JNK und NF- κ B zu aktivieren (Al-Ghoul *et al.*, 2004). Die Stämme *HpPAI*, *Hp0539* und *P1* Δ *VIRB7*, die entweder ein fehlendes oder defektes T4SS besitzen, zeigten weder veränderte Expression noch Aktivität von MMP-1 im Vergleich zur Negativkontrolle. Daher scheint die Expressionserhöhung von MMP-1 zwar unabhängig von der Translokation des CagA Proteins in die Wirtszelle zu sein, für die Überexpression von MMP-1 ist allerdings ein funktionsfähiges T4SS unabdingbar.

Zur Überprüfung des Ergebnisses wurden auch die primären Magenepithelzellen mit P1 und den dazugehörigen isogenen Mutantenstämmen ($P1 \Delta VIRB7$ und $P1 \Delta CagA$) von *H. pylori* für einen Zeitraum von 8 h mit einer MOI=50 cokultiviert. Die MMP-1 Expression wurde auf mRNA- untersucht.

In Abbildung 4.14 ist zu sehen, dass der *H. pylori wt P1* ebenso wie bei den AGS-Zellen eine signifikante Erhöhung der MMP-1 Expression induziert. Auch bei Verwendung der isogenen Mutante *P1* Δ *CagA* kommt es beinahe zu einer Verdopplung der MMP-1 Expression im Vergleich zu den nicht-infizierten primären Epithelzellen (NK). Die Mutante *P1* Δ *VIRB7* hat dagegen einen eher gegenteiligen Effekt auf die MMP-1 Expression.

64


Abb. 4.14: Die Induktion der MMP-1 Expression von primären Epithelzellen in Abhängigkeit bakterieller Virulenzfaktoren. Primäre Epithelzellen wurden mit *H.p.* wt *P1* und den dazugehörenden isogenen Mutanten (*P1* Δ *CagA*, *P1* Δ *VIRB7*) mit einer MOI=50 infiziert. Die MMP-1 mRNA-Level wurden per quantitativer RT-PCR bestimmt. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Zellen (NK). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Gel. Ein Abgleich erfolgte gegen das Haushaltsgen 18S rRNA. Fehlerindikator: +/- Standardabweichung. Asterisk: p < 0,05 versus *H.p.* wt-infizierte Primärzellen.

4.8 Potentielle MMP-1 Regulatoren

4.8.1 Einfluss von Chemokinen/Zytokinen auf die MMP-1 Expression

Da *H. pylori* die Produktion Entzündungs-assoziierter Zytokine und Chemokine in den Wirtszellen stimuliert (Crabtree *et al.*, 1995 und 1996), wurde der Einfluss solcher Botenstoffe auf die MMP-1 Expression untersucht.

Serumverarmte AGS-Zellen wurden 24 h mit IL-1ß, IL-6, TNF- α sowie TGF-ß (c = 50 ng/ml) inkubiert. Die optimale Zytokin-/Chemokinkonzentration ergab sich dabei aus früheren Experimenten. Die MMP-1 Expression wurden auf RNA- (quantitative RT-PCR, Ergebnisse nicht gezeigt) und Proteinebene (Western Blot) untersucht. Die Aktivität wurde mittels MMP-1 Aktivitäts-ELISA bestimmt.

Wie Abbildung 4.15 (A) zeigt, wurde eine signifikant erhöhte MMP-1 Aktivität nach Zugabe von IL-1ß und TNF- α detektiert, wobei IL1-ß einen deutlich höheren Einfluss aufweist als TNF- α : Die MMP-1 Expression steigt unter Einfluss von TNF- α nur etwa halb so hoch an. Eine noch geringere Steigerung der MMP-1 Expression bzw. Sekretion verursacht TGF-ß. IL-6 scheint keinen Einfluss auf die MMP-1 Expression/Aktivität zu haben.



Abb. 4.15: Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf die MMP-1 Expression von infizierten und nichtinfizierten AGS-Zellen. (A) Stimulation von AGS-Zellen mit Zytokinen. Zugabe neutralisierender Zytokin-Antikörper zu H. pylori-infizierten AGS-Zellen: Western Blot (B) und Aktivität (C). Nach 24 h serumfreier Kultur der AGS-Zellen erfolgte die Zugabe von IL-1ß, IL-6, TNF- α und TGF-ß (c=50 ng/ml). Die unkonzentrierten Überstände wurden im MMP-1 Aktivitäts-ELISA analysiert (A). Unter gleichen Bedingungen erfolgte die Infektion der AGS-Zellen mit H.p.wtP1 (MOI=50). Zu diesen Ansätzen wurden neutralisierende Antikörper (Ab) hinzugefügt. Die 10-fach konzentrierten Überstände wurden im Western Blot mit ß2-Mikroglobulin (ß2-MG) als interne Kontrolle (B), die unkonzentrierten im MMP-1 Aktivitäts-ELISA analysiert (C). Fehlerindikator: +/- Standard-abweichung. Asterisk: p < 0,05 versus unbehandelte AGS-Zellen.

Um nachzuweisen, ob IL-1ß, TNF- α und TGF-ß auch in der *H. pylori*-Infektion eine direkte Funktion bei der MMP-1 Expressionsregulation inne haben, wurden in einem weiteren Versuchsansatz *H. pylori wt P1*-infizierte AGS-Zellen (MOI=50) mit neutralisierenden Antikörpern gegen IL-1ß, IL-6, TNF- α und TGF-ß behandelt. Die optimalen Antikörperkonzentrationen zur Neutralisierung der entsprechenden Zytokine wurden in einem Vorversuch ermittelt. Keiner der verwendeten neutralisierenden Antikörper zeigte eine nennenswerte Reduktion der *H. pylori-*vermittelten MMP-1 Expression. Obwohl die Zytokine prinzipiell die MMP-1 Expression stimulieren können, spielen sie demnach für die *H. pylori*-induzierte Expressionssteigerung keine Rolle (Abb.4.15B, C).

4.8.2 Beteiligung von Signalwegskaskaden an der MMP-1 Expressionsregulation in Magenepithelzellen

H. pylori induziert in seinen Wirtszellen eine chronische Entzündungsreaktion und stimuliert die Zellproliferation (Bechi *et al.*, 1996, Peek *et al.*, 1997).

Die Unterfamilien der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK und p38 spielen eine große Rolle bei Entzündungs- (Lee *et al.*, 1996, Woodgett *et al.*, 1996) und Wachstumsprozessen (Pillinger *et al.*, 1996 und 2003). Die MAP-Kinase Kaskade führt schließlich zur Phosphorylierung und somit zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B. Dies geschieht auch bei der Infektion mit *H. pylori* und führt wiederum zur Sekretion entzündlicher Chemokine wie IL-8 (Naumann, 2000 und 2005, Maeda *et al.*, 2000).

Um die Rolle dieser Signalwege bei der MMP-1 Expression zu untersuchen, wurden mit *H. pylori* wt *P1* infizierte AGS-Zellen mit verschiedenen Signalweg-Inhibitoren behandelt: IKK-NBD und APDT (NF-κB-Inhibitoren); SB203580 (p38-Inhibitor); SP600125 (JNK-Inhibitor) und U0126 (MEK 1/2-Inhibitor). Die Analyse der MMP-1 Expression erfolgte auf RNA- (quantitative RT-PCR) und Proteinebene (Western Blot, Aktivitäts-ELISA).

Die Inhibition von ERK 1/2 und JNK durch U0126 und SP600125 führte zu einer vollständig unterdrückten Expressionserhöhung von MMP-1 durch *H. pylori*. Dies weist daraufhin, dass diese beiden Signalwege eine entscheidende Rolle bei der Regulation der MMP-1 Expression spielen. Alle übrigen Inhibitoren zeigten keinen Einfluss auf die MMP-1 Expression/Aktivität (Abb.4.16).



Abb. 4.16: Effekt von Signaltransduktions-Inhibitoren auf die MMP-1 Expression und Aktivität. Nach 24 h serumfreier Kultur der AGS-Zellen erfolgte die Infektion mit *H.p.* wt P1 (MOI=50) und die Zugabe von reinem DMSO bzw. der in DMSO gelösten Inhibitoren (NF- κ B: IKK-NBD, APDT, JNK: SP600125, MEK 1/2: U0126, p38: SB203580; c=10µM) für einen Zeitraum von 24 h. Als absolute Kontrollen (AGS NK) dienten nicht-infizierte Zellen. Die MMP-1 mRNA-Level wurden per quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Kontrollgel (A). Ein Abgleich erfolgte gegen das Haushaltsgen 18S rRNA. Die 10-fach konzentrierten Überstände der Ansätze wurden im Western Blot (B) analysiert und densitometrisch augewertet (schwarze Balken). Als interne Kontrolle diente ß2-Mikroglobulin (ß2-MG). Die unkonzentrierten Überstände der Ansätze wurden im MMP-1 Aktivitäts-ELISA analysiert (C; graue Balken). Fehlerindikator: +/- Standardabweichung. Asterisk: p < 0,05 versus mit *H.p.* wt P1 infizierte AGS-Zellen (Kontrolle).

Um zu überprüfen, ob die Inhibition von ERK 1/2 und JNK auch *in vivo* die *H. pylori*-induzierte MMP-1 Expressionssteigerung unterbindet, wurden In einem weiteren Versuch die primären Magenepithelzellen mit *H. pylori* wt P1 infiziert und mit den Inhibitoren U0126 und SP600125 behandelt. Die Aktivierung von ERK in primären Magenepithelzellen durch *H.pylori* wurde in einem Vorversuch bestätigt (s. Abb. 4.17 A).



Abb. 4.17: Auswirkung der inhibierten Signaltransduktion über ERK 1/2 und JNK- auf die MMP-1 Expression von primären Magenepithelzellen. (A) Primäre Epithelzellen wurden serumfrei (Quantum 286, PAA, Cölbe) kultiviert. Die Infektion mit *H. p. wt P1* MOI=50 erfolgte für 8 h. Der Nachweis der *H.p.*-induzierten Aktivierung von ERK erfolgte im Western Blot durch Verwendung eines Phospho-spezifischen Antikörpers (A). (B) Die Zugabe von reinem DMSO bzw. der in DMSO gelösten Inhibitoren (NF- κ B: IKK-NBD, APDT, JNK: SP600125, MEK 1/2: U0126, p38: SB203580; c = 10µM) erfolgte für einen Zeitraum von 8 h unter gleichen Infektionsbedingungen wie in (A). Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Zellen +/- DMSO. Die MMP-1 mRNA-Level wurden per quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Kontrollgel. Ein Abgleich erfolgte gegen das Haushaltsgen 18S rRNA. Fehlerindikator: +/- Standardabweichung. Asterisk: p < 0,05 versus mit *H.p.* wt P1 infizierte AGS-Zellen (Kontrolle).

Wie Abbildung 4.17 (B) zeigt, lässt sich die *H. pylori*-induzierte MMP-1 Expressionssteigerung durch Verwendung der ERK 1/2- und JNK-Inhibition (U0126 und SP600125) auch bei den primären Magenepithelzellen auf den Level nicht-infizierter Zellen bringen. Dies bestätigt, dass diese beiden Signalwege auch *in vivo* eine Rolle bei der Regulation der MMP-1 Expression spielen.

5. Diskussion

H. pylori ist ein spiralförmiges, mikroaerophiles und gram-negatives Bakterium, welches die humane Magenschleimhaut besiedelt. Es gehört zu den wenigen bakteriellen Pathogenen, die im Menschen eine chronische Infektion hervorrufen. Etwa 70% aller Magengeschwüre in Europa sind *H. pylori*-assoziiert. Die Infektion mit *H. pylori* spielt eine kausale Rolle in der Karzinogenese: infizierte Patienten weisen gegenüber nicht infizierten ein 3 - 6 -fach höheres Krebsrisiko auf. Die Folgen einer *H. pylori*-Infektion sind abhängig von Wirt, Umfeld und bakteriellen Faktoren.

Untersuchungen der Genexpression lassen nur einen kleinen Einblick in die zellphysiologischen Zusammenhänge zu. Um das Reaktionsmuster eines einzelnen Zelltyps separat zu untersuchen, stehen Primärkulturen und immortalisierte Zelllinien zur Verfügung. In beiden Systemen kann die *in vivo* Situation nur annähernd nachgeahmt werden. Der Einsatz permanenter Zelllinien aus immortalisierten Zellen stellt die einfachste Möglichkeit der Zellkultur dar. Doch haben permanente Zelllinien den Nachteil, dass sie primär aus Tumorzellen entwickelt werden und im Verlauf ihrer Kultivierung Veränderungen unterworfen sind, so dass die Ergebnisse nur mit Einschränkungen interpretierbar sind.

In den meisten Studien zur Pathogenese von H. pylori findet die Adenokarzinomzelllinie AGS Verwendung. Jedoch weisen Experimente mit dieser Zelllinie eine eingeschränkte Aussagekraft auf. Beispielsweise bindet H. pylori vorzugsweise an den Zell-Zell-Kontakten (Heckzo et al., 2000). AGS-Zellen exprimieren zwar die meisten Zell-Zell-Verbindungsproteine, wie ZO-1 (Amieva et al., 2003), Claudin-4 und -5 (Fedwick et al., 2005), Occludin (Mima et al., 2005) und ß-Catenin (Kim et al., 2005), bilden jedoch nicht die entsprechenden funktionellen Strukturen wie z.B. Tight Junctions aus. Bakterielle Anheftungsstellen finden sich hier an Zell-Zell Berührungsflächen aber auch über die ganze Zelle verteilt. Ferner zeigen AGS-Zellen im Vergleich zu primären Zellen eine abnormale Verteilung mancher Proteine, wie in Abbildung 4.3 zu sehen ist, oder z.B. das Zellmatrixprotein Dystroglukan und das Adapterprotein der Fokalkontakte Paxillin (Conlin et al., 2004). Permanente Zelllinien weisen außerdem eine geringere Sensitivität gegenüber bakteriellen Virulenzfaktoren

(VacA) auf (Smoot *et al.*, 1996). Somit sind primäre Magenepithelzellen ein besseres *in vitro*-Modell zum Studium der *H. pylori*-Infektion, dass jedoch durch Zugang zu frischem Biopsiematerial bzw. Resektaten beschränkt ist.

