

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

*Etablierung und Charakterisierung eines doppel-transgenen
Mausmodells zur Magenkarzinogenese*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Sascha Schmidt

aus Rostock

Magdeburg im Jahr 2016

Bibliographische Beschreibung:

Poster

S. Krueger, A. Bernhardt, **S. Schmidt**, A. Roessner, D. Kuester
Etablierung eines Magenkarzinom-Mausmodells zur Untersuchung der Funktion von Cathepsin X im
Rahmen der *H. pylori*-abhängigen Immunantwort.
94. Jahrestagung der DGP in Berlin 2010.

Abkürzungsverzeichnis

1. Einführung

1.1. Überblick und Ziele	1
1.2. Makroskopische und mikroskopische Anatomie des humanen und murinen Magen	2
1.3. Physiologie des Magens	4
1.4. Helicobacter pylori	5
1.4.1. Allgemeines	5
1.4.2. Epidemiologie	5
1.4.3. Infektion und Pathogenitätsfaktoren	6
1.4.4. Immunreaktion, Entzündung und Histologie	6
1.5. Magenkarzinom	8
1.5.1. Epidemiologie	8
1.5.2. Ablauf der Magenkarzinogenese	9
1.5.3. Magenkarzinom – Einteilung und Typen	10
1.6. Unterschiede der Mausmodelle zum Menschen	10
1.7. Cathepsin Z	11

2. Materialien und Methoden

2.1. Geräte	13
2.2. Labormaterialien	14
2.3. Reagenzien	14
2.4. Antibiotika	15
2.5. Antikörper	16
2.6. Kits	16
2.7. Bioinformatische Mittel	16
2.8. PCR-Spezifika	17
2.8.1. Cathepsin Z	17
2.8.2. Humanes Gastrin	18
2.8.3. H. pylori	18
2.9. Helicobacter pylori	18
2.10. Kultivierung	18
2.11. Verwendete Mausstämme	19
2.11.1. CtsZ ^{-/-} (FVB/N-Hintergrund)	19
2.11.2. INS-GAS (FVB/N-Hintergrund)	19
2.12. Tierversuchsbestimmung	19
2.13. Maushaltung	20
2.14. Genotypisierung der Mäuse	20
2.14.1. Mäuseschwanzbiopsien	20
2.14.2. Blutentnahme und Aufbereitung	20
2.14.3. DNA-Isolation	20

2.14.4. PCR	21
2.14.5. Semiquantitative PCR	22
2.14.6. Agarosegel-Elektrophorese	23
2.14.7. Gastrin-17 ELISA	23
2.15. Orale Infektion der Mäuse	23
2.16. Tötung der Versuchstiere und Magenresektion	24
2.17. Einbettung in Paraffin und Herstellung von Schnittpräparaten	25
2.18. Histochemische und immunhistochemische Färbungen	25
2.18.1. Immunhistochemische Färbung	25
2.19. Nachweis von H. pylori	26
2.19.1. Indirekte Immunfluoreszenz	26
2.19.2. PCR	26
2.20. Histologische Beurteilung	27
2.20.1. Nachweis von H. pylori	27
2.20.2. Allgemeines zur Auswertung	27
2.20.3. Auswertung der Atrophie der Parietalzellen	28
2.20.4. Bewertung der muzinösen Metaplasie (SPeM)	28
2.21. Statistische Auswertung	30
3. Ergebnisse	
3.1. Etablierung eines neuen in-vivo Mausmodelles	31
3.1.1. Allgemeines zum Kreuzungsvorhaben	31
3.1.2. Ablauf der Kreuzungen	32
3.1.3. Erste Kreuzung	33
3.1.4. Zweite Kreuzung	34
3.1.5. Dritte Kreuzung	35
3.1.6. Rückkreuzung	36
3.2. Untersuchung der Rolle des Cathepsin Z in der Magenkarzinogenese	36
3.2.1. Versuchsaufbau	36
3.2.2. (Immun-)histologische Auswertung von Teilschritten der Magenkarzinogenese	37
3.2.3. Atrophie	37
3.2.3.1. Ausprägung der Atrophie in Abhängigkeit vom Locus im Magen	38
3.2.3.2. Abhängigkeit der Atrophie vom Geschlecht	39
3.2.3.3. Einfluss der H. pylori-Infektion auf die Atrophie	40
3.2.3.4. Einfluss des Cathepsin Z auf die Atrophie	41
3.2.4. SPeM	42
3.2.4.1. Abhängigkeit der SPeM vom Locus im Magen	42
3.2.4.2. Abhängigkeit der SPeM vom Geschlecht	43
3.2.4.3. Einfluss der H. pylori-Infektion auf die SPeM	44
3.2.4.4. Einfluss des Cathepsin Z auf die SPeM	45

Inhaltsverzeichnis

3.2.5. SPEM und Atrophie	46
4. Diskussion	
4.1. Ausbildung von Atrophie	48
4.2. Atrophie nach H. pylori-Infektion und Einfluss des Cathepsin Z	49
4.3. Ausbildung von SPEM	50
4.4. Einfluss des Cathepsin Z auf die SPEM-Bildung	51
4.5. Verhältnis von SPEM zu Atrophie	52
4.6. Abschließende Diskussion	52
5. Zusammenfassung	
Literaturverzeichnis	
Danksagung	
Ehrenerklärung	
Beruflicher Werdegang	

Abkürzungsverzeichnis

APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i> (Gen)
aqua dest.	<i>aqua destillata</i>
BabA	<i>blood group antigen-binding adhesin</i> (Gen)
BHI	<i>brain heart infusion</i>
bp	<i>base pair</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cagPAI	<i>cytotoxin-associated gene pathogenecity island</i>
CD44	<i>cluster of differentiation 44</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid (chemische Abkürzung)
CT	Computertomographie
CtsZ	Cathepsin Z
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	Diamidinphenylindol
DCC	<i>deleted in colorectal carcinoma</i> (Gen)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ECL(-Zellen)	<i>enterochromaffin-like</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
et al.	et alii
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAP	<i>familial adenomatous polyposis</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FELASA	<i>Federation of Laboratory Animal Science Association</i>
ggfs.	gegebenenfalls
GRP	<i>gastrin releasing peptide</i>
H. pylori	Helicobacter pylori
HCl	Salzsäure (chemische Abkürzung)
HDGC	<i>hereditary diffuse gastric cancer</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNPCC	<i>hereditary non-polyposis colon cancer</i>
HPF	<i>high power field</i>
IL-8	Interleukin-8
INS-GAS	Insulin-Gastrin (Transgen)
IVC	<i>individually ventilated cages</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen</i>
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
LW	Leerwert

Abkürzungsverzeichnis

Mac-1	<i>Macrophage-1 antigen</i>
MAG	multifokale atrophische Gastritis
MALT(-Lymphom)	<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
MS	Microsoft
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
O ₂	Sauerstoff (chemische Abkürzung)
oipA	<i>outer inflammatory protein A</i>
OLGA	<i>Operative link for gastritis assessment</i>
OLGIM	<i>Operative link on intestinal metaplasia assessment</i>
OMP	<i>outer membrane protein</i>
PAS	<i>periodic acid–Schiff</i>
PBS	<i>phosphate bufferd saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH-Wert	chemische Abkürzung der Wasserstoffionendichte
PPI	Protonenpumpeninhibitoren
RGD-Motiv	Arginyl-glycyl-aspartic acid-Motiv
SabA	sialic acid binding adhesin
SPEM	spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia
SPF	<i>specific-pathogen-free</i>
SS1	<i>Sydney strain 1</i>
T4SS	<i>Type 4 Secretion System</i>
TFF2	<i>Trefoil factor 2</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultraviolett
VacA	<i>Vacuolating cytotoxin A</i>
VBNC	<i>viable but not cultureable</i>
vgl.	vergleiche
wpi	<i>Wochen post infectionem</i>

1. Einführung

1.1. Überblick und Ziele

Das Magenkarzinom nimmt bei den weltweiten Krebssterbefällen den zweithöchsten Rang ein. Zwar besitzt es eine geringere Inzidenz als diverse andere Krebsentitäten, jedoch ist die Prognose bei einer durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 30%, insgesamt sehr ungünstig. Aus diesem Grund ist der Erforschung der Magenkarzinogenese ein hoher Stellenwert zuzuordnen, um mittel- und langfristig unser Verständnis für die Pathogenese auch auf molekularer Ebene zu erweitern und um darauf aufbauend neue Therapiestrategien zu entwickeln.

Als ein herausragender Risikofaktor für das Magenkarzinom gilt seit den 1990er Jahren das Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Es ist außerdem bei der Entstehung der chronisch-aktiven Gastritis, dem MALT-Lymphom des Magens und beim Ulcus ventriculi et duodeni bekannt. Somit ist die präzise Aufklärung der Pathogenese der *H. pylori*-assoziierten Erkrankungen von großer Bedeutung und dementsprechend spielen Tiermodelle dabei eine entscheidende Rolle. So wurden Modelle in Frettchen, Primaten, Gerbils, Ratten und Mäusen entwickelt, von denen sich Mausmodelle wegen ihres weit erforschten Genoms und der relativ einfachen Zucht als besonders leistungsfähig herausgestellt haben.

So untersuchten Fox und Wang 1996 den Einfluss verschiedener *Helicobacter*-Species auf Histologie und Zellproliferation des Mausmagens auf der Suche nach einem passenden Mausmodell, in dem die Progression von einer chronischen Gastritis über Zellmeta- und dysplasien hin zu einem invasiven Karzinom gut zu untersuchen ist (Wang et al. 1996). Dabei ließen sich in bis dahin bestehenden Mausmodellen auch nach *H. pylori*-Infektion keine Magenkarzinome nachweisen. Allerdings zeigte die gleiche Arbeitsgruppe im Jahr 2000 in dem neuartigen Mausmodell INS-GAS, das durch ein transgenes Insulin-Gastrin-Fusionsgen das Peptidhormon Gastrin überproduzierte, erstmals eine spontane Progression bis hin zu einem Magenkarzinom, was durch eine Infektion mit *H. pylori* (Stämme: B128 und SSI) und *H. felis* verstärkt wurde (Wang et al. 2000).

Weitere Forschungsansätze fokussieren sich mehr auf die Tumorbilogie. So wird versucht zu verstehen, wie das menschliche Immunsystem mit dem Malignom interagiert und mit welchen Mechanismen dieses es schafft, wichtige Fähigkeiten wie Tumorzellmigration, -invasion und -metastasierung zu erlangen. So erkannten Krueger et al. 2005 eine Überexpression einer lysosomalen Protease - des Cathepsin Z (CtsZ, auch Cathepsin P oder X) - in *H. pylori*-infiziertem menschlichen Magen und im Magenkarzinom. Dieser Protease, die erst seit ca. 15 Jahren bekannt ist, werden in der Literatur modulatorische Funktionen bei immunologischen und neurodegenerativen Prozessen, sowie bei Zellkommunikation und Tumorentstehung zugeschrieben. Somit kommt dem CtsZ eine potentielle Rolle in der Karzinogenese des Magenkarzinoms zu (Krueger et al. 2005, Krueger et al. 2009). Zur tiefergehenden Untersuchung ist ein leistungsstarkes Mausmodell notwendig, das uns den Einfluss des Cathepsins auf die Magenkarzinogenese bis hin zum invasiven Tumor erforschen zulässt.

Ziel der Studie für diese Promotionsarbeit war es, solch ein neuartiges Mausmodell für die Magenkarzinogenese in Bezug zur Cysteinprotease Cathepsin Z zu generieren. Dazu griffen wir auf eine CtsZ-defiziente Mauslinie und den oben beschriebenen INS-GAS-Stamm zurück und haben durch Kreuzung einen CtsZ-defizienten/INS-GAS-transgenen (CtsZ^{-/-} INS-GAS^{+/+}, im folgenden CtsZ/IG) Mausstamm gezüchtet und an ihm Teilschritte der Magenkarzinogenese histologisch untersucht.

1.2. Makroskopische und mikroskopische Anatomie des humanen und murinen Magens

Der menschliche Magen erfüllt verschiedenste Aufgaben. So hat er neben seiner klassischen Aufgabe als Nahrungsreservoir und Verdauungsorgan auch endokrine Funktionen, wie z.B. im Vitamin B12-Stoffwechsel. Dabei wird er anatomisch und auch (patho-)physiologisch in verschiedene Bereiche geteilt (vgl. Abbildung 1). Mikroskopisch besitzt der Magen den typischen Wandaufbau des Gastrointestinaltraktes. Dabei besteht die Mukosa aus Drüenschläuchen, die in zwei Abschnitte geteilt werden. Der superfizielle Teil besteht aus schleimproduzierendem Oberflächenepithel, welcher einen Schutzfilm gegen die Magensäure bildet. Im Bereich des Überganges zum Drüsenteil der Mukosa sitzen Nebenzellen, die als Stammzellen das restliche Epithel regenerieren. Im Drüsenkörper befinden sich die Hauptzellen, Belegzellen (Parietalzellen) und die endokrinen ECL-Zellen (vgl. Abbildung 2 und 3).

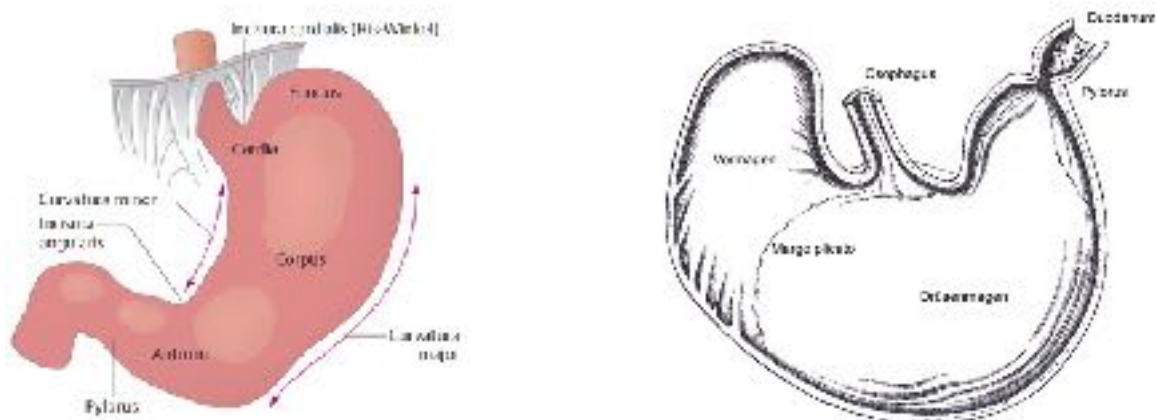


Abbildung 1 – Magenanatomie. Links des Menschen (Bommas-Ebert 2011, Seite 267); rechts der Maus (Hedrich 2004, modifiziert).

Die Mägen von Mensch und Maus zeigen bei prinzipiell ähnlichem Aufbau jedoch bestimmte Unterschiede in makro- und mikroskopischer Anatomie. So besitzt die Maus einen drüsenlosen Vormagen aus Plattenepithel, der zur Speicherung von Nahrung und deren Andauung mit α -Amylase dient (Peters 1973). Eine Schleimhautfalte (Plica) trennt diesen im Bereich Ösophagusmündung vom Drüsenmagen (Corpus). Distal der Plica beginnt ein Bereich von nur wenigen Drüenschläuchen, welcher der menschlichen Cardia entspricht. Direkt darauf beginnt die Corpusschleimhaut mit Beleg-

und Hauptzellbesatz ähnlich dem menschlichen Antrum. Belegzellen können in Mäusen diskontinuierlich in der Magenschleimhaut verteilt sein; es gibt aber auch Bereiche, in denen antrumartige Drüsenformationen die gesamte Länge des Magens vom Ösophagus bis zum Pylorus einnehmen können (Wang et al. 2009, Seite 324).

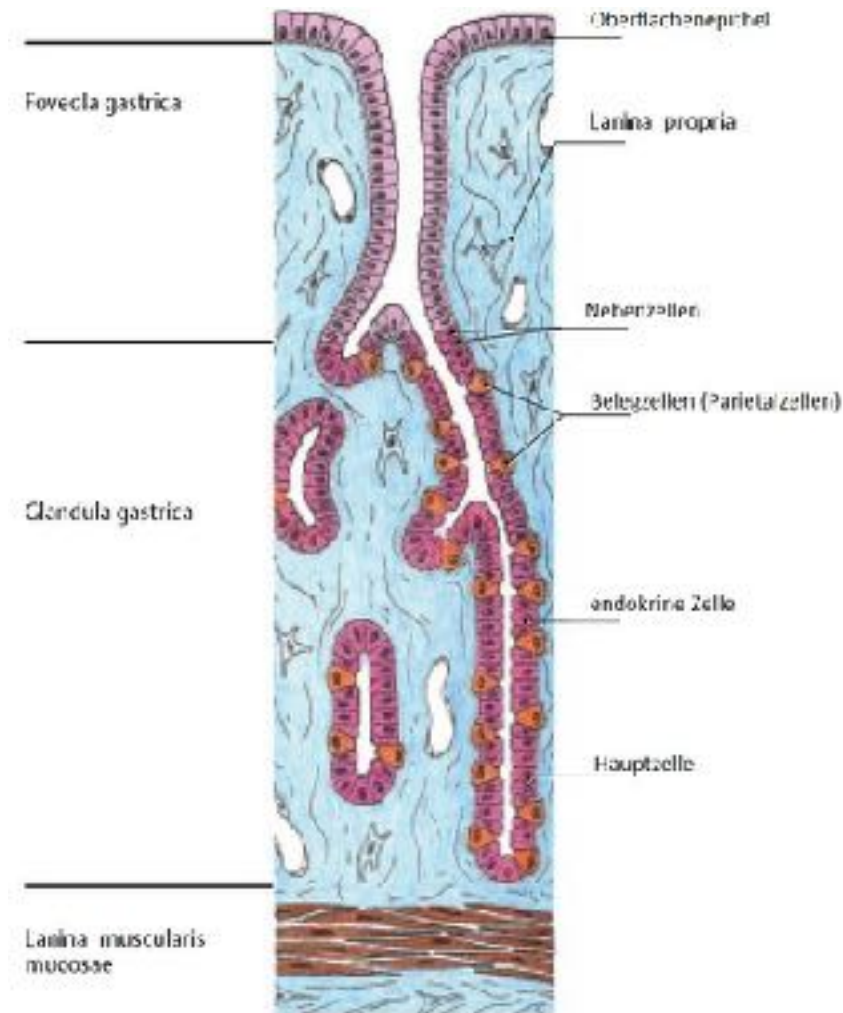


Abbildung 2 – Aufbau eines typischen Drüsenschlauches des Magens. *Oberflächenepithel:* produziert hochviskosen protektiven Schleimfilm; *Nebenzellen:* Regeneration des restlichen Epithels, ebenfalls Schleimproduktion; *Belegzellen:* Produktion von HCl und Intrinsic Factor; *Hauptzelle:* Produktion von Pepsinogen und Lipase; *endokrine Zelle:* im Antrum als G-Zelle: Gastrin-produzierende Zelle; (Ulfing 2011, Seite 129, modifiziert).

1.3. Physiologie des Magens

Hauptaufgabe des Magens ist die weitere Zerkleinerung der festen Nahrung aus dem proximalen Teil des gastroenteralen Systems mithilfe von Salzsäure und Enzymen (vor allem Pepsin) zu Chymus. Dabei herrscht, aufrechterhalten durch die H^+/K^+ -ATPase der Belegzellen, ständig ein pH-Wert im sauren Bereich. Stimuliert wird die Säuresekretion durch Acetylcholin, Gastrin und Histamin.

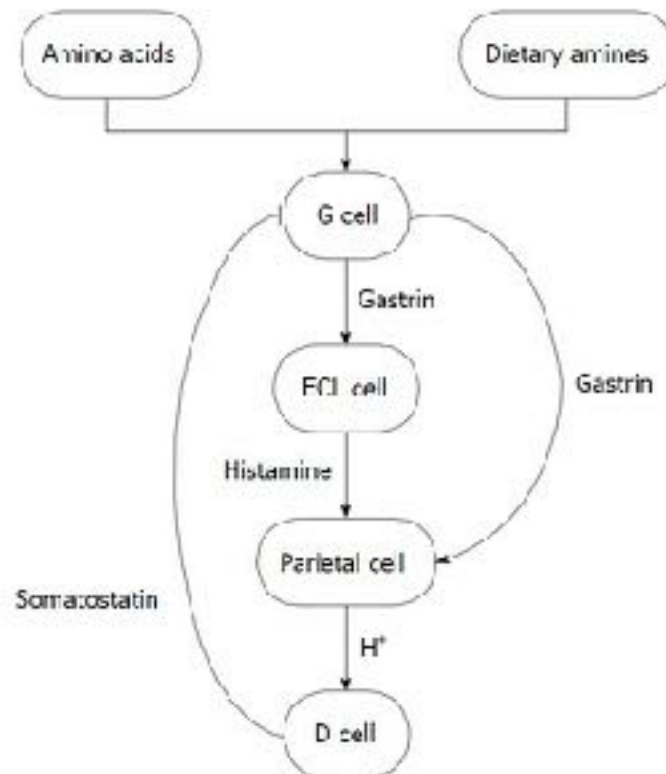


Abbildung 3 - Regulation der Säuresekretion im Magen, aus Burkitt et al. 2009.

Die Gastrinliberation wird dabei getriggert durch luminale Aminosäuren und Calciumionen, Magendehnung und das GRP (*Gastrin-releasing peptide*) aus postganglionären Fasern des parasympathischen Systems. Gehemmt wird die Gastrinproduktion durch Prostaglandine und Somatostatin (vgl. Abbildung 3). Neben der Stimulation der HCl-Sekretion wirkt Gastrin proliferativ auf die Magenschleimhaut und beeinflusst wichtige Mechanismen wie Apoptose, Angiogenese und Zellmigration/-invasion (Burkitt et al. 2009).

1.4. Helicobacter pylori

1.4.1. Allgemeines

H. pylori ist ein Gram-negatives, s-förmig gekrümmtes Stäbchen mit 1 bis 3 Windungen (Breite 0,5 – 0,9 µm, Länge 2-4 µm). Es besitzt zur Fortbewegung bis zu 6 polare Geißeln und ist vollständig von einer 40 nm dicken Glykokalix bzw. Polysaccharidkapsel umhüllt. Außerdem ist eine kokkoide Form beschrieben, die zB. in älteren Kulturen auftritt und als zeitweilige Anpassungsreaktion an Stressoren wie Nahrungsentzug, Antibiotika oder zu lange Inkubationszeit interpretiert wird. Es wird angenommen, dass dieser Vorgang reversibel ist (Owen 1998).

Der *H. pylori* lässt sich idealerweise unter mikroaerophiler Atmosphäre mit 5% O₂ und 5-10% CO₂ bei 37° C auf bluthaltigem Agar kultivieren und wächst in 3 bis 5 Tagen. Katalase und Cytochrom-Oxidase sind positiv und das Bakterium besitzt einen hohen Gehalt an Urease, alkalischer Phosphatase und Lipase (Owen 1998).

Vorrangiger Wirt ist der Mensch, aber es wurden auch *H. pylori* in Hauskatzen, Schweinen, Pavianen und Rhesusaffen gefunden. In seinem Wirt hält er sich fast ausschließlich in der gastrointestinalen Mukosa auf (vor allem im Magen); ist seltener aber auch in Zahnbelägen, Faeces und Blut nachweisbar (Owen 1998).

1.4.2. Epidemiologie

Epidemiologisch gesehen kommt *H. pylori* weltweit vor und etwa 50% der Weltbevölkerung ist infiziert - somit ist diese Infektion eine der häufigsten überhaupt. Allerdings divergieren lokale Infektionsraten erheblich, wobei entwickelte Länder (wie USA, Europa und Australien) mit 25% eine wesentlich geringere Durchseuchung zeigen als Länder der dritten Welt. Ursächlich angenommen werden vor allem hygienische und sozioökonomische Faktoren sowie die Verbreitung von Antibiotika und deren Resistenzen. Weiterhin infiziert man sich in entwickelnden Ländern in der Kindheit, in entwickelten Ländern eher im späteren Leben. Die Rate nimmt mit steigendem Lebensjahrzehnt fast proportional zu. Die genauen Infektionswege sind noch nicht abschließend gesichert. Am wahrscheinlichsten und häufigsten aber ist eine fäkal-orale oder oral-orale Übertragung vor allem von Mutter zu Kind (Pounder 1995; Malaty 2007; Everhart 2000; Brown 2000). Die beschriebene kokkoide Form (VBNC – „viable but not cultureable“) begünstigt wahrscheinlich ein Überleben des Keimes auch außerhalb eines Wirtes. So ist Trinkwasser wahrscheinlich doch als Infektionsquelle anzunehmen, trotzdem aus ihm der Keim nicht kultivierbar ist (Adams et al. 2003).

1.4.3. Infektion und Pathogenitätsfaktoren

Das Ausmaß der Infektion hängt von stammspezifischen Pathogenitätsfaktoren ab. Der Keim bewegt sich korkenzieherartig durch die mukosale Barriere; Urease und Lipase schützen dabei vor dem niedrigen pH-Wert, indem sie einen Film um das Bakterium aufbauen. Die Ammoniumionen können neben ihrer Schutzfunktion auch eine direkte Zellschädigung hervorrufen (Slomiany et al. 1987; Smoot et al. 1990).