Normale humane Epithelzelllinien sind zur Zeit nicht käuflich erwerbbar. Um die Auswirkungen einer *H. pylori*-Infektion unter *in vivo*-näheren Bedingungen untersuchen zu können wurde in dieser Arbeit eine Methode zur Isolierung primärer humaner Magenepithelzellen aus Magenresektaten bzw. Biopsiematerial etabliert.

Am erfolgreichsten erwies sich dabei die enzymatische Dissoziation des Gewebes durch ein Gemisch aus Collagenase und Dipsase. Nach 24 Stunden bildeten die isolierten Zellen Kolonien und konnten für etwa eine Woche in Kultur gehalten werden. Die immunhistochemischen Untersuchungen ergaben für Oberflächenepithel typische positive Reaktionen (Cytokeratin 18, PAS, Muc5AC).

5.1 Differentiell exprimierte Gene in AGS-Zellen nach *H. pylori*-Infektion

Die cDNA-Array Technologie ermöglicht die gleichzeitige Expressionsanalyse einer großen Anzahl verschiedener Gene. Um einen ersten Eindruck zu bekommen, wie sich das Genexpressionsmuster von Magenepithelzellen unter Einfluss von *H. pylori* verändert, wurde ein Mircoarray (GEArray Q Series Human Tumor Metastasis Array, Biomol, Hamburg) zur Analyse von 96 Genen, die in Prozessen wie zellulärem Wachstum, extrazellulärem Matrixumbau und Signaltransduktion involviert sind, durchgeführt. Die Mehrzahl der in sieben Gruppen unterteilten 96 Gene des cDNA Arrays zeigte ein unverändertes Expressionsmuster. Lediglich 17 Gene wurden signifikant hoch- und 19 Gene wurden signifikant herunterreguliert (vgl. Tab. 4.1 und Abb. 4.5).

Aus der Gengruppe der Tumorsupressoren wurden drei Vertreter herunterreguliert CD44, SNCG und NM 23.

CD 44, ein Transmembranglykoprotein, ist bei einer Reihe von adhäsiven und migratorischen Mechanismen involviert. Es beeinflusst die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Aktivierung vaskulärer Endothel- sowie Tumorzellen.

Herunterregulation von CD 44 ist für den Prozess der Metastasierung von Bedeutung. (Yasasever *et al.*, 2000).

SNCG spielt eine Rolle in Neoplasien, besonders Brust- und Gebärmutterkrebs. Bei Überexpression stimuliert SNCG die Proliferation und induziert die Metastasierung von Krebszellen (Liu *et al.*, 2005). Yanagawa *et al.* (2005) konnten im Magenkarzinom und Magenkarzinomzelllinien eine aberrierende Expression des Proteins durch Demethylierung der CpG-Inseln feststellen. Allerdings wurden hier keine AGS-Zellen verwendet. Über den Einfluss von *H. pylori* auf die SNCG-Expression ist bislang noch nichts bekannt.

Die Expression von NM23 wurde in zahlreichen Tumoren, darunter Brust- und Darmkrebs, Melanome und hepatozelluläre Karzinome untersucht. Die Herunterregulation des Proteins ist in einigen Tumoren, darunter auch dem Magenkarzinom, assoziiert mit Metastasierung oder Voranschreiten der Krankheit beschrieben (Kodera *et al.*, 1994, Kumar *et al.*, 1999).

Von der Gruppe der Onkogene wurden c-ets , PEA 3, c-fos hoch- und c-src herunterreguliert.

Die Src-Familie der Proteinkinasen ist einer Vielzahl an von Signaltransduktionskaskaden beteiligt und reguliert Zellteilung, Motilität, Adhäsion, Angiogenese und Überleben der Zellen. In einigen (nicht-)epithelialen Krebsarten sind Mitglieder dieser Familie, darunter auch c-src, überexprimiert bzw. anormal aktiviert (Summy und Gallick, 2003). Die Aktivierung und Überexpression von Onkogenen wie c-ets-2, PEA-3 und c-fos ist ebenfalls in diversen Krebsformen beschrieben (Mitsuno et al., 2002, Davidson et al., 2004, Tynan et al., 2005, Baldus et al., 2004).

Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungsmoleküle sind essenziell für den Erhalt der Gewebestruktur. Der Verlust von Zell-Zell und Zell-Matrixkontakten ist charakteristisch für hochinvasive Karzinomzellen. Eine Unterexpression lag im Experiment bei Caveolin-1, Integrin α 5 und Integrin α 6 vor. N-Cam-1 wurde überexprimiert.

Caveolin-1, ein potentielles Tumorsuppressorgen, ist in vielen Karzinomen anormal exprimiert. Gao *et al.* (2005) konnten zeigen, dass der Caveolin Level im Magenkarzinom signifikant niedriger ist als in normaler Mukosa.

Während des Invasionsprozesses müssen Tumorzellen mit den umgebenden Proteinen der Extrazellulären Matrix interagieren. Obwohl Integrine dabei eine

bedeutende Rolle spielen (Hynes, 1987, Weinel *et al.*, 1995), tendieren epitheliale Karzinome *in vivo* dazu, bestimmte Integrinuntereinheiten zu unterexprimieren (Albelda, 1993, Koretz *et al.*, 1991, Pignatelli *et al.*, 1991).

Von den vier auf dem Array vertretenen Signaltransduktionsmolekülen wurde die Expression von Rac1 und uPAR signifikant hochreguliert.

Aus der Gruppe der Wachstumsfaktoren und -inhibitoren lag im *H. pylori*-infizierten Ansatz bei NGF-ß, csf-1 und TGF-ß eine Überexpression, bei VEGF eine Unterexpression vor.

Infektionen mit Н. pylori sind typischerweise mit ausgedehnten Entzündungsreaktionen und der Gewebeinfiltration durch Lymphozyten/ 2001). Monozyten assoziiert (Mayer-Scholl et al., 2004, Allen, Die Entzündungsantwort durch die Immunzellen scheint ein Hauptgrund der epithelialen Gewebeschädigung zu sein und trägt so vermutlich zu einer Vielzahl von Krankheiten wie z.B. Magen-/Zwölffingerdarmgeschwüre, MALT-(mucosaassociated lymphoid tissue) Lymphom oder Adenokarzinome (Peek und Blaser, 2002, Montecucco und Rappuoli, 2001). CSF-1 ist ein wichtiger Faktor für die Rekrutierung, Aktivierung und Differenzierung von Monozyten (Varney et al., 2005). Die H. pylori-induzierte Überexpression des Monozyten-Botenstoffes CSF-1 könnte so einen Beitrag zur Infiltration des Gewebes durch Entzündungszellen leisten.

In der Gruppe der Protease-Inhibitoren wurden PAI-1, Maspin und TIMP-1 hoch-, TIMP-3 herunterreguliert.

Maspin (mammary serine proteinase inhibitor) ist ein Tumorsupressor-Gen, welches zur Serpin-Familie gehört. Inhibitorische Funktionen sind beschrieben für Motilität, Invasion, Metastasierung und Agiogenese von Brust- und Prostatakarzinomen (Bischof *et al.*, 2001). Terashima *et al.* (2005) schlagen für Maspin eine potentielle Rolle in der Metastasierung des Magenkarzinoms vor: In normalem Magenepithelien konnte keine Expression gefunden werden, wohl aber in 74 von 85 Tumorgeweben.

TIMPs gelten als potentielle Inhibitoren von Tumorwachstum (Henriet *et al.*, 1999). Die TIMP-1 Expression wurde jedoch hochreguliert. Ein erhöhter TIMP-1 mRNA Level ist in Magenkarzinomen beschrieben (Yasui *et al.*, 2005, Mimori *et al.*, 1997). Erhöhte mRNA Level von TIMP-1 konnten durch *in situ*-Hybridisierung in

Gewebeproben von Magengeschwüren, Morbus Crohn und Dünndarmgeschüren nachgewiesen werden (Saarialho-Kere *et al.*, 1996).

In der Gruppe der Proteasen wurden die Cathepsine (Cathepsin B, D, L) sowie die beiden Apoptose-assoziierten Proteasen (Caspase 8 und 9) herunterreguliert.

Apoptose oder der programmierte Zelltod ist ein wichtiger Prozess um normale Entwicklung und Gewebehomöostase zu gewährleisen. Tumore sind jedoch durch unkontrolliertes Zellwachstum und Verlust von Apoptose gekennzeichnete Krankheitsstadien. In vielen Tumoren ist die Dysregulation der Apoptose eng mit der Onkogenese und dem malignen Phänotyp der Tumorzellen assoziiert. Meist ist die Expression anti-apoptotischer Moleküle (z.B. BCL-2) hochreguliert während die Funktion pro-apoptotischer Moleküle (z.B. Caspasen) gestört ist. Die Aktivierung von Caspase-8 und -9 initiiert Apoptose und ist einigen Studien zufolge für die charakteristischen Schädigungen des Magenepithels unter einer *H. pylori*-Infektion verantwortlich (Basak *et al.*, 2005, Ledig *et al.*, 2004).

In der Literatur finden sich viele Hinweise auf die Rolle von Cathepsinen im Magenkarzinom bzw. in der *H. pylori*-assoziierten Gastritis. Farinati *et al.* beschreiben (1996) eine Hochregulation von Cathepsin B und L (den am meisten verbreiteten endosomalen/lysosomalen Cysteinproteasen) in späten Stadien des voranschreitenden Magenkarzinoms (atrophe Gastritis, epitheliale Dysplasie). Eine weitere Cysteinprotease, Cathepsin X, ist in der *H. pylori*-assoziierten Gastritis hochreguliert (Krueger *et al.*, 2005). Nach Bühling *et al.* (2004) bleibt die Expression der Cathepsine B und L in Gewebeproben unbeeinflusst von der *H. pylori*-Infektion. In diesem Experiment wurden die Cathepsine B, L und auch D auf mRNA-Ebene jedoch herunterreguliert.

Eine Überexpression ist neben uPA vor allem unter den Mitgliedern der Matrix-Metalloproteinasen (MMP-1, -3, -7, -8, -10) zu finden

5.2 Matrix-Metalloproteinasen

Die Magenschleimhaut besteht hauptsächlich aus Epithelzellen und zahlreichen Bestandteilen der Extrazellulären Matrix (ECM). Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind Zn²⁺- und Ca²⁺-abhängige Endopeptidasen, welche diese ECM-Makromoleküle während der embryonalen und fetalen Entwicklung, bei der

Wundheilung sowie bei Wachstum und Progression maligner Tumoren, insbesondere bei Angiogenese, Invasion und Metastasierung degradieren (Sternlicht *et al.*, 1999).

Die Genfamilie der humanen MMPs umfasst mindestens 19 Mitglieder, die in vier verschiedene Klassen eingeteilt werden, entweder auf Grundlage ihrer Domänen-Struktur und bevorzugten Substrate (z.B. Kollagenasen, Gelatinasen), oder durch ihre transmembrane Lokalisation, wie die Klasse membranständiger MMPs (MT-MMPs) (Woessner und Nagase, 2000).

Von den drei auf dem Array vertretenen MT-MMPs wurden MMP-14 (MT1-MMP) und MMP-15 (MT2-MMP) herunterreguliert, MMP-16 (MT3-MMP) blieb in der Expression unverändert.

Koyama (2004) beschreibt, eine Expressionserhöhung von MMP-14 in der *H. pylori*-assoziierten Gastritis, die jedoch von den gewebeinfiltrierenden Lymphozyten und nicht von Epithelzellen ausgeht.

MMP-15 wird in einigen Karzinomen eine invasionsförderdernde Funktion zugesprochen (Zhang *et al.*, 2005) und die Überexpression von MMP-16 ist im Magenkarzinom beschrieben (Lowy *et al.*, 2006), bislang gibt es jedoch bei beiden Proteasen keine Zusammenhänge zu der von uns beschriebenen *H. pylori*-bedingten Expressionsalteration.

Bei den überexprimierten MMPs handelt es sich um MMP-1, -3, -7, -8 und -10. Die Überexpression von MMPs ist im Magenkarzinom bzw. in der *H. pylori*assoziierten Gastritis beschrieben (Gooz *et al.*, 2003, McCaig *et al.*, 2006, Crawford *et al.*, 2003, Aung *et al.*, 2006, Deng *et al.*, 2005).

Die Überexpression von MMP-10 ist neben dem Magenkarzinom (Aung et al., 2006) in einigen weiteren Karzinomen, wie z.B. Lymphomen (van Themsche et al., 2004), Gehirntumoren (Thorns et al., 2003) oder Lungentumoren (Gill et al., 2004) von Bedeutung. Hohe MMP-8-Level korrelieren mit der Bösartigkeit von Gebärmutterkarzinomen (Stadlmann et al., 2003, Stenman et al., 2003). Die Expression von MMP-7 ist in der H. pylori-assoziierten Gastritis sowie im Magenkarzinom beschrieben (Bebb et al., 2003, Wroblewski et al., 2003) und Crawford al. Н. pylori-abhängige et (2003)wiesen eine MMP-7 Expressionserhöhung in AGS-Zellen nach. Eine Erhöhung der MMP-3 Sekretion unter Einfluss von H. pylori wurde bereits von Gooz et al. (2001 und 2003) beschrieben.

-9 Die Proteasen MMP-2, und -13 zeigten im Experiment keine Expressionsänderung. Bergin et al. (2004) fanden zwar eine Erhöhung der MMP-2 Expression in infizierten Individuen, in vitro-Studien konnten dies jedoch noch nicht belegen (Mori et al., 2003, Yokoyama et al., 2000). Mori et al. (2003) konnten eine H. pylori-induzierte MMP-9 Expressionserhöhung sowohl in vitro als auch in vivo nachweisen, jedoch wurden hier MKN45- statt AGS-Zellen verwendet. Pillinger *et al.*, (2005) konnten AGS-Zellen mit Hilfe von Zytokinen (TNF- α /IL-1ß) zur Sekretion von MMP-13 stimulieren. Vielleicht spiegelt diese Stimulation jedoch nicht die komplexen Aktivierungsmechanismen, die durch eine H. pylori-Infektion in Epithelzellen verursacht werden, wieder.

Vermutlich gibt es für die einzelnen Familienmitglieder differenzierte Aktivierungsmechanismen in der *H. pylori*-Infektion. Die unterschiedlichen Ergebnisse zeigen auch, dass artifizielle *in vitro*-Systeme limitiert sind und die daraus gewonnen Daten vorsichtig interpretiert werden müssen.

Da MMP-1 den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge das in Magenepithelzellen am stärksten unter *H. pylori*-Einfluss hochregulierte Gen ist, wurden alle folgenden Untersuchungen auf diese Protease fokussiert.

5.3 Matrix-Metalloproteinase 1

MMP-1 (Kollagenase 1, Fibroblasten-Kollagenase, Interstitielle Kollagenase) wurde als solche erstmals 1966 von Fullmer und Gibson in menschlichem Zahnfleisch beschrieben (Fullmer und Gibson, 1966) und 1970 von Bauer, Eisen und Jeffrey aus menschlicher Haut aufgereinigt (Bauer *et al.*, 1970).

Die proteolytische Aktivität von Krebszellen spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von Metastasen. MMPs sowie TIMPs stehen in enger Verbindung mit dem Prozess der Metastasierung. MMP-1 wurde dabei eine wesentliche Funktion zugesprochen (Sakurai *et al.*, 1997, Murray *et al.*, 1998, Inoue *et al.*, 1999). Otani *et al.* (1994) zeigten, dass diese Protease ausschließlich von Fibroblasten des Stromas, Makrophagen und verschiedenen anderen Entzündungszellen überexprimiert wird und sprach MMP-1 eine Rolle bei der Metastasierung zu (Gooz *et al.*, 2001, Crawford *et al.*, 2003, Bebb *et al.*, 2003).

5.3.1 Allgemeine Faktoren der *H. pylori*-abhängigen MMP-1 Überexpression

Einige der im Array aberrierend exprimierten Gene könnten potentiell an der MMP-1 Expressionserhöhung beteiligt sein. Die Expression der MMPs wird auf drei Ebenen reguliert: 1. Transkriptionskontrolle durch Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine und Zell-Matrix Interaktionen, 2. Sezernierung als Proenzym und Aktivierung durch proteolytische Spaltung der N-terminalen Domäne, 3. Kontrolle der enzymatischen Aktivität durch spezifische TIMPs.

Fast alle freien MMPs, auch MMP-1, werden als inaktive Proenzyme sezerniert, die eine enzymatische Abspaltung der Propeptiddomäne zur Aktivierung benötigen (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993; Woessner, 1994). Eine erhöhte MMP-1 Expression bedingt somit nicht notwendigerweise auch eine erhöhte Aktivität. Die proteolytische Aktivierung der meisten MMPs wird durch Serinproteasen wie dem urokinase-typ Plasminogenaktivator (uPA) uPA eingeleitet (Lijnen, 2001). Wie bereits erwähnt ist die uPA Expression in AGS-Zellen unter *H. pylori*-Einfluss erhöht.

Die Balance zwischen den Mengen an aktivierten MMPs und freien Inhibitoren bestimmt die effektive MMP-1 Aktivität (Mohanam *et al.*, 1995). TIMPs inhibieren MMPs durch nicht-kovalente Bindung im Verhältnis 1:1. Die Homöostase dieses kritischen Equilibriums ist essentiell, da ein gestörtes Verhältnis von MMP zu TIMP den invasiven Prozess beeinflusst. Wie bereits erwähnt gelten TIMPs als potentielle Inhibitoren von Tumorwachstum (Henriet *et al.*, 1999). Die TIMP-2 Sekretion blieb unbeeinflusst von der Infektion. Die gesteigerte TIMP-1 Sekretion kann dadurch erklärt werden, dass erhöhte MMP-Aktivität meist gefolgt von erhöhter TIMP-Sekretion ist (Brew *et al.*, 2000). Gooz *et al.* (2001) konnten sowohl in infizierten als auch in nicht-infizierten AGS-Zellen einen zeitabhängigen Anstieg der TIMP-1 Expression beobachten.

Kuppers *et al.* (2005) zeigen, dass die Hemmung der Funktion von NM 23 durch das Epstein-Barr Virus latente Protein EBNA3C zu einer Überexpression von MMP-9 führt. Ebenso könnte die durch *H. pylori* verursachte Unterexpression von NM 23 zu der erhöhten MMP-1 Expression führen.

Caveolin-1 assoziiert mit EMMPRIN (CD147), einem Induktor der MMP-Synthese, und reduziert so die CD147-abhängige MMP-1 Expressionserhöhung (Tang und Hemler, 2004). Die nach *H. pylori*-Infektion beobachtete Unterexpression von Caveolin-1 könnte durch verminderte Hemmung von CD147 zu einer MMP-1 Expressionssteigerung führen.

Auch Integrine spielen eine Rolle bei der Regulation der MMP Expression (Brooks *et al.*, 1996, Jia *et al.*, 2004): Die Interaktionen zwischen Zellen und Komponenten der ECM wird durch Integrine vermittelt (Hynes, 1992), die dadurch Prozesse wie Umorganisation des Zytoskeletts oder Signalkaskaden in Gang setzen und somit auf die Genexpression von bestimmten MMPs Einfluss nehmen. So ist die Expression von MMP-1 in Fibroblasten bei funktioneller Inhibition bestimmter Integrine deutlich hochreguliert (Kheradmand *et al.*, 1998).

Die GTPasen der Rho-Familie sind an Signalwegen beteiligt, die sowohl durch Rezeptor-Ligand-Interaktionen als auch Integrin-Dimerisierung eingeleitet werden. Die Expression von aktivem Rac1 in Synovialfibroblasten von Kaninchen ist nach Aussage von Kheradmand *et al.* (1998) ausreichend, um die MMP-1 Expression zu erhöhen.

Ets-1 reguliert eine Vielzahl von MMPs, darunter auch MMP-1, und seine Überexpression fördert den Abbau von ECM-Proteinen (Mizui *et al.*, 2006, Ozaki *et al.*, 2000). Jedoch ist Ets-1 in diesem Experiment deutlich unterexprimiert.

VEGF reguliert über seinen Rezeptor die MMP-9 Expression in Lungengewebe (Lee *et al.*, 2006), ist hier in *H. pylori*-infizierten AGS-Zellen jedoch leicht unterexprimiert.

TGF-ß verschiebt die Balance zwischen MMP-1 und TIMP-1 zugunsten von seinem Inhibitor in HT1080-Zellen (Kwak *et al.*, 2006). Dies könnte die im Experiment beobachtete Expressionserhöhung von TIMP-1 erklären.

Zur endgültigen Klärung, welche der hier genannten Faktoren tatsächlich einen Einfluss auf die MMP-1 Expression haben, sind jedoch weitere Experimente nötig.

5.3.2 Biologische Bedeutung der *H. pylori*-abhängigen MMP-1 Überexpression

In dieser Arbeit konnte auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen werden, dass auch Epithelzellen unter H. pylori-Einfluss verstärkt MMP-1 sezernieren. Dies gilt für die etablierte Zelllinie AGS ebenso wie für die humanen primären Magenepithelzellen. Verglichen mit den Biopsien gesunder Patienten, konnte in H. pylori-infizierten Patientenmaterial eine deutliche Erhöhung der MMP-1-Expression festgestellt werden, vor allem an bakteriellen Anheftungsstellen. Die immunhistochemischen Untersuchungen ergaben, dass aber auch Fibroblasten unter *H. pylori*-Einfluss eine Quelle der MMP-1 Expression sind. Den Ergebnissen Cokultur-Experiments zufolge bleibt die Sekretion monokultiverter des Fibroblasten unbeeinflusst von der Infektion mit H. pylori. Proteine, die von Epithelzellen sezerniert bzw. auf der Zelloberfläche exprimiert werden beeinflussen die Proteinexpression der Fibroblasten des Stromas. Als Beispiel sei hier der extrazelluläre Matrixmetalloprotease-Induktor (EMMPRIN, CD147) genannt, welcher Tumor-Stroma Interaktionen vermittelt und die MMP-Expression in epithelialen und stromalen Zellen steigert (Tang et al., 2005). Andererseits produzieren auch Fibroblasten zahlreiche Faktoren, die auf die Invasivität von Tumorzellen Einfluss nehmen (Inoue et al., 1997). Die Cokultur beider Zelltypen resultiert zumindest in einer deutlichen Steigerung der MMP-1 Expression auf mRNA und Protein-Ebene unter H. pylori-Einfluss. Dies deutet darauf hin, dass die gesteigerte MMP-1 Expression im Gewebe ein additiver Effekt aus der Hochregulation im Epithel und assoziierte Fibroblasten darstellt. Somit spielt nicht nur die direkte Wirkung von H. pylori auf das Oberflächenepithel eine Rolle, sondern auch die Wechselwirkungen mit dem darunter liegenden Stroma.

5.3.2.1 Kinetik der *H. pylori*-abhängigen MMP-1-Sekretion

Die gezeigte Kinetik der *H. pylori*-abhängigen MMP-1-Sekretion stimmt mit den Ergebnissen überein, die Pillinger *et al.* (2005) für die TNF-α/IL-1ß-stimulierte Sekretion der Protease erhielten. Aufgrund der zeitverzögerten Sekretion und der nochmals zeitverzögerten Aktivitätssteigerung von MMP-1 legen die Ergebnisse

des Western Blots und des ELISAs eine *de novo*-Synthese des Proteins nahe, was dadurch bestätigt wurde, dass unstimulierte AGS-Zellen nur eine basale MMP-1 Expression, nahe der Detektionsgrenze, aufweisen.

5.3.2.2 Bedeutung von MMP-1 für die Motilität von AGS-Zellen

Das Stroma der Magenschleimhaut besteht hauptsächlich aus Collagen I und III. Nur fünf Mitglieder der MMP-Familie sind in der Lage diese Strukturproteine zu degradieren: MMP-1, -8, -13, -18 und MT1-MMP. Menges *et al.* (2000) fanden auch eine MMP-1 Überexpression in *H. pylori*-induzierten, jedoch nicht in NSAID verursachten Magengeschwüren und mussten demzufolge eine generelle Funktion von MMP-1 in der Ulkusentstehung ausschließen. Zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit legt dies aber deutlich den engen Zusammenhang zwischen dem Bakterium und der MMP-1 Überexpression dar.

Die Prozesse der zellulären Motilität und Zellinvasion bis hin zur Metastasierung benötigen die koordinierte Regulation adhäsiver, proteolytischer und migratorischer Vorgänge. Dabei spielen MMPs eine Schlüsselrolle bei der Degradierung der Basalmembran und der extrazellulären Matrix (Murphy et al., 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss ein antisense Oligonukleotid gegen MMP-1 und ein nonsense Kontroll-Oligonukleotid auf die H. pylori-infizierter AGS-Zellen Migration hat. Je nach Auswahl der entsprechenden Zielsequenz kommt Unterbrechung es zur der Transkriptionsinitiation, der posttranslationalen Prozessierung (Splicing, Polyadenylierung), des Transports der messenger RNA, der Translationsinitiation oder zu einem Abbau der RNA-DNA Hybride durch die RNase H (Hélène und Toulmé, 1990). Die Sequenz des Oligonukleotides (asMMP-1) liegt in antisense Orientierung zum Translationsstartpunkt des MMP-1. Die Sequenz des nonsense Kontroll-Oligonukleotid ist nicht-komplementär zur Sequenz des MMP-1 und kann seine mRNA-Synthese daher nicht unterbinden. Die verwendeten Oligonukleotide wurden zum Schutz vor nukleolytischem Abbau in der Zellkultur mit einer Phosphorothioat-Modifikation versehen. Phosphorothioat-Modifikationen sind außerdem speziell geeignet, die RNase H Spaltung der Oligonukleotid/mRNA

Hybride zu fördern, ein Hauptmechanismus zur Reduktion der mRNA-Transkripte des zu hemmenden Gens (Stewart *et al.*, 1996).

Phänomene wie Scattern, erhöhte Motilität und Zellelongation sind cagPAI- und CagA-abhängige Mechanismen (AI-Ghoul *et al.*, 2004, Churin *et al.*, 2003). Mit *H. pylori*-Wildtypstämmen infizierte AGS Zellen wiesen eine stark erhöhte Motilität auf. Die Verwendung des antisense MMP-1 Oligonukleotids resultierte in einer deutlichen Verminderung dieser Motilität und legt damit eine besondere Bedeutung dieser Protease im entzündungsbedingten Gewebeumbau der Magenschleimhaut nahe. Das Hauptsubstrat von MMP-1, Collagen I, ist jedoch kein Bestandteil der in dem Experiment verwendeten Basalmembran. Somit scheint es wahrscheinlich, dass nicht allein die proteolytische Aktivität, sondern auch das Zusammenspiel von MMP-1 mit verschiedenen Biomolekülen für die Matrixdegradierung von Bedeutung ist.