An das Oberflächenepithel bindet der *H. pylori* vor allem durch OMPs (*outer membrane proteins*) und Adhäsine, wie zB. das BabA oder das SabA, die an Lewis-Antigene von Muzinen binden (Ilver et al. 1998, Mahdavi et al. 2002). Das oipA („outer inflammatory protein“) ist maßgeblich an einer Induktion des IL-8 beteiligt (Yamaoka et al. 2000) und konnte in erhöhtem Maße in präkanzerösen Läsionen nachgewiesen wurde.

Die Mehrheit der *H. pylori*-Stämme exprimieren das Zytotoxin VacA, das sich in die Zellmembran des Epithels integriert und dort einen Ionenkanal formt, der Chlorid und Pyruvat aus der Zelle strömen und dem Keim als Substrate zur Verfügung stehen lässt (Tombola et al. 1999; Guarino 1998; Szabo et al. 1999) und letztendlich zur Vakuolenbildung führt (Tombola et al. 2001). Außerdem beeinflusst es die Sekretion und das endosomale System und unterstützt den *H. pylori* so aktiv bei seinem intrazellulären Wachstum (Terebiznik et al. 2006).

Weitere Wirkungen des VacA sind die Hemmung des Zell-Zyklus beim Übergang der G1 in die S-Phase (Manente et al. 2008), die Aktivierung und Stimulation von den Caspasen und proapoptotischer Faktoren (Yamasaki et al. 2006; Willhite 2004) sowie die Aktivierung spezifischer Signalwege (Nakayama et al. 2009; Hisatsune et al. 2007, Nakayama et al. 2004).

Infektionen mit VacA-positiven Stämmen führen durch diese Mechanismen zu einer akuten Gastritis mit zytoplasmatischer Schwellung, Vakuolisierung, Muzin-Verlust und Desquamation des Oberflächenepithels.

Ein weiterer wichtiger Pathogenitätsfaktor ist die *cag*-Pathogenitätsinsel (*cagPAI*) im Genom des *H. pylori*, die 29 verschiedene Gene enthält (Censini et al. 1996). So wird zB. ein Typ IV-Sekretionssystem (T4SS) exprimiert, welches die Oberfläche der Magenepithelzelle bindet (Backert 2008; Kwok et al. 2007) und Virulenzfaktoren, wie das CagA, in die Oberflächenepithelzellen injiziert. Dort führt das CagA zum Anstieg der Wachstumsfaktor- und Zytokinproduktion (zB. IL-8) und somit zur Zellproliferation im Epithelgewebe und zur Immigration von Entzündungszellen. Weiterhin stört es die apikalen Tight-junction-Komplexe (Amieva et al. 2003) und begünstigt Apoptose (Moss et al. 2001).

1.4.4. Immunreaktion, Entzündung und Histologie

Die häufigste Manifestation einer *H. pylori*-Infektion ist die Typ B-Gastritis. Die individuelle Ausprägung der Entzündung hängt vom Vorhandensein spezifischer Pathogenitätsfaktoren (vgl.

Kapitel 1.3.3.), aber auch von der damit assoziierten Immun- bzw. Entzündungsreaktion des Wirtes, sowie nutritiven Faktoren (salzhaltige Nahrung) ab.

Nach Infektion werden neutrophile Granulozyten rekrutiert und später folgen T und B-Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen. Die *H. pylori*-Infektion induziert eine signifikante zelluläre und auch humorale Immunantwort über Antigenstimulation von mukosalen Monozyten und T-Lymphozyten. Weiterhin produzieren die eingewanderten Entzündungszellen zahlreiche Zytokine (TNF- α , Interferon- γ und die Interleukine 1,6 und 8), Prostaglandine, Proteasen (wie z.B. das Cathepsin Z) und reaktive Sauerstoffmetabolite, die Epithelnekrosen und Schleimhautschäden hervorrufen. IL-8 ist ein potenter Aktivator der neutrophilen Granulozyten (Yamaoka et al. 2000) und ist stark erhöht bei Vorliegen des *cagPAI* (Naumann et al. 1999). Antikörperproduzierende B-Lymphozyten führen zu einer komplementvermittelten Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten. Dabei hängt das Ausmaß der Gastritis direkt von den Antikörpertitern im Serum ab (Kreuning et al. 1994).

Histopathologisch gesehen handelt es sich meist um eine Antrumgastritis. Auf Grund von Regeneration durch Stammzellen bildet sich eine vielzellige Oberflächenschicht mit schlecht diskriminierbaren Zellgrenzen, die im Mikroskop wie ein Synzytium erscheint. Basal davon finden sich Neutrophileninfiltrate, die Abszesse bilden können. Die Schleimhaut ist auf Grund der lymphozytären Infiltrate in der Lamina propria, die sich später auch zu Follikeln gruppieren können, dabei schon leicht verdickt. Eosinophile Granulozyten können auch vorhanden sein. In diesem Stadium spricht man bereits von einer chronisch-aktiven Gastritis. Durch die Epithelschädigung des

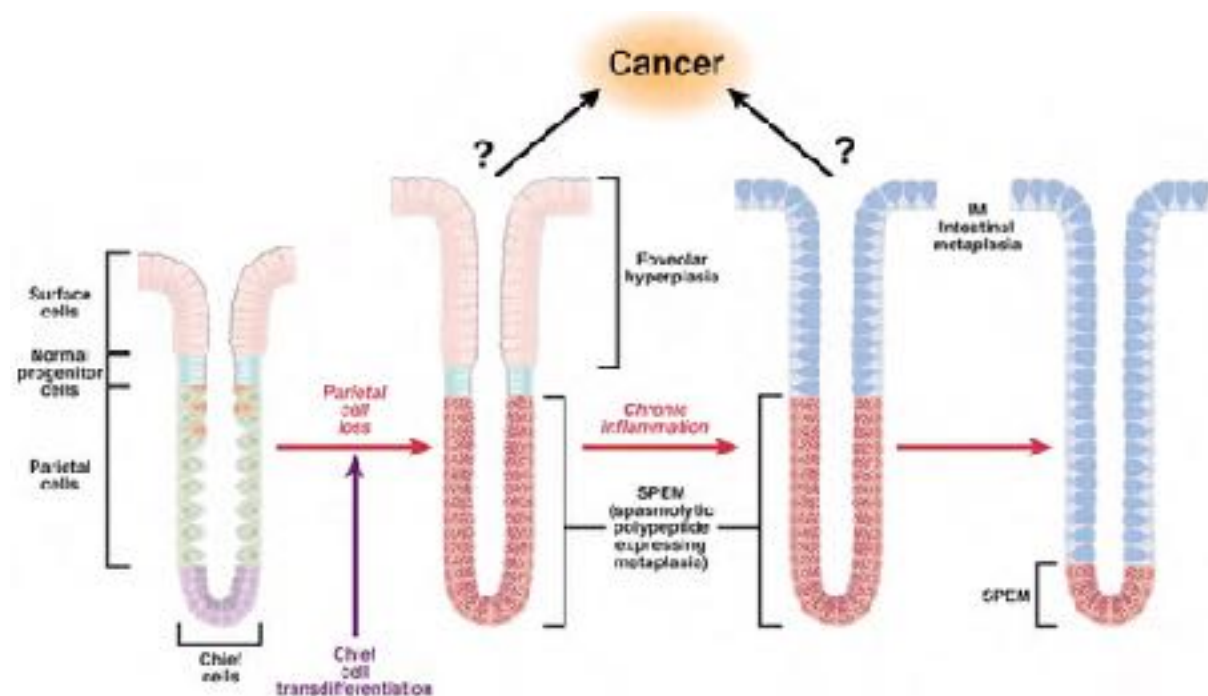


Abbildung 4 – Zusammenhang der Schleimhautveränderungen Parietalzellatrophie, SPEM, intestinale Atrophie und Malignität, aus Goldenring et al. 2010.

H. pylori und der Neutrophilen bilden sich Erosionen und Ulcera, die sich typischerweise von Stress- und NSAR-Ulcera durch das Fehlen einer homogenen eosinophilen Nekrose unterscheiden.

Wenn eine Regeneration der Läsionen fehlschlägt, dann kommt es zu einer Proliferation von Fibroblasten und extrazellulärer Matrix und somit zu einem irreversiblen Verlust von funktioneller Mukosa.

Neben der Entzündungsreaktion führt die Infektion mit *H. pylori* so auch zu einer Atrophie, v. a. der Parietalzellen. Nun führt die Parietalzellatrophie zusammen mit der Entzündung zur Entwicklung von Metaplasie. Dabei unterscheidet man seit einigen Jahren von der klassischen intestinalen Metaplasie die muzinöse Metaplasie (*spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia* – SPEM) (Schmidt et al. 1999). Dabei sollen SPEM-Zellen in der atrophischen Schleimhaut die Hauptzellen ersetzen und von basal die Drüsenschläuche des Magens ausfüllen (Nomura et al. 2004; Nozaki et al. 2008). So sorgt ein Fehlen der Parietalzellen für eine gestörte Herausbildung von differenzierten Haupt- und Nebenzellen (Li et al. 1996). Die Hauptzellen (oder eine Unterform von ihnen) sind somit nicht - wie vorher angenommen - in einem post-mitotischem Stadium, sondern agieren als Progenitorzellen, die in einer entzündeten Magenmukosa aktiviert werden können.

Diese Vorgänge sind als Anpassungsreaktion auf den *H. pylori* zu werten (Weis 2009), denn dieser kann die metaplastische Mukosa nicht mehr kolonisieren, da die oben beschriebenen Adhäsionsfaktoren nun fehlen. Dabei konstituiert sich die Magenschleimhaut in einem Hybrid aus intestinaler/muzinöser Metaplasie und inflammatorischer Mukosa (MAG – multifokale atrophische Gastritis). Diese Form der chronisch-atrophischen Gastritis stellt einen hohen Risikofaktor für die Entwicklung eines Magenkarzinoms dar und ist stark mit der *H. pylori*-Infektion assoziiert (Correa 1992; Schmidt et al. 1999).

1.5. Magenkarzinom

1.5.1. Epidemiologie

Das Magenkarzinom ist das einzige Karzinom, dessen Inzidenz und Mortalität seit über 70 Jahren weltweit, aber vor allem in industrialisierten Ländern, kontinuierlich abnimmt (Parkin 1993). Dabei sinkt lediglich die Inzidenz des intestinalen Typs, wohingegen die Inzidenz des diffusen Typs sogar leicht ansteigt (Roder 2002; Henson et al. 2004). Außerdem zeigt der Trend, dass sich das Verhältnis von proximalem (*cardia*) zu distalem (*non-cardia*) Entstehungsort zugunsten des proximalen verschiebt (Blot et al. 1991). Trotzdem nimmt das Magenkarzinom in der Mortalitätsstatistik weltweit immer noch den zweiten Platz nach dem Lungenkrebs ein (Parkin 2004).

Die wichtigsten und am besten untersuchten Risikofaktoren für die Entwicklung eines distalen Magenkarzinoms sind die *H. pylori*-Infektion, das männliche Geschlecht, Magenkrebs in der Familienanamnese, Tabakrauchen, Alkoholkonsum, perniziöse Anämie, vorangegangene Magenteiloperationen und vermehrte Strahlenexposition (Moehler et al. 2011; Stael et al. 1995; Kato

1982; Brumback et al. 1984). Ernährungsfaktoren wie salz- und nitrithaltige Nahrung oder zu geringes Obst- und Gemüseangebot erhöhen zwar das Risiko, sind aber statistisch schwer zu erheben und die genaue Rolle als ätiologische Faktoren sind weiterhin unsicher (Brenner et al. 2009).

Weiterhin können bösartige Neubildungen im Magen bei verschiedenen genetischen Tumorsyndromen auftreten, wie z.B. dem HNPCC (*hereditary nonpolyposis colon cancer*) (Park et al. 2000), der FAP (*familial adenomatous polyposis*) (Utsunomiya et al. 1974) oder dem HDGC (*hereditary diffuse gastric cancer*) (Dunbier 2001).

1.5.2. Ablauf der Magenkarzinogenese

Auf Grund der Bedeutungsschwere des Magenkarzinoms in Inzidenz und Mortalität ist seine Entstehungssequenz ähnlich wie im Kolon-Karzinom relativ gut aufgeklärt und es hat sich mittlerweile ein differenziertes und multifaktorielles Bild seiner Genese entwickelt.

Typischerweise geschieht die Infektion mit dem *H. pylori* von der Mutter auf das Kind, sodass sich erste Magenmukosaveränderungen im Sinne einer Oberflächengastritis bereits in der Kindheit manifestieren können. In dieser Phase spielen exogene Faktoren wie Ernährungsverhalten und Rauchen eine wichtige Rolle. Bereits im Jugendalter kann sich so ein sporadisches, diffuses Magenkarzinom ausbilden, vor allem in Verbindung mit genetischen Prädispositionen, wie einer E-Cadherin-Mutation im Rahmen des HDGC (vgl. Kapitel 1.5.1.).

Im mittleren Erwachsenenalter entwickelt sich mit den oben beschriebenen Mechanismen die oberflächliche Gastritis zu einer chronisch-atrophischen Gastritis mit progredienter metaplastischer Umwandlung der Magenmukosa bis hin zu der MAG. Auf diesem Boden kann sich dann klinisch auch ein Ulcus ventriculi manifestieren. Außerdem nachweisbar sind in dieser Phase meist eine Hypochlorhydrie und eine Hypergastrinämie. Der Hypergastrinämie könnte dort eine wichtige Rolle in der Beeinflussung prokarzinogener Prozesse zukommen (vgl. Kapitel 1.3.). Den genauen Einfluss auf die Karzinogenese im Menschen ist aber noch nicht abschließend gesichert (Burkitt et al. 2009). Allerdings bewirken zytotoxische Effekte - zum Beispiel von Nitrosoverbindungen, akkumulativ zu DNA-Replikationsfehlern und Hypermethylation - Mutationen oder eine LOH (*loss of heterozygosity*) in diversen Genen (z.B. APC, p53, CD44, DCC etc.) und führen so zellmorphologisch und histologisch zu Dysplasien (vgl. Abbildung 6).

Dysplastische Areale können nun stabil bleiben, innerhalb einiger Jahre den Progress zum invasiven Karzinom vom intestinalen Typ beschreiten oder sich sogar wieder zurückbilden. Dabei zeigen vor allem mittlere und leichte Dysplasien den Trend sich eher zurückzubilden und schwere Dysplasien sich zu invasiven Karzinomen weiterzuentwickeln (Saraga et al. 1987). Im Gegenteil dazu kann sich ein diffuses Karzinom im jugendlichen Alter auch auf einer nicht-dysplastischen Mukosa entwickeln

1.5.3. Magenkarzinom – Einteilung und Typen

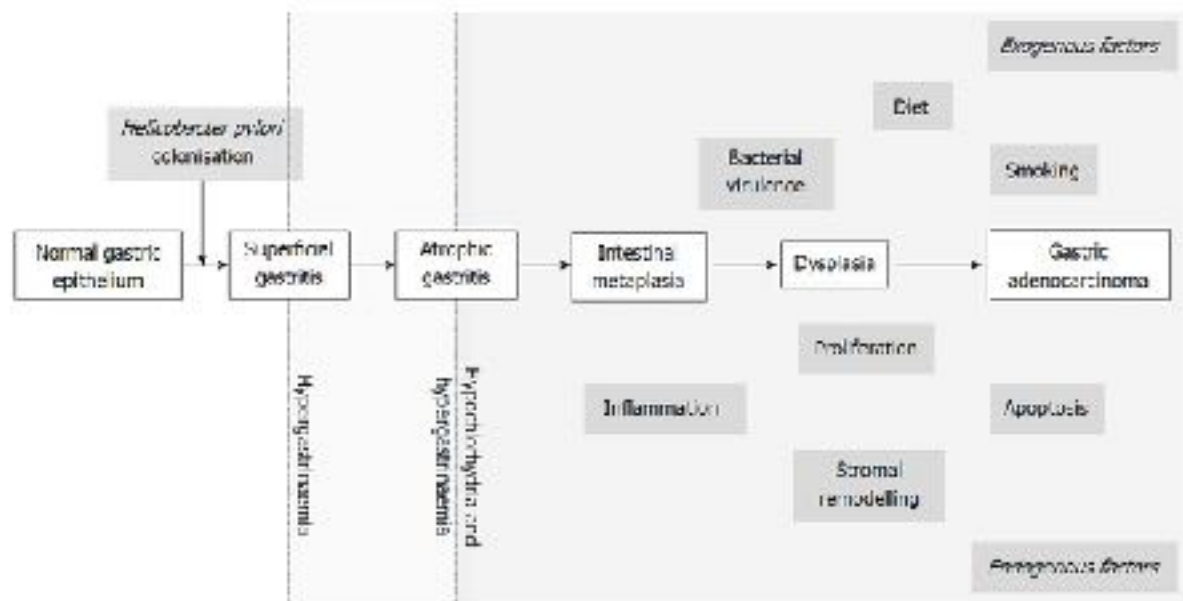


Abbildung 5 - Ablauf der Entwicklung eines Adenokarzinoms des Magen, aus Burkitt 2009.

Man unterscheidet unter prognostischen Kriterien vom Magenkarzinom das Magenfrühkarzinom, welches definiert ist als Ausbreitung des Tumors auf höchstens Mukosa und Submukosa unabhängig davon, ob bereits Lymphknotenmetastasen vorliegen.

Eine alte aber immer noch geläufige Einteilung nahm Pekka Laurén vor, der erstmals 1965 makroskopisch das Magenkarzinom des intestinalen Typs vom diffusen Typ unterschied. Sie spielt heute immer noch eine bedeutende Rolle in der Auswahl des geeigneten Therapieverfahrens und der Prognose der Erkrankung (LAUREN 1965).

Die Borrmann-Klassifikation unterscheidet vier Wachstumstypen (polypös, scharfbegrenzte Ulcusform, unscharf begrenzte Ulcusform, diffus infiltrierend).

Nach histologischen Kriterien unterscheidet die WHO seit 1997 die Hauptform eines Adenokarzinoms (95%) mit den Subtypen papillär, tubulär, muzinös und siegelringzellig vom adenosquamösen Karzinom (4%) und seltenen Plattenepithel- und undifferenzierten Karzinomen (Hamilton 2000).

1.6. Unterschiede der Mausmodelle zum Menschen

Wie oben beschrieben hat sich aus der Vielfalt an Tiermodellen das Mausmodell als besonders leistungsfähig herausgestellt, wobei es auch einige Nachteile bzw. Unterschiede zum humanen Modell gibt. So zeigen Mäuse eine teils differente makroskopische und mikroskopische Anatomie (vgl. Kapitel 1.2.). Außerdem hängt der zu untersuchende Aspekt der Karzinogenese vom Genotyp des

spezifischen Mausmodells ab, sodass Vorsicht bei Generalisierung von Forschungsergebnissen angebracht ist (z.B. starkes Übergewicht der Th1-Immunantwort bei der typischen Labormaus C57BL/6 im Unterschied zum Menschen).

Andere bedeutende Unterschiede von Mausmodellen zum Menschen sind die nicht immer vorhandene Suszeptibilität für eine *H. pylori*-Infektion und die männliche Geschlechtspräferenz der Karzinogenese beim Menschen. Beides ist jedoch in den von uns verwendeten Mausstämmen vorhanden (Fox et al. 2003). Bisherige Mausmodelle zeigen außerdem nicht die typische humane antrale Prädominanz der gastralen Läsionen, sondern Entzündung und Dysplasien zeigen sich typischerweise primär im Corpus.

Ein bedeutender Unterschied in der Karzinogenese ist das seltene Auftreten einer intestinalen Metaplasie in bisherigen Mausmodellen, dafür aber die Entwicklung von SPEM als typische präneoplastische Läsion (Weis 2009). Das einzige Tiermodell mit ausgeprägter intestinaler Metaplasie sind mongolische Gerbils (Hirayama et al. 1996). Eine häufige gastrale Veränderung von *H. pylori*-infizierten Tieren ist die Gastritis cystica profunda, die dort als typische präneoplastische Läsion interpretiert wird, wobei diese Pathologie im Menschen lediglich selten und meist als Folge von Magen Chirurgie gesehen wird.

1.7. Cathepsin Z

Das Cathepsin Z (auch: Cathepsin P oder X, folgend: CtsZ) ist eine lysosomale Cysteinprotease und wurde 1998 das erste Mal beschrieben (Nägler et al. 1999; Santamaria et al. 1998). Dabei weist es verschiedene Besonderheiten in Struktur und Funktion im Vergleich zu den anderen Cathepsinen auf; so ist es die einzige Monopeptidyl-Carboxypeptidase, besitzt außerdem keinerlei Endopeptidaseaktivität wie die anderen Cathepsine (Nägler et al. 1999; Devanathan et al. 2005) und wird vom Cathepsin L aus dem Proenzym in seine aktive Form konvertiert.

Dabei lässt sich eine CtsZ-Expression ubiquitär, vor allem in Monozyten/Makrophagen (Kos et al. 2005) finden, kann aber auch Ausdruck einer speziellen Funktion verschiedenster Zellen sein und spielt somit pathophysiologisch eine bedeutende Rolle.

Als erstes konnte so ein Zusammenhang mit der Karzinogenese des Prostatakarzinoms vermutet werden, da sich in Prostatektomieproben eine erhöhte Expression von CtsZ finden ließ (Nägler et al. 2004). Außerdem wiesen Bühling et al. im gleichen Jahr (Bühling et al. 2004) erstmals in einer *Helicobacter*-Gastritis eine CtsZ-Überexpression nach, wobei die anderen untersuchten Cathepsine (B, L und K) keine oder nur vereinzelte Überexpression zeigten. Weitergehende Untersuchungen der gleichen Arbeitsgruppe konnten ebenfalls einen Zusammenhang des CtsZ mit dem Magenkarzinom vor allem des intestinalen Typs und seiner Genese herausarbeiten (Krueger et al. 2005). Andere Studien weisen auf die Rolle des Cathepsin Z in anderen bösartigen Tumoren beim Menschen hin. So wird die Protease z.B. im Gallenblasenkarzinom hochreguliert (Sahasrabudhe et al. 2014) oder führt in Leberzellkarzinomen zu einer verstärkten Metastasierung (Wang et al. 2011). Außerdem zeigen Lines et al. 2012 eine Interaktion mit dem Bindeprotein S100P bei der Entstehung von

Pankreaskarzinomen. In Synergie mit dem Cathepsin B kommt dem Cathepsin Z eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Mammakarzinoms (Vasiljeva et al. 2006; Sevenich et al. 2010) zu. Dabei sah man an Cathepsin-einfach- und doppel-knockout Brustkrebs-Mausmodellen eine Verzögerung des Tumoraufretens, allerdings wurde das fehlende Cathepsin in einfach-defizienten Mäusen durch das vorhandene andere Cathepsin teilweise durch eine Hochregulation kompensiert. Eine gegenteilige Funktion könnte das Cathepsin Z in der Magenkarzinogenese spielen. So ließ sich in einem *Helicobacter*-Gastritis-Mausmodell im CtsZ-Knockout-Stamm eine signifikant höhere Menge von SPEM, Proliferation, Cytokinaktivierung und Makrophagenimmigration nachweisen (Krueger et al. 2013). Demnach würde dem CtsZ eine protektive Rolle in der Entzündung und Karzinogenese im Magen zukommen, bzw. das Fehlen der Protease diese beschleunigen.

Viele weitere Arbeiten deckten Mechanismen und Interaktionspartner des CtsZ auf. Nascimento et al. untersuchten 2005 das - den Cathepsinen typische – Interaktionsverhalten mit der extrazellulären Matrix (EZM) und zeigten, dass das extrazelluläre Proteoglykan Heparansulfat die intrazelluläre Aktivität und das Verhalten des CtsZ beeinflussen kann und selbst auch als Bindungspartner agiert (Nascimento et al. 2005). Außerdem vermag das CtsZ Beta-2-Integrine mit seinem exklusiven RGD-Motiv zu binden und ihre Funktionen zu modulieren (Obermayer et al. 2006) und kann so Einfluss auf Zell-Zell-Adhäsion und Migration (Lechner et al. 2006) nehmen. Außerdem kann das CtsZ über die Beta-2-Integrin-Rezeptoren (LFA-1 und Mac-1) das Immunsystem in Form von T-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen aktivieren (Obermayer et al. 2008a, Obermayer et al. 2008b) und sie zur Migration (Jevnikar et al. 2008) und Phagozytoseaktivität anregen (Kos et al. 2009). Neben den wichtigen Rollen in Stimulation des Immunsystems, Degradation von EZM und Karzinogenese konnten auch Funktionen in neuronaler Entwicklung und neurodegenerativen Erkrankungen (Wendt et al. 2007), an hämatopoetischen Stammzellen (Staudt et al. 2010) und im Kallikrein-/Kinin- bzw. Renin-/Angiotensinsystem aufgezeigt werden (Nägler et al. 2010).