5.3.3 Die *H. pylori*-induzierte MMP-1 Überexpression ist abhängig von einem funktionellen T4SS

Viele von *H. pylori* verursachten Krankheiten sind stark assoziiert mit einem funktionellen T4SS und der Translokation von funktionellem CagA in die Wirtszelle. So entwickeln Patienten, die mit CagA-positiven *H. pylori*-Stämmen infiziert sind, überproportional häufig eine atrophische Gastritis oder Magenkarzinome (Blaser *et al.*, 1995, Crabtree *et al.*, 1993, Parsonnet *et al.*, 1997). Jedoch gibt es auch CagA-unabhängige Mechanismen, wie die Induktion der Interleukin (IL)-8 Sekretion (Naumann *et al.*, 1999, Meyer-Ter-Vehn *et al.*, 2000, Tummuru *et al.*, 1995).

Die Verwendung isogener *H. pylori*-Mutanten ließ die Frage klären, ob ein funktionelles T4SS bzw. CagA-Translokation bei der Expressionssteigerung von MMP-1 essentiell sind. Verwendet wurden der Genom-sequenzierte Wildtyp-Stamm *Hp26695* (Tomb *et al.*, 1997) mit den isogenen Mutanten *HpPAI* (*Hp0520-Hp0547*), *Hp0539* und *Hp0543*, sowie das klinische Isolat *P1* (Haas *et al.*, 1993) mit *P1* Δ *virB7* (*Hp0532*) und *P1* Δ *CagA* (*Hp0547*).

Zellen, die mit T4SS-defekten Stämmen (P1^ΔvirB7, HpPAI, Hp0539) behandelt wurden, wiesen eine etwa gleiche Menge an MMP-1-mRNA bzw. -Protein wie

nicht-infizierte Zellen, also keine Expressionssteigerung von MMP-1, auf. Somit scheint die *H. pylori*-induzierte Erhöhung der MMP-1 Expression durch ein funktionelles cag PAI vermittelt zu werden.

Guillemin *et al.* (2002) fanden das Genexpressionsmuster von *H. pylori* Δ *CagA*⁻infizierten AGS-Zellen relativ unverändert im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen. Stämme mit fehlender CagA-Expression bzw. -Translokation (*P1* Δ *CagA*⁻, *Hp0543*) konnten jedoch in AGS-Zellen eine ähnliche MMP-1 Expressionssteigerung erzielen wie die verwendeten Wildtypen (*P1, Hp26695*). Crawford *et al.* (2003) konnten zeigen, dass die Induktion der MMP-7 Expression in AGS-Zellen ebenfalls CagA-unabhängig ist. Ebenso ist die zelluläre IL-8 Sekretion abhängig von der strukturellen Integrität des T4SS, nicht jedoch von der CagA-Translokation in die Zelle (Selbach *et al.*, 2002). Möglich ist, dass neben CagA ein weiteres bzw. weitere Effektormoleküle durch das T4SS in die Wirtszelle transferiert werden.

Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Untersuchungen hinsichtlich der zellulären Motilität/Invasivität überein: Stämme mit defekter Pathogenitätsinsel induzierten weder das sogenannte Scattern, noch wirken sie sich auf die Zellmigration durch Matrigel[®]-beschichtete Polycarbonfilter aus (Al-Ghoul *et al.*, 2004, Krüger *et al.*, 2005). CagA(-)-Mutanten können jedoch durch bislang ungeklärte Mechanismen die zelluläre Motilität deutlich steigern (Al-Ghoul *et al.*, 2004). Demzufolge könnte MMP-1 *in vivo* ein downstream Faktor im komplexen Regulationsprozess der *H. pylori* verursachten Gewebezerstörung darstellen, der z.B. an Prozessen zellulärer Motilität beteiligt sein könnte.

5.3.4 Potentielle Regulatoren der *H. pylori*-abhängigen MMP-1 Überexpression

5.3.4.1 Zytokine/Chemokine

H. pylori stimuliert in den Wirtszellen die Produktion entzündlicher Zytokine und Chemokinen (Shimoyama und Crabtree, 1997). Botenstoffe wie EGF, TNF- α und IL-1ß sind auch für die MMP-1 Expression von Bedeutung (Pillinger *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte die Auswirkung von drei Chemokinen auf die

MMP-1 Expression bestätigt werden: II-1ß und TNF- α induzieren eine deutliche, TGF-ß eine leichte und IL-6 keine Erhöhung von MMP-1 auf mRNA- und Proteinebene. Dennoch scheinen diese Botenstoffe im Falle der *H. pylori*induzierten MMP-1 Expressionssteigerung eine untergeordnete Rolle zu spielen, da neutralisierende Antikörper gegen IL-1ß, IL-6, TNF- α und TGF-ß keine signifikante Reduktion des MMP-1 Levels zur Folge hatten. Für die Expressionssteigerung von MMP-1 müssen also andere durch *H. pylori* ausgelöste Faktoren und Signale eine Rolle spielen.

5.3.4.2 Signalwege

Neuere Studien belegen die Beteiligung von ERK1/2, JNK und p38 Signalwegen an der Regulation der MMPs (Brauchle *et al.*, 2000, Reunanen *et al.*, 2002, Lai *et al.*, 2003). Diese Signalkaskaden werden in AGS-Zellen durch *H. pylori* aktiviert (Naumann, 2005). Mimuro *et al.* (2002) wiesen nach, dass intrazelluläres CagA an Grb2 (growth receptor bound 2) bindet und in einer Aktivierung des Ras/Mitogenaktiverten Protein-Kinase Kinase (MEK)/extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (ERK) Signalweges resultiert, was zu zellulärer Motilität ("Scattern") und Proliferation führt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *die H. pylori*-induzierte MMP-1 Expressionserhöhung von der Aktivierung von ERK1/2 und JNK abhängt: Die Verwendung von U0126 (ERK1/2) bzw. SP600125 (JNK) hatte eine vollständige MMP-1 Repression zur Folge.

Die experimentelle Inhibition von NF-κB (IKK-NBD, APDC) zeigte keinen Effekt auf die MMP-1 Expression, was auf eine untergeordnete Rolle bei der MMP-1 Expressionserhöhung hindeutet. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Aktivierung der Transkription des MMP-1 Genes hauptsächlich durch andere Faktoren, wie AP-1, gesteuert wird (Okuno *et al.*, 2002, Sun *et al.*, 2002). Barchowsky *et al.* (2000) beschreiben die Stimulation des AP-1 Signalweges in der transkriptionellen MMP-1 Genexpression in Synovialfibroblasten des Kaninchens als essentiell. Auch die Inhibition von p38 (SB203580) wirkte sich nicht auf die *H. pylori*induzierte MMP-1 Expression aus, was ebenfalls auf geringe Rolle dieses Signalweges bei der MMP-1 Regulation hindeutet.

Eine Regulation von MMP-1 über ERK1/2 und/oder JNK wurde bereits in humanen Fibroblasten der Haut und des Zahnfleisches (Deroanne et al., 2005, Kida et al., 2005), Monozyten (Lai et al., 2003), invasiven Melanomen (Huntington et al., 2004), Chondrozyten (Ho et al., 2005) und TNF- α -/IL-1ß-stimulierten Magenepithelzellen (Pillinger et al., 2005) beschrieben. Im Gegensatz dazu findet sich über MMP-1 Regulation durch p38 widersprüchliche Literatur. In einigen Studien wird diesem Signalweg keine Bedeutung bei der MMP-1 Regulation beigemessen. Andere Studien belegen dagegen eine signifikante Expressionserhöhung. Dies könnte zum einem an den unterschiedlich verwendeten Konzentrationen des Inhibitors SB203580 liegen oder sogar ein zelltypspezifischer Effekt sein. Andererseits konnten Pillinger et al. (2005) mit der gleichen Konzentration von p38-Inhibitor SB203580 eine signifikante Erhöhung der MMP-1 Expression bei gleichzeitiger ERK-Aktivierung feststellen. Vielleicht spiegelt die dort verwendete TNF- α /IL-1ß-Stimulation nicht die komplexen Aktivierungsmechanismen, die durch eine H. pylori-Infektion in Epithelzellen verursacht werden, wieder.

Für die Expressionsregulation anderer MMPs wie MT1-MMP (Huntington *et al.*, 2004), MMP-9 (Mori *et al.*, 2003) oder MMP-13 (Pillinger *et al.*, 2005) sind andere Signalwege und Faktoren beschrieben. MMP-7 wird jedoch, wie auch MMP-1, in der *H. pylori*-Infektion über ERK1/2 reguliert (Crawford *et al.*, 2003). Einige potentielle MMP-1 Stimulatoren, wie HGF und u-PAR/uPA, werden ebenfalls über ERK1/2 aktiviert. Somit könnte die *H. pylori*-induzierte MMP-1 Überexpression auch auf interagierende Faktoren zurückzuführen sein (Ridley, 2001, Sossey-Alaoui *et al.*, 2005).

In Hinblick auf die zelluläre Motilität (vgl. 5.3.2.2) sind Rho-GTPasen wichtige Schlüsselregulatoren, bedingt durch die Umorganisation des Zytoskeletts (Sossey-Alaoui *et al.*, 2005). Zu den am besten charakterisierten Mitgliedern dieser Proteinfamilie gehören RhoA, Rac1 und Cdc42. RhoA reguliert die Bildung von Stressfasern aus bestehenden Aktinfilamenten, Rac1 und Cdc42 bilden durch *de novo*-Polymerisation von Aktinfilamenten Lamellopodien und Filopodien aus (Kaverina *et al.*, 2002).

Im cDNA-Microarray ergab sich für Rac1 eine Verdopplung der Expression unter Einfluss von *H. pylori*. Wie bereits in Abschnitt 5.3.1 erwähnt, wirkt sich die Expression von Rac1 auf die MMP-1 Expression von Fibroblasten aus (Kheradmand *et al.*, 1998). Rac1 und Cdc42 haben jedoch in humanen Derma-Fibroblasten einen antagonistischen Effekt auf die MMP-1-Expression (Deroanne *et al.*, 2005). Die Autoren schlagen eine Beteiligung von WASP/WAVE-Proteinen an der MMP-1-Expressionserhöhung vor, da eine Reduktion der Aktivität von Cdc42 keinen Einfluss auf die Aktivität von Rac1 hat. Die Mitglieder der WAVE-Familie sind Schlüsselkomponenten der Aktin-Polymerisierungs-Maschinerie, die schließlich zu zellulärer Migration führt (Takenawa *et al.*, 2001). Sossey-Alaoui *et al.* (2005) identifizierten WAVE3 als Aktivator von MMP-1 in Neuroblastoma-Zellen. In der *H. pylori*-induzierten MMP-1 Expression der Magenmukosa könnte neben ERK1/2 und JNK also sogar noch ein dritter Signalweg über WASP/WAVE-Proteine bestehen.

Insgesamt betrachtet scheint die *H. pylori*-Infektion eine komplexe Aktivierungs-Maschinerie in Gang zu setzen, die unter anderem auch eine massive Überproduktion von proteolytischen Enzymen induziert.

6. Zusammenfassung

Das Bakterium Helicobacter pylori besiedelt die humane Magenschleimhaut im Bereich der Antrum- und Corpus-Region und ist heute als Hauptverursacher von chronischen Gastritiden und der peptischen Ulkuskrankheit identifiziert. Das Bakterium induziert in seinen Wirtszellen eine Entzündungsreaktion und trägt zur Magenkarzinomen Unter Entstehung von bei. chronischen Entzündungsbedingungen trägt die extrazelluläre Sekretion von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) beträchtlich zur Zerstörung der Gewebestruktur bei. MMPs spielen daher in der Pathogenese von Magenerkrankungen eine wichtige Rolle.

Um die Pathogenese von *H. pylori* im Magen unter *in vivo*-näheren Bedingungen untersuchen zu können, wurde zusätzlich zu etablierten Zellkulturmodellen in dieser Arbeit eine Methode zur Isolierung primärer Magenepithelzellen etabliert. *H. pylori* veränderte das Genexpressionsmuster von Magenepithelzellen: von 96 Genen des eingesetzten cDNA-Microarrays, die in Prozessen wie zellulärem Wachstum, extrazellulärem Matrixumbau und Signaltransduktion involviert sind, wurden 17 Gene signifikant hoch- und 19 Gene signifikant herunterreguliert. Da MMP-1 den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge das am stärksten unter *H. pylori*-Einfluss hochregulierte Gen ist, wurden alle folgenden Untersuchungen auf diese Protease fokussiert.

Die *H. pylori*-induzierte MMP-1 Expressionserhöhung wurde auf mRNA-(quantitative PCR) und Protein-Ebene (Western Blot, MMP-1 Aktivitäts-ELISA, Immunhistochemie) sowohl *in vitro* (AGS- und primäre Magenepithelzellen) als auch *in vivo* (Biopsiematerial) bestätigt. Die MMP-1 Expressionserhöhung ist im Gewebe ein additiver Effekt von Epithelzellen und den Fibroblasten der Stromas. Die MMP-1 Expressionserhöhung in AGS- und primären Magenepithelzellen ist weiterhin abhängig vom Vorhandensein des funktionellen Typ IV-Sekretionssystems, jedoch nicht von *cagA*.