2. Materialien und Methoden

Nachfolgend werden die verwendeten Geräte und Materialien aufgelistet:

2.1. Geräte

Gerätebezeichnung	Name	Hersteller	Firmensitz
Eismaschine	AF80	Scotsman	Frimont, Italien
Zentrifuge	5417R	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge	Minispin	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge	MCF-2360	LMS Consult	Brigachtal
Thermomixer	comfort	Eppendorf	Hamburg
PCR-Maschine	DNA-Machine Gradient Cycler	Bio-Rad	Hercules, USA
Magnetrührer		Neolab	Heidelberg
Schlittenmikrotom	HM335	Microm	Walldorf
Paraffinstreckbad		Medax Nagel GmbH	Kiel
Einbettautomat	HyperCenter	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH	Wetzlar
Gefrierschrank (-80°C)		Fryka	Esslingen
37°C Schränke		Memmert	Schwa-bach
Vortexer	MS3 basic	IKA	Staufen
Elektrophoresekammer	Mupid-One	Advance	Tokio, Japan
Präzisionswaage	BP121 S	Sartorius	Göttingen
Geldokumentations-system	Gene Genius	Syngene	Cambridg, England
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf	Hamburg
Färbeautomat		Leica Microsystems GmbH	Wetzlar
Pascal Druckkammer		Dako Denmark A/S	Glostrup, Dänemark
Mikroplaterereader	Glomax Multidetec-tion System	Promega GmbH	Mannheim
Brutschrank (Inkubator)		Binder GmbH	Tuttlingen

Tabelle 1 - verwendete Geräte.

2.2. Labormaterialien

Labormaterial	Hersteller	Firmensitz
Anaerobiertöpfe	Oxoid	Wesel
Campygen	Oxoid	Wesel
Einbettkassetten	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Handschuhe	Hartmann	Heidenheim
Kanülen und Spritzen	B. Braun AG	Melsungen
Objektträger SuperFrostPlus	Thermo Scientific	München
Petrischalen	Greiner	Solingen
Präparationsschere	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Selectip Uretherkatheter	Bard Portsysteme	Karlsruhe
Tuberkulinspritze 1 ml	B. Braun	Melsungen
Einweg-Impfösen	Greiner	Solingen

Tabelle 2 - verwendete Labormaterialien.

2.3. Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Firmensitz
LE Agarose	Biozym	Hess. Oldendorf
Tris-Base (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
0,5M EDTA (pH 8,0)	Sigma Aldrich	Deisenhofen
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
5xDNA-Loading Buffer, Blue	Bioline	London, England
HyperLadder I	Bioline	London, England
HyperLadder IV	Bioline	London, England
Ethanol 100%	MERCK	Darmstadt
Formalin 4%	MERCK	Darmstadt
Eosin	MERCK	Darmstadt
Hämatoxylin	MERCK	Darmstadt
Paraffin	Thermo Scientific	München

GC-Agar-Base	BD	Maryland, USA
Bakto Proteose Pepton	BD	Maryland, USA
<i>brain heart infusion</i> (BHI)	Fluka	Schweiz
Fetales Kälber Serum (FCS)	PAA	Parsching
Pferdeserum 10%	Biochrom	Berlin
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Xylol	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Natrium-Citrat 0,01 M	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
PBS	Invitrogen	Darmstadt
DAPI (Diamidinphenylindol)	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat und Zitronensäure (McIlvain-Puffer)	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Antikörpervedünnungspuffer	DCS –Innovative Diagnostik Systeme	Hamburg
Corbitbalsam	Hecht-Mertens	Kiel
DAB Substratpuffer	Dako Denmark A/S	Glostrup, Dänemark
DAB+-Chromogen	Dako Denmark A/S	Glostrup, Dänemark
Fluorescent mounting medium	Dako Denmark A/S	Glostrup, Dänemark
Triton	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg

Tabelle 3 - verwendete Reagenzien.

2.4. Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration
Trimethoprim	5 µg/ml
Vancomycin	10 µg/ml

Tabelle 4 - verwendete Antibiotika.

2.5. Antikörper

Antikörper	Hersteller	Firmensitz
Fluoresceine anti-Rabbit IgG (grün)	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH	Eching
Polyclonal Rabbit Anti- <i>H. pylori</i>	Dako Denmark A/S	Glostrup, Dänemark
Polyclonal H ⁺ /K ⁺ -ATPase IgG-rabbit-Antikörper (sc-84304)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Dallas, USA
Elite PK-4001 Rabbit-IgG Vectastain ABC Kit; iVIEW	Ventana Medical Systems, Inc.	Tucson, USA

Tabelle 5 - verwendete Antikörper.

2.6. Kits

Methode	Produktname	Hersteller	Firmensitz
DNA-Aufreinigung	NucleoSpin Tissue	Macherey-Nagel	Düren
PCR	FastStart Taq DNA Polymerase, dNTPack	Roche	Mannheim
Gastrin-17 ELISA	Gastrin-17 Advanced	Biohit	Helsinki, Finnland

Tabelle 6 - verwendete Kits.

2.7. Bioinformatische Mittel

Software/Datenbank	Hersteller	Firmensitz
MS-Word 97	Microsoft Corporation	Redmond, USA
MS-Excel 97	Microsoft Corporation	Redmond, USA
Pages 5.1 bis 5.5.3	Apple Inc.	Cupertino, USA
Numbers 3.1	Apple Inc.	Cupertino, USA
GeneTools	Syngene	Cambridge, USA
GeneTools Scan- und Auswertepaket	Syngene	Cambridge, USA

Prism 6	GraphPad Software, Inc.	La Jolla, USA
Medline/Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi	
GIMP Version 2.8.14	Freie Lizenz	

Tabelle 7 - verwendete Software.

2.8. PCR-Spezifika

2.8.1. Cathepsin Z

Primer	Sequenz 5' → 3'
P1: MCI-1 fw	TTG CTG TTG GCG AGT GCG
P2: MCZ-GT b rev	CTT GTC ACC AGA TTC CAG C
P3: GT-2 fw	GCT ACC TGC CCA TTC GAC
P4: MCI-31 rev	ACA GTA GGA CTG GCC AGC

Tabelle 8 - verwendeter CtsZ-Primer. Cathepsin Z (Wildtyp und Knock-out).

PCR-Produkte:

P1/P2: 948 bp (Wildtyp +/+)
P3/P4: ~500 bp (Knock-out -/-)

2.8.2. Humanes Gastrin

Tabelle 8 - verwendeter Gastrin-Primer. Humanes Gastrin.

Primer	Sequenz 5' → 3'
--------	-----------------

IG sense (in Exon 2)	GCT CTG GCC GCC TTC TCT GA
IG antisense (in Exon 3)	CAT CCA TAG GCT TCT TCT TCT TCC

PCR-Produkt: 357 bp

2.8.3. *H. pylori*

Für den PCR-Nachweis wurden folgende *H. pylori*-spezifische Primer verwendet:

Primer	Sequenz 5' → 3'
Hp1vw	CTG GAG AGA CTA AGC CCT CC
Hp2rw	ATT ACT GAC GCT GAT TGT GC

Tabelle 9 - verwendeter Gastrin-Primer. Humanes Gastrin.

2.9. *Helicobacter pylori*

In den durchgeführten Versuchen kam der mausadaptierte *H. pylori*-Stamm SS1 (Sydney-Strain 1) zur Anwendung (Lee et al. 1997). Bereitgestellt wurde er uns freundlicherweise von Prof. Steffen Backert (Lehrstuhl für Mikrobiologie, F.-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg). Das Bakterium wurde unter einer Sterilbank in einem dafür zugelassenen S2-Labor für die einzelnen Versuche angezogen. Der Transport in den Tierstall geschah in BHI-Flüssigmedium in 20 ml-Reagenzgefäßen, die zweifach luftdicht und wärmeisolierend verpackt wurden.

2.10. Kultivierung

Zur Kultivierung des *H. pylori* benutzten wir als Agar-Grundmix 37 g/l GC-Agar-Base und 18 g Bakto Proteose Pepton, der nach Herstellung autoklaviert wurde. Daraufhin wurde der Agar-Grundmix in einem 56°C warmen Wasserbad abgekühlt und anschließend Vitaminmix (mit Trimethoprim), Pferdeserum und Vancomycin hinzugefügt.

Der *H. pylori* wurde aus dem Glycerolstock (200 µl Glycerol + 800 µl BHI) auf die vorbereiteten Agarplatten mit einer sterilen Impföse ausgestrichen und diese dann für 48 h bei 37°C unter Zugabe von Campygen in mikroaerophilen Konditionen (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) in Anaerobiertöpfen

kultiviert. Dann erstellten wir drei Verdünnungsaustriehe, indem wir mit sterilem Wattestäbchen dreimalig Bakterien vom Agar entnahmen und sie in 1 ml BHI resuspendierten. Den dritten Ausstrich haben wir auf die Agarplatte beimpft zur weiteren Inkubation für 48 h. Zur Anlage von Flüssigkulturen resuspendierten wir den *H. pylori* in BHI-Flüssigmedium.

2.11. Verwendete Mausstämme

2.11.1. CtsZ^{-/-} (FVB/N-Hintergrund)

Die Cathepsin Z-defizienten (Gen-Knockout) Mäuse entstammen der Zucht von Prof. Christoph Peters aus dem Institut für Molekulare Medizin und Zellforschung in Freiburg, die er uns dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt hat. Die CtsZ-defizienten Mäuse wurden in den Hintergrund des FVB/N-Stammes zurückgekreuzt (Sevenich et al., 2010).

2.11.2. INS-GAS (FVB/N-Hintergrund)

Die hypergastrinämisch-transgene INS-GAS-Maus wurde 1993 durch Timothy Wang und seine Arbeitsgruppe etabliert, indem in Embryonen des Inzuchtstammes FVB/N (Taconic Farms) das Fusionsgen aus einem Ratteninsulingenfragment (Promotor) und dem humanen Gastringen mikroinjiziert wurde, um dann in Muttermäusen ausgetragen zu werden. So wird nun das humane Gastringen vom Insulinpromoter der Ratte transkribiert (Wang et al. 1993).

INS-GAS-Mäuse sezernieren demnach hohe Level Gastrin aus dem Pankreas, selbst wenn die endogene Gastrinproduktion bereits ausgeschaltet (z.B. zwischen den Mahlzeiten) oder versiegt ist (z.B. atrophische Gastritis) (Wang et al. 1992). Dieser Mausstamm wurde uns freundlicherweise von Richard Peek von der *Vanderbilt University Nashville* für unsere Studien zur Verfügung gestellt.

2.12. Tierversuchsbestimmung

Die Durchführung der Versuche wurde mit dem Bescheid vom 16.02.2010 durch das Landesverwaltungsamt Halle genehmigt. Di.

2.13. Maushaltung

Alle Mäuse wurden im *Zentralen Tierlabor* der medizinischen Fakultät Magdeburg gehalten. Beide externen Mauslinien wurden zunächst isoliert und erste Nachkommen einer Untersuchung nach FELASA-Richtlinien (klein) unterzogen.

Die Maushaltung geschah unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen (SPF) in IVC-Käfigen (*Individually Ventilated Cages*) vom Typ II (Größe: 25 x 40 x 20 cm). Der Boden war mit Holzspänen befüllt und wurde wöchentlich gesäubert. Pro Käfig lebten 1 bis 5 Mäuse des gleichen Geschlechts (außer bei Zuchtpaaren). Die Tierhaltungsräume wurden bei $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ Temperatur und $50\pm 5\%$ Luftfeuchtigkeit klimatisiert und es herrschte ein 12:12 Stunden Lichtregime mit Wechsel um jeweils 6 Uhr MEZ. Ernährt wurden die Tiere mit pelletiertem Standardfutter und frischem Leitungswasser *ad libitum*.

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden auf einer Arbeitsbank mit Abzug durchgeführt. Alle Mäuse waren frei von viralen, bakteriellen und parasitären Erkrankungen. Die Versuche wurden unter Einhaltung der Bestimmungen der Deutschen Tierschutzverordnung durchgeführt.

2.14. Genotypisierung der Mäuse

2.14.1. Mäuseschwanzbiopsien

Zur Genotypisierung der Mäuse wurden ca. 5 mm lange Biopsien der Mäuseschwänze mit einer sterilen Schere entnommen und in einem 0,2 ml-PCR-Tube ins Labor transportiert.

2.14.2. Blutentnahme und Aufbereitung

Die Blutentnahme erfolgte mittels retrobulbärer Punktion. Dazu wurde eine Glaskapillare drehend zwischen Auge und medialem Augenwinkel der Maus in Richtung retrobulbärem Venenplexus geführt. Das gewonnene Blut wurde anschließend 3 min bei 11000 rpm zentrifugiert und ca. 50-70 μl Serum isoliert und tiefgefroren.

2.14.3. DNA-Isolation

Die DNA-Präparation erfolgte mit dem NucleoSpin Tissue-Kit der Firma Macherey-Nagel über Filtersäulen. Das vorgegebene Protokoll wurde lediglich im letzten Schritt abgeändert, indem die 100 μl 70°C Elution Buffer-Lösung durch 80 μl 70° aqua dest. ersetzt wurde. Die DNA-Lösungen wurden bei -21°C konserviert.

2.14.4. PCR

Zur weiteren Genotypisierung wurde eine PCR der DNA-Proben mit einem PCR-Kit (FastStart Taq DNA Polymerase von Roche) und dem Gen entsprechenden Primern angesetzt (vgl. Kapitel 2.8.1.). Dabei wurde nach dem PCR-Protokoll des Herstellers vorgegangen.

Die CtsZ-PCR bestand aus Primern für zwei verschiedene Genprodukte, je nachdem, ob Knockout-, native oder beide Allele vorhanden waren.

Reagenz	Menge
10xReaktionspuffer	5 µl
Enhancer/5xRich-Solution	10 µl
dNTP's[20mM]	1 µl
MCI-1 fw [25µM]	0,6 µl
MCZ-GT b rev [25µM]	0,6 µl
GT-2 fw [25µM]	0,4 µl
MCI-31 rev [25µM]	0,4 µl
FastStart-Taq-Polymerase [5U/µl]	0,25 µl
DNA bzw. aqua dest. für Leerwert	1 µl
aqua dest.	ad 50 µl

Tabelle 10 - PCR-Protokoll. Cathepsin Z (Pqrlab® FastStart von Roche).

Die Annealing Temperatur betrug 63°C. Die Amplifikation erfolgte nach einem initialen 95°C Schritt über 37 Zyklen mit folgendem Programm:

Denaturierung: 95°C für 30 sec.

Hybridisierung: 63°C für 30 sec.

Elongation: 72°C für 60 sec.

Als Nachsynthese folgte eine 10-minütige Inkubation bei 72°C.

Bei der INS-GAS-PCR musste zur Unterscheidung zwischen Hetero- und Homozygotie eine semiquantitative PCR durchgeführt werden.

2.14.5. Semiquantitative PCR

Zur Differenzierung der Hetero- von der Homozygotie für das INS-GAS-Gen führten wir eine semiquantitative PCR mit gleichen DNA-Mengen und leicht abgeänderten PCR-Bedingungen durch, um über Vergleich der Bandenstärke nach Gel-Elektrophorese beurteilen zu können, ob ein oder zwei Allele amplifiziert wurden. Zur Angleichung der DNA-Mengen aus den Schwanzproben führten wir

eine photometrische Messung der DNA-Konzentration und anschließend eine entsprechende Verdünnung durch. Die besten Konditionen zur Differenzierung der Bandenstärke boten sich nach Vorversuchen bei einer DNA-Konzentration von 15 ng/μl und der auf 28 Zyklen verkürzten INS-GAS-PCR.

Reagenz	Menge
10xReaktionspuffer	2,5 μl
Enhancer/5xRich-Solution	5 μl
dNTP's[20mM]	0,5 μl
IG sense [12,8μM]	2,5 μl
IG antisense [11,2μM]	2,5 μl
FastStart-Taq-Polymerase [5U/μl]	0,2 μl
DNA bzw. aqua dest. für Leerwert	0,5 μl
aqua dest.	ad 25 μl

Tabelle 11 - PCR-Protokoll. INS-GAS (Peqlab® FastStart von Roche)

Die Annealing Temperatur betrug 55°C. Die Amplifikation erfolgte nach einem 95°C Schritt für 2 min über 28 Zyklen mit folgendem Programm:

Denaturierung: 95°C für 30 sec.

Hybridisierung: 55°C für 30 sec.

Elongation: 72°C für 30 sec.

Als Nachsynthese folgte eine 7-minütige Inkubation bei 72°C.

2.14.6. Agarosegel-Elektrophorese

Zur Herstellung eines 1,2%-igen Agarosegels wurden 1,2 g Agarose (LE Biozym®) in 100 ml 1xTBE-Puffer (10,8 g Tris-Base[89mM]; 5,5 g Borsäure[89mM]; 0,7 g EDTA-Na₂[2mM]) unter Erhitzen in einem Mikrowellenofen gelöst. Die Lösung wurde unter kaltem, fließendem Wasser leicht abgekühlt und mit 5 μl Ethidiumbromid bzw. GelRaid versetzt, beides vermischt und in eine entsprechend große Gelkammer mit Gelkamm (1 mm dick) ausgegossen. Nach ca. 30 Minuten wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt und mit 1xTBE-Puffer vollständig bedeckt. Jeweils 10 μl von den PCR-Produkten (inklusive Leerwert) wurden mit je 5 μl blauem Loading-Buffer (Bioline®) versetzt und der Reihe nach auf das vorbereitete 1,2%-iges Agarosegel pipettiert. Als

Marker diente HyperLadder I von Bioline®. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 V für 70 Minuten. Das fertige Elektrophoresegel wurde in das UV-Gel-Dokumentationssystem *Gene Genius* von Syngene gebracht und digital fotografiert, beschriftet, gespeichert und ausgedruckt.

2.14.7. Gastrin-17 ELISA

ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) ist eine quantitative Methode zur Messung von Antigenen verschiedenster Art mittels zweier Antikörper, wovon einer durch Enzymkopplung, nach Bindung an das Antigen, über Umsatz eines spezifischen Substrates einen Farbumschlag bewirkt, der dann quantitativ photometrisch erfasst werden kann.

Wir benutzten den *GASTRIN-17 ADVANCED ELISA-Kit* von Biohit um im Serum aus Blutproben der Mäuse die Spiegel humanem Gastrins zu bestimmen. Dies ist möglich, da die INS-GAS-Mäuse humanes Gastrin exprimieren (vgl. Kapitel 2.8.2.).

Das Kit benutzt zwei monoklonale Antikörper spezifisch gegen Gastrin-17. Einer liegt gebunden auf der Mikrotiterplatte vor. Ein anderer ist mit der HRP (*horseradish peroxidase*) konjugiert, die TMB (*Tetramethylbenzidin*) zu einem blauen Produkt umsetzt. Die Durchführung des ELISA geschah nach Arbeitsanweisung des Kits mit Serumproben der zu testenden Mäuse.

2.15. Orale Infektion der Mäuse

Vor der Infektion wurde jede Maus gewogen. Das Alter der Tiere bei Infektion betrug zwischen 8 und 12 Wochen.

Für die Applikation verwendeten wir eine 1 ml-Tuberkulinspritze mit Kanüle, bei der die Nadelspitze halbiert und abgeschliffen wurde, um eine unnötige Traumatisierung der Mäuse zu minimieren. Als Intubationsschlauch diente ein auf der Kanüle angebrachtes 2 cm langes Stück einer gebräuchlichen urologischen Ureterschleife (Ø 1 mm). Die zu infizierende Maus wurde aus dem Käfig genommen und an der Nackenhaut mit zwei Fingern bewegungsfixiert. Dann wurden 0,2 ml *H. pylori*-Suspension ($\sim 1 \times 10^9$ CFU des *H. pylori*) per Schlündeln intragastral appliziert. Diesen Vorgang wiederholten wir je Maus am dritten und fünften Tag *post-infectionem*, um eine ausreichende Keimzufuhr zu gewährleisten.

2.16. Tötung der Versuchstiere und Magenresektion

Die Tötung der Versuchsmäuse erfolgte durch rasche zervikale Dislokation der Wirbelsäule. Die postmortale Laparotomie erfolgte mit sterilem Sektionsbesteck. Jeder Maus wurde nach Desinfektion der Abdominalhaut diese inzidiert, die Peritonealhöhle freigelegt und der Magen stumpf von angrenzenden Organen und anderen Residuen befreit (vgl. Abbildung 6A/B). Anschließend wurde der



Abbildung 6 – Resektion und Präparation des Magens; (A) und (B) Situs bei Magenresektion (Pfeile bezeichnen Magen); (C) Anatomie eines *in toto* entnommenen Magens einer Wildtyp Maus: 1 = Ösophagus, 2 = Vormagen, 3 = Margo plicatus, 4 = pars fundica, 5 = pars pylorica, 6 = Duodenum; (D) Verlauf der Sektionsgrenzen bei Zerschneiden des Magens vor Einbettung; (E) Magen einer INS-GAS-Maus mit Karzinom der pars fundica; (F) Magen einer Wildtyp-Maus nach Zerschneiden; (G) Magen einer INS-GAS-Maus nach Zerschneiden; Abbildung aus Krueger et al. 2011.

Magen inklusive ca. 0,5 cm Ösophagus und Duodenum *in toto* entnommen und über Nacht in 4%-igem Formalin fixiert.

2.17. Einbettung in Paraffin und Herstellung von Schnittpräparaten

Die Mägen wurden im Labor gereinigt, in longitudinale Wandringe zugeschnitten (vgl. Abbildung 6D-G), diese von Nahrungsresiduen befreit und in eine Einbettkassette gelegt. Im Einbettautomaten (*HyperCenter*) wurde der Magen fixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Xylol gespült und letztendlich in flüssiges Paraffin überführt.

Die Gewebeschnitte wurden mit einem Schlittenmikrotom vom Paraffinblock mit 2 bis 3 μ m Dicke geschnitten, mit einem angefeuchteten Pinsel abgehoben, zum Glätten in ein 39°C warmes Wasserbad

überführt und auf einen Objektträger aufgezogen. Anschließend wurde das Präparat über Nacht in einem 37°C warmen Brutschrank zum Trocknen verwahrt.

2.18. Histochemische und immunhistochemische Färbungen

Von jedem für die histologische Untersuchung ausgewähltem Präparat wurden jeweils eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung sowie eine kombiniert PAS-Alcianblau-Färbung zur Beurteilung der SPEM nach Standardprotokoll auf dem Färbeautomaten (*Leica*) angefertigt. Zur Beurteilung der Atrophie wurde außerdem an jedem Präparat eine immunhistologische Färbung zur Darstellung der Parietalzellen durchgeführt.

2.18.1. Immunhistochemische Färbung

Zunächst erfolgten die Antigen-Demaskierung in der Pascal-Druckkammer in 0,01 M Na-Citratpuffer (pH=6,0), die Kühlung der Schnitte unter fließendem Leitungswasser für 15 min, eine Spülung mit *aqua dest.*, die Blockierung der endogenen Peroxidase mit 3 %-igem Wasserstoffperoxid für 10 min, ein weiteres dreimaliges Spülen mit *aqua dest.* sowie die Inkubation der Präparate für 10 min in Tris-Puffer versetzt mit Triton X-100-Detergenz. Danach erfolgte das Auftragen von je 100 µl des Parietalzell-markierenden H⁺/K⁺-ATPase Antikörpers (*IgG-rabbit-Antikörper*; Verdünnung 1:30) und Inkubation der Schnitte für 2 Stunden in einem 37 °C warmen Brutschrank in einer feuchten Kammer. Nach dreimaliger Waschung mit Tris-Puffer folgte die Inkubation mit dem biotinylierte Sekundärantikörper (Elite PK-4001 *Rabbit-IgG* Vectastain; Verdünnung 1:200) für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Das dreimalige Spülen mit Tris-Puffer wurde wiederholt, die Schnitte mit VECTASTAIN ABC-Reagenz mit Streptavidin in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung beträufelt und erneut 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut mit Tris-Puffer gespült und anschließend jeder Schnitt für je 2 min mit einer 1:50 verdünnten Diaminobenzididlösung benetzt und daraufhin, um die Färbereaktion zu beenden, mehrfach in *aqua dest.* gespült. Die Gegenfärbung der Kerne wurde für 3 min mit Hämatoxylin durchgeführt, die Bläuerung erfolgte für 5 min in warmem Wasser. Danach wurden die Schnitte mehrfach mit *aqua dest.* gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (75%, 96%, 2x 100%) entwässert. Nachdem die Schnitte zweimalig 5 min in Xylol inkubierten, wurden sie in Corbit-Balsam mit einem Deckgläschen eingedeckt. Als Kontrolle der Spezifität der Färbung wurden Schnitte mitgeführt, auf die anstatt des Primärantikörpers Tris-Puffer aufgetragen wurde.

2.19. Nachweis von *H. pylori*

Der Nachweis einer positiven *H. pylori*-Kolonisation in den Infektionsgruppen bzw. Kontrolle der Infektionsfreiheit der nicht-infizierten Gruppen erfolgte zum einen durch visuelle Darstellung der *H.*

pylori-Kolonisation der Magenmukosa per Immunfluoreszenz und zum anderen durch molekularen Nachweis mittels PCR.

2.19.1. Indirekte Immunfluoreszenz

Die Gewebeschnitte wurden in Xylol entparaffiniert, in absteigender Alkoholreihe rehydriert und mit Leitungswasser und *aqua dest.* abgespült. Daraufhin wurden die Schnitte für 30 min in der Pascal-Druckkammer mit Citratlösung (0,01 M; pH 6) vorbehandelt und anschließend mit Leitungswasser gespült. Daraufhin Waschung mit *aqua dest.*, dann mit 1xPBS und danach mit 1xPBS-0,1% Triton. Ab jetzt wurden alle Arbeiten im Dunkeln durchgeführt. Es wurden je Gewebeschnitt 100 µl verdünnter Primär-Ak (*Rabbit Anti-H. pylori*; Verdünnung 1:50 in PBS) aufgetragen und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte in 1xPBS-Puffer gewaschen und jeweils 100µl Sekundär-Ak (FITC anti-rabbit IgG (grün); Verdünnung 1:100 in 1xPBS und 10%-igem BSA (*bovine serum albumin*) aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Präparate nach dem Waschen mit 1xPBS mit DAPI gegengefärbt (1 ml DAPI (1mg/ml) auf 50 ml McIlvaine-Puffer) und 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschung mit 1xPBS und Spülen mit *aqua dest.* wurden die Präparate mittels *Fluorescent Mounting Medium* eingedeckt.