Obwohl die Zytokine II-1ß und TNF- α *in vitro* eine deutliche Erhöhung von MMP-1 auf mRNA- und Proteinebene auslösen konnten, hatte die Neutralisierung dieser Faktoren während der *H. pylori*-Infektion keine signifikante Reduktion des MMP-1 Levels zur Folge. Für die Expressionssteigerung von MMP-1 müssen also andere Faktoren und Signale eine Rolle spielen. In dieser Abeit wurden ERK 1/2 und JNK Signalkaskaden als essentielle Faktoren der MMP-1 Expressionserhöhung in AGS- und primäre Magenepithelzellen nach Infektion mit *H. pylori* nachgewiesen. Weitere Studien zur funktionellen Beteiligung von MMP-1 an Prozessen des Gewebeumbaus im Rahmen der Entwicklung von Magenulcera und Karzinomen und Untersuchungen zur Entschlüsselung von Faktoren, deren Funktionen und beteiligten Regulationskaskaden der *H. pylori*-induzierten MMP-1 Expressionserhöhung sind nötig, um ein besseres Verständnis für die molekularen Zusammenhänge und potentielle neue Therapiekonzepte zu erhalten.

7. Literatur

Albelda, S. M. (1993) Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest.* **68** (1): 4-17.

Al-Ghoul, L., Wessler, S., Hundertmark, T., Kruger, S., Fischer, W., Wunder, C., Haas, R., Roessner, A., Naumann, M. (2004) Analysis of the type IV secretion system-dependent cell motility of *Helicobacter pylori*-infected epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **322** (3): 860-6.

Allen, L. A. (2001) The role of the neutrophil and phagocytosis in infection caused by *Helicobacter pylori. Curr Opin Infect Dis.* **14** (3) : 273-7.

Amieva, M. R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L. S., Nelson, W. J., Falkow, S. (2003) Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science*. **300** (5624): 1430-4.

Aung, P. P., Oue, N., Mitani, Y., Nakayama, H., Yoshida, K., Noguchi, T., Bosserhoff, A. K., Yasui, W. (2006) Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data: melanoma inhibitory activity and matrix metalloproteinase-10 are novel prognostic factors in patients with gastric cancer. *Oncogene.* **25** (17).

Baldari, C. T., Lanzavecchia, A., Telford, J. L. (2005) Immune subversion by *Helicobacter pylori*. *Trends Immunol*. **26** (4):199-207.

Baldus, C. D., Liyanarachchi, S., Mrozek, K., Auer, H., Tanner, S. M., Guimond, M., Ruppert, A. S., Mohamed, N., Davuluri, R. V., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D., de la Chapelle, A. (2004) Acute myeloid leukemia with complex karyotypes and abnormal chromosome 21: Amplification discloses overexpression of APP, ETS2, and ERG genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**(11):3915-20.

Barchowsky, A., Frleta, D., Vincenti, M. P. (2000) Integration of the NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the collagenase-1 promoter: divergence of IL-1 and TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts. *Cytokine*. **12**(10):1469-79.

Basak, C., Pathak, S. K., Bhattacharyya, A., Pathak, S., Basu, J., Kundu, M. (2005) The secreted peptidyl prolyl cis,trans-isomerase HP0175 of *Helicobacter pylori* induces apoptosis of gastric epithelial cells in a TLR4- and apoptosis signal-regulating kinase 1-dependent manner. *J Immunol.* **174** (9): 5672-80.

Bauer, E. A., Eisen, A. Z., Jeffrey, J. J. (1970) Immunologic relationship of a purified human skin collagenase to other human and animal collagenases. *Biochim Biophys Acta*. **206**(1):152-60.

Bayerdorffer, E., Miehlke, S., Neubauer, A., Stolte, M. (1997) Gastric MALT-lymphoma and *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* **1**:89-94.

Bhattacharyya, A., Pathak, S., Datta, S., Chattopadhyay, S., Basu, J., Kundu, M. (2002) Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB regulate *Helicobacter pylori*mediated interleukin-8 release from macrophages. *Biochem J.* **368**: 121-9.

Bebb, J. R., Letley, D. P., Thomas, R. J., Aviles, F., Collins, H. M., Watson, S. A., Hand, N. M., Zaitoun, A., Atherton, J.C. (2003) *Helicobacter pylori* upregulates matrilysin (MMP-7) in epithelial cells *in vivo* and *in vitro* in a Cag dependent manner. *Gut.* **52**(10):1408-13.

Beil, W., Enss, M. L., Muller, S., Obst, B., Sewing, K. F., Wagner, S. (2000) Role of vacA and cagA in *Helicobacter pylori* inhibition of mucin synthesis in gastric mucous cells. *J Clin Microbiol.* **38**(6):2215-8.

Bellack, N. R., Koehoorn, M. W., Macnab, Y. C., Morshed, M. G. (2006) A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission: a review of the evidence. *Epidemiol Infect*. 1-11.

Bergin, P. J., Anders, E., Sicheng, W., Erik, J., Jennie, A., Hans, L., Pierre, M., Qiang, P.
H., Marianne, Q. J. (2004) Increased production of matrix metalloproteinases in *Helicobacter pylori*-associated human gastritis. *Helicobacter*. **9**(3):201-10.

Birnboim, H. C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**(6):1513-23.

Bischof, P., Meisser, A., Campana, A. (2001) Biochemistry and molecular biology of trophoblast invasion. *Ann N Y Acad Sci.* **943**:157-62.

Bizzozero, G. (1893) Über die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehung ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. *Arch. Mikrobiol. Anat.* 42, 82-152. Zit. nach Degroote et al. 1999.

Blaser, M. J., Parsonnet, J. (1994) Parasitism by the "slow" bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. *J Clin Invest.* 94(1):4-8.

Blaser, M. J., Perez-Perez, G. I., Kleanthous, H., Cover, T. L., Peek, R. M., Chyou, P.H, Stemmermann, G. N., Nomura, A. (1995) Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* **55**(10):2111-5.

Boren, T., Falk, P., Roth, K. A., Larson, G., Normark, S. (1993) Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*. **262**(5141):1892-5.

Brauchle, M., Gluck, D., Di Padova, F., Han, J., Gram, H. (2000) Independent role of p38 and ERK1/2 mitogen-activated kinases in the upregulation of matrix metalloproteinase-1. *Exp Cell Res.* **258**(1):135-44.

Brew, K., Dinakarpandian, D., Nagase, H. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. **1477**(1-2):267-83.

Bronsdon, M. A., Goodwin, C. S., Sly, L. I., Chilvers, T., Schoenknecht, F. D. (1991) Helicobacter nemestrinae sp. nov., a spiral bacterium found in the stomach of a pigtailed macaque (Macaca nemestrina) *Int J Syst Bacteriol.* **41**(1):148-53.

Brooks, P. C., Stromblad, S., Sanders, L. C., von Schalscha, T. L., Aimes, R. T., Stetler-Stevenson, W. G., Quigley, J. P., Cheresh, D. A. (1996) Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell.* **85**(5):683-93.

Buhling, F., Waldburg, N., Kruger, S., Rocken, C., Wiesner, O., Weber, E., Welte, T. (2002) Expression of cathepsins B, H, K, L, and S during human fetal lung development. *Dev Dyn.* **225**(1):14-21.

Caputo, R., Tuccillo, C., Manzo, B. A., Zarrilli, R., Tortora, G., Blanco, C., Ricci, V., Ciardiello, F., Romano, M. (2003) *Helicobacter pylori* VacA toxin up-regulates vascular endothelial growth factor expression in MKN 28 gastric cells through an epidermal growth factor receptor-, cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Clin Cancer Res.* **9** (6): 2015-21.

Churin, Y., Kardalinou, E., Meyer, T. F., Naumann, M. (2001) Pathogenicity islanddependent activation of Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in *Helicobacter pylori* infection. *Mol Microbiol.* **40**(4):815-23.

Churin, Y., Al-Ghoul, L., Kepp, O., Meyer, T. F., Birchmeier, W., Naumann, M. (2003) *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *J Cell Biol.* **161**(2):249-55.

Conlin, V. S., Curtis, S. B., Zhao, Y., Moore, E. D., Smith, V. C., Meloche, R. M., Finlay, B. B., Buchan, A. M. (2004) *Helicobacter pylori* infection targets adherens junction regulatory proteins and results in increased rates of migration in human gastric epithelial cells. *Infect Immun.* **72**(9):5181-92.

Correa, P., Fontham, E. T., Bravo, J. C., Bravo, L. E., Ruiz, B., Zarama, G., Realpe, J. L., Malcom, G. T., Li, D., Johnson, W. D., Mera, R. (2000) Chemoprevention of gastric dysplasia: randomized trial of antioxidant supplements and anti-*Helicobacter pylori* therapy. *J Natl Cancer Inst.* **92**(23):1881-8.

Covacci, A., Telford, J. L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., Rappuoli, R. (1999) *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*. **284**(5418):1328-33.

Crabtree, J. E., Wyatt, J. I., Sobala, G. M., Miller, G., Tompkins, D. S., Primrose, J. N., Morgan, A. G. (1993) Systemic and mucosal humoral responses to *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Gut.* **34**(10):1339-43. Crabtree, J. E., Covacci, A., Farmery, S. M., Xiang, Z., Tompkins, D. S., Perry, S., Lindley, I. J., Rappuoli, R. (1995) *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J Clin Pathol.* **48**(1):41-5.

Crabtree, J. E. (1996) Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol Suppl.*;**215**:3-10.

Crawford, H. C., Krishna, U. S., Israel, D. A., Matrisian, L. M., Washington, M. K., Peek, R. M., Jr. (2003) *Helicobacter pylori* strain-selective induction of matrix metalloproteinase-7 *in vitro* and within gastric mucosa. *Gastroenterology*. **125**(4):1125-36.

Davidson, B., Goldberg, I., Tell, L., Vigdorchik, S., Baekelandt, M., Berner, A., Kristensen, G. B., Reich, R., Kopolovic, J. (2004) The clinical role of the PEA3 transcription factor in ovarian and breast carcinoma in effusions. *Clin Exp Metastasis*. **21**(3):191-9.

De Groote, D., van Doorn, L. J., Ducatelle, R., Verschuuren, A., Haesebrouck, F., Quint, W. G., Jalava, K., Vandamme, P. (1999) *'Candidatus Helicobacter suis'*, a gastric *helicobacter* from pigs, and its phylogenetic relatedness to other gastrospirilla. *Int J Syst Bacteriol.* **49** Pt 4:1769-77.

De Luca, A., Ianquinto, G. (2004) *Helicobacter pylori* and gastric diseases : a dangerous association. *Cancer Lett.* **213**(1) :1-10

Deng, H., Guo, R. F., Li, W. M., Zhao, M., Lu, Y. Y. (2005) Matrix metalloproteinase 11 depletion inhibits cell proliferation in gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **14**;326(2):274-81.

Deroanne, C. F., Hamelryckx, D., Ho, T. T., Lambert, C. A, Catroux, P., Lapiere, C. M., Nusgens, B. V. (2005) Cdc42 downregulates MMP-1 expression by inhibiting the ERK1/2 pathway. *J Cell Sci.* **118**(Pt 6):1173-83.

Dixon, M. F. (2001) Prospects for intervention in gastric carcinogenesis: reversibility of gastric atrophy and intestinal metaplasia. *Gut.* **49**(1):2-4.

Eaton, K. A, Brooks, C. L., Morgan, D. R., Krakowka, S. (1991) Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.* **59**(7):2470-5.

Eaton, K. A., Radin, M. J., Kramer, L., Wack, R., Sherding, R., Krakowka, S., Fox, J. G., Morgan, D. R. (1993) Epizootic gastritis associated with gastric spiral bacilli in cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Vet Pathol.* **30**(1):55-63.

Farinati, F., Herszenyi, L., Plebani, M., Carraro, P., De Paoli, M., Cardin, R., Roveroni, G., Rugge, M., Nitti, D., Grigioni, W. F., D'Errico, A., Naccarato, R. (1996) Increased levels of cathepsin B and L, urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type-1 as an early event in gastric carcinogenesis. *Carcinogenesis*. **17**(12):2581-7.

Fedwick, J. P., Lapointe, T. K., Meddings, J. B., Sherman, P. M., Buret, A. G. (2005) *Helicobacter pylori* activates myosin light-chain kinase to disrupt claudin-4 and claudin-5 and increase epithelial permeability. *Infect Immun.* **73**(12):7844-52.

Feldman, R. A. (2001) Would eradication of *Helicobacter pylori* infection reduce the risk of gastric cancer? *Aliment Pharmacol Ther.* **15**(1):2-5.

Fischer, W., Haas, R. (2000) *Helicobacter* vacuolating cytotoxin. Bacterial Protein Toxins. *Handbook of Experimental Pharmacology*. **145**: 489-507.

Foryst-Ludwig, A., Naumann, M. (2000) p21-activated kinase 1 activates the nuclear factor kappa B (NF-kappa B)-inducing kinase-Ikappa B kinases NF-kappa B pathway and proinflammatory cytokines in *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem.* **275**(50):39779-85.

Fox, J. G., Cabot, E. B., Taylor, N. S., Laraway, R. (1988) Gastric colonization by *Campylobacter pylori subsp. mustelae* in ferrets. *Infect Immun.* **56**(11):2994-6.

Galmiche, A., Rassow, J., Doye, A., Cagnol, S., Chambard, J. C., Contamin, S., de Thillot, V., Just, I., Ricci, V., Solcia, E., Van Obberghen, E., Boquet, P. (2000) The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J.* **19**(23):6361-70.

Gao, X., Sun, Y., Huang, L., Chen, X. Y., Zhang, K. L., Kong, Q. Y., Liu, J., Li, H. (2005) Down-regulation of caveolin-1 in gastric carcinoma and its clinical biological significance. *Ai Zheng.* **24**(3):311-6. Gatti, L. L., Burbano, R. R., de Assumpcao, P. P., Smith, A., Payao, S. L. (2004) Interleukin-1beta polymorphisms, *Helicobacter pylori* infection in individuals from Northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *Clin Exp Med.* **4**(2):93-8.

Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hoffmann, R., Haas, R. (2003) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*. **301**(5636):1099-102.

Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Boren, T., Rad, R., Schepp, W., Miehlke, S., Classen, M., Prinz, C. (1999) Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(22):12778-83.