2.19.2. PCR

Zum molekularen Nachweis von *H.pylori* erfolgte die DNA-Präparation aus jeweils 3 Paraffinschnitten eines repräsentativen Magenrings mit dem NucleoSpin Tissue-Kit der Firma Macherey&Nagel über Filtersäulen nach dem vorgegebenen Protokoll des Herstellers. Die Elution erfolgte mit 80 µl EB-Puffer. Die DNA-Lösungen wurden bei -21°C konserviert bzw. gleich in die PCR eingesetzt. Die Primer sind in Kapitel 2.8.3 spezifiziert (Hp1vw und Hp1rw).

Die Annealing Temperatur betrug 60°C. Die Amplifikation erfolgte nach einem 95°C Schritt für 5 min über 35 Zyklen mit folgendem Programm:

Denaturierung:	95°C für 60 sec.
Annealing:	60°C für 60 sec.
Elongation:	72°C für 90 sec.

Als Nachsynthese folgte eine 10-minütige Inkubation bei 72°C und anschließend wurden die PCR-Produkte auf Eis gekühlt und nach Gelelektrophorese ausgewertet.

2.20. Histologische Beurteilung

2.20.1. Nachweis von *H. pylori*

Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte bei positiver Kolonisation mit *H.pylori* die spiralförmigen Bakterien in den Foveolen und an der Oberfläche der Magenmukosa. Ließ sich *H.pylori* mikroskopisch nicht nachweisen, wurde auf der Basis der PCR-Ergebnisse über einer positive oder negative Infektion entschieden. Bei allen nicht-infizierten Mäusen ließ sich die zu erwartende Negativität für *H.pylori* nachweisen. Bei allen infizierten Tieren ließ sich eine Persistenz von *H. pylori* bis zum Zeitpunkt der Tötung bestätigen. Eine quantitative Beurteilung der Bakteriendichte erfolgte im Rahmen der vorliegenden Studie nicht.

2.20.2. Allgemeines zur Auswertung

Auf jedem histologischen Präparat befanden sich verschiedene Anschnitte (vgl. Abbildung 6 und 7) des jeweiligen Magens mit zum Teil (ortsbedingt) sehr unterschiedlich ausgeprägten Krankheitsmorphologien. Zur Bewertung wurde immer der Anschnitt mit den ausgeprägtesten pathologischen Veränderungen herangezogen. Die histologische Auswertung erfolgte nach einem etwas modifizierten Schema nach Arlin B. Rogers (Rogers et al. 2005).



Abbildung 7 - Makroskopische Ansicht. Verschiedene Anschnitte des Mausmagens (vgl. Abbildung 6 D, F, G).

Die histologische Auswertung unter dem Mikroskop wurden im zeitlichen Zusammenhang durchgeführt und alle Präparate wurden nach initialer Bewertung nochmals komplett untersucht.

Die Bewertung nach verschiedenen Kriterien geschah immer in den gleichen Untersuchungsloci der verschiedenen Mausmägen:

Cardia	1 HPF in 40-facher Vergrößerung distal der Plica
Corpus	2-3 HPF in 40-facher Vergrößerung distal der Plica
Corpus distal	5 HPF in 40-facher Vergrößerung distal der Plica
Magen distal	Mitte zwischen beiden Plicae

Da sich bei histomorphologisch stark erkrankten Tieren eine zum Teil sehr ausgeprägte Hyperplasie der Mukosa zeigte, verschoben sich die Untersuchungsloci, sodass diese nicht mehr streng nach den oben beschriebenen HPFs in 40-facher Vergrößerung aufgesucht werden konnten und eine relative Anpassung vorgenommen werden musste (vgl. Abbildung 8).

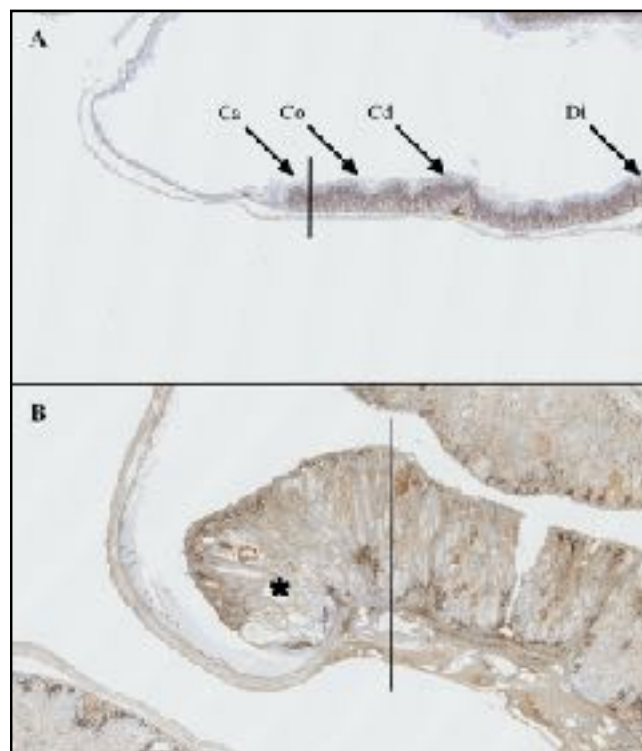


Abbildung 8 - Auswertung - Vergleich der Morphologien bei verschieden ausgeprägten Pathologien (beide Vergrößerung 1,25x, Protonenpumpenfärbung): Teil A zeigt die verschiedenen Bereiche, die zur Auswertung verwendet wurden. Ca(*) = Cardia, Co = Corpus, Cd = Corpus distal, Di = Magen distal. Im Vergleich von A und B erkennt man bei gleicher Vergrößerung deutliche Unterschiede in der Dicke der Mukosa. Das erste HPF ist beispielhaft durch die schwarzen Striche vom distaleren Bereich getrennt. Man erkennt die Mukosahyperplasie.

2.20.3. Auswertung der Atrophie der Parietalzellen

Bewertet wurden Höhe (absolut) und Dichte der Parietalzellen im Magenepithel in der Protonenpumpenfärbung mit einem Scoring zwischen 0 und 10, wobei 10 überhaupt keine und 0 eine komplette Atrophie repräsentiert. Erstellt wurde das Scoring ausgehend von den Mägen mit den geringsten und mit den ausgeprägtesten Pathologien (vgl. Abbildung 9).

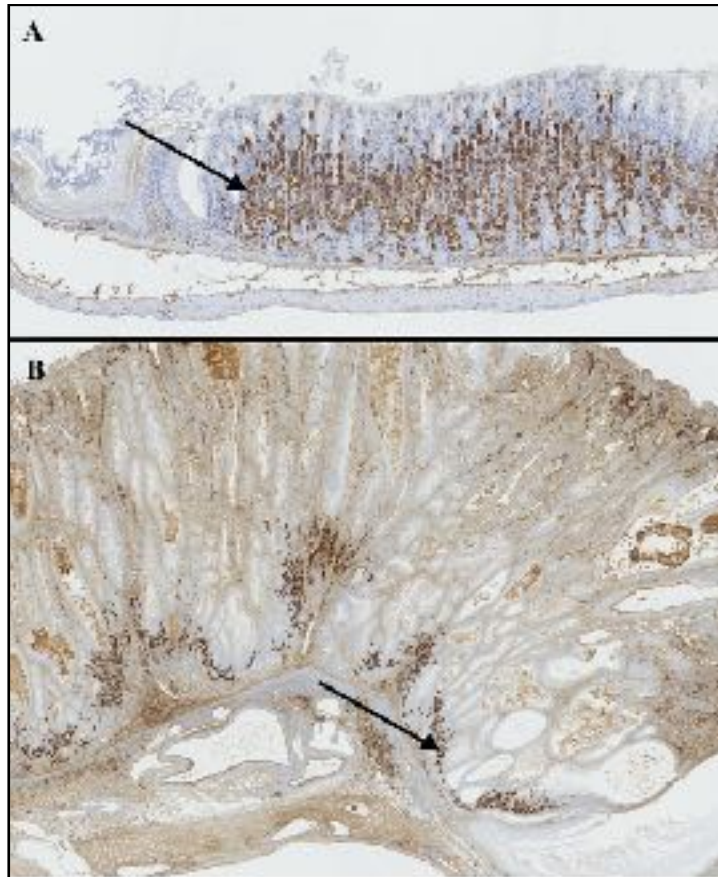


Abbildung 9 - Protonenpumpenfärbung (Vergrößerung A:5x, B:2,5x): A zeigt eine Mukosa mit normal konfigurierten Drüsen und gutem Belegzellbesatz (braune Färbung). In B sieht man einen stark reduzierten Belegzellbesatz (starke Atrophie).

2.20.4. Bewertung der muzinösen Metaplasie (SPEM)

Die Bewertung des Vorhandenseins und der Ausprägung von SPEM erfolgte nach Anfärbung mit PAS-Alcianblau. Dabei galten als SPEM-Formationen eher basal-gelegene Drüsen mit muköser Morphologie (flache, nach basal gedrängte Zellkerne und Vakuolenbildung im Zytoplasma), die sich mit PAS-Alcianblau rosa bis pink anfärbten (vgl. Abbildung 10).

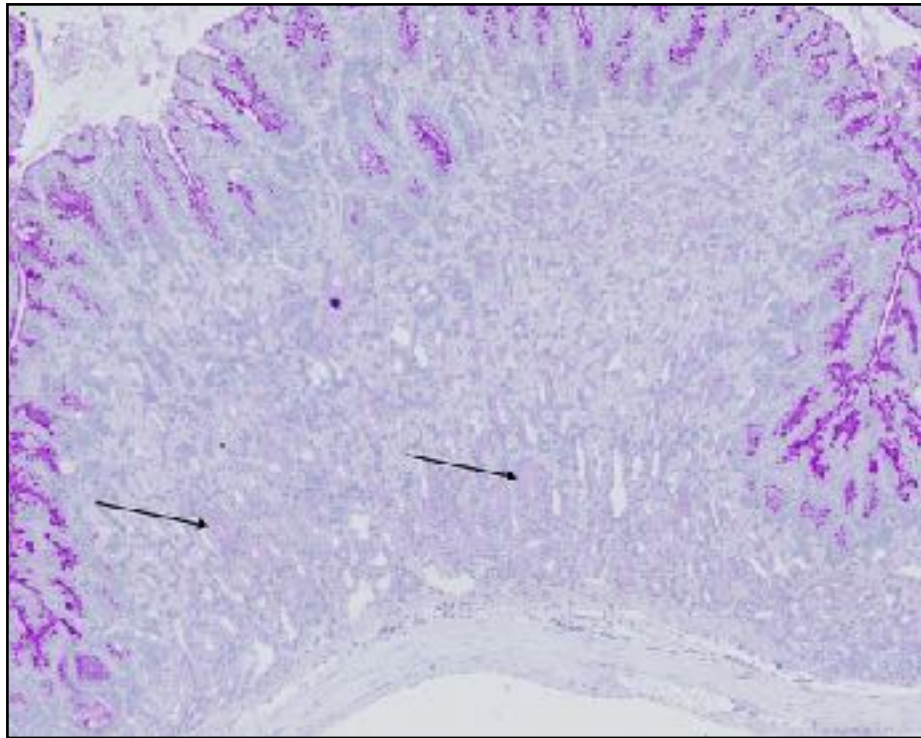


Abbildung 10 - PAS-Alcianblau-Färbung in 5x Vergrößerung: In diesem Abschnitt findet sich eine ausgeprägte SPEM. Mit Pfeil markiert sind Beispiele für sich rosa bis pink anfärbende metaplastische Drüenschläuche.

Vergeben wurde ein Score für das gesamte Präparat zwischen 0 und 4:

Grad 0	keine SPEM vorhanden
Grad 1	vereinzelte SPEM-Drüsen
Grad 2	regelmäßig vorhandene und eher flächenhafte Ausprägung der SPEM ($<1/3$ der Parietalzellen)
Grad 3	Befall größerer zusammenhängender Teile der Mukosa ($<2/3$ der Parietalzellen)
Grad 4	Veränderungen in über $2/3$ der Parietalzellen

2.21. Statistische Auswertung

Die statistische Aufarbeitung der Ergebnisse erfolgte mit der Software *Prism 6* von GraphPad. Zum Vergleich der Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurde ein t-Test *nach Student* verwendet. Mit ihm lässt sich überprüfen, ob sich zwei unabhängige Datengruppen signifikant voneinander unterscheiden. Eine annähernde Normalverteilung und hohe Varianzhomogenität sind Voraussetzungen für den Test. Der resultierende Wert p beschreibt dabei die Wahrscheinlichkeit, mit der die Stichproben einander ähneln, wobei eine statistische Signifikanz bei einem p -Wert von $\leq 0,05$ angenommen wird. Die Daten werden als Boxplot-Diagramme präsentiert. Bei Vorliegen statistisch signifikanter Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen ist der p -Wert angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung eines neuen in-vivo Mausmodelles

Ziel dieser Promotionsarbeit im Rahmen unserer Versuche war die Untersuchung der Rolle des Cathepsin Z in der Magenkarzinogenese in einem Mausmodell. Als einziges bisher etabliertes Mausmodell, in dem es möglich ist alle Schritte der Karzinogenese detailliert zu erforschen, hat sich der transgene INS-GAS-Mausstamm (INS-GAS^{+/+}) bewährt (Fox et al. 2003), in dem die Gastrinproduktion unter Kontrolle eines Ratteninsulinpromoters steht und durch eine Hypergastrinämie praktisch alle Mäuse innerhalb von 2 Jahren Magenkarzinome entwickeln (Wang et al. 2000). Weiterer einzigartiger Vorteil dieses Mausstamms als Modell der Magenkarzinogenese besteht in der Geschlechtsspezifität der Ausprägung der Pathologien, welche der menschlichen Risikorealität besser entspricht.

Als Modell zur Erforschung des Cathepsin Z haben verschiedene Arbeitsgruppen weltweit sich in den letzten Jahren einer Cathepsin Z-defizienten Knockout-Maus (CtsZ^{-/-}) bedient.

Der erste Teil dieser Promotionsarbeit beinhaltet die Etablierung eines doppelt-transgenen Mausstammes basierend auf den beiden bereits bestehenden Modellen. Die CtsZ-defiziente INS-GAS Maus (genetisch: CtsZ^{-/-}/INS-GAS^{+/+}, im folgenden CtsZ/IG) dient als leistungsstarkes Modell zur weiteren Erforschung der Rolle von CtsZ in der Magenkarzinogenese. Der zweite Teil der Arbeit untersucht demzufolge den Einfluss des Verlustes von CtsZ auf einzelne Schritte der Magenkarzinogenese anhand einer histologischen Auswertung der Parameter Atrophie und SPEM.

3.1.1. Allgemeines zum Kreuzungsvorhaben

Die CtsZ/IG-Maus sollte durch Kreuzen der beiden Mausstämme INS-GAS^{+/+} und CtsZ^{-/-} alle vier genetisch veränderten Allele besitzen. Beide Ausgangsstämme hatten den genetischen Hintergrund von FVB/N-Mäusen. Die Verpaarungen wurden unter der Prämisse angelegt, möglichst keine Geschwister- oder Eltern-Kinder-Inzucht zu betreiben, um genetischem Drift entgegenzuwirken und eine möglichst große effektive Populationsgröße in unserem Zielstamm zu erreichen. Dabei lagen uns allerdings keine detaillierten Informationen über die Verwandtschaftsverhältnisse der uns bereitgestellten Zuchtpaare vor. Diese wurden jedoch nach Ankunft, als Basis für die nachfolgenden Experimente, auf ihre jeweils besonderen Allele genotypisiert (vgl. Abbildung 11 und 12). Die Mendelschen Regeln ließen sich lediglich auf unsere Kreuzung anwenden, wenn beide Gene unabhängig voneinander vererbt werden. Da aber der spezifische Genort des INS-GAS-Transgens uns

nicht bekannt war, konnten wir erst in der F1-Generation nachweisen, dass die klassischen Verpaarungsregeln zutreffen (vgl. 3.1.3.).



Abbildung 11 - Ausgangsgenotypisierung auf das CtsZ-Gen. Das PCR-Produkt hat ca. 500 bp, die Zahlen entsprechen den Nummern der einzelnen untersuchten Mäuse, IV - Ladder Nummer 4 (Herstellernamen für die Skala).



Abbildung 12 - Ausgangsgenotypisierung auf das INS-GAS-Gen. Das PCR-Produkt hat 357bp, die Zahlen entsprechen den Nummern der einzelnen untersuchten Mäuse, LW - Leerwert, IV - Ladder Nummer 4 (Herstellernamen für die Skala).

Wir verpaarten normalerweise zwei Weibchen mit einem Männchen. Beim Absetzen der Jungtiere aus dem Zuchtkäfig entnahmen wir Schwanzbiopsien zur Genotypisierung mittels PCR und Gelelektrophorese. Je nach getesteten Allelvorkommen in den Jungtieren wurden bei Geschlechtsreife gezielt neue Verpaarungen nach unserem Verpaarungsschema (vgl. Abbildung 13) angesetzt. Alle Versuchstiere, die auf Grund ihrer Genetik für den weiteren Versuchsablauf ungeeignet waren, töteten wir nach Tierschutzgesetz mittels zervikaler Dislokation.

3.1.2. Ablauf der Kreuzungen

Abbildung 13 zeigt eine schematische Darstellung zum prinzipiellen Ablauf des Kreuzungsvorhabens. Sie stellt die Versuchsmäuse mit vier verschiedenen Farben, stellvertretend für jeweils ein Allel, dar. Dabei bedeutet ein heller Farbton, dass das Allel des entsprechenden Gens nicht vorhanden ist und ein dunkler zeigt das Vorhandensein an. Grün steht dabei für das CtsZ und Blau für das INS-GAS-Gen. So ist das hellgrün-hellblaue Tier also homozygot für das CtsZ-Knockout und eine Maus mit allen vier Farben bedeutet, sie ist heterozygot für beide uns interessierenden Gene.

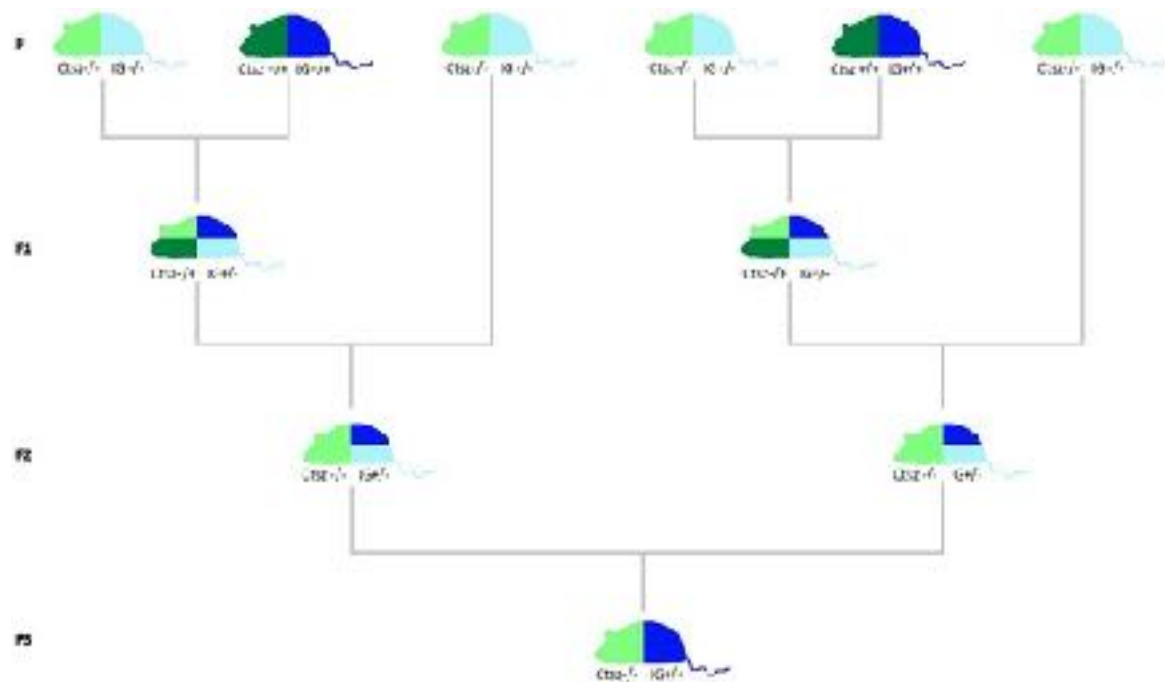


Abbildung 13 - Kreuzungsschema. Grün: CtsZ-Gen; Blau: INS-GAS-Gen. Hell bedeutet Allel nicht vorhanden, dunkel bedeutet Allel ist vorhanden.

3.1.3. Erste Kreuzung

In der parentalen Generation haben wir die beiden Ausgangsstämme $CtsZ^{-/-}$ ($CtsZ^{-/-}$ $INS-GAS^{-/-}$) und $INS-GAS^{+/+}$ ($CtsZ^{+/+}$ $INS-GAS^{+/+}$). Zuerst wurden diese miteinander verpaart. In der F1-Generation sollten bei Gültigkeit der Mendelschen Regeln alle Jungtiere jeweils eins aller vier verschiedenen Allele besitzen ($CtsZ^{+/+}$ $INS-GAS^{+/+}$; vgl. Abbildung 14).

In der Abbildung erkennt man, dass bei allen getesteten Mäusen beide verschiedenen Allele vorhanden sind. Somit konnten wir also eine unabhängige Vererbung nach Mendel annehmen.

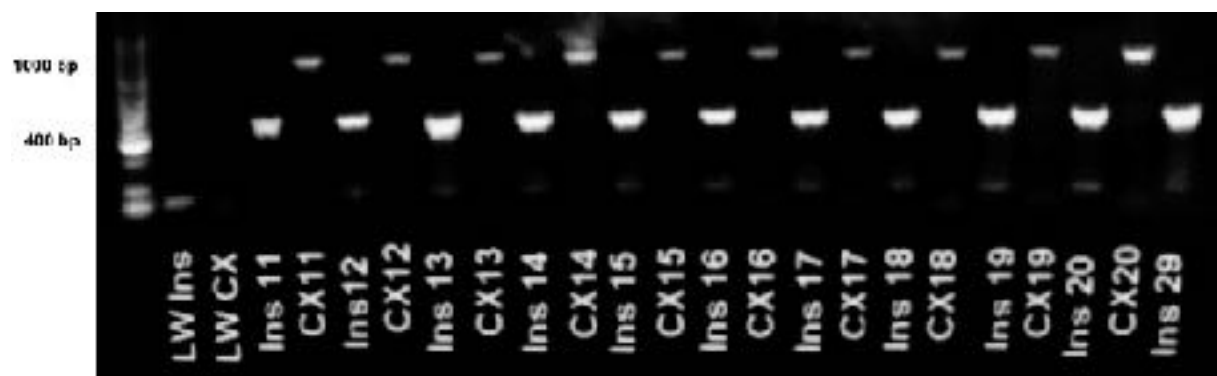


Abbildung 14 - Elektrophorese der Produkte beider verschiedener PCR der jeweiligen Mäuse. LW = Leerwert; Ins = $INS-GAS$ -Gen; CX = $CtsZ$ -Gen. Man erkennt, dass alle F1-Tiere je das $CtsZ$ und das $INS-GAS$ -Allel besitzen.

Im zweiten Schritt führten wir eine PCR des CtsZ-Gens bei den F2-Tieren mit positiver Bande in der Elektrophorese nach INS-GAS-PCR durch (vgl. Abbildung 17).

Bei den CtsZ-heterozygoten Tieren kann man zwei Banden im Elektrophoresegel erkennen, da sich die Größen (bp) der Genprodukte, je nach Vorhandensein des Knockout- oder des Wildtypgens, unterscheiden (vgl. Kapitel 2.8.1.). Die CtsZ-homozygot-negativen Tiere zeigen dagegen lediglich eine Bande.

3.1.5. Dritte Kreuzung

In der dritten Kreuzung verpaarten wir zwei Tiere der F2-Generation verschiedener Eltern untereinander mit dem Ziel in der F3-Generation Homozygotie für das INS-GAS-Transgen zu erreichen. Die Wahrscheinlichkeit dafür lag bei $p=0,25$ (vgl. Abbildung 18).

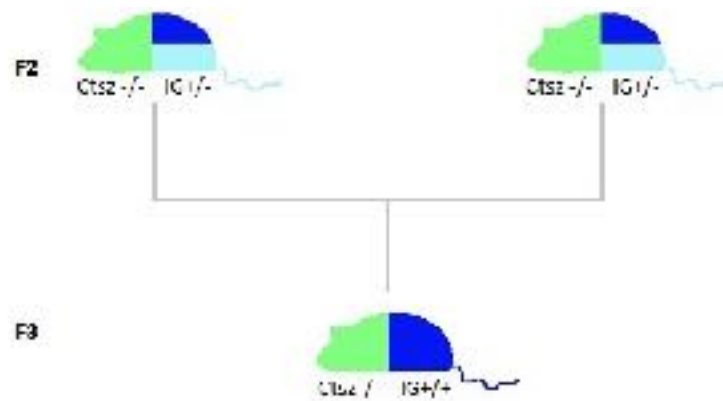


Abbildung 18 - Dritte Kreuzung.