Gibson, W., Fullmer, H. (1966) Collagenolytic activity of gingival tissues *in vitro*. *J Dent Res*. **45**(4):1225.

Gill, J. H., Kirwan, I. G., Seargent, J. M., Martin, S. W., Tijani, S., Anikin, V. A., Mearns, A. J., Bibby, M. C., Anthoney, A., Loadman, P. M. (2004) MMP-10 is overexpressed, proteolytically active, and a potential target for therapeutic intervention in human lung carcinomas. *Neoplasia*. **6**(6):777-85.

Goodwin, W. J., Jr. (1988) Infectious and inflammatory diseases of the orbit. *Otolaryngol Clin North Am.* **21**(1):65-75.

Goodwin, C. S., Armstrong, J. A. (1990) Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **9**(1):1-13.

Goodwin, C. S. (1994) How *Helicobacter pylori* acquired its name, and how it overcomes gastric defence mechanisms. *J Gastroenterol Hepatol.* **9** (1):S1-3.

Gooz, M., Gooz, P., Smolka, A. J. (2001) Epithelial and bacterial metalloproteinases and their inhibitors in *H. pylori* infection of human gastric cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **281**(3):G823-32.

Gooz, M., Shaker, M., Gooz, P., Smolka, A. J. (2003) Interleukin 1beta induces gastric epithelial cell matrix metalloproteinase secretion and activation during *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* **52**(9):1250-6.

Graham, D. Y. (1989) *Campylobacter pylori* as a pathogenetic factor in duodenal ulcer: the case for. *Scand J Gastroenterol* **160**:46-52.

Guillemin, K., Salama, N. R, Tompkins, L. S., Falkow, S. (2002) Cag pathogenicity islandspecific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **12**;99(23):15136-41.

Gurbuz, Y., Kloppel, G. (2005) Comparison of pathological features of gastric carcinoma in Turkey and Germany. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* **24**(4):271-80.

Haas, R., Meyer, T. F., van Putten, J. P. (1993) Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. *Mol Microbiol.* **8**(4):753-60.

Harris, P. R., Mobley, H. L., Perez-Perez, G. I., Blaser, M. J., Smith, PD. (1996) *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology.* **111**(2):419-25.

Haringsma, P. C., Mouwen, J. M. (1992) Possible significance of spiral-shaped bacteria in the etiology of abomasal ulcers in adult cattle. *Tijdschr Diergeneeskd*. **1**;117(17):485-7.

Heczko, U., Smith, V. C., Mark Meloche, R., Buchan, A. M., Finlay, B. B. (2000) Characteristics of *Helicobacter pylori* attachment to human primary antral epithelial cells. *Microbes Infect.* **2**(14):1669-76.

Helene, C., Toulme, J. J. (1990) Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. *Biochim Biophys Acta*. **1049**(2):99-125.

Henriet, P., Blavier, L., Declerck, Y. A. (1999) Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *APMIS*. **107**(1):111-9.

Henry, G. A., Long, P. H., Burns, J. L., Charbonneau, D. L. (1987) Gastric spirillosis in beagles. *Am J Vet Res.* **48**(5):831-6.

Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., Hatakeyama, M. (2002) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*. **295**(5555):683-6. Epub 2001 Dec 13.

Ho, L. J., Lin, L. C., Hung, L. F, Wang, S. J., Lee, C. H, Chang, D. M., Lai, J. H., Tai, T. Y. (2005) Retinoic acid blocks pro-inflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase production by down-regulating JNK-AP-1 signaling in human chondrocytes. *Biochem Pharmacol.* **70**(2):200-8.

Hofman, V., Ricci, V., Galmiche, A., Brest, P., Auberger, P., Rossi, B., Boquet, P., Hofman, P. (2000) Effect of *Helicobacter pylori* on polymorphonuclear leukocyte migration across polarized T84 epithelial cell monolayers: role of vacuolating toxin VacA and cag pathogenicity island. *Infect Immun.* **68**(9):5225-33.

Huntington, J. T., Shields, J. M., Der, C. J., Wyatt, C. A, Benbow, U., Slingluff, C. L., Jr., Brinckerhoff, C. E. (2004) expression of collagenase 1 (MMP-1) is mediated by the ERK pathway in invasive melanoma cells: role of BRAF mutation and fibroblast growth factor signaling. *J Biol Chem.* **279**(32):33168-76.

Hynes, R. O., Schwarzbauer, J. E., Tamkun, J. W. (1987) Isolation and analysis of cDNA and genomic clones of fibronectin and its receptor. *Methods Enzymol.* **144**:447-63.

Hynes, R. O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* **69**(1):11-25.

IARC [No authors listed] (1994) Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* **61**:1-241.

Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I. M., Kersulyte, D., Incecik, E. T., Berg, D., E., Covacci, A., Engstrand, L., Boren, T. (1998) *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*. **279**(5349):373-7.

Inoue, T., Chung, Y. S., Yashiro, M., Nishimura, S., Hasuma, T., Otani, S., Sowa, M. (1997) Transforming growth factor-beta and hepatocyte growth factor produced by gastric fibroblasts stimulate the invasiveness of scirrhous gastric cancer cells. *Jpn J Cancer Res.* **88**(2):152-9.

Inoue, T., Yashiro, M., Nishimura, S., Maeda, K., Sawada, T., Ogawa, Y., Sowa, M., Chung, K. H. (1999) Matrix metalloproteinase-1 expression is a prognostic factor for patients with advanced gastric cancer. Int J Mol Med. **4**(1):73-7.

Isomoto, H., Mizuta, Y., Miyazaki, M., Takeshima, F., Omagari, K., Murase, K., Nishiyama, T., Inoue, K., Murata, I., Kohno, S. (2000) Implication of NF-kappaB in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Am J Gastroenterol.* **95**(10):2768-76.

Iwamoto, J., Mizokami, Y., Takahashi, K., Nakajima, K., Ohtsubo, T., Miura, S., Narasaka, T., Takeyama, H., Omata, T., Shimokobe, K., Ito, M., Takehara, H., Matsuoka, T. (2005) Expressions of urokinase-type plasminogen activator, its receptor and plasminogen activator inhibitor-1 in gastric cancer cells and effects of *Helicobacter pylori. Scand J Gastroenterol.* **40**(7):783-93.

Jakob, W., Stolte, M., Valentin, A., Schroder, H. D. (1997) Demonstration of *Helicobacter pylori*-like organisms in the gastric mucosa of captive exotic carnivores. *J Comp Pathol.* **116**(1):21-33.

Jia, Y., Zeng, Z. Z., Markwart, S. M., Rockwood, K. F., Ignatoski, K. M., Ethier, S. P., Livant, D. L. (2004) Integrin fibronectin receptors in matrix metalloproteinase-1-dependent invasion by breast cancer and mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **64**(23):8674-81.

Kaverina, I., Krylyshkina, O., Small, J. V. (2002) Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility.*Int J Biochem Cell Biol.* **34**(7):746-61.

Kheradmand, F., Werner, E., Tremble, P., Symons, M., Werb, Z. (1998) Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science*. **280**(5365):898-902.

Kida, Y., Kobayashi, M., Suzuki, T., Takeshita, A., Okamatsu, Y., Hanazawa, S., Yasui, T., Hasegawa, K. (2005) Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts. *Cytokine*. **29**(4):159-68.

Kim, S. M., Kim, R., Ryu, J. H., Jho, E. H., Song, K. J., Jang, S. I., Kee, S. H. (2005) Multinuclear giant cell formation is enhanced by down-regulation of Wnt signaling in gastric cancer cell line, AGS. *Exp Cell Res.* **308**(1):18-28.

Kim, M. H., Yoo, H.S., Chang, H. J., Hong, M. H., Kim, H. D., Chung, I. J., Shin, B. A., Cho, M. J., Ahn, B. W., Jung, Y.,D. (2005) Urokinase plasminogen activator receptor is upregulated by *Helicobacter pylori* in human gastric cancer AGS cells via ERK, JNK, and AP-1. *Biochem Biophys Res Commun.* **333**(3):874-886.

Kim, N., Cho, S. I., Yim, J. Y., Kim, J. M., Lee, D. H., Park, J. H., Kim, J. S., Jung, H. C., Song, I. S. (2006) The effects of genetic polymorphisms of IL-1 and TNF-A on *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases in Korea. *Helicobacter.* **11**(2):105-112.

Kitadai, Y., Sasaki, A., Ito, M., Tanaka, S., Oue, N., Yasui, W., Aihara, M., Imagawa, K., Haruma, K., Chayama, K. (2003) *Helicobacter pylori* infection influences expression of genes related to angiogenesis and invasion in human gastric carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **311**(4):809-14.

Kodera, Y., Isobe, K., Yamauchi, M., Kondoh, K., Kimura, N., Akiyama, S., Itoh, K., Nakashima, I., Takagi, H. (1994) Expression of nm23 H-1 RNA levels in human gastric cancer tissues. A negative correlation with nodal metastasis. *Cancer.* **73**(2):259-65.

Koretz, K., Schlag, P., Boumsell, L., Moller, P. (1991) Expression of VLA-alpha 2, VLAalpha 6, and VLA-beta 1 chains in normal mucosa and adenomas of the colon, and in colon carcinomas and their liver metastases. *Am J Pathol.* **138**(3):741-50.

Koyama, S. (2004) Significance of cell-surface expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors on gastric epithelium and infiltrating mucosal lymphocytes in progression of *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Scand J Gastroenterol*. **39**(11):1046-53. Koyama, S. (2005) Coordinate cell-surface expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors on cancer-associated myofibroblasts from malignant ascites in patients with gastric carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* **131**(12):809-14.

Krejs, G. J. (2000) *Helicobacter pylori* and stomach cancer. *Acta Med Austriaca*. **27**(4):129-30.

Krienitz, W. (1906) Über das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi. Deutsch. *Med. Wochenschr.* **32**, 872. Zit. nach Kroher (1998).

Kroher, G. (1998) Haus- und Nutztiere als Reservoir für die Übertragung von *Helicobacter heimannii*-Infektionen auf den Menschen. Erlangen, Nürnberg, Univ., Inst. f. Pathol., Diss.

Krueger, S., Kalinski, T., Hundertmark, T., Wex, T., Kuster, D., Peitz, U., Ebert, M., Nagler, D. K., Kellner, U., Malfertheiner, P., Naumann, M., Rocken, C., Roessner, A. (2005) Up-regulation of cathepsin X in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *J Pathol.* **207**(1):32-42.

Krueger, S., Hundertmark, T., Kalinski, T., Peitz, U., Wex, T., Malfertheiner, P., Naumann, M., Roessner, A. (2006) *Helicobacter pylori* encoding the pathogenicity island activates matrix metalloproteinase 1 in gastric epithelial cells via JNK and ERK. *J Biol Chem.* **281**(5):2868-75.

Kumar Dhar, D., Kubota, H., Tabara, H., Kotoh, T., Monden, N., Igarashi, M., Kohno, H., Nagasue, N. (1999) nm23 in the primary and metastatic sites of gastric carcinoma. Relation to AFP-producing carcinoma. *Oncology*. **56**(2):122-8.

Kuppers, D. A., Lan, K., Knight, J. S., Robertson, E. S. (2005) Regulation of matrix metalloproteinase 9 expression by Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and the suppressor of metastasis Nm23-H1. *J Virol.* **79**(15):9714-24.

Kwak, H. J., Park, M. J., Cho, H., Park, C. M., Moon, S. I., Lee, H. C., Park, I. C., Kim, M. S., Rhee, C. H., Hong, S. I. (2006) Transforming growth factor-beta1 induces tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression via activation of extracellular signal-regulated kinase and Sp1 in human fibrosarcoma cells. *Mol Cancer Res.* **4**(3):209-20.

Lai, W. C., Zhou, M., Shankavaram, U., Peng, G., Wahl, L. M. (2003) Differential regulation of lipopolysaccharide-induced monocyte matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 by p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *J Immunol.* **170**(12):6244-9.

Ledig, S., Wagner, S., Manns, M. P., Beil, W., Athmann, C. (2004) Role of the receptormediated apoptosis in *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *Digestion*. **70** (3): 178-86.

Lee, A., Hazell, S. L., O'Rourke, J., Kouprach, S. (1988). Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infect Immun.* **56**(11):2843-50.

Lee, K. S, Min, K. H., Kim, S. R., Park, S. J., Park, H. S., Jin, G. Y., Lee, Y. C. (2006) Vascular Endothelial Growth Factor Modulates Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.*

Lijnen, H. R. (2001) Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost.* **86**(1):324-33.

Liu, H., Liu, W., Wu, Y., Zhou, Y., Xue, R., Luo, C., Wang, L., Zhao, W., Jiang, J. D., Liu, J. (2005) Loss of epigenetic control of synuclein-gamma gene as a molecular indicator of metastasis in a wide range of human cancers. *Cancer Res.* **65**(17):7635-43.

Lowy, A. M., Clements, W. M., Bishop, J., Kong, L., Bonney, T., Sisco, K., Aronow, B., Fenoglio-Preiser, C., Groden, J. (2006) beta-Catenin/Wnt signaling regulates expression of the membrane type 3 matrix metalloproteinase in gastric cancer. *Cancer Res.* **66**(9):4734-41.

Lu, H., Wu, J. Y., Kudo, T., Ohno, T., Graham, D. Y., Yamaoka, Y. (2005) Regulation of interleukin-6 promoter activation in gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*. *Mol Biol Cell*. **16**(10):4954-66.

Maeda, S., Yoshida, H., Ogura, K., Mitsuno, Y., Hirata, Y., Yamaji, Y., Akanuma, M., Shiratori, Y., Omata, M. (2000) *H. pylori* activates NF-kappaB through a signaling pathway involving IkappaB kinases, NF-kappaB-inducing kinase, TRAF2, and TRAF6 in gastric cancer cells. *Gastroenterology.* **119**(1):97-108.
Maeda, S., Yoshida, H., Mitsuno, Y., Hirata, Y., Ogura, K., Shiratori, Y., Omata, M. (2002) Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Mol Pathol.* **55** (5): 286-93.

Malaty, H. M., Graham, D. Y. (1994) Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* **35**(6):742-5.

Malfertheiner, P. (1993) Compliance, adverse events and antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* treatment. *Scand J Gastroenterol* **196**:34-7.

Malfertheiner, P., Sipponen, P., Naumann, M., Moayyedi, P., Megraud, F., Xiao, S. D., Sugano, K., Nyren, O.; Lejondal H. pylori-Gastric Cancer Task Force. (2005) Helicobacter pylori eradication has the potential to prevent gastric cancer: a state-of-the-art critique. *Am J Gastroenterol.* **100**(9):2100-15.

Marchetti, M., Arico, B., Burroni, D., Figura, N., Rappuoli, R., Ghiara, P. (1995) Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science*. **267**(5204):1655-8.

Marshall, B. J., Warren, J. R. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* **1**(8390):1311-5.

Marshall, B. J., Armstrong, J. A., McGechie, D. B., Glancy, R. J. (1985) Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust.* **142**(8):436-9.

Mayer-Scholl, A., Averhoff, P., Zychlinsky, A. (2004) How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol.* **7**(1): 62-6.

McCaig, C., Duval, C., Hemers, E., Steele, I., Pritchard, D. M., Przemeck, S., Dimaline, R., Ahmed, S., Bodger, K., Kerrigan, D. D., Wang, T. C., Dockray, G. J, Varro, A. (2006) The role of matrix metalloproteinase-7 in redefining the gastric microenvironment in response to *Helicobacter pylori. Gastroenterology.* **130**(6):1754-63.

Megraud, F., Neman-Simha, V., Brugmann, D. (1992) Further evidence of the toxic effect of ammonia produced by *Helicobacter pylori* urease on human epithelial cells. *Infect Immun.* **60**(5):1858-63.

Menges, M., Chan, C. C., Zeitz, M., Stallmach, A. (2000) Higher concentration of matrixmetalloproteinase 1 (interstitial collagenase) in H. pylori-compared to NSAID-induced gastric ulcers. *Z Gastroenterol.* **38**(11):887-91.

Meyer-ter-Vehn, T., Covacci, A., Kist, M., Pahl, H. L. (2000) *Helicobacter pylori* activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun. *J Biol Chem.* **275**(21):16064-72.

Mima, S., Tsutsumi, S., Ushijima, H., Takeda, M., Fukuda, I., Yokomizo, K., Suzuki, K., Sano, K., Nakanishi, T., Tomisato, W., Tsuchiya, T., Mizushima, T. (2005) Induction of claudin-4 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and its contribution to their chemopreventive effect. *Cancer Res.* **65**(5):1868-76.

Mimori, K., Mori, M., Shiraishi, T., Fujie, T., Baba, K., Haraguchi, M., Abe, R., Ueo, H., Akiyoshi, T. (1997) Clinical significance of tissue inhibitor of metalloproteinase expression in gastric carcinoma. *Br J Cancer.* **76**(4):531-6.

Mimuro, H., Suzuki, T., Tanaka, J., Asahi, M., Haas, R., Sasakawa, C. (2002) Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol Cell.* **10**(4):745-55.

Mitsuno, Y., Yoshida, H., Maeda, S., Ogura, K., Hirata, Y., Kawabe, T., Shiratori, Y., Omata, M. (2001) *Helicobacter pylori* induced transactivation of SRE and AP-1 through the ERK signalling pathway in gastric cancer cells.*Gut.* **49**(1):18-22.

Mitsuno, Y., Maeda, S., Yoshida, H., Hirata, Y., Ogura, K., Akanuma, M., Kawabe, T., Shiratori, Y., Omata, M. (2002) *Helicobacter pylori* activates the proto-oncogene c-fos through SRE transactivation. *Biochem Biophys Res Commun.* **291**(4):868-74.

Mizui, M., Isaka, Y., Takabatake, Y., Sato, Y., Kawachi, H., Shimizu, F., Takahara, S., Ito, T., Imai, E. (2006) Transcription factor Ets-1 is essential for mesangial matrix remodeling. *Kidney Int*. May 31; [Epub ahead of print].

Mohanam, S., Wang, S. W., Rayford, A., Yamamoto, M., Sawaya, R., Nakajima, M., Liotta, L. A, Nicolson, G. L., Stetler-Stevenson, W. G., Rao, J. S. (1995) Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases: negative regulators of human glioblastoma invasion *in viivo*. *Clin Exp Metastasis*. **13**(1):57-62.

Molinari, M., Salio, M., Galli, C., Norais, N., Rappuoli R., Lanzavecchia, A., Montecucco, C. (1998) Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med.* **187**(1):135-40.

Montecucco, C., Rappuoli, R. (2001) Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**(6):457-66.

Mori, N., Sato, H., Hayashibara, T., Senba, M., Geleziunas, R., Wada, A., Hirayama, T., Yamamoto, N. (2003) *Helicobacter pylori* induces matrix metalloproteinase-9 through activation of nuclear factor kappaB. *Gastroenterology*. **124**(4):983-92.

Murray, G. I., Duncan, M. E., O'Neil, P., McKay, J. A., Melvin, W. T., Fothergill, J. E. (1998) Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer. J Pathol. **185**(3):256-61.

Nagase, H., Woessner, J. F., Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. **274**(31):21491-4.

Nakshabendi, I. M., Peebles, S. E., Lee, F. D., Russell, R. I. (1991) Spiral shaped microorganisms in the human duodenal mucosa. *Postgrad Med J.* **67**(791):846-7.

Naumann, M., Wessler, S., Bartsch, C., Wieland, B., Covacci, A., Haas, R., Meyer, T. F. (1999) Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the cag pathogenicity island. *J Biol Chem.* **274**(44):31655-62.

Naumann, M. (2001) Host cell signaling in *Helicobacter pylori* infection. *Int J Med Microbiol.* **291**(4):299-305.

Naumann, M. (2005) Pathogenicity island-dependent effects of *Helicobacter pylori* on intracellular signal transduction in epithelial cells. *Int J Med Microbiol.* **295**(5):335-41.

Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., Haas, R. (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*. **287**(5457):1497-500. Ogura, K., Takahashi, M., Maeda, S., Ikenoue, T., Kanai, F., Yoshida, H., Shiratori, Y., Mori, K., Mafune, K. I., Omata, M. (1998) Interleukin-8 production in primary cultures of human gastric epithelial cells induced by *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci.* **43**(12):2738-43.

Ogura, K., Maeda, S., Nakao, M., Watanabe, T., Tada, M., Kyutoku, T., Yoshida, H., Shiratori, Y., Omata, M. (2000) Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J Exp Med.* **192**(11):1601-10.

Okuno, T., Andoh, A., Bamba, S., Araki, Y., Fujiyama, Y., Fujiyama, M., Bamba, T. (2002) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha induce chemokine and matrix metalloproteinase gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *Scand J Gastroenterol.* **37**(3):317-24.

Orsini, B., Ciancio, G., Censini, S., Surrenti, E., Pellegrini, G., Milani, S., Herbst, H., Amorosi, A., Surrenti, C. (2000) *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island is associated with enhanced interleukin-8 expression in human gastric mucosa. *Dig Liver Dis*. **32**(6):458-67.

Otani, Y., Okazaki, I., Arai, M., Kameyama, K., Wada, N., Maruyama, K., Yoshino, K., Kitajima, M., Hosoda, Y., Tsuchiya, M. (1994) Gene expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in gastrointestinal tract cancers. *J Gastroenterol.* **29**(4):391-7.

Owen, R. J. (1998) *Helicobacter*-species classification and identification. *Br Med Bull*. **54**(1):17-30.

Ozaki, I., Mizuta, T., Zhao, G., Yotsumoto, H., Hara, T., Kajihara, S., Hisatomi, A., Sakai, T., Yamamoto, K. (2000) Involvement of the Ets-1 gene in overexpression of matrilysin in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **60**(22):6519-25.

Papini. E., de Bernard, M., Bugnoli, M., Milia, E., Rappuoli, R., Montecucco, C. (1993) Cell vacuolization induced by *Helicobacter pylori*: inhibition by bafilomycins A1, B1, C1 and D. *FEMS Microbiol Lett.* **113**(2):155-9.

Parsonnet, J., Friedman, G. D., Vandersteen, D. P., Chang, Y., Vogelman, J. H., Orentreich, N., Sibley, R. K. (1991) *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med.* **325**(16):1127-31.

Parsonnet, J., Friedman, G. D., Orentreich. N., Vogelman, H. (1997) Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* **40**(3):297-301.

Peek, R. M., Jr., Blaser, M. J. (2002) *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer.* 2 (1): 28-37.

Pignatelli, M., Hanby, A. M., Stamp, G. W. (1991) Low expression of beta 1, alpha 2 and alpha 3 subunits of VLA integrins in malignant mammary tumours. *J Pathol.* **165**(1):25-32.

Pillinger, M. H., Marjanovic, N., Kim, S. Y., Scher. J. U., Izmirly, P., Tolani, S., Dinsell, V., Lee, Y. C., Blaser, M. J., Abramson, S. B. (2005) Matrix metalloproteinase secretion by gastric epithelial cells is regulated by E prostaglandins and MAPKs. *J Biol Chem.* **280**(11):9973-9.

Prinz, C., Schoniger, M., Rad, R., Becker, I., Keiditsch, E., Wagenpfeil, S., Classen, M., Rosch, T., Schepp, W., Gerhard, M. (2001) Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res.* **61**(5):1903-9.

Queiroz, D. M., Rocha, G. A., Mendes, E. N., Lage, A. P., Carvalho, A. C., Barbosa, A. J. (1990) A spiral microorganism in the stomach of pigs. *Vet Microbiol.* **24**(2):199-204.

Ramirez-Ramos, A., Gilman, R. H., Leon-Barua, R., Recavarren-Arce, S., Watanabe, J., Salazar, G., Checkley, W., McDonald, J., Valdez, Y., Cordero, L., Carrazco, J. (1997) Rapid recurrence of *Helicobacter pylori* infection in Peruvian patients after successful eradication. Gastrointestinal Physiology Working Group of the Universidad Peruana Cayetano Heredia and The Johns Hopkins University. *Clin Infect Dis.* 25(5):1027-31.

Rappin, J. P. (1881) Contribution a létude des bacteries de la bouche a létat normal et dans la fievre thyphoide. College de France, Nantes. Zit. nach Seidel et al. 1999.

Reunanen, N., Li, S. P., Ahonen, M., Foschi, M., Han, J., Kahari, V. M. (2002) Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization. *J Biol Chem.* **277**(35):32360-8.

Richter-Dahlfors, A., Heczko, U., Meloche, R. M., Finlay, B. B., Buchan, A. M. (1998) *Helicobacter pylori*-infected human antral primary cell cultures: effect on gastrin cell function. *Am J Physiol.* **275(**3 Pt 1):G393-401.

Ridley, A. J. (2001) Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* **11**(12):471-7.

Saarialho-Kere, U. K., Vaalamo, M., Puolakkainen, P., Airola, K., Parks, W. C., Karjalainen-Lindsberg, M. L. (1996) Enhanced expression of matrilysin, collagenase, and stromelysin-1 in gastrointestinal ulcers. *Am J Pathol.* **148**(2):519-26.

Sakurai, Y., Otani, Y., Kameyama, K., Igarashi, N., Kubota, T., Kumai, K., Kitajima, M. (1997) The role of stromal cells in the expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) in the invasion of gastric cancer. *J Surg Oncol.* **66**(3):168-72.

Segal, E. D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., Tompkins, L. S. (1999) Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori. Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(25):14559-64.

Seidel, K. E., Stolte, M., Lehn, N., Bauer, J. (1999) Antibodies against *Helicobacter felis* in sera of cats and dogs. *Zentralbl Veterinarmed B.* **46**(3):181-8.

Selbach, M., Moese, S., Hauck, C. R., Meyer, T. F., Backert, S. (2002) Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein *in vitro* and *in vivo. J Biol Chem.* **277**(9):6775-8.

Shimoyama, T., Crabtree, J. E. (1997) Mucosal chemokines in *Helicobacter pylori* infection. *J Physiol Pharmacol.* **48**(3):315-23.

Smoot, D. T., Earlington, M. H., Abebe, E., Desbordes, B. C., Murigande, C., Naab, T. (1996) Effects of sucralfate on vacuolating cytotoxin activity and adherence of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelial cells. *J Assoc Acad Minor Phys.* **7**(4):88-92.

Sommi, P., Ricci, V., Fiocca, R., Romano, M., Ivey, K. J., Cova, E., Solcia, E., Ventura, U. (1996) Significance of ammonia in the genesis of gastric epithelial lesions induced by *Helicobacter pylori*: an *in vitro* study with different bacterial strains and urea concentrations. *Digestion*. **57**(5):299-304.

Sossey-Alaoui, K., Ranalli, T. A., Li X., Bakin, A. V., Cowell, J. K. (2005) WAVE3 promotes cell motility and invasion through the regulation of MMP-1, MMP-3, and MMP-9 expression. *Exp Cell Res.* **308**:135-145.

Stadlmann, S., Pollheimer, J., Moser, P. L., Raggi, A., Amberger, A., Margreiter, R., Offner, F. A., Mikuz, G., Dirnhofer, S., Moch, H. (2003) Cytokine-regulated expression of collagenase-2 (MMP-8) is involved in the progression of ovarian cancer. *Eur J Cancer.* **39**(17):2499-505.