Wie bereits in Kapitel 2.14.4. beschrieben, war es mittels nicht-quantitativer PCR nicht möglich zwischen Hetero- und Homozygotie des INS-GAS-Transgens zu unterscheiden. So kreuzten wir die F3-Generation mit CtsZ-defizienten Mäusen unter der Prämisse zurück, dass Jungtiere von $INS-GAS^{+/+}$ -Tieren alle heterozygot für das Transgen sein müssen und somit eine Bande nach Amplifizierung ausprägen, wohingegen Nachfahren eines lediglich heterozygoten Elterntieres auch einen $INS-GAS^{-/-}$ -Genotyp zeigen sollten. So war im Umkehrschluss eine positive Selektion der Elterntiere möglich.

Um die Rückkreuzungsexperimente möglichst effektiv zu gestalten bzw. möglichst wenig Versuchstiere dafür zu benötigen, trafen wir eine Vorauswahl der wahrscheinlichsten $INS-GAS$ -homozygoten Mäuse mittels semiquantitativer PCR und Gastrin-17 ELISA.

Abbildung 19 zeigt ein Beispiel für das Gel einer semiquantitativen PCR. Die durchschnittlichen Gastrin-Level der ELISA waren 0,142 für $INS-GAS^{-/-}$ -Mäuse und 0,516 für $INS-GAS^{+/+}$ -Mäuse. Die Level der heterozygoten Tiere waren durchschnittlich bei 0,259. Somit legten wir einen Cut-Off-Wert mit 0,5 fest. Alle durch ELISA getesteten Mäuse mit einer Extinktion über 0,5 und hoher Intensität nach semiquantitativer PCR wurden für die Rückkreuzungsverpaarungen vorgesehen.

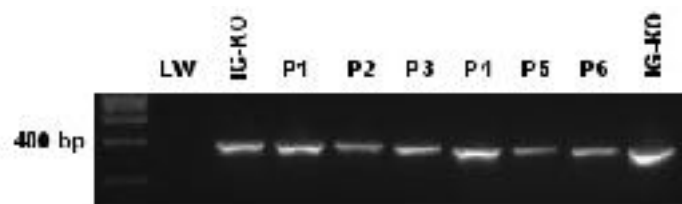


Abbildung 19 - Semiquantitative PCR der F3-Generation. Im Gel verglichen wir die Intensitäten möglicher $CtsZ^{-/-}/INS-GAS^{+/+}$ -Tiere (P1-6) mit $INS-GAS^{+/+}$ -Kontrolltieren (IG-KO). In diesem Fall nahmen wir P1 und P4 als homozygot an.

3.1.6. Rückkreuzung

Die Jungtiere der Rückkreuzungen wurden mit PCR genotypisiert. Die Eltern, die in allen Würfen lediglich $INS-GAS$ -positive Kinder gezeugt haben, wurden von uns als die gewünschten $CtsZ/IG$ -Mäuse angenommen. Trotzdem wurden in den nächsten beiden Generationen alle weiteren Jungtiere von uns getestet, um eine maximale Sicherheit für das Vorliegen der beiden Transgene in unseren Versuchsmäusen zu erhalten.

3.2. Untersuchung der Rolle des Cathepsin Z in der Magenkarzinogenese

3.2.1. Versuchsaufbau

In unserem zweiten Versuchsteil wurden drei verschiedene Mausstämmen eingesetzt (n gesamt = 144):

$CtsZ$ ($CtsZ^{-/-}$)

$INS-GAS$ ($INS-GAS^{+/+}$)

$CtsZ/IG$ ($CtsZ^{-/-}/INS-GAS^{+/+}$)

Bei Versuchseintritt hatten alle Mäuse ein Alter zwischen 6 und 12 Wochen. Die Mäuse der Analysegruppe wurden mit dem *H. pylori*-Stamm SS1 infiziert ($CtsZ^{H_{p+}}$, $INS-GAS^{H_{p+}}$, $CtsZ/IG^{H_{p+}}$). Ebenso viele Tiere wurden als Kontrollen infektionsfrei belassen ($CtsZ^{K_0}$, $INS-GAS^{K_0}$, $CtsZ/IG^{K_0}$) (vgl. Tabelle 12). Das Alter in Wochen der einzelnen Gruppen begann *post-infectionem* (wpi) zu zählen. Bei Erreichen des Alters der entsprechenden Gruppe wurden die Versuchstiere getötet und die Mägen *in toto* reseziert, histologisch aufgearbeitet und zum Teil spezifisch gefärbt. Daneben wurde jeweils zum Nachweis des Infektionsstatus eine *H. pylori*-Färbung (Immunfluoreszenz) sowie eine Genamplifizierung (PCR) und semiquantitativer Gelelektrophorese angefertigt.

		Alter in wpi			
		12	24	36	50
CtsZ ^{Ko}	m	4	4	4	4
	w	2	2	2	2
CtsZ ^{Hp+}	m	4	4	4	4
	w	2	2	2	2
INS-GAS ^{Ko}	m	4	4	4	4
	w	2	2	2	2
INS-GAS ^{Hp+}	m	4	4	4	4
	w	2	2	2	2
CtsZ/IG ^{Ko}	m	4	4	4	4
	w	2	2	2	2
CtsZ/IG ^{Hp+}	m	4	4	4	4
	w	2	2	2	2

Tabelle 12 - Versuchsgruppen und Alter mit Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe

3.2.2. (Immun-)histologische Auswertung von Teilschritten der Magenkarzinogenese

Die histologische Auswertung erfolgte anhand der Kriterien:

1. Vorhandensein und Ausprägung einer mukosalen Atrophie
(definiert als Verlust der Belegzellen in der Protonenpumpenfärbung)
2. Vorhandensein und Ausprägung einer muzinösen Metaplasie (SPEM)

Untersucht wurden jeweils vier Loci an den Magenschnitten um eine genauere Spezifizierung und Befallsmuster von bestimmten Pathologien nachzuweisen.

3.2.3. Atrophie

3.2.3.1. Ausprägung der Atrophie in Abhängigkeit vom Locus im Magen

Fünf von den sechs Versuchsgruppen zeigten schon bei einem Alter von 12 wpi eine ausgeprägte Atrophie. Lediglich in der nicht-infizierten CtsZ-Gruppe ließ sich erst bei den männlichen Tieren 50

wpi eine mäßige Atrophie nachweisen. Die Ausprägung der Atrophie war in allen Gruppen eindeutig vom untersuchten Locus im Magen abhängig; so stellte sich die Atrophie in allen Versuchsgruppen sehr konsistent Cardia-nah deutlich ausgeprägter als Cardia-fern dar (vgl. Abbildung 20).

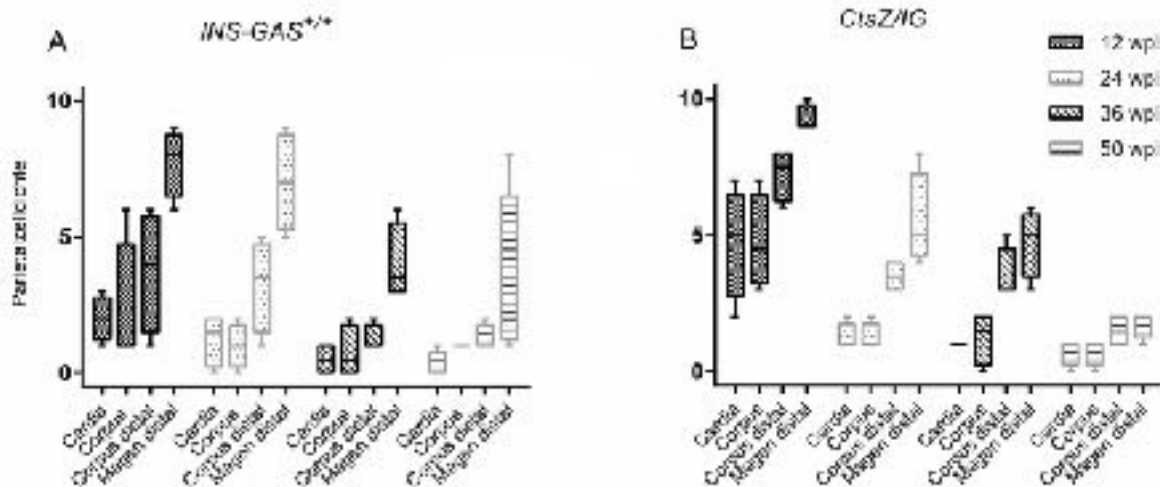


Diagramm 1 - Ausprägung der Atrophie in den verschiedenen Bereichen des Magens

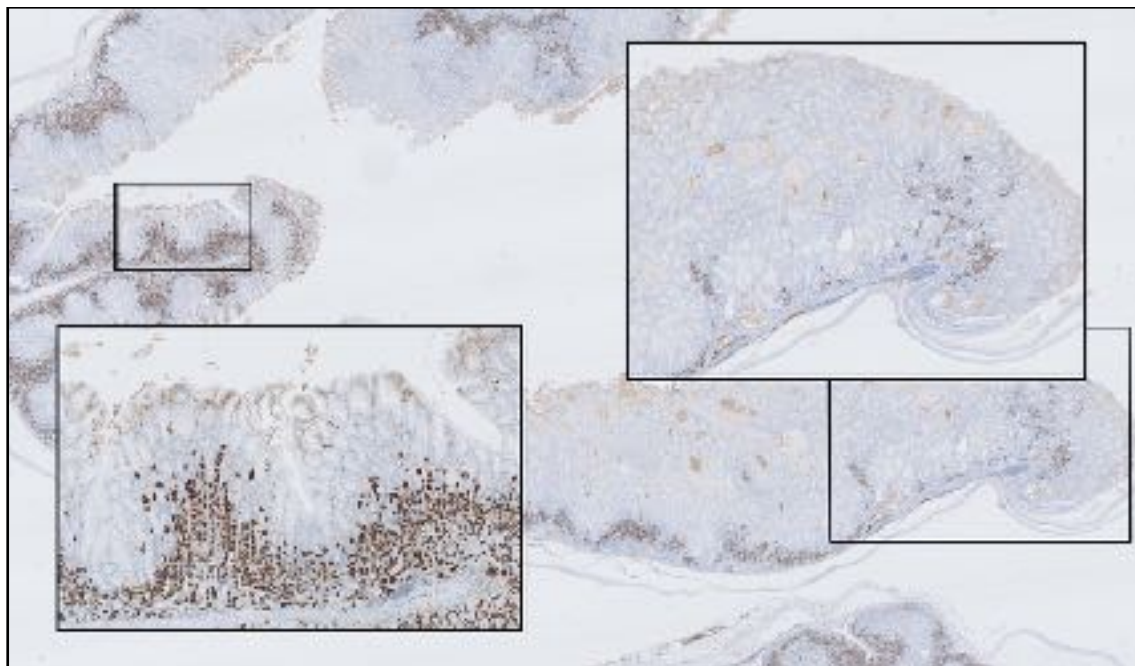


Abbildung 20 - CtsZ/IG 24 wpi (Protonenpumpe). Vergleich der Atrophie in Cardia (rechts) und distalem Magen (links). Der Cardiabereich (rechts) ist zur besseren Übersicht in ca. halber Vergrößerung (1,8x) zur linken Abbildung (3,8x).

Wie man im Diagramm 1 gut erkennen kann ergibt sich somit eine Dichotomie, sodass wir bei unseren weiteren Betrachtungen der Atrophie mit dem Cardia-Wert als Ort der stärksten Atrophie rechnen können.

3.2.3.2. Abhängigkeit der Atrophie vom Geschlecht

Im Vergleich der beiden Geschlechter fallen große Unterschiede auf. So zeigen die Männchen in jüngerem Alter wpi bereits eine ausgeprägtere Atrophie (vgl. Diagramm 2), sowie auch eine stärkere

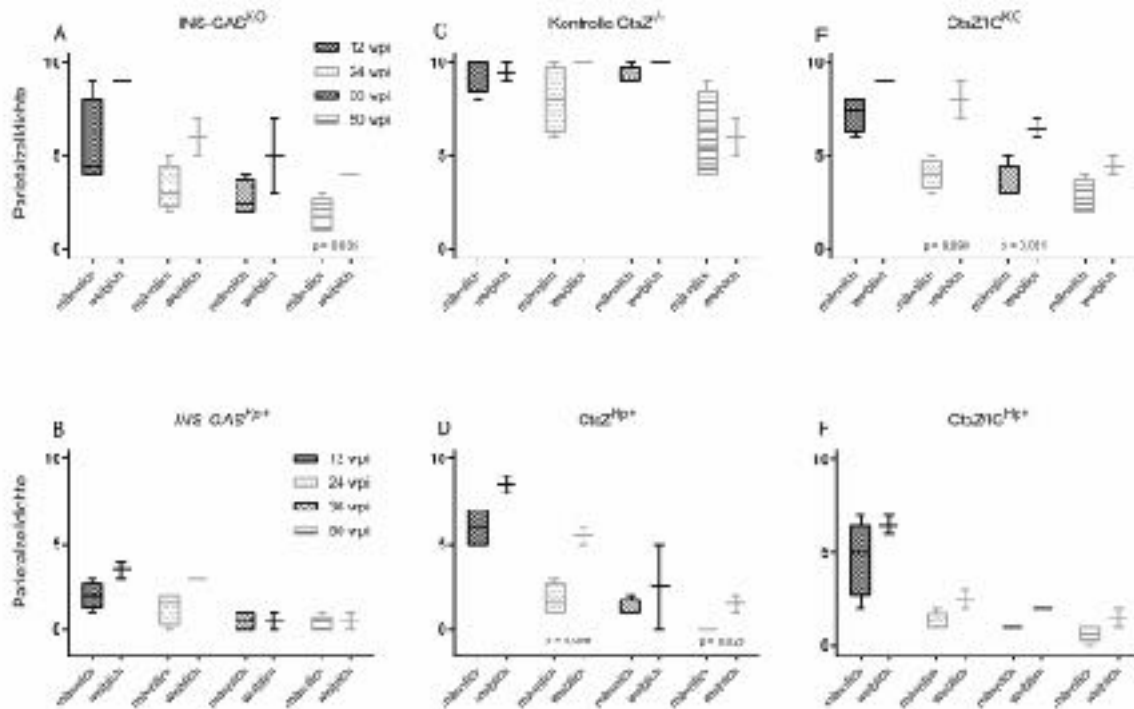


Diagramm 2 - Vergleich der Atrophie zwischen den männlichen und weiblichen Tieren des gleichen Stammes und des gleichen Alters wpi. Man erkennt eine zumeist deutlich verminderte Parietalzellendichte und somit stärkere Atrophie in den männlichen Tieren. Die statistischen Signifikanzen sind als p-Wert hinterlegt.

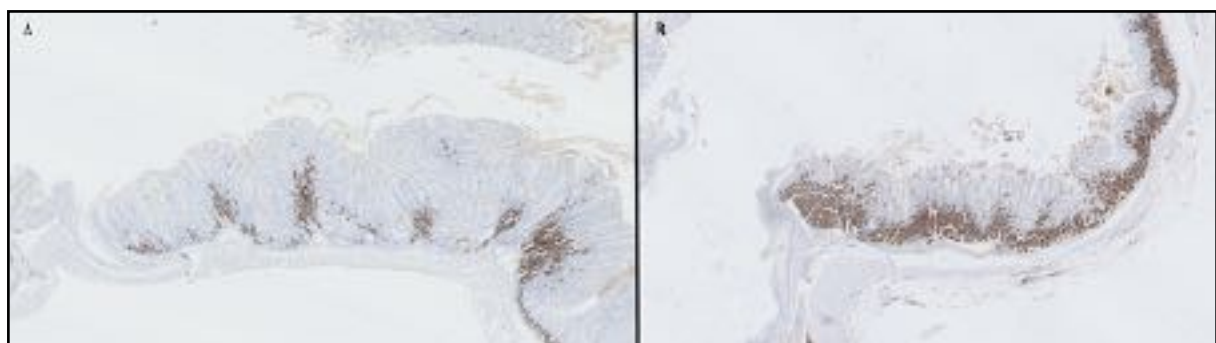


Abbildung 21 - CtsZ/IG^{KO} 24wpi (Protonenpumpe; 2,4x). A zeigt ein männliches und B ein weibliches Tier.

foveoläre Hyperplasie (Daten nicht gezeigt). Nur in der INS-GAS^{H+}-Gruppe kam es zu einem Angleich des Atrophiegrades ab 36 wpi (maximale Atrophie). Die intersexuellen Unterschiede ließen sich am deutlichsten in den Gruppen CtsZ^{H+} und CtsZ/IG^{KO} nachweisen (vgl. Abbildung 21).

3.2.3.3. Einfluss der *H. pylori*-Infektion auf die Atrophie

Bei den mit *H. pylori* infizierten Versuchsgruppen ließ sich über alle Gruppen hinweg eine ausgeprägtere, sowie früher beginnende Atrophie, als in den Kontrollgruppen nachweisen (vgl. Abbildung 22). Die Unterschiede sind am deutlichsten, wie in Diagramm 3 gezeigt, in der *CtsZ*^{-/-}-Kohorte. Während die infizierten Tiere bereits bei 12 Wochen eine mäßige und bei 24 Wochen eine ausgeprägte Atrophie vorweisen, beginnt der Parietalzellverlust mit konsekutiver Atrophie in der Kontrollgruppe erst bei 50 Wochen.

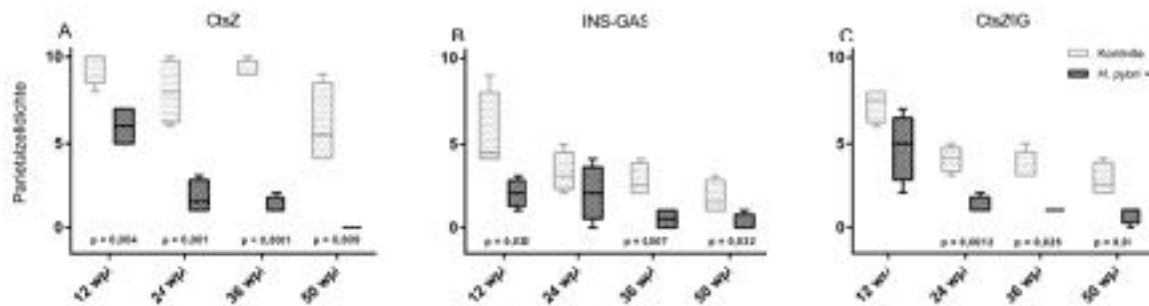


Diagramm 3 - Vergleich der *H. pylori*-infizierten Tiere mit den Kontrolltieren. Man sieht einen Verlust der Parietalzellen in den infizierten Tieren. Bei den Unterschieden mit statistischer Signifikanz sind die entsprechenden p-Werte hinterlegt.

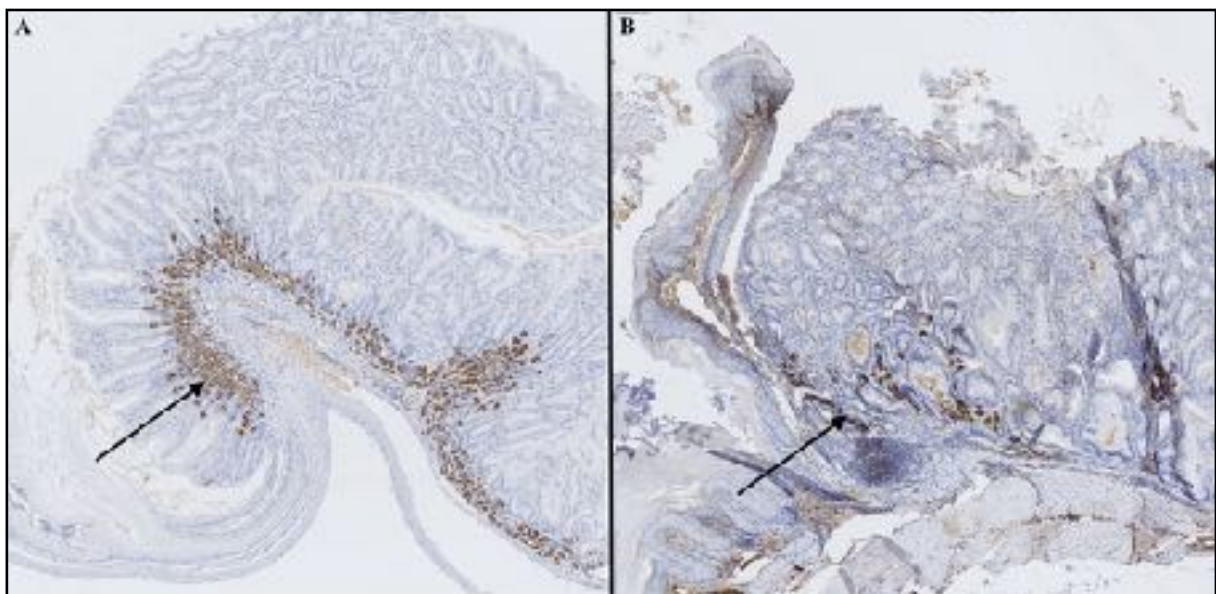


Abbildung 22 - Vergleich eines *H. pylori*-infizierten *CtsZ*/IG-Tiers mit einer Kontrolle bei 36 wpi (Protonenpumpe; 3,7x). A zeigt die Kontrolle mit im Vergleich zu B (*Hp*+) deutlich mehr Belegzellbesatz.

3.2.3.4. Einfluss des Cathepsin Z auf die Atrophie

Ein Vergleich der Gruppen INS-GAS^{Ko} und CtsZ/IG^{Ko}, sowie INS-GAS^{Hp+} und CtsZ/IG^{Hp+} stellt den Einfluss des Cathepsin Z auf den untersuchten Parameter Atrophie heraus. Dabei scheint die Cathepsin Z-Defizienz eine mildere Atrophie zu verursachen (vgl. Diagramm 4; Abbildung 23). Bei einem Alter von 12 Wochen in beiden *H. pylori*-positiven Gruppen ist dieser Unterschied signifikant ($p=0,048$). Ansonsten geben fünf von sieben Mittelwerten die gleiche Tendenz wieder und zwei Mittelwerte sind gleich. Niemals jedoch zeigte ein Cathepsin-defizientes Tier eine stärkere Atrophie im Vergleich zur Cathepsin-positiven Kohorte.

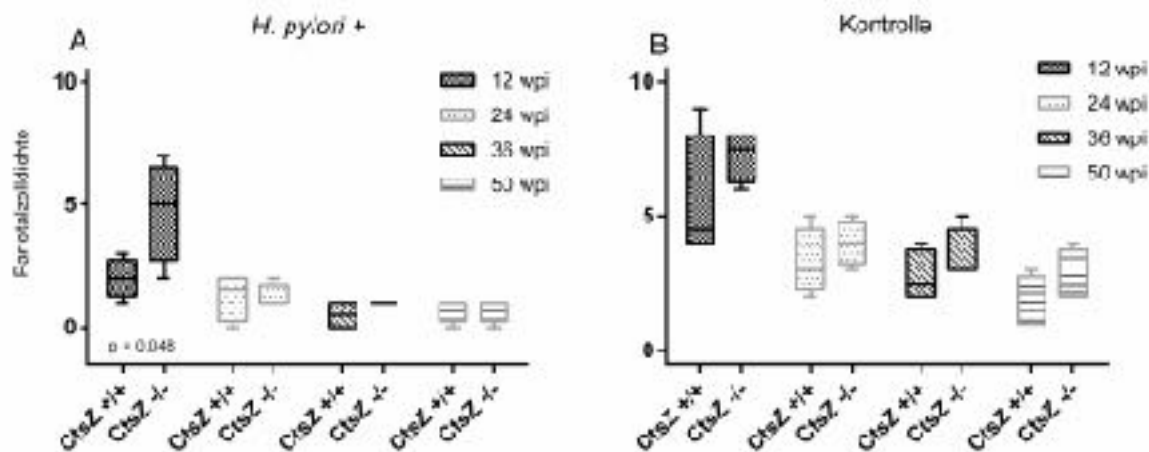


Diagramm 4 - Vergleich der Gruppen INS-GAS (CtsZ^{+/+}) und CtsZ/IG (CtsZ^{-/-}) zur Darstellung des Einflusses von Cathepsin Z auf die Atrophieentwicklung. Man sieht eine Tendenz dazu, dass die Cathepsin-defizienten Tiere einen geringeren Parietalzellverlust ausweisen und somit eine geringere Atrophie ausbilden. Statistisch signifikant ist dies in A bei den 12-Wochen-Tieren.

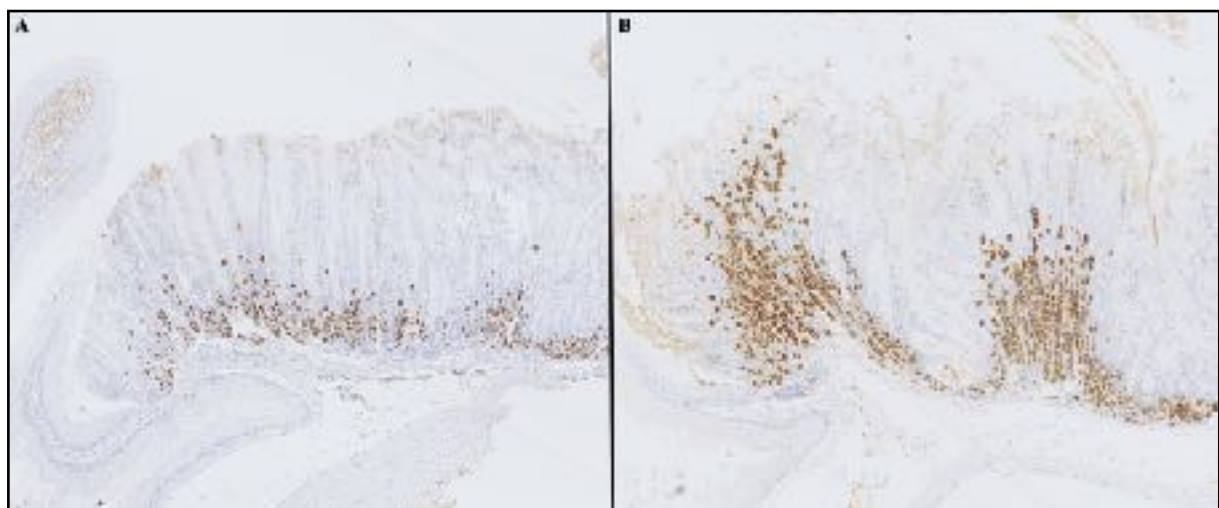


Abbildung 23 - A = CtsZ^{+/+} und B = CtsZ^{-/-} bei 12 wpi (Protonenpumpe, 3,6x). Man erkennt eine stärkere Belegzellatrophie in dem Cathepsin Z exprimierenden Tier.

3.2.4. SPEM

3.2.4.1. Abhängigkeit der SPEM vom Locus im Magen

In allen Gruppen und in 94,4% (136/144) aller Mäuse war SPEM in verschiedener Ausprägung nachweisbar. Auffällig war ein insgesamt nur minimales Vorkommen in der Gruppe $CtsZ^{K0}$. Weiterhin zeigte sich auch bei der SPEM eine deutliche Abhängigkeit vom Locus im Magen. Histologisch und statistisch imponiert eine Dichotomie, wobei bei den untersuchten Tieren meist die vorderen (cardia-nahen) Gesichtsfelder eine eher geringere und die distalen Anteile eine stärkere Ausprägung aufwiesen (vgl. Diagramm 5; Abbildung 24).

Für die zunächst folgenden Betrachtungen zur SPEM gehen wir vom Ort der stärksten Ausprägung aus, welcher in 95,1% (137/144) der distale Magen ist. Dieser Wert spiegelt größtenteils die SPEM-Verteilung unter den Mäusen gut wieder. Manche Tiere zeigen jedoch eine homogene SPEM-Ausbildung über das gesamte Präparat, sodass hierfür auch eine differenziertere Betrachtung aufgeführt ist. Weiterhin betrachten wir auch noch aufgeschlüsselt die einzelnen Orte und ihr Verhältnis von Atrophie und SPEM.

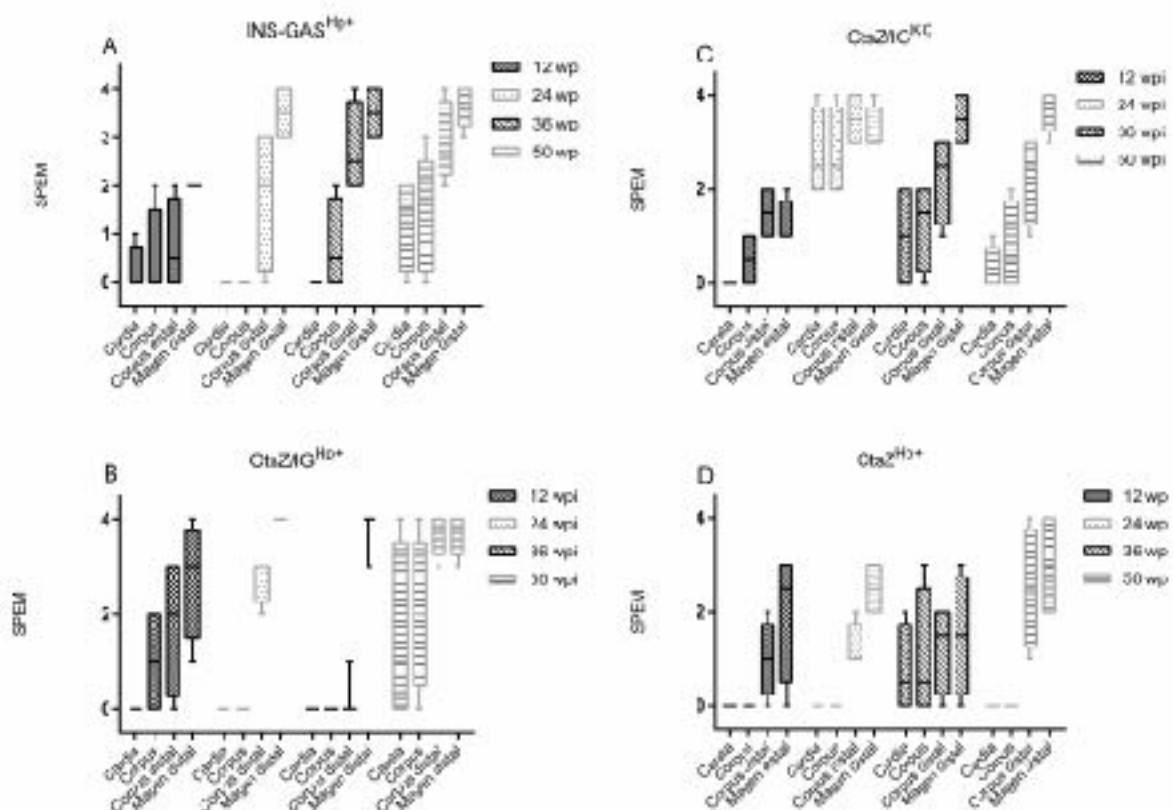


Diagramm 5 - Verteilung der SPEM an den jeweiligen Orten im Magen, aufgeschlüsselt nach Stamm und Alter wpi.
Man erkennt den Locus „Magen distal“ als Ort der zumeist ausgeprägtesten SPEM-Entwicklung.

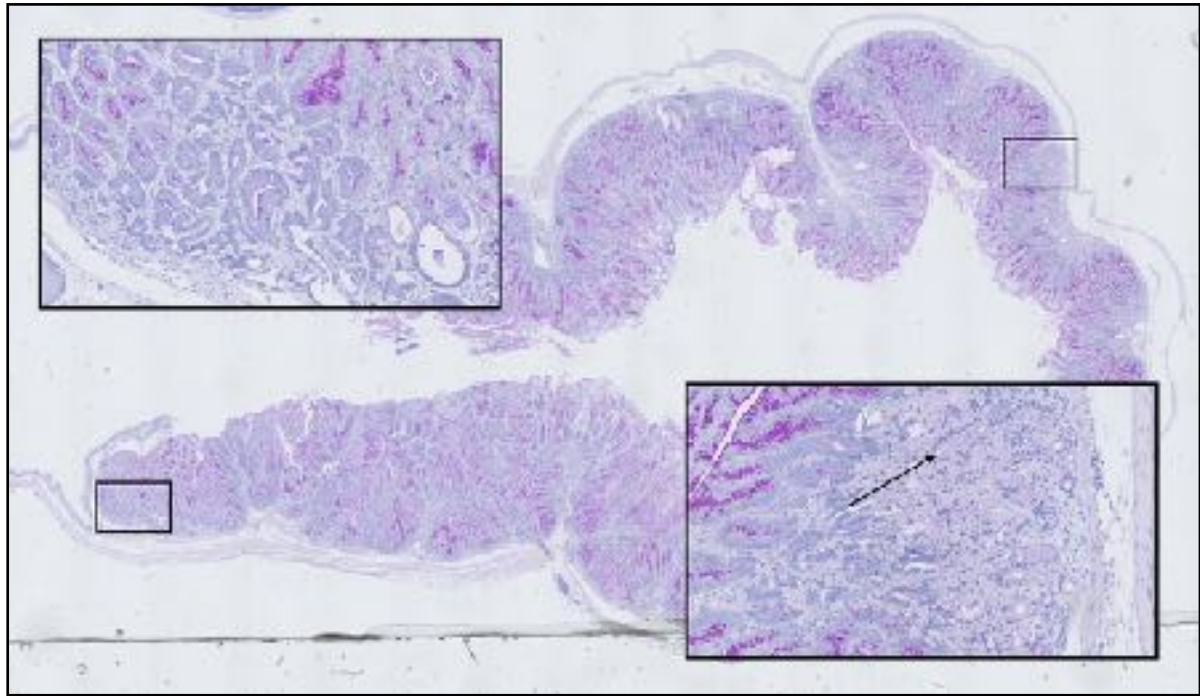


Abbildung 24 - CtsZ/IG^{KO} 50 wpi (PAS-Alcian; Fenster in 14x). Links ist der Cardiabereich dargestellt, wo sich nur minimal SPEM findet. Rechts im distalen Magen zeigt sich eine ausgeprägte SPEM (Pfeil). Weiterhin erkennt man in dem Bereich mit viel SPEM auch noch größtenteils intakte Drüsenschläuche mit sich hier hell färbenden Belegzellen. In der Cardia mit minimal SPEM findet sich hingegen eine ausgeprägte Belegzellatrophy.

3.2.4.2. Abhängigkeit der SPEM vom Geschlecht

In den Untersuchungen zeigt sich eindeutig eine stärkere Ausprägung der SPEM bei den männlichen Tieren (vgl. Diagramm 6). In den INS-GAS-Gruppen ist dieser Unterschied statistisch signifikant.

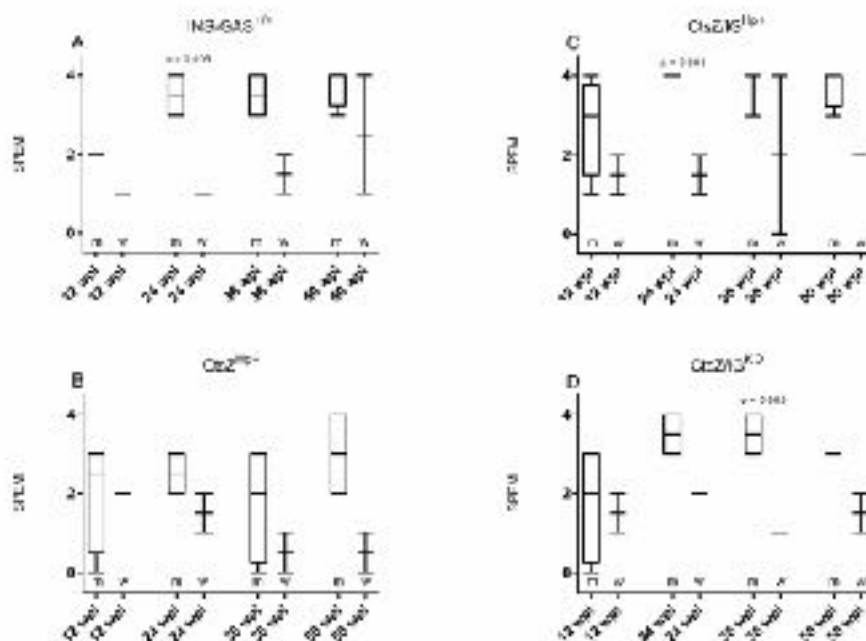


Diagramm 6 - Vergleich SPEM zwischen Männchen und Weibchen. Dabei ist eine klar männliche Dominanz erkennbar.

3.2.4.3. Einfluss der *H. pylori*-Infektion auf die SPEM

Der Vergleich der *H. pylori*-infizierten mit den Kontrollgruppen bezüglich der Ausbildung von SPEM ergibt ein homogenes Bild. In den Mittelwerten besitzen die infizierten Tiere in allen Gruppen mindestens gleich viel und zum Teil mehr SPEM als die Kontrollen (vgl. Abbildung 25). In zwei Vergleichsgruppen ist dieser Unterschied statistisch signifikant mit einem $p < 0,05$ (vgl. Diagramm 7).

Die nicht-infizierten Tiere zeigen jedoch in der *Cardia* eine deutlich stärkere Ausbildung von SPEM als die Infektionsgruppe. Hier zeigt eine weitere Differenzierung der Loci eine durchschnittliche SPEM (*Cardia*) der infizierten Tiere von 0,37; und der Kontrollen von 1,22 ($p = 0,0506$).

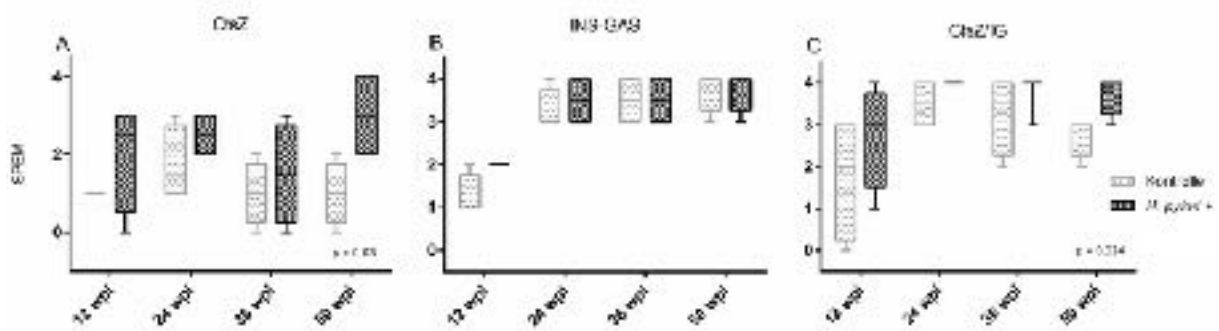


Diagramm 7 - Vergleich von SPEM der infizierten mit den Kontrolltieren. Die statistisch signifikanten Werte sind als p-Wert angegeben.

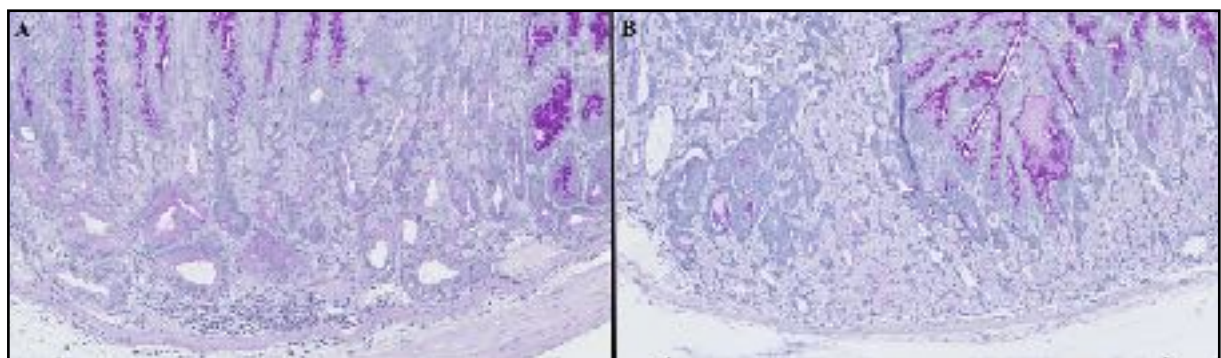


Abbildung 25 - CtsZ/IG 50 wpi (PAS-Alcian; 12x). A zeigt eine ausgeprägte SPEM in einem *H. pylori* infizierten Tier. Im Vergleich dazu signifikant weniger SPEM in der Kontrolle (B).

3.2.4.4. Einfluss des Cathepsin Z auf die SPEM

Um den Einfluss des Cathepsin Z auf die SPEM zu bewerten wurden die beiden INS-GAS-transgenen Gruppen (mit und ohne Cathepsin Z-Knockout) jeweils in der Infektionsgruppe und in der Kontrollgruppe verglichen. Dabei deutet sich ein Zusammenhang nur an. Bei Betrachtung der *cardia*-fernen Loci indizieren vier von acht Mittelwerte (ohne signifikante Unterschiede) eine vermehrte SPEM in den Cathepsin Z-Knockout-Mäusen. In einer Kontroll-Gruppe zeigt sich ein signifikanter

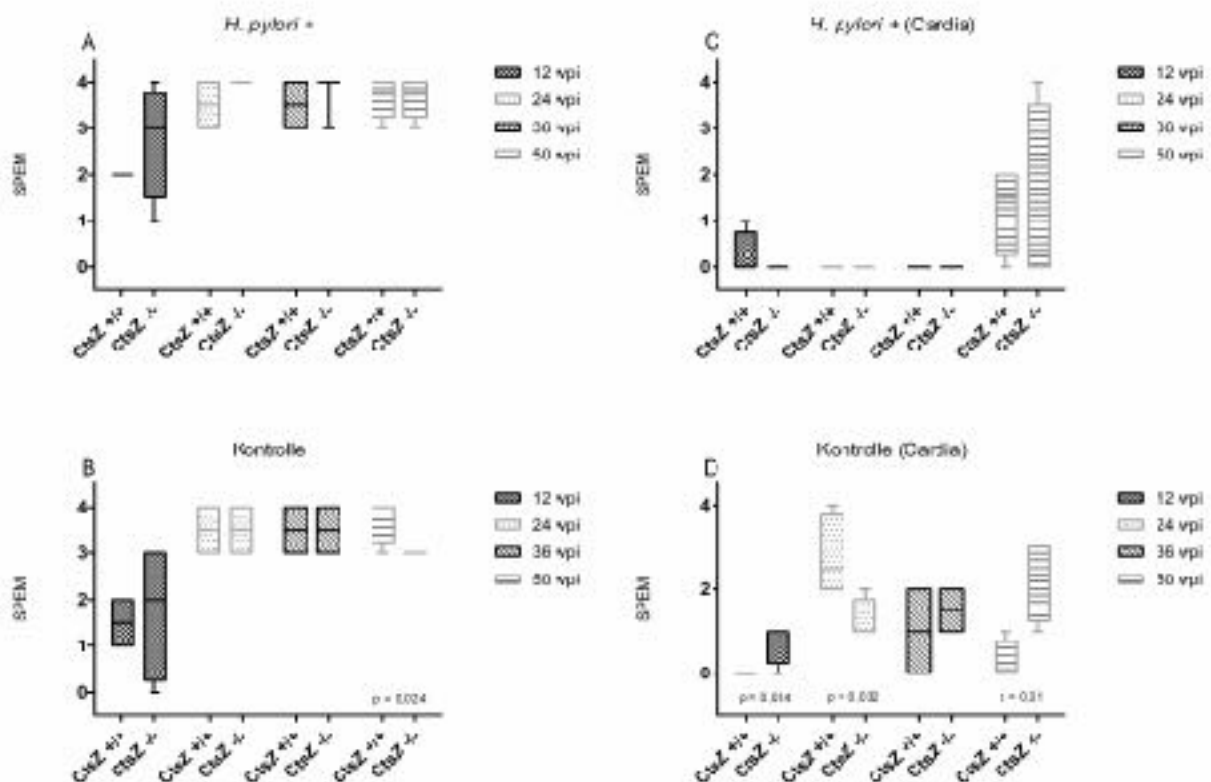


Diagramm 8 - Vergleich der Gruppen INS-GAS (*CtsZ*^{+/+}) und *CtsZ*/IG (*CtsZ*^{-/-}) um den Einfluss des Cathepsin Z auf die SPEM in unserem Mausmodell darzustellen. Weiterhin werden in C und D zusätzlich die SPEM-Werte an der *Cardia* verglichen. Statistische Signifikanzen zeigen sich ausschließlich in den Kontrollgruppen (p-Werte im Diagramm).

gegenteiliger Effekt ($p=0,024$). Im Diagramm 8 ist jedoch auch die SPEM für die *Cardia* aufgeschlüsselt (Abschnitt C und D). In der *Cardia* der infizierten Tiere lässt sich (bei einer durchschnittlichen SPEM von 0,37) für das Cathepsin Z kein signifikanter Unterschied ausarbeiten. In der Kontrollgruppe verursacht das Cathepsin Z jedoch größere Unterschiede. Drei von vier Mittelwerte und zwei signifikante Gruppen (12 und 50 wpi) indizieren eine vermehrte SPEM im Cathepsin Z-Knockout. In der 24 wpi-Gruppe ist jedoch im Knock-out signifikant weniger SPEM zu sehen.

3.2.5. SPEM und Atrophie

Die Präparate wurden weiterhin auf das Verhältnis des Vorhandenseins von SPEM und Atrophie in den einzelnen Loci untersucht (vgl. Diagramm 9 A-D). Dabei präsentieren sich beide qualitativ indirekt proportional zueinander. An Orten mit einer geringen Atrophie ist vermehrt SPEM vorhanden, bzw. an Orten mit einer ausgeprägten Atrophie findet sich lediglich gering ausgeprägte SPEM (vgl. Abbildung 25). Dies ist über alle Versuchsgruppen konsistent.

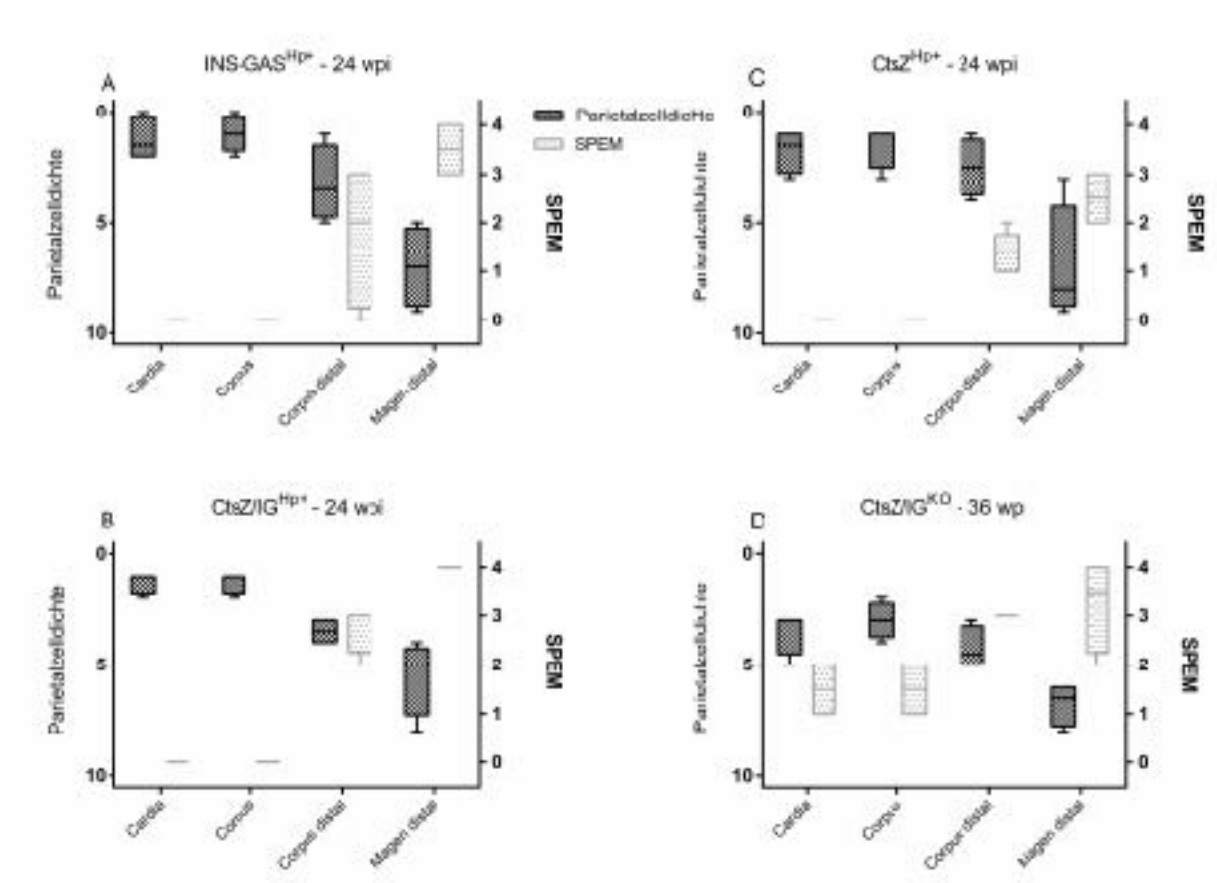


Diagramm 9 - Korrelation von Atrophie und SPEM in einem Diagramm. Die linke Y-Achse repräsentiert die Parietalzelldichte und die rechte Y-Achse die SPEM. Man beachte, dass die Skala für die Parietalzelldichte invers ist, um die Proportionalität besser grafisch deutlich zu machen.

4. Diskussion

Die Erforschung der *H. pylori*-Infektion und ihrer Pathogenese, sowie der damit assoziierten Erkrankungen beim Menschen bis hin zum Magenkarzinom, erforderte in der Vergangenheit immer neue *in-vitro* und *in-vivo*-Modelle. Viele verschiedene Tiermodelle sind beschrieben, so z.B. von Mäusen, mongolischen Gerbils, Hauskatzen oder sogar Primaten (Solnick et al. 1999). Dabei haben sich Mausmodelle insbesondere als bedeutend herausgestellt, da Mäuse eine geringe Generationszeit haben, leicht zu halten sind und erfolgreich mit verschiedenen *H. pylori*-Stämmen infiziert werden können. Nur wenige Modelle bilden die komplette Pathogenese bis hin zur Entstehung von Magenkarzinomen nach *H. pylori*-Infektion ab. Insbesondere für den Insulin-Gastrin-transgenen Mausstamm (INS-GAS) konnte jedoch eine Progression bis zum Magenkarzinom beschrieben werden (Wang et al. 2000).

Bisherige Forschungsarbeiten konnten eine Überexpression von Cathepsin Z in entzündeter Magenschleimhaut und im Magenkarzinom nachweisen (Krueger et al. 2005). Dabei scheinen eine große Menge von Faktoren eine Rolle zu spielen. So konnte in der Vorstudie unserer Arbeitsgruppe in einem ähnlichen Versuch gezeigt werden, dass *CtsZ*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren signifikant mehr SPEM, Epithelproliferation und Induktion proinflammatorischer Zytokine entwickelten. Es ließen sich weiterhin signifikant mehr infiltrierende Makrophagen in der Mukosa nachweisen (Krueger et al. 2013). Demnach würde dem *CtsZ* eine protektive Rolle in der Entzündung und Karzinogenese im Magen zukommen, bzw. das Fehlen der Protease diese beschleunigen. Zur weiteren Untersuchung ist ein Mausmodell notwendig, das uns den Einfluss des Cathepsins auf die Magenkarzinogenese bis hin zum Karzinom erforschen lässt.

Ziel der Studie für die Dissertationsarbeit war es, solch ein neuartiges Mausmodell für die Magenkarzinogenese in Bezug zur Cysteinprotease Cathepsin Z zu generieren. Dafür wurden zwei in der Literatur etablierte Mausmodelle (INS-GAS (FVB/N-Hintergrund) und *CtsZ*^{-/-} (FVB/N-Hintergrund)) verwendet und zu einem neuen Stamm gemäß der Mendel'schen Gesetze verpaart. Mäuse mit dem FVB/N-Hintergrund entwickeln schneller und ausgeprägter Magenpathologien als die klassischen C57BL/6-Mäuse (Takaishi et al. 2009). Scheinbar begünstigt der genetische Hintergrund der FVB/N-Mäuse eine schnellere Karzinomentstehung. Dies ist auch von Wakabayashi et al. 2007 für Plattenepithelkarzinome der Haut beschrieben worden. Dafür werden von Wakabayashi Genpolymorphismen in einem Tumorsuppressor-Gen (*Ptch1*) in den FVB/N-Mäusen verantwortlich gemacht. Aus diesem Grund haben wir bei unseren Neuverpaarungen beim *CtsZ*^{-/-}-Stamm nicht wie im Vorversuch der C57BL/6, sondern analog zu INS-GAS den genetischen FVB/N-Hintergrund verwendet. Die Kreuzungen sind ausführlich im Ergebnisteil (vgl. Kapitel 3) beschrieben.

Weiterhin wurden die Tiere von uns in einen Versuchsablauf integriert, sodass durch Vergleich des neuen Mausmodells mit den beiden bereits etablierten Mausmodellen, der Einfluss des Cathepsin Z

auf die Ausbildung von SPEM und die Belegzellatrophie als initiale Teilschritte der Magenkarzinogenese untersucht werden konnten. Die Untersuchung von intraepithelialen Neoplasien und invasiven Tumoren ist nicht Teil der Arbeit.

4.1. Ausbildung von Atrophie

Die gastrale Atrophie der Belegzellen ist ein bedeutender Schritt in der postulierten Sequenz der Magenkarzinogenese. Sie bedingt eine Hypo- bzw. Achlorhydrie mit einer atrophen Gastritis. Auf diesem Boden können sich klassischerweise erst Metaplasien und später Dysplasien entwickeln. Sie gilt beim Menschen als ein Hauptrisikofaktor für die Entwicklung von Magenkarzinomen des intestinalen Typs (Burkitt 2009). Aus diesem Grund hat die Atrophie sogar als wichtiges histologisches Kriterium im sogenannten OLGA (*Operative Link for Gastritis Assessment*) Staging System Eingang gefunden (Rugge et al. 2008). Demnach werden Patienten in fünf verschiedene Risikogruppen eingestuft (0 bis IV), von denen die weitere Behandlung abhängen soll. Neuere Untersuchungen schlagen einen modifizierten OLGA-Score vor - den OLGIM-Score - der anstatt der Atrophie, das Vorhandensein von Metaplasien als histologisches Kriterium verwendet. Dies wird begründet mit einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse, da in einer Studie nachgewiesen werden konnte, dass bei Pathologen die Interobserver-Variabilität für die Metaplasie signifikant kleiner als für die Atrophie ist (Capelle et al. 2010).

In der Humanmedizin spielt das biologische Geschlecht des Individuums immer wieder auch eine entscheidende Rolle für die Qualität und Quantität der Ausbildung bestimmter pathologischer Prozesse. So treten die meisten Krankheiten häufiger bei dem einen oder anderen Geschlecht - bestimmte sogar nur bei einem der Geschlechter auf. Beim Menschen besteht eine männliche Prädominanz des Magenkarzinoms und seiner Vorstufen (Robert-Koch-Institut 2013). So ist das Geschlechterverhältnis männlich zu weiblich bei Magenantrumkarzinomen ca. 2:1 und bei Cardiakarzinomen sogar 5:1. Die Geschlechtsunterschiede sind global gleich im Vergleich von Ländern mit relativ hoher und mit relativ niedriger Inzidenz. Dabei konnten Sipponen und Correa bei der Untersuchung von 19 Krebsregistern weltweit bei Frauen eine Verzögerung von 10 bis 15 Jahren bei der Krebsentstehung nachweisen. Diskutiert werden hormonelle Einflüsse oder eine spätere Exposition der Frauen mit *H. pylori* (Sipponen et al. 2002). Dementsprechend müsste in der Forschung ein ideales Krankheitsmodell diese Zustände mit abbilden.

In unserer Studie zeigte sich die Belegzellatrophie in allen Stämmen geschlechterabhängig. Männliche Tiere entwickelten schneller eine stärker ausgeprägte Atrophie als weibliche Tiere. Dabei gab es keine Unterschiede beim Befallsmuster innerhalb des Magens (Cardia, Corpus und distal). In unserer Studie waren die Geschlechtsunterschiede der Atrophie verhältnismäßig in der INS-GAS^{Hp+}- und in der CtsZ^{Ko}-Gruppe am geringsten ausgeprägt. Bei den INS-GAS^{Hp+}-Tieren war die Atrophie beider Geschlechter nach 12 Wochen schon so ausgeprägt, dass sich zwar noch ein signifikanter Unterschied

ergab, dieser jedoch bereits nach 36 Wochen nicht mehr nachweisbar war. In der CtsZ^{Ko}-Gruppe zeigte sich über alle Wochen hinweg zwar eine Mittelwert-Tendenz, jedoch keine signifikanten Unterschiede. Dies liegt sicherlich darin begründet, dass die Atrophie insgesamt nur sehr gering ausfiel und beide Trigger, der *H. pylori* und das Gastrin, fehlten. So zeigten in dieser Gruppe die Tiere erst nach 50 Wochen eine mäßige Atrophie, jedoch ohne signifikante Abhängigkeit vom Geschlecht.

Die dargestellten Ergebnisse unterstützen insgesamt gut die bisher dazu durchgeführten Studien, vor allem auch zu den INS-GAS-Tieren. Es konnte zum ersten Mal 2003 von Fox et al. an einer größeren Population eine eindeutige Abhängigkeit des Magenkarzinoms und seiner Vorstufen vom Mausgeschlecht in INS-GAS-Stämmen nachgewiesen werden. Das besondere dabei ist, dass diese Geschlechtsspezifität die Qualität des INS-GAS-Mausmodells (FVB/N-Hintergrund) erhöht, da sie die Bedingungen beim Menschen abbildet. Damit erscheint dieses Mausmodell noch geeigneter zur Untersuchung der Magenkarzinogenese.

Demgegenüber zeigen aber andere genetische Hintergründe (z.B. C57BL6 oder 129Sv) auch bei der INS-GAS-Maus keine Geschlechtsspezifität (Cai et al. 2005 und Houghton et al. 2004). Wiederum konnten Ohtani et al. 2007 die weiblichen Geschlechtshormone als Ursache für die Geschlechtsspezifität ausmachen. Sie verglichen unter *H. pylori*-infizierten INS-GAS-Tieren (FVB/N) männliche mit weiblichen ovariectomierten Tieren, wovon eine Untergruppe mit 17 β -Estradiol behandelt wurde. Während viele der weiblichen ovariectomierten und der männlichen Tiere *in-situ*-Karzinome entwickelten, trat diese in der intakten weiblichen Kontrollgruppe nicht auf. Eine Behandlung der ovariectomierten Tiere mit dem Sexualhormon schwächte die Schwere der Pathologien signifikant ab. Dies würde die These von Sipponen et al. unterstützen, dass sich bei Frauen auf Grund des hormonellen Schutzes das Magenkarzinom ca. 10 bis 15 Jahre später manifestiert als bei Männern. So konnten Lindblad et al. 2006 ein vermindertes Risiko u.a. für Magenkarzinome bei Patientinnen mit einer postmenopausalen Hormonersatztherapie nachweisen.

4.2. Atrophie nach *H. pylori*-Infektion und Einfluss des Cathepsin Z

Die Infektion mit *H. pylori* beschleunigte und verstärkte in allen drei untersuchten Stämmen signifikant die Ausbildung von Atrophie. Da die beiden INS-GAS-transgenen Stämme auch ohne infektiöses Pathogen bereits eine mäßige bis ausgeprägte Atrophie bildeten (auf Grund der Hypergastrinämie), waren die Unterschiede in diesen Stämmen zwar signifikant, im Vergleich mit der CtsZ-Gruppe jedoch nur mäßig. Im CtsZ-Stamm triggerte der *H. pylori* aus einer mehr oder weniger gesunden Mukosa eine maximale Atrophie bei 50 Wochen. Der Unterschied findet sich am stärksten bei 36 Wochen, wo in der Kontrolle noch so gut wie keine Atrophie nachweisbar ist. Somit lassen sich in diesen Versuchen gut die bereits vielfach nachgewiesenen positiven Einflüsse des *H. pylori* auf die Atrophie in verschiedenen Mausstämmen nachvollziehen (vgl. Fox et al. 2003, Krueger et al. 2013), die auch mit den Untersuchungen im Menschen korrelieren (Correa 1992).

Bezüglich der Ausbildung von Atrophie scheint das Cathepsin Z einen triggernden Einfluss zu haben. Zwar war der Vergleich nur in einer Untergruppe (INS-GAS^{Hp+} vs. CtsZ/IG^{Hp+} bei 12 wpi) statistisch signifikant ($p < 0,05$), jedoch deuten die anderen Mittelwerte auf diesen Zusammenhang hin. Letztlich waren die Unterschiede in der *H. pylori*-infizierten Gruppe ab einem Alter von 24 wpi eher gering, was sicherlich durch die *a-priori* schon sehr ausgeprägte Atrophie zu erklären ist. In der Kontrollgruppe liegen zwar die Mittelwerte weiter auseinander; die Versuchsgruppengröße scheint aber nicht auszureichen um einen möglichen signifikanten Unterschied aufzuzeigen.

Diese Ergebnisse weisen also auf eine fördernde Wirkung des Cathepsin Z auf die Ausbildung von Parietalzellatrophie und konsekutiv also auf die Magenkarzinogenese hin. Diese Rolle wurde für das Cathepsin Z ursprünglich bereits von Krueger et al. 2005 angenommen, da die Protease in humanen Zellen vermehrt in Gastritis- und Magenkarzinomgewebe nachgewiesen werden konnte und *in-vitro* sogar zu einer vermehrten Tumordinvasion geführt hat. Kürzlich konnte in einem zu dieser Studie ähnlich angelegten Versuch jedoch ein scheinbar gegenteiliger Effekt signifikant nachgewiesen werden (Krueger et al. 2013). Hierin ließ sich in CtsZ^{-/-} C57Bl/6-Tieren bei 50 wpi eine signifikant stärkere Ausprägung von Atrophie und SPEM nachweisen als im Wildtyp. Diese Ergebnisse waren in der Studie von Krueger unerwartet gewesen. Diskutiert wird ein mögliches Unvermögen der CtsZ^{-/-}-Tiere, eine ausreichende Rekrutierung von Entzündungszellen zu erreichen. Die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen (CXCL1/KC, MCP-1 und IL-6) ist in dieser Studie in den CtsZ^{-/-} stärker und länger andauernd als in den Wildtypen und fördern über diesen Mechanismus die Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen, B- und T-Zellen (Krueger et al. 2013).

4.3. Ausbildung von SPEM

Die SPEM als eine Form der Metaplasie (neben der „intestinalen Metaplasie“) bildet sich auf dem Boden einer atrophischen Gastritis bzw. der Parietalzellatrophie. Aus der SPEM kann sich eine intestinale Metaplasie mit Ausbildung von Becherzellen entwickeln. Es ist postuliert, dass die schleimbildenden SPEM-Zellen in der atrophischen Schleimhaut nach und nach die Hauptzellen ersetzen und von basal die Drüschläuche des Magens ausfüllen (Nomura et al. 2004; Nozaki et al. 2008). Dies soll unter anderem in spezifischen Funktionen der Parietalzellen in der Differenzierung der Magenstammzelllinien begründet sein. So sorgt das Fehlen der Parietalzellen für eine gestörte Herausbildung von differenzierten Hauptzellen und Nebenzellen (Li et al. 1996). Die Hauptzellen (oder eine Unterform von ihnen) sind somit nicht - wie vorher angenommen - in einem *post-mitotischen* Stadium, sondern agieren als Progenitorzellen, die in einer entzündeten Magenmukosa aktiviert werden können. Somit erscheint es Goldenring et al. 2010 als vorstellbar, dass sich Dysplasien und Karzinome auch aus der mitotisch aktiven basalen Zone entwickeln, wo Hauptzellen zu SPEM transdifferenzieren. Dieser Vorgang wird als Anpassungsreaktion gewertet (Weis 2009).

Die Ausbildung von SPEM zeigte sich in unserer Studie geschlechtsabhängig. So zeigten die männlichen Tiere eine stärkere Ausprägung der SPEM als die weiblichen. Diese Ergebnisse sind konsistent zu der allgemeinen Geschlechtsspezifität der Magenkarzinogenese beim Menschen mit Prädominanz des männlichen Geschlechts. Analog zur Atrophie hatten Fox et al. den Zusammenhang zwischen muzinöser Metaplasie zum Mausgeschlecht 2003 beschrieben. Bei weiter oben beschriebener früherer und stärkerer Atrophie ist eine konsekutiv frühere und stärkere Ausprägung einer SPEM in unserer Studie gut erklärbar. Wir konnten dies somit auch für das von uns neu generierte Mausmodell belegen.

Im Weiteren ließ sich eine verstärkte SPEM-Bildung in den *H. pylori*-infizierten Stämmen nachweisen. Dieser Zusammenhang erscheint analog zur Atrophie gut nachvollziehbar und ist auch als Triggerfaktor der SPEM 1998 von Wang et al. in einem Mausmodell erstmalig beschrieben worden. Wenig später konnte der Zusammenhang auch im Menschen histologisch nachgewiesen werden (Schmidt et al. 1999). Diese Ergebnisse ließen sich in unserem Mausmodell gut reproduzieren. Dabei ist in der Literatur in Wildtypmäusen der *H. pylori* als eine Voraussetzung für die Entwicklung von SPEM festgehalten (Yoshizawa et al. 2007). Im INS-GAS-Modell ist sie auch ohne Infektion teils sehr ausgeprägt vorzufinden. Dies lässt sich aus der angenommenen Ätiologie der SPEM heraus ableiten. Die Insulin-Gastrin-transgenen Tiere entwickeln auf Grund der Hypergastrinämie eine foveolare Hyperplasie und nach initialer Zellvermehrung später eine Belegzellatrophie. Der Belegzellverlust mit konsekutiv gestörter Differenzierung der Magenzelllinien kann als alleinige Ursache zu SPEM führen (Nomura et al. 2005). Die isolierte (in den Versuchen von Nomura pharmazeutisch herbeigeführte) Atrophie ohne eine Entzündungsreaktion führte allerdings niemals zur Entstehung von Dysplasien. Dies ist in unserem INS-GAS-Modell anders (Vergleich Wang et al. 2000). Eine Entzündungsreaktion ist also eine Voraussetzung und beschleunigt in allen in der Literatur durchgeführten Versuchen auf dem Boden der Atrophie die SPEM-Bildung. Somit kommt dem *H. pylori* in der Entstehung von SPEM eine überaus wichtige Rolle zu.

4.4. Einfluss des Cathepsin Z auf die SPEM-Bildung

In den Cathepsin Z-Knockouts stellte sich die Belegzellatrophie insgesamt signifikant geringer dar, als mit den Wildtyp-Allelen. Eine geringere (bzw. spätere) Herausbildung der Atrophie sollte demnach im Gedankenexperiment auch zu einer geringeren oder sich später bildenden SPEM führen.

Das lässt sich in dieser Studie nicht mit statistischer Sicherheit annehmen oder ablehnen. Möglicherweise waren die Stichproben der Versuchsgruppen zu klein, womit sich interindividuelle Ausprägungen, zufällige histologische Anschnitte oder ähnliche verzerrenden Effekte zu stark auswirken und sich somit vielleicht bestehende Unterschiede nicht mehr bzw. noch nicht nachweisen lassen.

4.5. Verhältnis von SPEM zu Atrophie

Insgesamt gesehen scheinen in unserer Studie Atrophie und Vorhandensein von SPEM zusammenzuhängen. Nach dem Modell von Goldenring (vgl. Kapitel 1.4.4., Abbildung 4) folgt die Transdifferenzierung von Hauptzellen zu SPEM-Drüsen der Belegzellatrophie. Dies scheint sich zunächst in unserer Studie nur zum Teil miteinander zu decken. In unseren Mäusen ließ sich allgemein eine indirekte Proportionalität feststellen. In Bereichen des Magens, wo sich eine ausgeprägte Atrophie fand, bestand zumeist nur wenig SPEM und umgekehrt waren die Belegzellen in Bereichen mit viel SPEM nicht so sehr atrophiert. Dabei sind nun die oben beschriebenen (Vergleich Ergebnisteil) verschiedenen Verteilungsmuster beider Pathologien interessant. Da zeigte sich die Atrophie stets prädominant im Bereich der *Cardia* und nahm nach distal (Duodenum) stetig ab. Die SPEM hingegen fand sich vor allem im mikroskopisch gesünder erscheinenden, distal der *Cardia* gelegenen, Gewebe mit weniger foveolärer Hyperplasie und weniger Atrophie. Dabei findet sich bei uns die meiste SPEM in Bereichen mit mäßiger Atrophie (Grad 4-6).

Atrophie scheint in unseren Ergebnissen (so wie auch im bestehenden Modell) eine Voraussetzung für die SPEM-Bildung zu sein. In den CtsZ^{KO}-Tieren findet sich zB. weder viel Atrophie noch SPEM. Erst in den Bereichen mit mäßiger Atrophie findet sich SPEM, dort aber meist sehr ausgeprägt und dieses dann häufig weit distal der *Cardia* oder zB. in den Versuchsgruppen mit einer nur mäßigen Atrophie (CtsZ/IG^{KO}).

4.6. Abschließende Diskussion

Insgesamt ist das neue Mausmodell vielversprechend für die weitere Erforschung der Rolle des Cathepsin Z in der Magenkarzinogenese. Das Cathepsin Z zeigte sich in vorherigen Studien in gastralem inflammatorischen und Karzinomgewebe überexprimiert, und es sind Mechanismen beschrieben, die auf eine Funktion des Cathepsin Z bei Tumorinvasion und Metastasierung hinweisen. Damit ist insgesamt eine unterstützende Rolle in der Karzinogenese postuliert worden und konsekutiv müsste ein Fehlen des Cathepsins im Körper die Karzinomentstehung und Ausbreitung verlangsamen.

In der nun erstmaligen Möglichkeit mit dem neuen Mausmodell dies zu beweisen scheinen sich im Rahmen meiner Promotionsstudie Hinweise dafür zu zeigen, dass das Cathepsin Z bei der Entstehung von Magenkarzinomen eine wichtige Rolle spielt. Die Parietalzellatrophie als wichtige Voraussetzung der Entstehung von Dysplasien ist in den Knockout-Mäusen geringer ausgeprägt als bei Vorhandensein der Wildtyp-Allele. Zu erwarten wäre gemäß der aktuellen Forschungen zur Magenkarzinogenese und SPEM (vgl. Goldenring et al. 2010) analog der stärkeren Atrophie eine verstärkte Ausbildung von SPEM in den Cathepsin Z-exprimierenden Mäusen. Leider ließen sich in dieser Promotionsstudie keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich der Einflüsse des Cathepsin Z auf das Vorhandensein von SPEM nachweisen.

Ein verstärkende Funktion in der Karzinogenese des Cathepsins ist zwar bereits 2005 von Krueger et al. angenommen worden, als vermehrt Cathepsin Z in Magenkarzinomgewebe nachgewiesen werden konnte, hat zuletzt jedoch in entsprechenden Mausmodellen (Krueger et al. 2013) und im aktuellen Versuch zu scheinbar kontroversen Ergebnissen geführt. So sind die genauen Mechanismen der Rolle der Protease Cathepsin Z in Interaktion mit den Inflammationszellen wie Makrophagen, der Magenmukosa, extrazellulären Matrix und Zytokinen noch nicht zufriedenstellend erklärt und insbesondere die Frage, ob das hochregulierte Cathepsin Z im Magenkarzinom als begünstigender Faktor, oder Teil der protektiven Immunantwort des Organismus zu werten ist.

Letztlich muss man weiterhin die Übertragung der Ergebnisse aus Studien mit diversen Tiermodellen auf die humane Pathogenese kritisch betrachten. So besitzen verschiedene Mausstämme an sich schon ein verschiedenes Verhalten des Immunsystems bei zB. Art und Ausprägung von zellulärer Immunität und Zytokinen, vor allem auch im Vergleich zum Menschen (vgl Kapitel 1.5.). Als eine weitere Limitierung des von uns benutzten Mausmodells im Vergleich zum Menschen ist die Verwendung des *H. pylori* SS1-Stammes zu werten. Erstmals beschrieben wurde er von Lee et al. 1997 als ein Stamm, der zu einer verlässlichen Infektion in Mäusen führt und *cagA*⁺ und *VacA*⁺ ist. Allerdings konnten Philpott et al. 2002 nachweisen, dass viele *H. pylori*-Stämme (so auch der SS1-Stamm) bei der Infektion des Mäusemagens nicht in der Lage sind, eine IL-8-Induktion über NF- κ B trotz vorhandener *cagPAI* auszulösen. Somit fehlt im Modell ein wichtiger Mechanismus, der im Menschen zur Entstehung einer schweren Gastritis und Karzinomen führt. Ein ideales *H. pylori*-Modell für die murine Infektion ist leider noch nicht beschrieben.

Die weiteren (histo-)pathologischen Schritte der Magenkarzinomentstehung sind im Rahmen dieser Promotionsarbeit nicht mit untersucht. Weitere Parameter - wie intestinale Metaplasie, Dysplasien und Karzinom - wurden aber in unserer Arbeitsgruppe ausgewertet und es zeigt sich dort eine scheinbar verzögerte Entstehung des Magenkarzinoms in den Tieren mit dem Cathepsin Z-Knockout-Gen (Daten bisher unveröffentlicht). Dies unterstützt auch bestehende Forschungsergebnisse. So z.B. konnten Sevenich et al. 2010 bereits beim Mamma-Karzinom dem Fehlen von Cathepsin B und Z (im Einzelnen, und sogar additive Effekte bei Kombination derselben) einen tumorprotektiven Effekt nachweisen. Weiterhin wurde eine geringere und spätere Metastasierung beobachtet. In der Arbeit von Sevenich et al. werden vor allem die proteolytischen Eigenschaften des Cathepsin Z, sowie die Interaktionen mit der ECM für die Auswirkungen diskutiert. Dies ist sicherlich einer der Schlüsselfaktoren, der entscheidend zum Verständnis der Rolle des Cathepsin Z in der Karzinogenese beitragen wird. So wird in der aktuellen Literatur sogenannten Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) eine zunehmende Rolle bei Tumorprogression und Invasion zugeschrieben (Biswas et al. 2013). Sie können über Enzyme (wie z.B. das Cathepsin Z) spezifische Funktionen wie die Bindung an ECM und ihre Degradation übernehmen, die die Tumorzellen selber nicht leisten können. Dabei werden differente Aufgaben und Wirkungsmechanismen (z.B. die Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden) des Cathepsin Z je nach dem es produzierenden Zelltyps postuliert (Akkari et al. 2014). Die gezielte Beeinflussung dieser tumoralen Mikroumgebung ist Ziel aktueller und zukünftiger Forschung zum besseren Verständnis der Biologie der Krebsentstehung und zur

Entwicklung neuartiger Therapiestrategien. Ansätze dafür wären eine antikörpergesteuerte Hemmung der Makrophagenrekrutierung in den Tumor und ihre Lebensdauerverkürzung sowie Modulation ihrer spezifischen immunologischen Reaktion, um durch sie sogar eine antitumorale Wirkung zu erzielen (Josephs et al. 2015). Diese Ideen erscheinen als ein Ansatz vielversprechend angesichts der zum Teil ausgereizt erscheinenden, etablierten Krebstherapien. Hier wäre die Grundlagenforschung in der Lage, neue Hoffnung für viele betroffene Menschen zu schaffen.

5. Zusammenfassung

Ziel der Dissertationsarbeit war es ein neues Mausmodell zu generieren und etablieren, in welchem sich die Zusammenhänge zwischen Cathepsin Z-Defizienz und Magenkarzinogenese weiter erforschen lassen. Cathepsin Z ist eine lysosomale Protease, der modulatorische Funktionen bei immunologischen und neurodegenerativen Prozessen sowie bei Zellkommunikation und Tumorentstehung zugeschrieben werden. Sie ist in Vorstudien in gastralem inflammatorischen und Karzinomgewebe überexprimiert und es sind Mechanismen beschrieben, die auf eine Funktion des Cathepsin Z bei Tumordinvasion und Metastasierung hinweisen (Krueger et al. 2005 und 2009). Damit ist insgesamt eine unterstützende Rolle in der Karzinogenese postuliert worden und konsekutiv müsste ein Fehlen des Cathepsins im Körper die Karzinogenese und Ausbreitung verlangsamen. Als zweiten Ausgangsstamm haben wir uns für die INS-GAS-Maus entschieden, die ein transgenes Insulin-Gastrin-Fusionsgen - das Peptidhormon Gastrin - überproduziert und mit der erstmals eine spontane Progression bis zu einem Magenkarzinom in einem Mausmodell gezeigt werden konnte, was zusätzlich durch eine Infektion mit *H. pylori* (Stämme: B128 und SS1) und *H. felis* verstärkt wird (Wang et al. 2000).

Dazu haben wir die beiden Stämme systematisch so miteinander verpaart, dass am Ende des Versuchs CtsZ-defiziente, INS-GAS-transgene Zuchtpaare bereitstanden. Weiterhin haben wir die neuen Tiere in einen histologischen Infektionsversuch mit *H. pylori* (Stamm SS1) implementiert und Teile der Entzündungs- und Magenkarzinogenese histologisch untersucht und mit Kontrollen verglichen. Dabei wurden als wichtige Teilschritte der Karzinogenese die Belegzellatrophie und die Entwicklung von muzinöser Metaplasie (SPEM) gemessen und statistisch im Vergleich auf Signifikanz geprüft.

Es konnten in den Untersuchungen bisherige Forschungsergebnisse zu Atrophie und SPEM-Entwicklung in unserem Mausmodell komplett nachvollzogen werden (Geschlechtsspezifität, Abhängigkeit von *H. pylori*-Infektion und topographische Abhängigkeit der Pathologien im Magen). Zudem konnte statistisch eine mildere Atrophie bei CtsZ-Defizienz gesehen werden. Die Untersuchung von SPEM in den CtsZ-defizienten Tieren ergab ein indifferentes Bild. Dabei scheinen sich die Ergebnisse mit der scheinbar hochkomplexen Rolle des Cathepsin Z in der Entzündungs- und Magenpathologie zu erklären. So sind die genauen Mechanismen der Rolle der Protease Cathepsin Z in Interaktion mit den Inflammationszellen wie Makrophagen, der Magenmukosa, extrazellulären Matrix und Zytokinen noch nicht zufriedenstellend erklärt und diesbezüglich vor allem die Annahme, ob das hochregulierte Cathepsin Z im Mausmodell des Magenkarzinoms als begünstigender Faktor oder Teil der protektiven Immunantwort des Organismus zu werten ist.

Literaturverzeichnis

Zeitschriften:

1. Adams BL, Bates TC, Oliver JD: Survival of *Helicobacter pylori* in a Natural Freshwater Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7462–7466 (2003)
2. Ajani JA, Hecht JR, Ho L, Baker J, Oortgiesen M, Eduljee A, et al.: An open-label, multinational, multicenter study of G17DT vaccination combined with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with untreated, advanced gastric or gastroesophageal cancer: the GC4 study. *Cancer* 106, 1908–16 (2006)
3. Akkari L, Gocheva V, Kester JC, Hunter KE, Quick ML, Sevenich L, et al.: Distinct functions of macrophage-derived and cancer cell-derived cathepsin Z combine to promote tumor malignancy via interactions with the extracellular matrix. *Genes Dev.* 28, 2134–50 (2014)
4. Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S: Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* 300, 1430–4 (2003)
5. Backert S, Selbach M: Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell. Microbiol.* 10, 1573–1581 (2008)
6. Biswas SK, Allavena P, Mantovani A: Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin. Immunopathol.* 35, 585–600 (2013)
7. Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF: Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 265, 1287–9 (1991)
8. Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V: Epidemiology of stomach cancer. *Methods Mol. Biol.* 472, 467–77 (2009)
9. Brown LM: *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol. Rev.* 22, 283–97 (2000)
10. Brumback RA, Gerber JE, Hicks DG, Strauchen JA: Adenocarcinoma of the stomach following irradiation and chemotherapy for lymphoma in young patients. *Cancer* 54, 994–8 (1984)
11. Bühling F, Peitz U, Krüger S, Küster D, Vieth M, Gebert I, et al.: Cathepsins K, L, B, X and W are differentially expressed in normal and chronically inflamed gastric mucosa. *Biol. Chem.* 385, 439–45 (2004)
12. Burkitt MD, Varro A, Pritchard DM: Importance of gastrin in the pathogenesis and treatment of gastric tumors. *World J. Gastroenterol.* 15, 1–16 (2009)
13. Cai X, Carlson J, Stoicov C, Li H, Wang TC, Houghton J: *Helicobacter felis* eradication restores normal architecture and inhibits gastric cancer progression in C57BL/6 mice. *Gastroenterology* 128, 1937–52 (2005)
14. Capelle LG, de Vries AC, Haringsma J, Ter Borg F, de Vries RA, Bruno MJ, et al.: The staging of gastritis with the OLGA system by using intestinal metaplasia as an accurate alternative for atrophic gastritis. *Gastrointest. Endosc.* 71, 1150–8 (2010)

15. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al.: *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14648–53 (1996)
16. Correa P: Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* 52, 6735–40 (1992)
17. Devanathan G, Turnbull JL, Ziomek E, Purisima EO, Ménard R, Sulea T: Carboxy-monopeptidase substrate specificity of human cathepsin X. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 445–52 (2005)
18. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P: Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am. J. Surg. Pathol.* 20, 1161–81 (1996)
19. Dunbier A, Guilford P: Hereditary diffuse gastric cancer. *Adv. Cancer Res.* 83, 55–65 (2001)
20. Everhart JE: Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 29, 559–78 (2000)
21. Fox JG, Rogers AB, Ihrig M, Taylor NS, Whary MT, Dockray G, et al.: *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer in INS-GAS mice is gender specific. *Cancer Res.* 63, 942–950 (2003)
22. Gilliam AD, Watson SA: G17DT: an antigastrin immunogen for the treatment of gastrointestinal malignancy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 7, 397–404 (2007)
23. Goldenring JR, Nam KT, Wang TC, Mills JC, Wright NA: Spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia and intestinal metaplasia: time for reevaluation of metaplasias and the origins of gastric cancer. *Gastroenterology* 138, 2207–10, 2210.e1 (2010)
24. Guarino A, Bisceglia M, Canani RB, Boccia MC, Mallardo G, Bruzzese E, et al.: Enterotoxic effect of the vacuolating toxin produced by *Helicobacter pylori* in Caco-2 cells. *J. Infect. Dis.* 178, 1373–8 (1998)
25. Henson DE, Dittus C, Younes M, Nguyen H, Albores-Saavedra J: Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973–2000: increase in the signet ring cell type. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 128, 765–70 (2004)
26. Hirayama F, Takagi S, Yokoyama Y, Iwao E, Ikeda Y: Establishment of gastric *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J. Gastroenterol.* 31 Suppl 9, 24–8 (1996)
27. Hisatsune J, Yamasaki E, Nakayama M, Shirasaka D, Kurazono H, Katagata Y, et al.: *Helicobacter pylori* VacA enhances prostaglandin E2 production through induction of cyclooxygenase 2 expression via a p38 mitogen-activated protein kinase/activating transcription factor 2 cascade in AZ-521 cells. *Infect. Immun.* 75, 4472–81 (2007)
28. Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, et al.: Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 306, 1568–71 (2004)
29. Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, et al.: *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 279, 373–7 (1998)
30. Jevnikar Z, Obermajer N, Bogyo M, Kos J: The role of cathepsin X in the migration and invasiveness of T lymphocytes. *J. Cell Sci.* 121, 2652–61 (2008)
31. Josephs DH, Bax HJ, Karagiannis SN: Tumour-associated macrophage polarisation and re-education with immunotherapy. *Front. Biosci. (Elite Ed).* 7, 334–51 (2015)

32. Kato H, Schull WJ: Studies of the mortality of A-bomb survivors. 7. Mortality, 1950-1978: Part I. Cancer mortality. *Radiat. Res.* 90, 395–432 (1982)
33. Kos J, Jevnikar Z, Obermajer N: The role of cathepsin X in cell signaling. *Cell Adh. Migr.* 3, 164–6 (2009)
34. Kos J, Sekirnik A, Premzl A, Zavasnik Bergant V, Langerholc T, Turk B, et al.: Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Exp. Cell Res.* 306, 103–13 (2005)
35. Kreuning J, Lindeman J, Biemond I, Lamers CB: Relation between IgG and IgA antibody titres against *Helicobacter pylori* in serum and severity of gastritis in asymptomatic subjects. *J. Clin. Pathol.* 47, 227–31 (1994)
36. Krueger S, Kalinski T, Hundertmark T, Wex T, Küster D, Peitz U, et al.: Up-regulation of cathepsin X in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *J. Pathol.* 207, 32–42 (2005)
37. Krueger S, Kuester D, Bernhardt A, Wex T, Roessner A: Regulation of cathepsin X overexpression in *H. pylori*-infected gastric epithelial cells and macrophages. *J. Pathol.* 217, 581–8 (2009)
38. Krueger S, Roessner A, Kuester D: Murine models of *H. pylori*-induced gastritis and gastric adenocarcinoma. *Pathol. Res. Pract.* 207, 599–607 (2011)
39. Kwok T, Zabler D, Urman S, Rohde M, Hartig R, Wessler S, et al.: *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* 449, 862–6 (2007)
40. LAUREN P: THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA. AN ATTEMPT AT A HISTO-CLINICAL CLASSIFICATION. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 64, 31–49 (1965)
41. Lechner AM, Assfalg-Machleidt I, Zahler S, Stoeckelhuber M, Machleidt W, Jochum M, et al.: RGD-dependent binding of procathepsin X to integrin α v β 3 mediates cell-adhesive properties. *J. Biol. Chem.* 281, 39588–97 (2006)
42. Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF: A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 112, 1386–97 (1997)
43. Li Q, Karam SM, Gordon JI: Diphtheria toxin-mediated ablation of parietal cells in the stomach of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 271, 3671–6 (1996)
44. Lindblad M, García Rodríguez LA, Chandanos E, Lagergren J: Hormone replacement therapy and risks of oesophageal and gastric adenocarcinomas. *Br. J. Cancer* 94, 136–41 (2006)
45. Lines KE, Chelala C, Dmitrovic B, Wijesuriya N, Kocher HM, Marshall JF, et al.: S100P-binding protein, S100PBP, mediates adhesion through regulation of cathepsin Z in pancreatic cancer cells. *Am. J. Pathol.* 180, 1485–94 (2012)
46. Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, et al.: *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* 297, 573–8 (2002)
47. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al.: Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 56, 772–781 (2007)
48. Malfertheiner P: *Helicobacter pylori* - A timeless source of lessons and research initiatives. *Helicobacter* 12, 85–89 (2007)

49. Malfertheiner P, Bornschein J, Selgrad M: Role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer pathogenesis: A chance for prevention. *J. Dig. Dis.* 11, 2–11 (2010)
50. Manente L, Perna A, Buommino E, Altucci L, Lucariello A, Citro G, et al.: The *Helicobacter pylori*'s protein VacA has direct effects on the regulation of cell cycle and apoptosis in gastric epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* 214, 582–7 (2008)
51. Misiewicz JJ: The Sydney System: a new classification of gastritis. Introduction. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 6, 207–8 (1991)
52. Moehler M, Andus T, Anthuber M, Arends J, Arnold D, Aust D, et al.: Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens Authors. *Z Gastroenterol* 49, 461–531 (2011)
53. Moore DM: RATS AND MICE: Biology. *Lab. Anim. Med. Sci. Ser. Ii* 1–23 (2000)
54. Moss SF, Sordillo EM, Abdalla AM, Makarov V, Hanzely Z, Perez-Perez GI, et al.: Increased gastric epithelial cell apoptosis associated with colonization with cagA + *Helicobacter pylori* strains. *Cancer Res.* 61, 1406–11 (2001)
55. Nägler DK, Zhang R, Tam W, Sulea T, Purisima EO, Ménard R: Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry* 38, 12648–54 (1999)
56. Nägler DK, Kraus S, Feierler J, Mentele R, Lottspeich F, Jochum M, et al.: A cysteine-type carboxypeptidase, cathepsin X, generates peptide receptor agonists. *Int. Immunopharmacol.* 10, 134–9 (2010)
57. Nägler DK, Krüger S, Kellner A, Ziomek E, Menard R, Buhtz P, et al.: Up-regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* 60, 109–19 (2004)
58. Nakayama M, Hisatsune J, Yamasaki E, Isomoto H, Kurazono H, Hatakeyama M, Azuma T, et al.: *Helicobacter pylori* VacA-induced inhibition of GSK3 through the PI3K/Akt signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 1612–9 (2009)
59. Nakayama M, Kimura M, Wada A, Yahiro K, Ogushi K, Niidome T, et al.: *Helicobacter pylori* VacA activates the p38/activating transcription factor 2-mediated signal pathway in AZ-521 cells. *J. Biol. Chem.* 279, 7024–8 (2004)
60. Nascimento FD, Rizzi CCA, Nantes IL, Stefe I, Turk B, Carmona AK, et al.: Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Arch. Biochem. Biophys.* 436, 323–32 (2005)
61. Naumann M, Wessler S, Bartsch C, Wieland B, Covacci A, Haas R, et al.: 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, 31655–62 (1999)
62. Nomura S, Baxter T, Yamaguchi H, Leys C, Vartapetian AB, Fox JG, et al.: Spasmolytic polypeptide expressing metaplasia to preneoplasia in *H. felis*-infected mice. *Gastroenterology* 127, 582–94 (2004)
63. Nozaki K, Ogawa M, Williams JA, Lafleur BJ, Ng V, Drapkin RI, et al.: A molecular signature of gastric metaplasia arising in response to acute parietal cell loss. *Gastroenterology* 134, 511–22 (2008)
64. Obermajer N, Premzl A, Zavasnik Bergant T, Turk B, Kos J: Carboxypeptidase cathepsin X mediates beta2-integrin-dependent adhesion of differentiated U-937 cells. *Exp. Cell Res.* 312, 2515–27 (2006)
65. Obermajer N, Repnik U, Jevnikar Z, Turk B, Kreft M, Kos J: Cysteine protease cathepsin X modulates immune response via activation of beta2 integrins. *Immunology* 124, 76–88 (2008)

-
66. Obermajer N, Svajger U, Bogyo M, Jeras M, Kos J: Maturation of dendritic cells depends on proteolytic cleavage by cathepsin X. *J. Leukoc. Biol.* 84, 1306–15 (2008)
 67. Ogden SR, Noto JM, Allen SS, Patel DA, Romero-Gallo J, Washington MK, et al.: Matrix metalloproteinase-7 and premalignant host responses in *Helicobacter pylori*-infected mice. *Cancer Res.* 70, 30–5 (2010)
 68. Ohtani M, García A, Rogers AB, Ge Z, Taylor NS, Xu S, et al.: Protective role of 17 beta - estradiol against the development of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer in INS-GAS mice. *Carcinogenesis* 28, 2597–604 (2007)
 69. Owen RJ: *Helicobacter* - species classification and identification From *Campylobacter* to *Helicobacter*. *Br. Med. Bull.* 54, 17–30 (1998)
 70. Park YJ, Shin KH, Park JG: Risk of gastric cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer in Korea. *Clin. Cancer Res.* 6, 2994–8 (2000)
 71. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J: Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int. J. Cancer* 54, 594–606 (1993)
 72. Parkin DM: International variation. *Oncogene* 23, 6329–6340 (2004)
 73. Peters K, Gärtner K: [Studies on the function of the fore-stomach in muridae. I. Passage of solid and fluid food parts, pH-value, and activity of alpha amylase in the fore-stomach of the rat]. *Zentralbl. Veterinarmed. A* 20, 233–43 (1973)
 74. Philpott DJ, Belaid D, Troubadour P, Thiberge J-M, Tankovic J, Labigne A, et al.: Reduced activation of inflammatory responses in host cells by mouse-adapted *Helicobacter pylori* isolates. *Cell. Microbiol.* 4, 285–296 (2002)
 75. Pounder RE, Ng D: The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9 Suppl 2, 33–9 (1995)
 76. Roder DM: The epidemiology of gastric cancer. *Gastric Cancer* 5 Suppl 1, 5–11 (2002)
 77. Rogers AB, Taylor NS, Whary MT, Stefanich ED, Wang TC, Fox JG: *Helicobacter pylori* but not high salt induces gastric intraepithelial neoplasia in B6129 mice. *Cancer Res.* 65, 10709–15 (2005)
 78. Rugge M, Correa P, Di Mario F, El-Omar E, Fiocca R, Geboes K, et al.: OLGA staging for gastritis: a tutorial. *Dig. Liver Dis.* 40, 650–8 (2008)
 79. Sahasrabuddhe NA, Barbhuiya MA, Bhunia S, Subbannayya T, Gowda H, Advani J, et al.: Identification of prosaposin and transgelin as potential biomarkers for gallbladder cancer using quantitative proteomics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 863–9 (2014)
 80. Santamaría I, Velasco G, Pendás AM, Fueyo A, López-Otín C: Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *J. Biol. Chem.* 273, 16816–23 (1998)
 81. Saraga EP, Gardiol D, Costa J: Gastric dysplasia. A histological follow-up study. *Am. J. Surg. Pathol.* 11, 788–96 (1987)
 82. Schmidt PH, Lee JR, Joshi V, Playford RJ, Poulsom R, Wright NA, et al.: Identification of a metaplastic cell lineage associated with human gastric adenocarcinoma. *Lab. Invest.* 79, 639–46 (1999)

83. Sevenich L, Schurigt U, Sachse K, Gajda M, Werner F, Müller S, et al.: Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2497–502 (2010)
84. Sipponen P, Correa P: Delayed rise in incidence of gastric cancer in females results in unique sex ratio (M/F) pattern: etiologic hypothesis. *Gastric Cancer* 5, 213–9 (2002)
85. Slomiany BL, Bilski J, Sarosiek J, Murty VL, Dworkin B, VanHorn K, et al.: *Campylobacter pyloridis* degrades mucin and undermines gastric mucosal integrity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144, 307–14 (1987)
86. Smoot DT, Mobley HL, Chippendale GR, Lewison JF, Resau JH: *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* 58, 1992–4 (1990)
87. Solnick J V, Canfield DR, Yang S, Parsonnet J: Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of *Helicobacter pylori*: noninvasive detection and derivation of specific-pathogen-free monkeys. *Lab. Anim. Sci.* 49, 197–201 (1999)
88. Staël von Holstein CC, Anderson H, Eriksson SB, Hultdt B: Mortality after remote surgery for benign gastroduodenal disease. *Gut* 37, 617–22 (1995)
89. Staudt ND, Aicher WK, Kalbacher H, Stevanovic S, Carmona AK, Bogoy M, et al.: Cathepsin X is secreted by human osteoblasts, digests CXCL-12 and impairs adhesion of hematopoietic stem and progenitor cells to osteoblasts. *Haematologica* 95, 1452–60 (2010)
90. Szabò I, Brutsche S, Tombola F, Moschioni M, Satin B, Telford JL, et al.: Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J.* 18, 5517–27 (1999)
91. Takaishi S, Tu S, Dubeykovskaya ZA, Whary MT, Muthupalani S, Rickman BH, et al.: Gastrin is an essential cofactor for *helicobacter*-associated gastric corpus carcinogenesis in C57BL/6 mice. *Am. J. Pathol.* 175, 365–75 (2009)
92. Terebiznik MR, Vazquez CL, Torbicki K, Banks D, Wang T, Hong W, et al.: *Helicobacter pylori* VacA toxin promotes bacterial intracellular survival in gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* 74, 6599–614 (2006)
93. Tombola F, Carlesso C, Szabò I, de Bernard M, Reyrat JM, Telford JL, et al.: *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. *Biophys. J.* 76, 1401–9 (1999)
94. Tombola F, Morbiato L, Del Giudice G, Rappuoli R, Zoratti M, Papini E: The *Helicobacter pylori* VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. *J. Clin. Invest.* 108, 929–37 (2001)
95. Utsunomiya J, Maki T, Iwama T, Matsunaga Y, Ichikawa T: Gastric lesion of familial polyposis coli. *Cancer* 34, 745–54 (1974)
96. Vasiljeva O, Papazoglou A, Krüger A, Brodoefel H, Korovin M, Deussing J, et al.: Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res.* 66, 5242–50 (2006)
97. Wakabayashi Y, Mao J-H, Brown K, Girardi M, Balmain A: Promotion of Hras-induced squamous carcinomas by a polymorphic variant of the Patched gene in FVB mice. *Nature* 445, 761–5 (2007)
98. Wang J, Chen L, Li Y, Guan X-Y: Overexpression of cathepsin Z contributes to tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 6, e24967 (2011)

99. Wang TC, Dangler C a, Chen D, Goldenring JR, Koh T, Raychowdhury R, et al.: Synergistic Interaction Between Hypergastrinemia and. 36–47 (2000)
100. Wang TC, Koh TJ, Varro A, Cahill RJ, Dangler C a., Fox JG, et al.: Processing and proliferative effects of human progastrin in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 98, 1918–1929 (1996)
101. Wang TC, Bonner-Weir S, Oates PS, Chulak M, Simon B, Merlino GT, et al.: Pancreatic gastrin stimulates islet differentiation of transforming growth factor α -induced ductular precursor cells. *J. Clin. Invest.* 92, 1349–1356 (1993)
102. Wang TC, Brand SJ: Function and regulation of gastrin in transgenic mice: A review. *Yale J. Biol. Med.* 65, 705–713 (1992)
103. Weis VG, Goldenring JR: Current understanding of SPEM and its standing in the preneoplastic process. *Gastric Cancer* 12, 189–197 (2009)
104. Wendt W, Zhu X-R, Lübbert H, Stichel CC: Differential expression of cathepsin X in aging and pathological central nervous system of mice. *Exp. Neurol.* 204, 525–40 (2007)
105. Willhite DC, Blanke SR: *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell. Microbiol.* 6, 143–54 (2004)
106. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY: A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7533–8 (2000)
107. Yamasaki E, Wada A, Kumatori A, Nakagawa I, Funao J, Nakayama M, et al.: *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation. *J. Biol. Chem.* 281, 11250–9 (2006)
108. Yoshizawa N, Takenaka Y, Yamaguchi H, Tetsuya T, Tanaka H, Tatematsu M, et al.: Emergence of spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia in Mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori*. *Lab. Invest.* 87, 1265–1276 (2007)

Bücher, Monographien und Manuskripte:

1. Bommas-Ebert, U., Teubner, P., Voß, R.: *Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie.* pp 267. Thieme, Stuttgart, 3. Auflage (2011)
2. Hedrich, H.J.: *The Laboratory Mouse (Handbook of Experimental Animals).* pp 656. Elsevier Academic Press (2004)
3. Hamilton, S.R., Aaltonen, L.A. (Eds.): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System.* IARC Press, Lyon (2000)
4. *Krebs in Deutschland 2009/2010.* 9. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, (2013)
5. Ulfing, N.: *Kurzlehrbuch Histologie.* pp 129. Thieme, Stuttgart, 3. Auflage (2011)
6. Wang, T. C., Fox, J. G., Giraud, A.: *The Biology of Gastric Cancers.* pp 324. Springer (2010)

Danksagung

Ich danke in erster Linie Herrn Prof. Albert Roessner für die Bereitstellung eines sehr spannenden und fordernden Forschungsthemas und vor allem Frau Prof. Dörthe Jechorek für die Supervision und Hilfe in allen Phasen der Arbeit.

Ein äußerst herzlicher Dank richtet sich an Dr. Sabine Franke, die fachlich sowie persönlich, jederzeit für mich da und ansprechbar war und mich die ganze Zeit über immer wieder motiviert hat, wenn es mal nicht so lief.

Weiterhin danke ich sehr Frau Hella Wolf und Frau Dr. Anja Bernhardt für die Unterstützung für meine Arbeit.

Ein großer Dank geht an die beiden unverzichtbaren Kirsten Herrmanns und Doreen Medau, die mir so viel beigebracht haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Zuletzt danke ich meiner Familie, meinen Eltern und Schwester, und am allermeisten meiner Partnerin Norma Mechow, die mich so nimmt wie ich bin und die uns einen tollen Sohn geschenkt hat.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

„Etablierung und Charakterisierung eines doppel-transgenen Mausmodells zur Magenkarzinogenese“

im Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit Unterstützung durch Frau Prof. Dr. med. Dörthe Jechorek und Frau Dr. rer. nat. Sabine Franke

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 10.10.2016

Unterschrift

Beruflicher Werdegang

Aus Gründen des Datenschutzes nur in der schriftlichen Dissertation verfügbar.