Stein, M., Bagnoli, F., Halenbeck, R., Rappuoli, R., Fantl, W. J., Covacci, A. (2002) c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol.* **43**(4):971-80.

Stenman, M., Paju, A., Hanemaaijer, R., Tervahartiala, T., Leminen, A., Stenman, U. H., Konttinen, Y. T., Sorsa, T. (2003) Collagenases (MMP-1, -8 and -13) and trypsinogen-2 in fluid from benign and malignant ovarian cysts. *Tumour Biol.* 24(1):9-12.

Sternlicht, M. D., Lochter, A., Sympson, C. J., Huey, B., Rougier, J. P., Gray, J. W., Pinkel, D., Bissell, M. J., Werb, Z. (1999) The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell.* **98**(2):137-46.

Stetler-Stevenson, W. G., Liotta, L. A., Kleiner, D. E., Jr. (1993) Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J.* **7**(15):1434-41.

Stewart, A. J., Canitrot, Y., Baracchini, E., Dean, N. M., Deeley, R. G., Cole, S. P. (2002) Reduction of expression of the multidrug resistance protein (MRP) in human tumor cells by antisense phosphorothioate oligonucleotides. *Biochem Pharmacol.* **51**(4):461-9.

Suerbaum, S., Michetti, P. (2002) *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med.* **347**(15):1175-86.

Summy, J. M., Gallick, G. E. (2003) Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **22**(4):337-58.

Sun, Y., Zeng, X. R., Wenger, L., Firestein, G. S., Cheung, H. S. (2004) P53 downregulates matrix metalloproteinase-1 by targeting the communications between AP-1 and the basal transcription complex. *J Cell Biochem.* **92**(2):258-69. Suzuki, M., Miura, S., Suematsu, M., Fukumura, D., Kurose, I., Suzuki, H., Kai, A., Kudoh, Y., Ohashi, M., Tsuchiya, M. (1992) *Helicobacter pylori*-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. *Am J Physiol.* **263**(5 Pt 1):G719-25.

Takenawa, T., Miki, H. (2001) WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci.* **114**(Pt 10):1801-1809.

Tanahashi, T., Kita, M., Kodama, T., Yamaoka, Y., Sawai, N., Ohno, T., Mitsufuji, S., Wei, Y. P., Kashima, K., Imanishi, J. (2000) Cytokine expression and production by purified *Helicobacter pylori* urease in human gastric epithelial cells. *Infect Immun.* **68**(2):664-71.

Tang, W., Hemler, M. E. (2004) Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering. *J Biol Chem.* **279**(12):11112-8.

Tang, Y., Nakada, M. T., Kesavan, P., McCabe, F., Millar, H., Rafferty, P., Bugelski, P., Yan, L. (2005) Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. *Cancer Res.* **65**(8):3193-9.

Terashima, M., Maesawa, C., Oyama, K., Ohtani, S., Akiyama, Y., Ogasawara, S., Takagane, A., Saito, K., Masuda, T., Kanzaki, N., Matsuyama, S., Hoshino, Y., Kogure, M., Gotoh, M., Shirane, M., Mori, K. (2005) Gene expression profiles in human gastric cancer: expression of maspin correlates with lymph node metastasis. *Br J Cancer.* **92**(6):1130-6.

Thorns, V., Walter, G. F., Thorns, C. (2003) Expression of MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10 and MMP-11 in human astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Anticancer Res.* **23**(5A):3937-44.

Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H. G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzegerald, L. M., Lee, N., Adams, M. D., Hickey, E. K., Berg, D. E., Gocayne, J. D., Utterback, T. R., Peterson, J. D., Kelley, J. M., Cotton, M. D., Weidman, J. M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W. S., Borodovsky, M., Karp, P. D., Smith, H. O., Fraser, C. M, Venter, J. C. T. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori. Nature*. 388(6642):539-47.

Tuccillo, C., Cuomo, A., Rocco, A., Martinelli, E., Staibano, S., Mascolo, M., Gravina, A. G., Nardone, G., Ricci, V., Ciardiello, F., Del Vecchio Blanco, C., Romano, M. (2005) Vascular endothelial growth factor and neo-angiogenesis in *H. pylori* gastritis in humans. *J Pathol.* **207** (3): 277-84.

Tummuru, M. K., Sharma, S. A., Blaser, M. J. (1995) *Helicobacter pylori* picB, a homologue of the Bordetella pertussis toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol.* **18**(5):867-76.

Tyagi, S. C., Kumar, S. G., Alla, S. R., Reddy, H. K., Voelker, D. J., Janicki, J. S. (1996) Extracellular matrix regulation of metalloproteinase and antiproteinase in human heart fibroblast cells. *J Cell Physiol.* **167**(1):137-47.

Tynan, J. A., Wen, F., Muller, W. J., Oshima, R. G. (2005) Ets2-dependent microenvironmental support of mouse mammary tumors. *Oncogene*. **24**(46):6870-6.

Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., Taniyama, K., Sasaki, N., Schlemper, R. J. (2001) *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med.* **345**(11):784-9.

Van Themsche, C., Alain, T., Kossakowska, A. E., Urbanski, S., Potworowski, E. F., St-Pierre, Y. (2004) Stromelysin-2 (matrix metalloproteinase 10) is inducible in lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors *in viivo*. *J Immunol*. **173**(6):3605-11.

Varney, M. L., Johansson, S. L., Singh, R. K. (2005) Tumour-associated macrophage infiltration, neovascularization and aggressiveness in malignant melanoma: role of monocyte chemotactic protein-1 and vascular endothelial growth factor-A. *Melanoma Res.* **15**(5):417-25.

Varney, M. L., Olsen, K. J., Mosley, R. L., Singh, R. K. (2005) Paracrine regulation of vascular endothelial growth factor--a expression during macrophage-melanoma cell interaction: role of monocyte chemotactic protein-1 and macrophage colony-stimulating factor. *J Interferon Cytokine Res.* **25** (11): 674-83.

Wagner, S., Beil, W., Mai, U. E., Bokemeyer, C., Meyer, H. J., Manns, M. P. (1994) Interaction between *Helicobacter pylori* and human gastric epithelial cells in culture: effect of antiulcer drugs. *Pharmacology*. **49**(4):226-37.

Webb, P. M., Crabtree, J. E., Forman, D. (1999) Gastric cancer, cytotoxin-associated gene A-positive *Helicobacter pylori*, and serum pepsinogens: an international study. The Eurogst Study Group. *Gastroenterology*. **116**(2):269-76.

Weinel, R. J., Rosendahl, A., Pinschmidt, E., Kisker, O., Simon, B., Santoso, S. (1995) The alpha 6-integrin receptor in pancreatic carcinoma. *Gastroenterology*. **108**(2):523-32.

Woessner, J. F., Jr. (1994) The family of matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci.* **732**:11-21.

Woessner, J. F. and Nagase, H. (2000) Matrix Metalloproteinases and TIMPs, *Oxford: Oxford University Press.*

Wroblewski, L. E., Noble, P. J., Pagliocca, A., Pritchard, D. M., Hart, C. A., Campbell, F., Dodson, A. R., Dockray, G. J., Varro, A. (2003) Stimulation of MMP-7 (matrilysin) by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells: role in epithelial cell migration. *J Cell Sci.* 116(Pt 14):3017-26.

Wu, Y. Y., Tsai, H. F., Lin, W. C, Chou. A. H., Chen, H. T., Yang, J. C., Hsu, P. I., Hsu, P. N. (2004) *Helicobacter pylori* enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in human gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol.* **10**(16):2334-9.

Yamazaki, S., Yamakawa, A., Ito, Y., Ohtani, M., Higashi, H., Hatakeyama, M., Azuma, T. (2003) The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. *J Infect Dis.* **187**(2):334-7.

Yanagawa, N., Tamura, G., Honda, T., Endoh, M., Nishizuka, S., Motoyama, T. (2004) Demethylation of the synuclein gamma gene CpG island in primary gastric cancers and gastric cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* **10**(7):2447-51.

Yasasever, V., Tas, F., Duranyildiz, D., Camlica, H., Kurul, S., Dalay, N. (2000) Serum levels of the soluble adhesion molecules in patients with malignant melanoma. *Pathol Oncol Res.* **6**(1):42-5.

Yasui, W., Oue, N., Aung, P. P., Matsumura, S., Shutoh, M., Nakayama, H. (2005) Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. *Gastric Cancer*. **8**(2):86-94.

Ye, M., Liu, J. K., Lu, Z. X., Zhao, Y., Liu, S. F., Li, L. L., Tan, M., Weng, X. X., Li, W., Cao, Y. (2005) Grifolin, a potential antitumor natural product from the mushroom Albatrellus confluens, inhibits tumor cell growth by inducing apoptosis *in vitro. FEBS Lett.* **579** (16): 3437-43.

Yokoyama, T., Otani, Y., Kurihara, N., Sakurai, Y., Kameyama, K., Suzuki, H., Igarashi, N., Kimata, M., Wada, N., Kubota, T., Kumai, K., Kitajima, M. (2000) Matrix metalloproteinase expression in cultured human gastric wall fibroblasts--interactions with *Helicobacter pylori* isolated from patients with ulcers. *Aliment Pharmacol Ther.* **1**:193-8.

Yoshiyama, H., Nakamura, H., Kimoto, M., Okita, K., Nakazawa, T. (1999) Chemotaxis and motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *J Gastroenterol.* **11**:18-23.

You, W. C., Li, J. Y., Zhang, L., Jin, M. L., Chang, Y. S., Ma, J. L., Pan, K. F. (2005) Etiology and prevention of gastric cancer: a population study in a high risk area of China. *Chin J Dig Dis.* **6**(4):149-54.

Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P. F., Telford, J. L., Figura, N., Rappuoli, R., Covacci, A. (1995) 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.* 63(1):94-8.

Zhang, J., Sarkar, S., Yong, V. W. (2005) The chemokine stromal cell derived factor-1 (CXCL12) promotes glioma invasiveness through MT2-matrix metalloproteinase. *Carcinogenesis*. **26**(12):2069-77.

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
AK	Antikörper
AP-1	Aktivator-Protein 1
APS	Ammoniumperoxidisulfat
as	antisense
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
CagA	zytotoxin-assoziiertes Protein A
CD	cluster of differentiation (Zelloberflächenantigene)
Cat	Cathepsin
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
d	Tag(e)
Da	Dalton
dest.	destilliert
d.h.	das heisst
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et alteres
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
E _X	Extinktion in Abhängigkeit von der Wellenlänge X
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Formelzeichen für die Fallbeschleunigung

h	Stunde(n)		
H. pylori	Helicobacter pylori		
HRP	Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase)		
lg	Immunglobulin		
IL	Interleukin		
kb	Kilobasen		
kDa	Kilodalton		
L	Liter		
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium		
М	Molarität		
MALT	mucosa associated lymphoid tissue		
min	Minute(n)		
ml	Milliliter		
μΙ	Mikroliter		
MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase		
MMP	Matrix-Metalloprotease		
MOI	multiplicity of infection; Anzahl der Bakterien pro Wirtszelle		
mRNA	messenger Ribonukleinsäure		
NCBI	The National Center of Biotechnology Information		
NF-κB	Nukleärer Faktor kappa B		
ng	Nanogramm		
nm	Nanometer		
ns	nonsense		
OD _{XXX}	optische Dichte bei der Wellenlänge XXX nm		
ORF	Offener Leserahmen		
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese		
PAI	Pathogenitätsinsel		
PBS	Phosphat/NaCI-Puffer		
PCR	Polymerasekettenreaktion		
PFA	Paraformaldehyd		
pН	potentia hydrogenii		
PMSF	Phenymethylsulfonylfluorid		
RNA	Ribonukleinsäuren		
RNase	Ribonuklease		
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotation per minute)		
RT	Raumtemperatur		
S	Sekunde(n)		

SDS	Sodiumdodecylsulfat
S.O.	siehe oben
S.U.	siehe unten
T _A	Annealing Temperatur
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylendiamin
Tm	Schmelztemperatur
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	units (Internationale Einheiten)
ÜN	über Nacht
u-PA	Urokinase-Plasminogenaktivator
u-PAR	Urokinase-Plasminogenaktivator Rezeptor
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
VacA	vakuolisierendes Zytotoxin A
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
v/v	Volumenanteil
WHO	Welt Gesundheitsorganisation, World Health Organisation
w/V	Gewichtsanteil
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-g
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
°C	Grad Celsius

Lebenslauf

Name:	Tanja Hunde	rtmark	
Geburtsdatum und -ort:	05.11.1974 ir	n Braunschweig	
Geschlecht:	weiblich		
Staatsangehörigkeit:	deutsch		
Familienstand:	verheiratet		
Wohnsitz:	Lönsweg 2, 38165 Lehre		
Schulausbildung:	1981-1985:	Laagbergschule (Grundschule), Wolfsburg	
	1985-1987:	Hermann-Löns-Schule	
		(Orientierungsstufe), Wolfsburg	
	1987-1994:	Theodor-Heuss-Gymnasium, Wolfsburg	
Schulabschluss:	Abitur am 13.06.1994		
Studium:	1994-2002:	Technische Universität Braunschweig, Fachrichtung Biologie-Diplom, Hauptfach: Zellbiologie Nebenfächer: Genetik, Mikrobiologie	
Studienabschluss:	Diplom am 24.06.2002, Prädikat: sehr gut Diplomarbeit: "Klonierung, Expression und Reinigung von löslichem humanem FGF Rezeptor 2 in Insektenzellen sowie Überprüfung der biologischen Aktivität"		
Berufstätigkeit:	2002, wissenschaftliche Hilfskraft, RELIA <i>Tech</i> GmbH, Braunschweig		
Promotionsarbeit:	seit 15.01.2003: Wissenschaftliche Mitarbeiterin des Instituts für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg		