
Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Medizinischen Fakultät der
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Charakterisierung *H. pylori* assoziierter Virulenzfaktoren,
insbesondere die EPIYA-Motive des CagA-Proteins in Bezug auf
Variabilität und Pathogenität, bei Patienten mit verschiedenen
gastrointestinalen Erkrankungen

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicine)

An der medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Wiebke Habendorf

aus Stendal

Magdeburg 2016

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Habendorf, Wiebke

Charakterisierung *H. pylori* assoziierter Virulenzfaktoren, insbesondere die EPIYA-Motive des CagA-Proteins in Bezug auf Variabilität und Pathogenität, bei Patienten mit verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen

2016 - 93 Blatt - 19 Abbildungen - 11 Tabellen

Kurzreferat:

Die Infektion mit dem Bakterium *H. pylori* ist durch eine meist lebenslange Persistenz des Erregers im Wirtsorganismus charakterisiert und führt in der Magenmukosa ohne erfolgreiche Eradikation zu einem chronischen Entzündungsprozess. Die Komplikationen, welche sich aus einer Infektion mit dem Mikroorganismus ergeben, sind vielfältig und deren Entstehung vom Zusammenspiel bakterieller Virulenz-, genetischer Wirts- und Umweltfaktoren abhängig. Das Magenkarzinom stellt dabei die wohl schwerwiegendste gastrointestinale Erkrankung dar, die mit der Infektion durch *H. pylori* einhergeht. Das CagA-Protein gilt als einer der bedeutendsten Virulenzfaktoren des Bakteriums. Der *cagA*-Genpolymorphismus und die Variabilität des CagA-Proteins in Bezug auf die EPIYA-Motive an dessen C-terminalen Ende beeinflussen das Pathogenitätspotential des Keims und die Immunantwort und Krankheitsmanifestation im infizierten Patienten. Ziel dieser Arbeit war es, das *cagA*-Gen in Bezug auf seine Variabilität und Pathogenität durch den Nachweis der EPIYA-Motive zu charakterisieren und eine Assoziation hinsichtlich des CagA-Proteins zum histopathologischen Befund der Magenschleimhaut des Patienten und zu anderen Virulenzfaktoren zu untersuchen. Bei 99 Patienten gelang die mikrobiologische Anzucht des *H. pylori* aus Zellkulturen und die Bestimmung der Anti-*H. pylori*-IgG und Anti-CagA-IgG im Serum. Das *cagA* und der EPIYA-Status wurden bei 93 Patienten nachgewiesen. Das Patientenkollektiv enthielt ausschließlich das Western CagA-Protein. Unsere Analysen zeigten enorme Variationen der EPIYA-Motive, enthüllten eine hohe genetische Variabilität des Bakteriums und zeigten eine hohe Prävalenz an Mischinfektionen. Eine Assoziation zwischen dem EPIYA-Status zum histopathologischen Befund und dem Anti-CagA-IgG-Status wurde nicht festgestellt. Wir konnten einen Zusammenhang in Bezug auf das Pathogenitätspotential zwischen dem *cagA*- und *vacA*-Genpolymorphismus identifizieren, sowie eine Abhängigkeit der Produktion CagA-spezifischer Antikörper vom *vacA*-Polymorphismus.

Schlüsselwörter: *H. pylori*, *cagA*-Gen, CagA-Protein, EPIYA-Motive, Anti-CagA-IgG, *vacA*

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	<i>H. pylori</i> : Historie, Epidemiologie und Transmission	1
1.2	<i>H. pylori</i> -assoziierte Erkrankungen	2
1.3	Diagnostik und Therapie der <i>H. pylori</i> -Infektion	4
1.4	Pathophysiologie und Mikrobiologie.....	5
1.5	Virulenzfaktoren des <i>H. pylori</i>	7
1.5.1	Die <i>cag</i> -Pathogenitätsinsel (<i>cag</i> -PAI)	8
1.5.2	Das Typ IV-Sekretionssystem (T4SS).....	9
1.5.3	Das CagA-Protein des <i>H. pylori</i> und die Variationen der EPIYA-Motive.....	12
1.5.5	Das Vakuolisierende Zytotoxin A (VacA)	16
1.5.6	Interaktionen zwischen dem VacA- und CagA-Protein.....	19
1.6	Die Immunantwort bei einer Infektion mit CagA-positiven <i>H. pylori</i> -Stämmen	20
1.7	Aufgabenstellung.....	21
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Studiendesign.....	22
2.2	Biopsie Protokoll und histopathologische Beurteilung.....	22
2.3	Diagnostik und Anzucht von <i>H. pylori</i>	23
2.4	ELISA zur Quantifizierung <i>H. pylori</i> spezifischer Antikörper	24
2.5	DNA Isolation aus <i>H. pylori</i>	26
2.6	Qualitative PCR zur Amplifikation <i>H. pylori</i> -spezifischer Gene	26
2.7	Agarosegelelektrophorese	28
2.8	Aufreinigung der PCR Produkte.....	28
2.9	Klonierung	29
2.9.2	Ligation.....	30
2.9.3	Transformation und Vermehrung positiver Klone	30
2.9.4	Plasmid Präparation	31
2.9.5	Qualitative PCR/Agarosegelelektrophorese	32
2.10	Sequenzierung	32
2.11	Computergestützte Analysen.....	33
2.12	Statistische Analyse.....	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Histopathologische Beurteilung des Biopsiebefundes in Abhängigkeit zur CagA Serologie	34
3.2	Identifikation des <i>cagA</i> -Gen bei Patienten mit oder ohne Anti-CagA-IgG.....	37
3.3	Nachweis der <i>vacA</i> -Varianten im Kontext mit der CagA-Serologie	39
3.4	Die Variabilität des CagA-Proteins in <i>H. pylori</i> -Stämmen	41
3.4.1	Analyse der EPIYA-Motive des CagA-Proteins.....	41
3.4.2	Klonierung und Sequenzanalyse	43
3.4.3	Demographische Datenanalyse.....	48
3.4.4	Variabilität des EPIYA-Status in den Biopsien aus Korpus und Antrum bei individuellen Patienten.....	49

3.4.5	Analyse des EPIYA-Status im Hinblick auf den histopathologischen Befund der Biopsien.....	50
3.4.6	Zusammenhang zwischen EPIYA-Status und <i>vacA</i> -Polymorphismus.....	52
4	Diskussion	54
4.1	Abweichungen zwischen <i>cagA</i> -Gen positiven <i>H. pylori</i> -Stämmen und der CagA-Serologie	55
4.2	Der <i>cagA</i> -Status und Validierung des Nachweisverfahrens CagA-spezifischer Antikörper	57
4.3	Die Assoziation zwischen CagA-spezifischen Antikörpern und dem Erkrankungsmuster im Wirt.....	58
4.4	Die Modulation der systemischen <i>H. pylori</i> -CagA Immunantwort durch bakterielle <i>vacA</i> -Varianten	58
4.5	Die hohe Prävalenz an Mischinfektionen und Diskussion möglicher Ursachen	59
4.6	Die Variation der EPIYA-Motive des <i>H. pylori</i> bei Patienten mit verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen	61
4.7	Der Einfluss von Mischinfektionen und anderen Virulenzfaktoren des <i>H. pylori</i> ...	64
5	Zusammenfassung	66
6	Literaturverzeichnis.....	67
7	Lebenslauf.....	84
8	Verzeichnis der Wissenschaftlichen Veröffentlichungen	85
9	Danksagung	87
10	Ehrenerklärung	88
11	Anhang	89

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Antrum/EPIYA-A
Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene
Alp	Adherence associated lipoprotein
ANOVA	Analysis of variance
Aqua dest	Aqua destillata
ATPase	Adenosintriphosphatase
BabA	Blood group antigen binding adhesin A
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Korpus/EPIYA-C
ca.	Circa
CAG	Chronisch atrophische Gastritis
<i>cagA</i>	Cytotoxin associated gene A (Gen)
CagA	Cytotoxin associated gene A protein (Protein)
CD44	Cluster of differentiation 44-Antigen, ein Glykoprotein
CG	Chronische Gastritis ohne Atrophie und ohne IM
CLO	Campylobacter Like Organism
c-Met	Mesenchymal epithelial transition factor
CM-Region	CagA multimerization region
COX	Cyclooxygenase
Crk	CT 10 Regulator of Kinase
Csk	C-terminal Src kinase
D	Dysplasie
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleotide
dup	Duodenal ulcer promoting gene

Abkürzungsverzeichnis

E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
ERA-NET	European Research Area Networks
F	Forward
FAK	Focal adhesion kinase
g	Gramm/Gravitationsbeschleunigung
glmM	Glomulin (Gen)
Grb2	Epidermal growth factor receptor-binding protein
GSH	Glutathion
GU	Ulkus ventriculi
<i>H. pylori</i>	Helicobacter pylori
HLA	Human Leukocyte Antigen
HopZ	Helicobacter outer membrane protein Z
HRP	Horseradish peroxidase
I	Incisura angularis
Ice	Induced by contact with epithelium
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IM	Intestinale Metaplasie
IPTG	Isoprpyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITP	Idiopathische Thrombozytopenische Purpura
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Lithiumborat
Le ^b	Lewis B
LOX	Lysyloxidase
M	Molar
MaCa	Magenkarzinom
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
MCL1	Myeloid cell leukemia 1
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/l)
mol	Stoffmenge
MotA	Motility protein A
MotB	Motility protein B

N	Normale Mukosa
Na	Natrium
NAP	Neutrophil-activating protein
NET	Neuroendokriner Tumor
NF-κB	Nuclear Factor-Kappa B
Nod1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
NTPasen	Nucleoside Triphosphatase
OipA	Outer inflammatory protein A
OMP	Outer membrane protein
PAI	Pathogenicity island
PAS	Periodic acis-Schiff reaction
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
PKC-δ	Proteinkinase C-Delta
PPI	Protonenpumpeninhibitor
PUD	Peptic Ulcer Disease
R	Reverse
ROS	Reactive Oxygen Species
SabA	Sialic acid binding adhesin A
SHP	Src homology phosphatase
Soc-Medium	Super Optimal Broth) + 20 mM Glucose
Src	Tyrosinproteinkinase (Akronym aus Sarcoma)
T4SS	Typ IV-Sekretionssystem
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TLR1	Toll-like-receptor 1
TMB	Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
USA	United States of America
UV	ultraviolet
V	Volt
<i>vacA</i>	Vacuolating cytotoxin A (Gen)
VacA	Vacuolating cytotoxin A (Protein)
V-ATPase	Vacuolar-type H ⁺ -ATPase
Vir	Virulenz
vol%	Volumenprozent
WHO	Weltgesundheitsorganisation
X- β-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

1 Einführung

1.1 *H. pylori*: Historie, Epidemiologie und Transmission

Seit über einem Jahrhundert berichten Forscher aus unterschiedlichen Bereichen der Medizin über die Existenz spiralförmiger Bakterien in Mägen von Tieren und Menschen. Trotzdem blieb das Dogma eines sterilen Magens lange Zeit bestehen. Erst im Jahr 1984 gelang es den Wissenschaftlern B. Marshall und J. R. Warren *H. pylori* (ursprünglich *Campylobacter pyloridis*) in Magenbiopsien von Patienten mit chronisch-aktiver Gastritis zu identifizieren und einen Zusammenhang zwischen dem Bakterium, der chronischen Gastritis und der peptischen Ulkuskrankheit herzustellen (Marshall und Warren 1984). Das Pathogenitätspotential des Keimes wurde durch den Selbstversuch von B. Marshall belegt, der nach oraler Einnahme einer *H. pylori*-Suspension eine akute Gastritis entwickelte. „Koch`s- Postulate“ waren mit dem Nachweis des Bakteriums am Erkrankungsort, seiner Kultivierbarkeit und dem Beweis eines eindeutigen Pathogenitätszusammenhangs bestätigt (Marshall et al. 1985). Dafür wurden beide Forscher 2005 mit dem Nobelpreis in Physiologie und Medizin ausgezeichnet. Heute, über 30 Jahre nach dieser revolutionären Entdeckung ist bekannt, dass die Prävalenz der *H. pylori*-Infektion in der Weltbevölkerung ca. 50 % beträgt und das Bakterium bei der Entstehung vieler gastrointestinaler Erkrankungen eine Schlüsselrolle einnimmt. Insgesamt bestehen deutliche Unterschiede in der Prävalenz hinsichtlich geographischer Verteilung, Alter und sozioökonomischen Status der Patienten. In den Industrienationen liegt die Infektionsrate bei 40 %, während in den Entwicklungsländern mehr als 70 % der Menschen an einer *H. pylori*-Infektion leiden. In den Industrienationen ist die Prävalenz innerhalb einer Population durch eine altersabhängige Zunahme von ca. 1 % pro Lebensjahr als Ausdruck eines Geburtskohorteneffekts charakterisiert (Roosendaal et al. 1997; Tkachenko et al. 2007). Die Neuerkrankungsrate ist stark vom Lebensstandard und den hygienischen Bedingungen abhängig. In Entwicklungsländern, in denen sich die Hygienestandards in den letzten Jahrzehnten verbessert haben, zeigt sich die Inzidenz deutlich rückläufig. Dies wird an dem steigenden Altersgradienten einer *H. pylori*-Infektion in diesen Ländern deutlich, wobei ältere Menschen dort eine höhere Prävalenz für eine *H. pylori*-Infektion aufweisen, als junge Menschen (Korwin 2014). Die Übertragung von *H. pylori* erfolgt meist intrafamiliär im Kindesalter von Mensch zu Mensch über den oral-oralen, gastral-oralen oder den fäkal-oralen Weg (Kivi et al. 2005). Kontrovers wird auch eine Transmission über verschmutztes Trinkwasser im Rahmen einer fäkalen Kontamination diskutiert (Glynn et al. 2002;

Aguemon et al. 2005). Der Keim persistiert lebenslang. Eine spontane Ausheilung der Infektion mit *H. pylori* wird in weniger als 1 % registriert (Brown 2000).

1.2 *H. pylori*-assoziierte Erkrankungen

Die Infektion mit *H. pylori* ist mit einer Reihe von gastrointestinalen Erkrankungen vergesellschaftet. Die Kolonisation der Magenschleimhaut durch das Bakterium führt immer zu einer histologisch nachweisbaren akuten Gastritis mit Infiltration neutrophiler Granulozyten und anderen Entzündungszellen, wie Lymphozyten. Die überwiegende Anzahl der infizierten Patienten bleibt symptomlos und zeigt keine Komplikationen (Egan et al. 2007). Da die Übertragung des Keims hauptsächlich in den ersten beiden Lebensjahren stattfindet, ist der Kenntnisstand über diese Akute-Phase der Infektion begrenzt und beruht fast ausschließlich aus Probanden, die sich selbst durch orale Ingestion mit *H. pylori* infiziert haben (Aebischer et al. 2008). Die Post-Akut-Phase zeichnet sich durch verschiedene Formen der chronischen Gastritis aus, die sich in der Lokalisation unterscheiden und mit verschiedenen Erkrankungen einhergehen (Selgrad et al. 2014a). Die gastrale Säure- und Gastrinproduktion und die lokale Ausbreitung des *H. pylori* bestimmen dabei den chronischen Verlauf der Infektion. Amieva und El-Omar haben 2008 drei charakteristische Erscheinungsbilder der chronischen *H. pylori*-Infektion beschrieben, welche in *Abbildung 1.1* mit ihren histologischen, pathologischen und klinischen Manifestationen dargestellt sind (Amieva und El-Omar 2008). Die meisten Patienten mit einer chronischen *H. pylori*-Infektion entwickeln eine milde Mischgastritis mit einem komplikationslosen klinischen Verlauf ohne Nachweis von gastralen Atrophiezeichen. Die antrumprädominante Gastritis ist mit einer intakten oder erhöhten Säureproduktion assoziiert und durch keine oder eine nur sehr gering ausgeprägte Atrophie gekennzeichnet. Die antrumprädominante Gastritis mit Hyperchlorhydrie ist mit dem Krankheitsbild des Ulkus duodeni vergesellschaftet. Dem gegenüber steht die korpusprädominante Gastritis, die üblicherweise mit einer Hypochlorhydrie oder Achlorhydrie korreliert (Amieva und El-Omar 2008). Im Rahmen der chronischen Entzündung der Korpus Schleimhaut kann es zu einem Verlust der dort lokalisierten Magendrüsen kommen und damit zur Entwicklung einer atrophischen Gastritis, die wiederum in eine intestinale Metaplasie übergehen kann. Beide histomorphologischen Veränderungen sind prä-maligne Läsionen und können sich über Dysplasien zum Intestinalen Typ des Magenkarzinoms entwickeln. Deshalb wurde der *H. pylori* als erstes Bakterium weltweit im Jahr 1994 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zur Klasse 1 Karzinogen deklariert (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 1994). Die „CORREA-Kaskade“ beschreibt den sequenziellen Ablauf über Gastritis, atrophische Gastritis, intestinale Metaplasie und Dysplasie bis zum Karzinom (Correa et al. 2012). Sie verläuft allerdings nicht immer sequenziell und zeitlich strukturiert und insgesamt entwickeln nur 1-2 % aller *H. pylori*-Infizierten in ihrem Leben ein

Magenkarzinom (Selgrad et al. 2014a). Neben dem Intestinalen Typ ist der Diffuse Typ des Magenkarzinoms häufig ohne histologisch nachweisbare prämalige Vorstufen charakterisiert. Eine Assoziation mit einer *H. pylori*-Infektion ist beim Diffusen Magenkarzinom möglich, allerdings sind hier vor allem Umweltfaktoren, wie Rauchen, Alkohol, Nitratreiche Ernährung und andere Aspekte der Lebensweise prädisponierend (Selgrad et al. 2014a). Eine weitere *H. pylori* induzierte Erkrankung stellt das Ulkusleiden dar. *Ulkus ventriculi et duodeni* umfassen mit 15 % sogar den Hauptteil der *H. pylori* assoziierten Krankheitsbilder (Venerito et al. 2011). Patienten mit einem *Ulkus duodeni* sind mit einer antrumprädominanten Gastritis mit einer Hyperchlorhydrie ohne Atrophiezeichen vergesellschaftet und werden nach Amieva und El-Omar hinsichtlich des klinischen Erscheinungsbildes dem „*Ulkus duodeni*-Phänotyp“ zugeordnet. Der Entstehungsmechanismus des *Ulkus duodeni* lässt sich so erklären, dass die säureproduzierenden Parietalzellen, die vorrangig im Korpus des Magens lokalisiert sind, im Gegensatz zur antralen Mukosa von der Entzündung verschont und in Ihrer Funktion unbeeinträchtigt bleiben. Durch die lokale Freisetzung von Ammoniak durch die Urease des *H. pylori* wird im Antrum des Magens die Säurehemmung beeinträchtigt und die Freisetzung von Gastrin gefördert. Diese Kombination aus erhöhter Gastrinproduktion und reduzierter Hemmung der Säurebildung führt zur Ulkuserstehung im Duodenum (McColl et al. 2000; Hunt et al. 2015). Patienten mit einem *Ulkus duodeni* zeigen dabei keine Korpusatrophie und haben deshalb kein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Magenkarzinoms (Uemura 2003). Bei einem *Ulkus ventriculi* lässt sich zu Beginn ebenfalls eine chronische Gastritis ohne Atrophie identifizieren. Bei Persistenz der *H. pylori*-Infektion kann sich diese zu einer chronisch atrophischen Gastritis mit Hypochlorhydrie weiter entwickeln. Korpus und Antrum des Magens können gleichermaßen betroffen sein (McColl et al. 2000). Eine seltenere Erkrankung im Zusammenhang mit einer *H. pylori*-Infektion ist das MALT-Lymphom des Magens als Sonderform eines extranodalen Non-Hodgkin-Lymphoms. 0,1 % aller *H. pylori*-Infizierten können in Ihrem Leben an einem MALT-Lymphom erkranken (Selgrad et al. 2014a). Auch einige extragastrale Erkrankungen sind mit einer *H. pylori*-Infektion assoziiert. Dazu gehören kardiovaskuläre, neurologische und psychologische Erkrankungen, sowie Manifestationen im Bereich der Haut (Banić et al. 2012). Für die Idiopathische Thrombozytopenische Purpura (ITP) und die unklare Eisenmangelanämie ist ein gesicherter Zusammenhang beschrieben (Bai et al. 2009; Qu et al. 2010).

Chronische *H. pylori*-Infektion

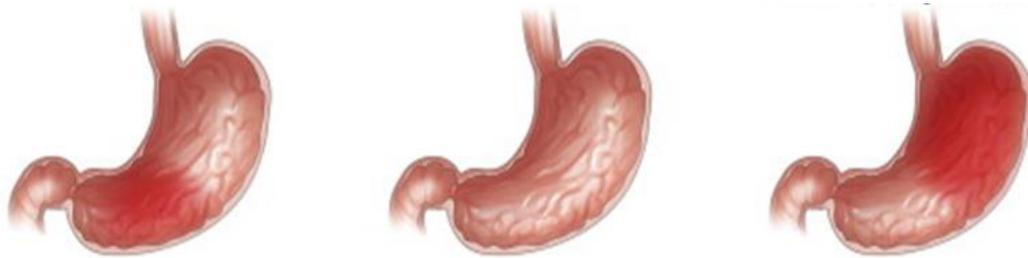


Abbildung 1.1: Pathophysiologische und klinische Charakteristika einer chronischen *H. pylori*-Infektion. Die Infektion mit *H. pylori* kann zu verschiedenen klinischen Manifestationen führen. Die Abbildung zeigt die histologischen, physiologischen und klinischen Auswirkungen in den drei Phänotypen (aus Amieva und El-Omar 2008).

1.3 Diagnostik und Therapie der *H. pylori*-Infektion

Heute existieren zum Nachweis einer *H. pylori*-Infektion effiziente Methoden, die sich in Sensitivität und Spezifität unterscheiden (Fischbach et al. 2009). Grundsätzlich werden nicht-invasive und invasive Verfahren differenziert. Der Harnstoff-Atemtest (^{13}C oder ^{14}C markiert), der Stuhl-Antigennachweis (auf Basis monoklonaler Antikörper) und der Antikörpernachweis im Serum (Anti-*H. pylori*-IgG, Anti-CagA-IgG) sind nicht-invasive Verfahren zur Identifikation des Bakteriums. Die endoskopisch-biopsische Methode als invasives Verfahren ermöglicht einen *H. pylori*-Nachweis mittels *Helicobacter*-Urease-Test, Histologie, Kultur und RT-PCR. Letztere zwei Methoden sind zwar ausreichend validiert (Juttner et al. 2004; Schwarzer et al. 2007), aber aufwendige und teure Verfahren, die deshalb nur bei besonderen Fragestellungen, wie Resistenzbestimmungen Anwendung finden. Keine der Testmethoden ist für sich absolut genau und aufgrund der niedrigen und weiter sinkenden Prävalenz der *H. pylori*-Infektion in Industrieländern (Roosendaal et al. 1997; Tkachenko et al. 2007) wird für eine zuverlässige *H. pylori*-Diagnostik das Vorliegen von zwei positiven Testergebnissen empfohlen (Fischbach et al. 2009). Die Kombination aus Urease-Schelltest und Histologie zur Identifikation des Keims ist geeignet, wenn Patienten eine Ösophago-Gastro-Duodenoskopie zum *H. pylori*-Nachweis bekommen.

Zeigen beide Verfahren diskrepante Ergebnisse, wird zusätzlich ein nicht-invasiver Test zur *H. pylori*-Diagnostik nötig. Häufig wird allerdings die Kombination aus histologischem *H. pylori*-Nachweis und das typische Bild einer *H. pylori*-Gastritis in der Endoskopie als ausreichend spezifisch angenommen (Fischbach et al. 2009).

Da die *H. pylori*-Infektion eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung verschiedener gastrointestinaler Erkrankungen zugeschrieben wird, ist eine effektive Eradikationstherapie des Bakteriums zur Reduktion der Krankheitsentstehung und des Krankheitsprogresses notwendig. Dabei scheint die Eradikationstherapie vor der Entstehung präneoplastischer Veränderungen im Bereich der Magenmukosa (intestinale Metaplasie, Atrophie) am wirksamsten zu sein (Selgrad et al. 2013). Die derzeit empfohlene Standard-Triple-Therapie ist charakterisiert durch die Gabe eines Protonenpumpeninhibitors (PPI) in Kombination mit Clarithromycin und Amoxicillin bzw. Metronidazol über 7 Tage. Die Kenntnis der lokalen Resistenzlage gegen die verwendeten Antibiotika ist dabei für die Auswahl des richtigen Therapiekonzeptes entscheidend. Der Hauptgrund für ein Therapieversagen sind eine zunehmende Widerstandsfähigkeit des *H. pylori* gegen die verwendeten Antibiotika, wobei genetische Modifikationen des Bakteriums als mögliche Ursache diskutiert werden (Wueppenhorst et al. 2009). Die Resistenzraten gegen Clarithromycin zeigen regionale Schwankungen und liegen derzeit in Deutschland bei ca. 10 % (Selgrad et al. 2013). Bei Vorliegen einer Clarithromycinresistenz sinkt die Effektivität der Standard-Triple-Therapie um bis zu 70 %. Deshalb sollte bei der Auswahl der richtigen Erstlinientherapie ein besonderes Augenmerk auf die lokale antibiotische Resistenzlage gegen Clarithromycin gelegt werden. Neben der Clarithromycinresistenz sind weitere Ursachen für den Verlust der Effizienz der Standard-Triple-Therapie bekannt. Ein erhöhter Body-Mass-Index und Aspekte der Lebensgewohnheiten, wie das Rauchen der Patienten sind für einen Effizienzverlust verantwortlich (Suzuki et al. 2006; Abdullahi et al. 2008). Da heute wirksame Methoden zur Diagnostik und zur Therapie einer *H. pylori*-Infektion vorliegen, hat sich die Forschung in den letzten Jahren besonders auf die Aufklärung molekularer Mechanismen *H. pylori*-induzierter Erkrankungen fokussiert. Im Zentrum stehen dabei Analysen hinsichtlich Wirts- und *H. pylori*-spezifischer Virulenzfaktoren und deren Einfluss auf die Entstehung gastrointestinaler Erkrankungen.

1.4 Pathophysiologie und Mikrobiologie

Die *H. pylori*-Infektion ist der Hauptrisikofaktor für die Entstehung des nicht-kardialen Adenokarzinoms des Magens. Trotzdem entwickeln nur ca. 1-2 % der Infizierten ein solches Malignom (Selgrad et al. 2014a). Verantwortlich hierfür sind komplexe Interaktionen zwischen bakteriellen Virulenzfaktoren, Wirtsfaktoren und Umwelteinflüssen (Abbildung 1.2; Amieva und El-Omar 2008). Des Weiteren sind eine Vielzahl von *H. pylori*-Stämmen

bekannt. Durch ihre hohe genetische Variabilität unterscheiden sie sich in der Existenz, der Expression und in den Isoformen ihrer Virulenzfaktoren (Suerbaum und Josenhans 2007). Dies führt dazu, dass jeder Stamm ein individuelles entzündliches Potential aufweist. Die molekulargenetischen Unterschiede erschweren das Verständnis über das Zusammenspiel zwischen Bakterium, Wirtsorganismus und gastrointestinaler Erkrankung.

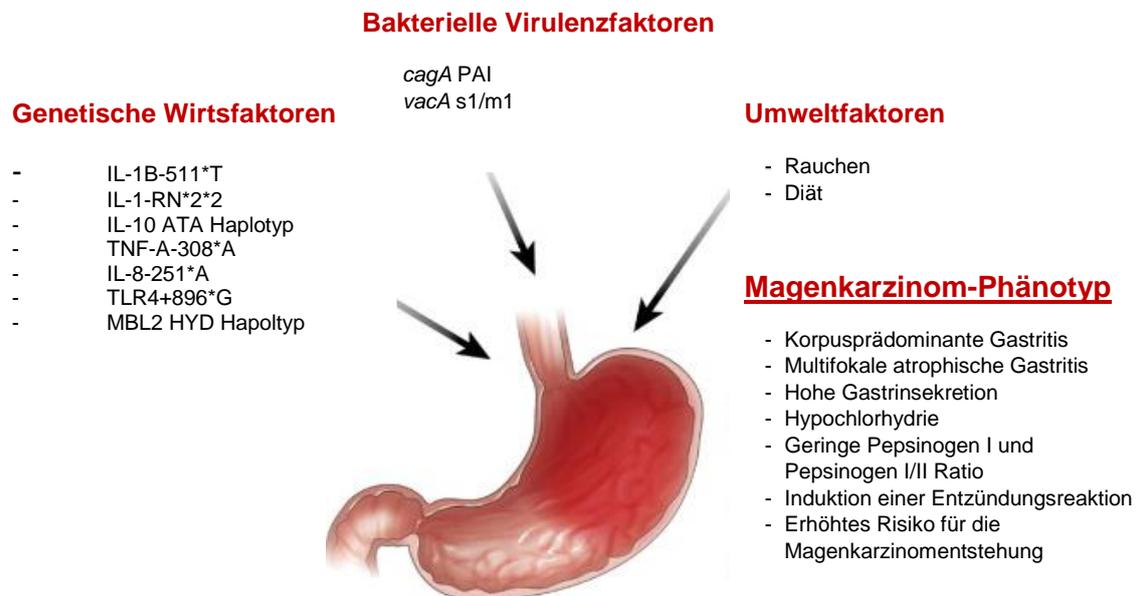


Abbildung 1.2: Einfluss von genetischen Wirts-, bakteriellen Virulenz- und Umweltfaktoren auf die *H. pylori*-induzierte gastrale Entzündungsreaktion und Tumorgenese. Das Zusammenspiel dieser Gegebenheiten führt im Magen des *H. pylori*-Infizierten zu einem Krankheitsgeschehen, welches mit einer chronischen Entzündungsreaktion, Hypochlorhydrie, bakterieller Überwucherung und toxischem Stress einhergeht und letztendlich über metaplastische und dysplastische Zellveränderungen in der Entstehung eines Magenkarzinoms münden kann (aus Amieva und El-Omar 2008).

H. pylori ist ein Gramnegatives, spiralförmiges Bakterium, welches auf die menschliche Magenschleimhaut spezialisiert ist. Der im Lumen des Magens vorherrschende pH-Wert von 2 macht ihn physiologisch zu einem lebensfeindlichen Ort. Da *H. pylori* nur ca. 30 min im Magenlumen überlebt (Schreiber et al. 2005), hat das Bakterium verschiedene Mechanismen entwickelt, um schnellstmöglich die pH-neutrale Schleimschicht der Magenmukosa zu erreichen. Der Mikroorganismus verfügt über das Enzym Urease, das durch hydrolytische Harnstoffspaltung Ammoniak und Kohlendioxid freisetzt. Dies schützt den Keim bei kurzfristiger Exposition mit der Magensäure (O'Toole et al. 2000). Die Kombination aus Chemotaxis und Motilität durch Flagellen ermöglicht die effektive Besiedlung des Magens (Keilberg und Ottemann 2016). Mit Hilfe der Fähigkeit Konzentrationsgradienten verschiedener Stoffe, wie Harnstoff (Huang et al. 2015) und Metalle (Sanders et al. 2013) zu erkennen, kann das Bakterium die Lokalisation der Magenepithelzellen identifizieren und sich durch seine helikale Struktur und den drei bis acht unipolaren Flagellen in Richtung der schützenden Schleimhautschicht fortbewegen.

Jedes Flagellum besteht aus 25-30 Proteinen, die auch in anderen Gramnegativen Bakterien nachgewiesen wurden (Lertsethtakarn et al. 2011). Um die Rotation der Flagellen zu gewährleisten sind Motorproteine, wie MotA und MotB essentiell. *H. pylori*-Stämme mit funktionslosen MotB können sich nicht fortbewegen und somit nicht das Magenepithel besiedeln (Ottemann 2002). Neben der Urease, der Chemotaxis und den Flagellen verfügt *H. pylori* über zahlreiche weitere Pathogenitätsfaktoren, deren Charakteristika und Funktionen in den nachfolgenden Abschnitten der Einführung erläutert werden.

1.5 Virulenzfaktoren des *H. pylori*

Für die Adhärenz an Epithel- und Immunzellen besitzt *H. pylori* über 30 Proteine in der äußeren Bakterienmembran, die als OMPs (Outer membrane Proteins) bezeichnet werden. Das BabA-Protein (Blood group antigen binding adhesin A) war das erste *H. pylori*-Adhesin, welches identifiziert wurde. Es ist zur Anhaftung an die Wirtszelle befähigt, in dem es mit fucosylierten Lewis B-Blutgruppenantigenen (Le^b), welche zahlreich von gastrointestinalen Epithelien exprimiert werden, interagiert (Ilver et al. 1998). Innerhalb der Wirtszelle löst das BabA-Protein Le^b-abhängig durch Rekrutierung von Zytokinen eine proinflammatorische Immunantwort aus und ist an der Erhöhung der Konzentration des CagA-Proteins, einem der bedeutendsten Virulenzfaktoren des *H. pylori*, in der Zelle beteiligt (Ishijima et al. 2011). Das äußere Membranprotein SabA (Sialic acid binding adhesin A) bindet an sialisierte Glykoproteine vom Sialyl-Lewis^a und Sialyl-Lewis^x-Typ. Es wird vermutet, dass die Interaktion zwischen dem SabA-Protein und diesen Antigenen zu einer verstärkten Adhäsion des Bakteriums an der Wirtszelle und Progression der Entzündungsreaktion führt (Mahdavi et al. 2002). Das SabA-Protein wird außerdem mit der Entstehung gastrointestinaler Erkrankungen, wie der Metaplasie und Atrophie der gastralen Mukosa, sowie dem Magenkarzinoms in Zusammenhang gebracht (Yamaoka et al. 2006). Das HopZ-Protein (Helicobacter outer membrane protein Z) ist wie das BabA- und das SabA-Protein an der Oberfläche des *H. pylori* lokalisiert und fungiert als Adhesin. Der Wirtszelloberflächenrezeptor ist noch nicht bekannt (Backert et al. 2011). Die Transkription des hopZ-Gens wird durch verschiedene äußere Faktoren, wie dem pH-Wert beeinflusst (Merrell et al. 2003). Das Oberflächenprotein OipA (Outer inflammatory protein A) wurde als Adhesin in Magenkarzinomzelllinien nachgewiesen (Yamaoka et al. 2006). *H. pylori*-Stämme mit dem Oberflächenprotein OipA führen zu einer deutlich höheren Expression des pro-inflammatorischen Chemokins IL-8 in infizierten Wirtszellen und haben ein erhöhtes Risiko für die Entstehung gastroduodenaler Ulcera und dem Magenkarzinom (Yamaoka et al. 2006). *In vitro* Versuche der Forschungsgruppe um Odenbreit haben die homologen Proteine AlpA und AlpB (Adherence associated lipoprotein A/B) nachgewiesen und ihre Rolle als Adhärenzvermittler identifiziert. Nach Gabe eines Antiserums konnte sich *H. pylori* nicht mehr an Gewebeschnitte von menschlichen Magenepithelzellen binden (Odenbreit et

al. 1999). Außerdem wurde die Anhaftungsfunktion des *H. pylori* durch Deletionen im alpA- und alpB-Gen stark verringert (Odenbreit et al. 2002). Neben der Gruppe der Oberflächenproteine existieren weitere Pathogenitätsfaktoren des *H. pylori*, wie das dupA (Duodenal ulcer promoting gene) und das IceA (Induced by contact with epithelium A), auf die nicht im Detail eingegangen werden kann (Shiota et al. 2013; Talebi Bezmin Abadi 2014). Im Folgenden werden zwei der bedeutendsten Virulenzfaktoren des *H. pylori*, das CagA-Protein (Cytotoxin associated gene A) und das VacA-Protein (Vacuolating cytotoxin A) beschrieben. Dabei ist das Verständnis über sogenannte bakterielle Pathogenitätsinseln und Sekretionssysteme für die Existenz, Expression, Variabilität und Pathogenität des CagA-Proteins essentiell.

1.5.1 Die *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI)

Eine Pathogenitätsinsel (PAI) ist eine chromosomale Region mit einer Größe von 10-200 kb, welche zumeist Gene enthält, die für Virulenzfaktoren kodieren, die spezifisch bei pathogenen Bakterienstämmen vorkommen. Apathogene Bakterien oder verwandte Spezies besitzen keine PAI. Die Identifizierung von Pathogenitätsinseln ist durch moderne Gensequenzierungen möglich. Pathogenitätsinseln kodieren z.B. für Proteine, die spezialisierte Sekretionssysteme bilden, welche Effektormoleküle in die Wirtszelle und deren Umgebung befördern können. Weltweit verfügen 50-70 % der *H. pylori*-Stämme über eine Pathogenitätsinsel in ihrem Genom, die als *cag*-PAI bezeichnet wird. Dieses 40 kb DNA-Segment enthält das *cagA*-Gen, wonach die Pathogenitätsinsel benannt wurde (Censini et al. 1996), sowie Gene für ein Typ IV-Sekretionssystem (T4SS) und eine variable Anzahl weiterer Gene (Kutter et al. 2008; Fischer 2011). Für die Existenz der *cag*-PAI ergeben sich geographische Unterschiede. Epidemiologische Studien zeigen, dass in Ostasien, wo auch die Inzidenz für das distale Magenkarzinom sehr hoch ist, die Prävalenz *cagA*-Gen positiver *H. pylori*-Stämme fast 100 % beträgt, während in westlichen Industrienationen nur 40-80 % aller Bakterienstämme das *cagA*-Gen und damit die *cag*-PAI besitzen (Yamaoka 2010). Es wird vermutet, dass die *cag*-PAI ursprünglich durch horizontalen Gentransfer in das *H. pylori*-Genom eingeschleust wurde (Censini et al. 1996; Covacci et al. 1999; Hatakeyama 2009). Die schnelle Insertion von fremder DNA in *H. pylori* hat zu einer enormen genetischen Variabilität in den Bakterienstämmen geführt und ermöglichte gleichzeitig eine optimale Anpassung des *H. pylori* an die Magenmukosa des Wirts (Suerbaum et al. 1998; Israel et al. 2001; Suerbaum und Josenhans 2007; Olbermann et al. 2010). Je nach Existenz der *cag*-PAI ergeben sich Variationen bezüglich der Virulenz der *H. pylori*-Stämme. Generell führt eine Infektion mit einem *cag*-PAI/*cagA*-Gen positiven Stamm (*cagA*+) im Vergleich zu *cag*-PAI/*cagA*-Gen negativen Stämmen (*cagA*-) zu einer verstärkten Entzündungsreaktion und ist mit einem schwereren Krankheitsgeschehen vergesellschaftet. Experimente am Mongolischen-Gerbil-Modell haben gezeigt, dass eine

Infektion mit *H. pylori*-Wildtypstämmen zu dysplastischen Zellveränderungen und der Entwicklung von Magenkarzinomen führen, während isogene Mutanten, die eine defekte *cag*-PAI besaßen, keine dieser Gewebeveränderungen aufwiesen (Rieder et al. 2005; Franco et al. 2008). Diese Erkenntnisse wurden von der Forschungsgruppe um Ohnishi im Mausmodell bestätigt (Ohnishi et al. 2008) und ließen die Schlussfolgerung zu, dass das CagA-Protein ein Effektorprotein mit onkogenem Potential ist. Die Forschungsgruppe um Hanada hat publiziert, dass Patienten, die mit einem *cagA*-Gen positiven *H. pylori*-Stamm infiziert sind, aufgrund der höheren Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen sogar ein doppelt so hohes Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms aufweisen, als *cagA*-Gen negative Patienten (Hanada et al. 2014). Neben dem Einfluss auf die Tumorgenese ist bei der Infektion mit *cag*-PAI/*cagA*+-Stämmen auch das Risiko für gastroduodenale Ulcera erhöht (Nilsson et al. 2003).

1.5.2 Das Typ IV-Sekretionssystem (T4SS)

Zahlreiche Gramnegative Bakterien verfügen über Typ IV-Sekretionssysteme (T4SS), welche als multimolekulare Konjugationssysteme den Im- und Export von DNA und/oder Proteinen ermöglichen (Cascales und Christie 2003; Tegtmeyer et al. 2011). Neben dem *H. pylori* wurden T4SS auch in *Agrobakterien*, *Bordetella*, *Bartonella* und *Legionellen* identifiziert. Das T4SS jeder dieser bakteriellen Spezies ist einzigartig. Die Grundstruktur jeder Sekretionseinheit besteht aus drei Proteinkomplexen. Das am besten charakterisierte T4SS ist das VirB- oder T-DNA-Transfersystem des *Agrobacterium tumefaciens*. Es setzt sich aus 11 VirB-Proteinen und einem membranassoziierten Kopplungsprotein namens VirD4 zusammen. Die VirB-Proteine 6-10 bilden den Transmembrankanale, der die Stabilisierung und den Transport der Effektormoleküle ermöglicht und den Transferpilus verankert. Der Transferpilus besteht aus den VirB-Proteinen 2,3 und 5. Der dritte Proteinkomplex fungiert als Energielieferant und setzt sich aus den NTPasen VirB4 und VirB11 zusammen (Christie 1997; Tegtmeyer et al. 2011). Das T4SS des *H. pylori* besteht analog zum Sekretionssystem des *Agrobacterium tumefaciens* aus 11 VirB-Homologen, energieliefernden Komponenten und einem VirD4-ähnlichen Kopplungsprotein. Das Modell des T4SS eines *cag*-PAI-positiven *H. pylori*-Stammes ist schematisch in *Abbildung 1.3* illustriert (Kutter et al. 2008; Fischer 2011). Über 20 Gene der *cag*-PAI kodieren für das T4SS des *H. pylori*. Umfangreiche Studien mit isogenen Mutanten von *H. pylori* haben 15 essentielle Gene innerhalb der *cag*-PAI identifiziert, die Komponenten des T4SS kodieren, die für die Translokation von CagA-Proteins zuständig sind (Tohidpour 2016). Dazu gehören *cagA*, *cagB*, *cagC*, *cagD*, *cagE*, *cagF*, *cagG*, *cagH*, *cagI*, *cagJ*, *cagK*, *cagL*, *cagM*, *cagN*, *cagO*, *cagP*, *cagQ*, *cagR*, *cagS*, *cagT*, *cagU*, *cagV*, *cagW*, *cagX*, *cagY*, *cagZ*, *cagA*, *cagB*, *cagC*, *cagD*, *cagE* und *cagC*. Zusätzlich wurden drei nicht essentielle Gene gefunden (*cagN*, *cagG* und *cagD*), welche diese Mechanismen unterstützen. Außerdem existieren drei weitere Gene (*cagB*, *cagF* und *cagZ*), deren Proteinprodukte als Translokationsfaktoren fungieren. Das

Translationsprodukt CagF bindet an den C-Terminus des CagA-Proteins und stabilisiert als Chaperon dessen Struktur (Pattis et al. 2007). Es sind zusätzlich weitere Gene, wie z.B. *cagS*, *cagQ* und *cagP* bekannt, deren Funktion ihrer Proteinprodukte im T4SS noch nicht abschließend geklärt ist. Es wird vermutet, dass diese Gene für Proteine kodieren, die akzessorische Proteinkomponenten des T4SS darstellen (Fischer 2011). Der Transmembrankomplex des *H. pylori*-T4SS besteht aus den 3 Hauptproteinen CagT, CagX und CagY. CagT ist ein großes Lipoprotein, welches an den äußeren Membranproteinkomplex aus CagX, CagM und Cag δ bindet (Fischer 2011). CagM und Cag δ besitzen beide am N-terminalen Ende Signalpeptide und sind mit der äußeren bakteriellen Membran assoziiert. CagY interagiert unter Bindung an das CagX mit dem CagT/CagX/CagM/Cag δ -Komplex (Kutter et al. 2008). CagY kann als Ligand des T4SS fungieren und an den Integrin- β 1 Rezeptor binden, der an der Oberfläche der Wirtszelle lokalisiert ist (Jiménez-Soto et al. 2009). Vergleichende Analysen des T4SS von *H. pylori* und dem *Agrobacterium* haben gezeigt, dass die zwei Proteine Cag γ und CagV als lytische Transglykosidasen initial die Peptidoglykane der Wirtszellmembran auflösen und somit die Lokalisation des T4SS ermöglichen (Fischer 2011). Vor der Ausbildung des Transferpilus des T4SS wird durch die Proteine CagW, CagU und CagH eine Membranpore in der inneren Plasmamembran des *H. pylori* geformt (Kutter et al. 2008; Fischer 2011). An der zytoplasmatischen Seite der inneren Membran sind die Proteine CagE und Cag α lokalisiert, die als ATPasen der Energiebereitstellung des T4SS dienen (Kutter et al. 2008). Die Struktur des äußeren Faltblattes des T4SS wird hauptsächlich durch ein akzessorisches Protein namens CagC (Andrzejewska et al. 2006) und anderen Proteinen, wie CagY, CagT, CagX und CagL gebildet (Rohde et al. 2003; Tanaka et al. 2003; Kwok et al. 2007). Das CagL scheint dabei essentiell für die Translokation des CagA-Proteins und die IL-8 Induktion zu sein, da Mutationen im zugehörigen Gen zu einem Verlust dieser Fähigkeiten führten (Fischer et al. 2001). Nach der Formierung des gesamten Komplexes ist das T4SS des *H. pylori* als spritzenartiger Apparat zur Sekretion des CagA-Proteins und löslicher Komponenten der Peptidoglykane in das Zytosol der Wirtszelle fähig. Die Peptidoglykane können an das intrazellulär lokalisierte Protein Nod1 (Viala et al. 2004) binden und zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Nuclear factor kappa B) führen und die Überexpression von IL-8 (Atherton 2006) induzieren. Nicht nur die durch das T4SS des *H. pylori* sezernierten Peptidoglykane, sondern auch das CagA-Protein selbst scheint die Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B und somit die anschließende Freisetzung von IL-8 in Epithelzellen zu stimulieren. Das CagA-Protein induziert in der Wirtszelle die Translokation der NF- κ B p65-Untereinheit in den Zellkern der Epithelzelle. Durch das transaktivierende Potential dieser Untereinheit wird der IL-8 Promoter aktiviert und die Expression und Freisetzung von IL-8 in das Magenlumen stimuliert (Brandt et al. 2005; Kim et al. 2006). Die CagA-induzierte Aktivierung des NF- κ B erfolgt über verschiedene Signaltransduktionswege, u.a. über die Bindung des CagA-Proteins an das Adapterprotein

Grb2 (Mimuro et al. 2002), der Proteinkinase C Delta (PKC- δ) (Brandt et al. 2009) und der Tyrosinrezeptorkinase c-Met (Oliveira et al. 2009). PKC- δ wird als einer der Hauptsignalmediatoren der CagA-induzierten Pathogenese des *H. pylori* im Magenepithel betrachtet (Brandt et al. 2009) und die Aktivierung der c-Met induziert die Expression einer Vielzahl von Genen, die zur Freisetzung von Zytokinen (TNF, IL-1, IL-8, Chemokine), Enzymen (COX-2, 5-LOX), Angiogenese-Faktoren und letztendlich zu einer Magenschleimhautentzündung führt (Suzuki et al. 2015). Ein intaktes T4SS scheint grundsätzlich die Besiedlung mit *H. pylori* zu fördern, denn *in vivo* Versuche im Mausmodell haben gezeigt, dass eine Inaktivierung von Genen, die für Proteinkomponenten des T4SS kodieren, zu einer deutlich reduzierten Infektionsrate im Vergleich zu einer Kolonisation mit dem *H. pylori*-Wildtyp führte (Hilleringmann et al. 2006).

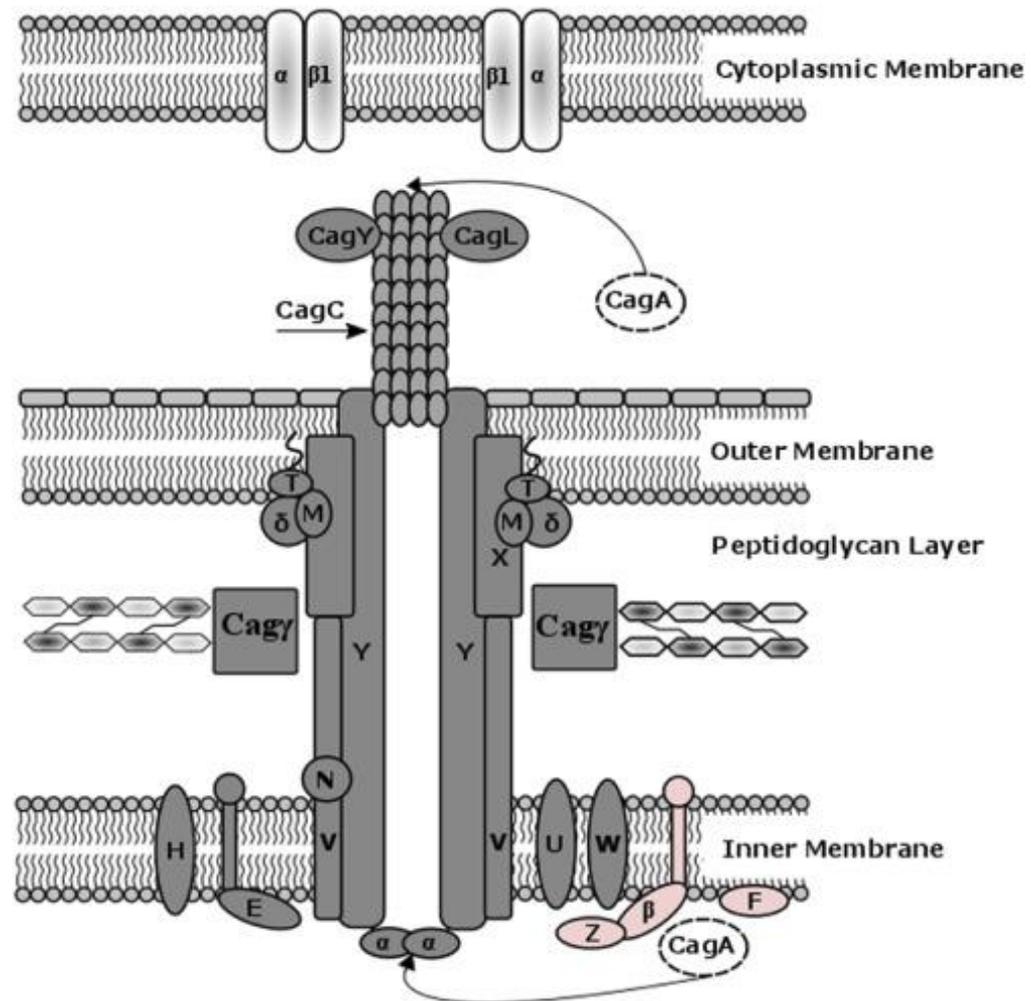


Abbildung 1.3: Modell des Typ IV-Sekretionssystems (T4SS) eines cag-PAI positiven *H. pylori*-Stammes. Das T4SS durchzieht die Innere (Inner Membrane) und Äußere (Outer Membrane) Membran des Bakteriums und bildet eine funktionelle Einheit aus Proteinkomponenten, die für die Translokation der Effektormoleküle essentiell sind. Der Transmembrankomplex, ein Transferringang und die energieliefernden Komponenten CagE und CagA sind dunkelgrau markiert. Sie bilden die 3 Hauptbestandteile des T4SS und setzen sich aus verschiedenen Proteinuntereinheiten zusammen. Die Translokationsfaktoren sind rosa abgebildet. Überlappende dargestellte Komponenten zeigen Interaktionen zwischen den Untereinheiten des T4SS. Das Effektorprotein CagA wird über den Translokationsapparat des T4SS sezerniert. Die Integrin-Rezeptoren α und $\beta 1$ sind in der Zytoplasmamembran (Cytoplasmic Membrane) der Wirtszelle lokalisiert und vermitteln die Assoziation mit dem T4SS des *H. pylori*. Die Struktur des T4SS ist noch nicht abschließend geklärt, da die Funktion einiger Proteinkomponenten bisher nicht erschlossen wurde (aus Kutter et al. 2008; Fischer 2011).

1.5.3 Das CagA-Protein des *H. pylori* und die Variationen der EPIYA-Motive

Das *cagA*-Gen kodiert für ein 120-145 kDa großes Protein namens CagA (Cytotoxin-associated gene A). Der C-Terminus des CagA-Proteins ist durch eine variable Region charakterisiert und weist Ähnlichkeiten zu eukaryotischen Proteinsequenzen auf. Dadurch wird das Protein nach Translokation in die Wirtszelle weder als fremd erkannt, noch abgebaut. An der Plasmamembran der Wirtszelle wird sezerniertes CagA-Protein an den Tyrosinresten der sogenannten EPIYA-Motive durch intrazelluläre Src- und Abl-Kinasen

phosphoryliert (Backert und Selbach 2005; Hayashi et al. 2013). Das EPIYA-Motiv am C-terminalen Ende des CagA-Proteins besteht aus der sich wiederholenden Aminosäuresequenz Glutamin-Prolin-Isoleucin-Tyrosin-Alanin. Die EPIYA-Motive weisen Unterschiede in der Anzahl der Wiederholungen und in den flankierenden repetitiven Aminosäuresequenzen auf. Hinsichtlich der geographischen Verteilung CagA-positiver *H. pylori*-Stämme und der flankierenden Sequenzen der Aminosäuren wurden vier Segmente des EPIYA-Motivs identifiziert, welche als EPIYA-A,-B,-C und -D bezeichnet werden (*Abbildung 1.4*; (Hatakeyama 2004; Backert und Tegtmeyer 2010). Die EPIYA-A- und -B-Motive kommen bei allen *cagA*-Gen positiven Stämmen vor, während das C-Motiv hauptsächlich in Stämmen charakterisiert wurde, welche in der USA, Europa, Australien und in einigen westasiatischen Ländern wie Malaysia und Indien verbreitet sind. Diese *H. pylori*-Stämme aus der westlichen Welt (Western CagA) können zwischen 0 und 5 C-Motive aufweisen, wobei ein singuläres C-Motiv (EPIYA-ABC) am Häufigsten vorkommt (Sgouras et al. 2009; Yadegar et al. 2015). *H. pylori*-Stämme in China, Japan und Korea werden durch CagA-Proteine mit EPIYA-Motiven vom A-B-D-Typ charakterisiert (East-Asian CagA), wobei das D-Motiv bis zweifach vorliegen kann. Die Variationen der EPIYA-Motive hinsichtlich regionaler Unterschiede sind in der *Abbildung 1.5* illustriert. Die EPIYA-A- und -B-Motive werden im Gegensatz zu C- und D-Motiven nur schwach phosphoryliert (Hatakeyama 2004; Backert und Tegtmeyer 2010). Die Src- und Abl-Kinasen werden in einer strukturierten Abfolge aktiviert. Zuerst phosphorylieren die Src-Kinasen die EPIYA-C(D)-Motive. In der Post-Akut-Phase der bakteriellen Infektion phosphorylieren die Abl-Kinasen jedes EPIYA-Motiv (Mueller et al. 2012). Das phosphorylierte CagA-Protein interagiert anschließend mit einer Vielzahl von intrazellulären Proteinen, wie z.B. mit der SHP-2-Tyrosinphosphatase (Higashi et al. 2002), der Tyrosinkinase Csk (Tsutsumi et al. 2003) und den Adapterproteinen Crk (Suzuki et al. 2005) und Grb2 (Selbach et al. 2009). Diese Wechselwirkungen induzieren einerseits zahlreiche Signaltransduktionswege, die zu Veränderungen der Zellpolarität, Zellsekretion, Zellmotilität und der Zellproliferation führen und andererseits die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Wroblewski et al. 2010; Murata-Kamiya 2011). Beispielsweise führt die Bindung der Tyrosinphosphatase an die phosphorylierten EPIYA-C- und -D-Motive des CagA-Proteins zur Aktivierung der SHP-2-Tyrosinphosphatase, wobei das EPIYA-D-Motiv eine höhere Bindungsaffinität zeigt (Higashi et al. 2002). Die aktivierte SHP-2 ermöglicht die Dephosphorylierung und Inhibition einer fokalen Adhäsionskinase (FAK) (Tsutsumi et al. 2003). Die FAK beeinflusst Zelladhäsions- und Zellmigrationsprozesse. So führt eine verminderte Aktivität u.a. zum Umbau des Zytoskeletts. Diese zelluläre Veränderung bewirkte in Zellinfektionsversuchen mit CagA-Protein positiven *H. pylori*-Stämmen eine Zellelongation und die Entwicklung nadelähnlicher Fortsätze, was als „Hummingbird-Phänotyp“ bezeichnet wird (Tsutsumi et al. 2006; Murata-Kamiya 2011). Auch das nicht-phosphorylierte CagA-Protein zeigt zahlreiche Wechselwirkungen mit intrazellulären Komponenten, wie u.a. mit dem

Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin, dem Cyclin-D1 und der Matrix-Metalloproteinase-1. Die Interaktion von nicht-phosphoryliertem CagA-Protein mit E-Cadherin, welches über α - und β -Catenin mit dem Aktinzytoskelett interagiert, führt zur Zerstörung der „Adherence Junctions“ in polarisierten Epithelzellen. Dies wird durch die Inhibition der E-Cadherin/ β -Catenin Komplexbildung und die Anreicherung von β -Catenin im Zytoplasma und im Zellkern hervorgerufen (Murata-Kamiya et al. 2007). Das kumulierte β -Catenin im Zellkern induziert durch die Bindung an Transkriptionsfaktoren, die in den Wnt-Signaltransduktionsweg eingeschaltet sind, die Transkription von Genen, die bei der Tumorgenese eine entscheidende Rolle spielen (Franco et al. 2005; Murata-Kamiya et al. 2007). Das CagA-Protein greift auch direkt in den Zellzyklus der Wirtszelle ein, indem es die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Cyclin-D1 und der Matrix-Metalloproteinase-1 stimuliert und so die Lebenszeit der infizierten Zellen verlängert (Chang et al. 2006; Pillinger et al. 2007). Insgesamt scheint die Variabilität innerhalb der EPIYA-Motive des CagA-Proteins einen Einfluss auf das Pathogenitätspotential der *H. pylori*-Stämme zu besitzen. Dieser Aspekt wird aktuell kontrovers diskutiert. Während beispielsweise die Forschungsgruppe um Acosta keine Assoziation zwischen dem CagA-Polymorphismus und der Pathogenität des *H. pylori* nachgewiesen haben (Acosta et al. 2010), zeigten Untersuchungen von Ferreira 2012, dass mit Zunahme der Anzahl an EPIYA-C-Motiven das Risiko für gastrale Neoplasien steigt (Ferreira et al. 2012c). *In vitro* Experimente an AGS-Zellen von Varizi et al. bestätigten diese Erkenntnisse und konnten nachweisen, dass eine Infektion dieser Zellen mit CagA-Protein positiven *H. pylori*-Stämmen vom EPIYA-ABCCC-Typ im Gegensatz zum EPIYA-ABC-Typ die Transkription einer Vielzahl von Genen induzierte, die bei der Tumorgenese des Magenkarzinoms eine Schlüsselrolle einnehmen. Des Weiteren konnte auch eine verstärkte Stimulation der IL-8-Produktion und Modifikationen Crk-abhängiger Proteine, die bei der Apoptose der Zellen eine Rolle spielen, nachgewiesen werden (Argent et al. 2008a; Vaziri et al. 2015). Die Forschungsgruppe um Papadakos konnte ebenfalls feststellen, dass die Existenz von terminalen EPIYA-Phosphorylierungsmotiven in *H. pylori* cagA-Gen positiven Stämmen zur IL-8-Sekretion beiträgt, allerdings unabhängig von der Anzahl ihrer Wiederholungen (Papadakos et al. 2013). Das Ziel der Dissertation ist es den cagA-Genpolymorphismus und die die Variationen der EPIYA-Motive zu identifizieren und ihren Einfluss auf die Krankheitsentstehung näher zu beleuchten, um anschließend die Ergebnisse mit anderen Forschungsarbeiten zu vergleichen und intensiv zu diskutieren.

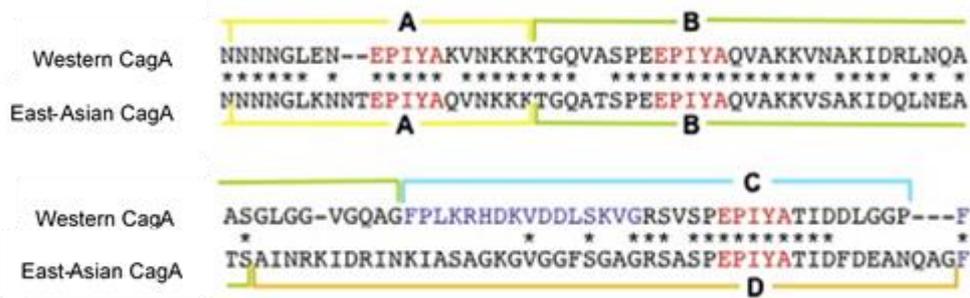


Abbildung 1.4: Darstellung der EPIYA-Motive des CagA-Proteins abhängig von der geographischen Herkunft des *H. pylori*-Stammes. Weltweit wurden mit dem A-, B-, C-, und D-Segment 4 Komponenten der EPIYA-Motive identifiziert. Western CagA-Proteine sind durch EPIYA-Motive mit A-, -B- und -C-Segmenten charakterisiert. *H. pylori*-Stämme der East-Asian CagA-Proteine beinhalten EPIYA-A-, -B- und -D-Motive, besitzen aber kein C-Segment am C-Terminus ihres CagA-Proteins. Die EPIYA-Motive bezeichnen Phosphorylierungsstellen der Src- und Abl-Tyrosinkinasen. Anschließend kann das phosphorylierte CagA-Protein mit einer Vielzahl von Molekülen, interagieren und morphologischen Wirtszellveränderungen induzieren (aus Murata-Kamiya 2011).

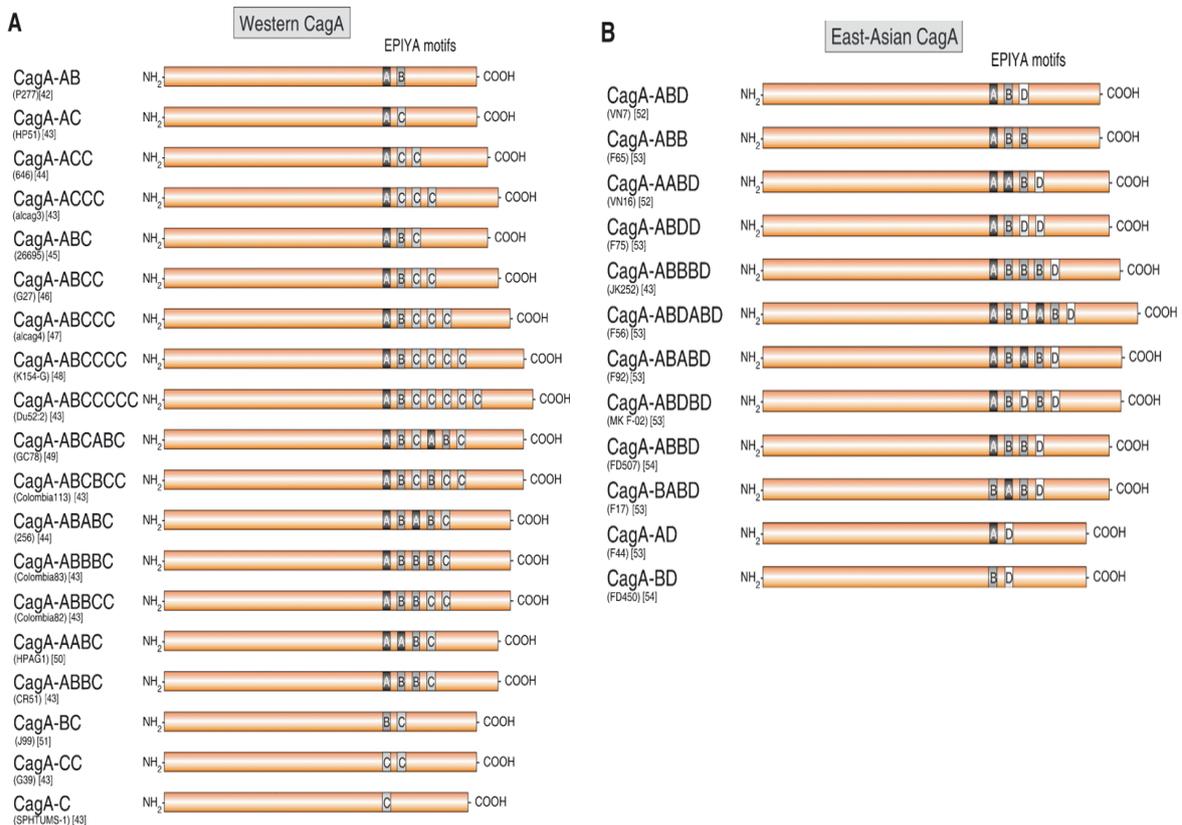


Abbildung 1.5: Die Variationen der EPIYA-Motive des CagA-Proteins von *H. pylori*. Insgesamt wurden in klinischen *H. pylori*-Stämmen mehrfache EPIYA-Motive und Variationen innerhalb der Segmente identifiziert. Neben der Bezeichnung der dargestellten *H. pylori*-Stämme ist die Unterscheidung hinsichtlich der geographischen Herkunft aufgeführt. Auf der linken Seite sind die Variationen der EPIYA-Motive in Western CagA-*H. pylori*-Stämmen (A) illustriert, während rechts die East-Asian CagA-*H. pylori*-Stämme gezeigt werden (B) (aus Backert und Tegtmeyer 2010).

1.5.5 Das Vakuolisierende Zytotoxin A (VacA)

Neben dem CagA-Protein ist das Vakuolisierende Zytotoxin A (VacA) ein weiterer bedeutender Virulenzfaktor des *H. pylori*. Im Gegensatz zum *cagA*-Gen verfügen alle *H. pylori*-Stämme über ein *vacA*-Gen. Aufgrund der Transkriptionsregulation des Gens wird das VacA-Protein aber nur in ca. 50 % aller Bakterienstämme exprimiert (Ahn und Lee 2015). Das *vacA*-Gen ist durch 4 variable Sequenzen charakterisiert. Die Signalpeptid-(s-) (s1 und s2), die Mittel-(m-) (m1 und m2), die Intermediär-(i-) (i1 und i2), und die Deletionsregion (d1 und d2). Es wurde gezeigt, dass Variationen in der Struktur des *vacA*-Gens die Art und Schwere der gastrointestinalen Erkrankung beeinflussen (Ahn und Lee 2015). Die strukturelle Unterscheidung des *vacA*-Gens in seiner Signalpeptid- (s1 und s2) und seiner Mittelregion (m1 und m2) führt zu Variationen in der vakuolisierenden Aktivität der unterschiedlichen *H. pylori*-Stämme (Atherton et al. 1995). *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass *H. pylori*-Stämme mit einem *vacA* s1m1 das höchste zytotoxische Potential besitzen, während Stämme mit einem s2m2 keine zytotoxische Aktivität aufweisen und *H. pylori*-Stämme mit einer *vacA*-Isoform s2m1 selten sind (Atherton et al. 1995; Winter et al. 2014). Der Genotyp s1 korreliert dabei eng mit der Existenz der *cag*-PAI und mit einem schwereren Krankheitsgeschehen (Yamaoka et al. 1999; Winter et al. 2014). In Übereinstimmung mit diesen Daten haben Forschungsgruppen herausgefunden, dass Patienten in Afrika, Lateinamerika und im mittleren Osten mit *H. pylori*-Stämmen mit einem *vacA*-Gen der Isoform s1 oder m1 im Vergleich zu *H. pylori*-Stämmen mit einem *vacA*-Gen der Isoform s2 oder m2 ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Magenkarzinoms und/oder gastroduodenale Ulcera haben (Sugimoto und Yamaoka 2009; Sugimoto et al. 2009; Pajavand et al. 2015). Kontrovers wird der Einfluss der Intermediärregion, die zwischen der Signal- und Mittelregion des *vacA*-Gens lokalisiert ist (Rhead et al. 2007), hinsichtlich der Entstehung gastrointestinaler Erkrankungen diskutiert. In Portugal und dem Iran wurde gezeigt, dass Patienten mit *vacA* i1-Stämmen nicht nur mit einer erhöhten Rate an entzündlichen und dysplastischen Zellveränderungen, sondern auch mit neoplastischen Zellveränderungen assoziiert sind (Ferreira et al. 2012b; Memon et al. 2014). Trotz diesen Ergebnissen präsentieren Studien von Patienten in Ost- und Südostasien, dass keine Korrelation zwischen der i-Region des *vacA*-Gens und dem Erkrankungsmuster besteht (Yamaoka 2010). Auch eine Langzeitstudie über 12,8 Jahren aus Spanien bestätigt diesen nicht existierenden Zusammenhang der i-Region und der resultierenden Erkrankung (Ferreira et al. 2012a). Die vierte und möglicherweise krankheitsassoziierte Region ist die Deletions-d-Region, die zwischen der i- und der m-Region lokalisiert ist. Mit der d1- (keine Deletion) und der d2-Region (eine 69- zu 81 bp Deletion) wurden zwei Subtypen identifiziert. Auch die Bedeutung der d-Region ist aktuell noch umstritten (Rhead et al. 2007; Ogiwara et al. 2009). Das *vacA*-Gen kodiert für ein 140 kDa Protoxin, welches posttranslational durch Proteolyse in eine Signalsequenz, ein 88 kDa Zytotoxin und eine C-terminale β -Domäne gespalten wird (*Abbildung 1.6*; Gonzalez-Rivera et al. 2010). Das reife

88 kDa Zytotoxin wird anschließend mit Hilfe der 33 kDa C-terminalen β -Domäne als lösliches Protein durch einen Autotransportmechanismus über die äußere Zellmembran des *H. pylori* in den Extrazellularraum exportiert (Dautin und Bernstein 2007). Das sezernierte Zytotoxin setzt sich aus den beiden Untereinheiten p33 (33 kDa) und p55 (55 kDa) zusammen. Die Aminosäuresequenzen dieser Bereiche beeinflussen die Bindungskapazität des VacA zur Wirtszelle. Durch Kontakt mit der Magensäure wird das exportierte Zytotoxin pH-abhängig in Monomere dissoziiert und aktiviert. Dies ermöglicht die Interaktion mit der Plasmamembran der Wirtszelle (Cover et al. 1997; Gonzalez-Rivera et al. 2010). In der *Abbildung 1.7* ist der Mechanismus der Vakuolisierung graphisch dargestellt. Formationsveränderungen im Rahmen einer Oligomerisierung bei Kontakt mit der Zytoplasmamembran führen zur Ausbildung von anionenselektiven VacA-Poren in der Epithelzellmembran der gastralen Zellen (Cover und Blanke 2005). Diese VacA-Poren werden anschließend endozytiert und in Vakuolen mit saurem pH kompartimentiert (Cover und Blanke 2005). Dazu fungieren die VacA-Poren als Chloridkanäle und stimulieren über die Aktivierung der endosomalen V-ATPase den Protoneneinstrom. Es entsteht ein intraluminaler Protonengradient, welcher durch Osmose die Akkumulation von Ammoniak und Wasser in die Vakuolen ermöglicht. Die osmotische Schwellung der Kompartimente mündet letztendlich in einer Vakuolisierung der gesamten Zelle und damit zur epithelialen Nekrose und Nährstoffemission aus den zerstörten Zellen. Die freigesetzten Nährstoffe nützen dem *H. pylori* als Substrat (Szabo et al. 1999; Cover und Blanke 2005). Das VacA-Protein ist neben der Vakuolisierung auch für die Induktion anderer zellulärer Mechanismen verantwortlich. Durch die Bindung an spezifische Zellmembranrezeptoren kann eine Entzündungsreaktion in der Wirtszelle ausgelöst werden (Cover und Blanke 2005). *In vitro* Experimente haben außerdem gezeigt, dass das VacA-Protein ein starker Inhibitor der T-Zellaktivierung ist (Gebert et al. 2003). Außerdem ist das Zytotoxin zur Permeabilitätserhöhung der Wirtszellmembran fähig (Szabo et al. 1999) und reguliert über die Reduktion des mitochondrialen Transmembranpotentials (Domanska et al. 2010) und über die Aktivierung proapoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie (Bak- und Bax-Protein) die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien und führt so zum Untergang der Wirtszelle (Yamaoka 2010; Jain et al. 2011).

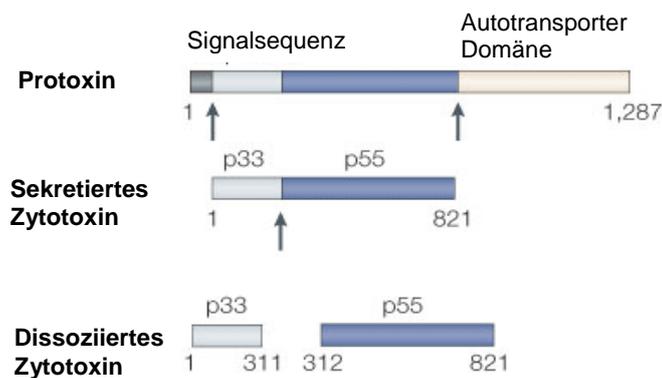


Abbildung 1.6: Darstellung der strukturellen Veränderungen des VacA-Proteins auf seinem Weg vom Protoxin zum reifen Zytotoxin. Nach Abspaltung der N-Terminal lokalisierten Signalsequenz entsteht aus dem 140 kDa Protoxin ein 88 kDa großes Zytotoxin, welches mit Hilfe eines Autotransportmechanismus in den Extrazellularraum sezerniert wird. Die Sekretion und proteolytische Prozessierung des VacA-Proteins sind charakteristische Eigenschaften der Autotransportproteine Gramnegativer Bakterien. Sie besitzen die Fähigkeit ohne Hilfe anderer Proteine ihre Sekretion eigenständig zu vermitteln. Dazu besitzt das VacA-Protein eine 33 kDa β -Fass-Domäne, die sich in die äußere Membran des *H. pylori* integrieren kann und einen Kanal formt, durch den das reife Zytotoxin in den Extrazellularraum transloziert wird (Cover und Blanke 2005).

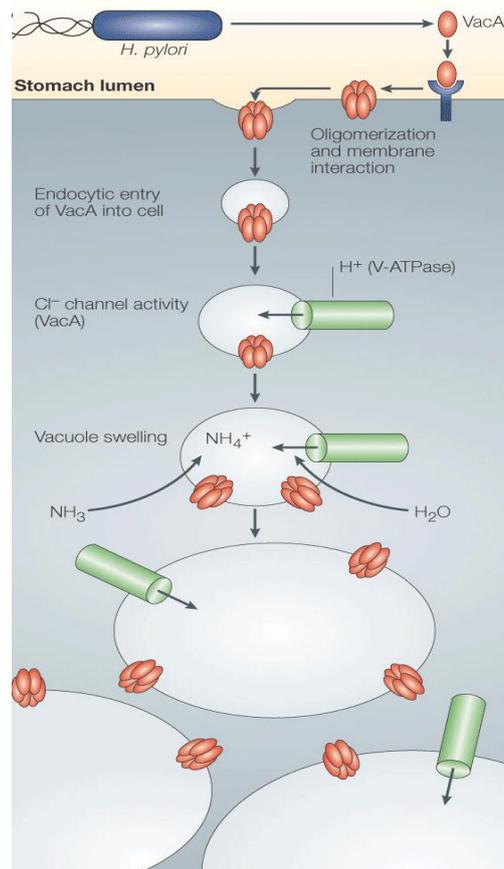


Abbildung 1.7: Illustration der zellulären Vakuolisierung. Schematisches Modell der Fähigkeit der zellulären Vakuolisierung durch das VacA-Protein. Nach Interaktion des Zytotoxins mit der Wirtszelloberfläche wird das Protein internalisiert und ist zur Ausbildung anionenselektiver VacA-Poren in der endosomalen Membran befähigt, welche als Chloridkanäle fungieren und über die Aktivierung der endosomalen V-ATPase den Einstrom von Protonen gewährleisten. Der intraluminale Protonengradient ermöglicht durch Osmose die Akkumulation von Ammoniak und Wasser in die Vakuolen. Dadurch kommt es zur Schwellung der Kompartimente und Vakuolisierung der Wirtszelle (Cover und Blanke 2005).

1.5.6 Interaktionen zwischen dem VacA- und CagA-Protein

Das CagA-Protein scheint schon in die Frühphase der Tumorgenese des Magenkarzinoms einzuwirken, denn das Protein lässt sich im Karzinomgewebe nicht mehr nachweisen (Yamazaki et al. 2003). Es wurde gezeigt, dass sezerniertes CagA-Protein im Rahmen einer Infektion mit *H. pylori*-Stämmen der VacA-Isoform m1 durch Autophagie abgebaut wird (Tsugawa et al. 2012). Diese VacA-Isoform interagiert mit dem Zelloberflächenrezeptor LRP1 (Low-density lipoprotein receptor-related protein-1), was zu einem Verlust an reduziertem Glutathion (GSH) und zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) in der Zelle führt. Dadurch kommt es zum Abbau des Akt-Kinase abhängigen Tumorsuppressors p53 und zur Induktion der Autophagie von CagA (Tsugawa et al. 2012). Interessanterweise werden autophagische Prozesse nicht in Zellen identifiziert, die eine bestimmte Variante des CD44-Adhäsionsmolekül exprimieren (Tsugawa et al. 2012). Diese Zellen zeichnen sich aufgrund der Aktivierung von xCT, einem Glutamat-Cystein-Transporter (Ishimoto et al. 2011), durch eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von GSH aus. Sie bilden wenig ROS und induzieren deshalb keine Autophagie des CagA-Proteins bei VacA-Bindung. CD44 ist ein Zelloberflächenmarker, der mit epithelialen Tumorstammzellen assoziiert ist. Das CagA-Protein kann in dieser Variation von CD44 exprimierenden Zellen bei Magenkarzinompatienten nicht nachgewiesen werden (Tsugawa et al. 2012). Paradoxerweise führen Gewebeveränderungen während der *H. pylori* induzierten Tumorgenese, wie die Entwicklung einer Intestinalen Metaplasie, zu niedrigeren Besiedlungsraten im Magen. Allerdings wurde im Mausmodell gezeigt, dass das Bakterium mit Magenvorläuferzellen interagiert (Oh et al. 2005). Die Fähigkeit des *H. pylori*, diese Vorläuferzellen zu besiedeln, der Verbleib des CagA-Proteins in diesen Zellen aufgrund der Aktivierung von xCT und die beeinträchtigte Autophagie, durch die es zu einem verringerten Abbau des CagA-Proteins kommt, könnte eine Schlüsselfunktion in der *H. pylori*-Besiedlung und der Tumorentstehung durch das CagA-Protein darstellen. Tan et al. stellten fest, dass das CagA-Protein im polarisierten Zellkulturmodell eine erhöhte basolaterale Aufnahme von Transferrin und die Transzytose von Transferrin fördert, während das VacA-Protein zu einer Lokalisationsveränderung des Transferrinrezeptors führt, welches die Eisenaufnahme durch das Bakterium erleichtert (Tan et al. 2011). In CagA-mutierten *H. pylori*-Stämmen erfordert die Besiedlung an der apikalen Zelloberfläche eine Eisenergänzung, während dies keine Voraussetzung bei Wildtyp-Bakterien ist. Dies deutet darauf hin, dass die veränderte Zellpolarität durch die CagA- und VacA-Proteine dem Bakterium einen Ernährungsnutzen verleiht. Im Einklang mit dieser Hypothese wird das CagA-Protein für eine effiziente Besiedlung des Bakteriums in Mongolischen Gerbils unter eisenlimitierten Bedingungen benötigt (Tan et al. 2011). Beide Proteine scheinen eng zusammen zu arbeiten, um eine effiziente Besiedlung in der eisenlimitierten Umgebung des Magens zu gewährleisten und um pathologische Fähigkeiten des CagA-Proteins zu vermitteln (Salama et al. 2013). Es konnten auch antagonistische Wechselwirkungen zwischen dem CagA- und dem VacA-

Protein identifiziert werden (Argent et al. 2008b). Beispielsweise führt das CagA-Protein durch Aktivierung von Signaltransduktionsprozessen und Proteinen, wie dem antiapoptotischen Protein MCL1 (Myeloid cell leukemia 1) zu einer Hemmung der Apoptose durch VacA (Backert und Tegtmeyer 2010).

1.6 Die Immunantwort bei einer Infektion mit CagA-positiven *H. pylori*-Stämmen

Neben der Untersuchung des Pathogenitätspotentials des CagA-Proteins durch Wechselwirkungen mit anderen Virulenzfaktoren und Komponenten der Wirtszelle ist auch die Immunantwort des Wirts hinsichtlich der Produktion CagA-spezifischer Antikörper vom IgG-Typ in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Schon im Jahr 1988 spielte die Immunantwort zur Identifikation des CagA-Proteins eine Schlüsselrolle, als es der Arbeitsgruppe um Apel mittels eines Immunoblotverfahrens gelang, das damals unbekanntes Protein indirekt in Patienten mit einer *H. pylori*-Infektion (ursprünglich *Campylobacter pyloridis*) nachzuweisen (Apel et al. 1988). Heute wird die Bestimmung der CagA-Antikörperkonzentration im Serum als diagnostischer Marker angesehen, da die im Wirt induzierte Immunantwort mit der Krankheitsschwere zu korrelieren scheint (Bhat et al. 2005). Die Infektion mit CagA-positiven *H. pylori*-Stämmen mit einem positiven Anti-CagA-IgG-Status in der Serologie ist mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung des gastroduodenalen Ulkusleiden und der Entstehung des nicht kardialen Adenokarzinoms des Magens assoziiert (Blaser et al. 1995; Cover et al. 1995). Auch eine Metaanalyse von insgesamt 16 Studien führte zu dem Erkenntnis, dass eine Seropositivität für IgG-Antikörper gegen das CagA-Protein mit einem 2,87-fach erhöhtem Risiko für die Entstehung des Magenkarzinoms einhergeht (Huang et al. 2003). Der Zusammenhang zwischen der erhöhten Pathogenität bei positivem Antikörperstatus scheint einerseits mit einer erhöhten *H. pylori*-Dichte im Magen, andererseits mit einer erhöhten IL-8-Expression und Infiltration neutrophiler Granulozyten zusammenzuhängen (Ando et al. 2000). Die Bestimmung des Anti-CagA-IgG-Status ist aufgrund dieser Erkenntnisse bei Hochrisikopatienten für das Adenokarzinom des Magens vorteilhaft. Allerdings konnte in einigen Studien eine Diskrepanz zwischen *cagA*-Gen positiven *H. pylori*-Stämmen und der Immunantwort des Wirts gegenüber dem CagA-Protein des *H. pylori* gezeigt werden. Die Ursache für eine hohe Prävalenz *cagA*-Gen positiver Bakterien und dem geringen Anti-CagA-IgG-Status im Blut des *H. pylori*-Infizierten ist noch nicht abschließend geklärt. Es existieren nur wenige Studien, die eine Erklärung für dieses Phänomen bieten (Figueiredo et al. 2001; Rhead et al. 2007; Basso et al. 2008). Das Ziel ist es, deshalb mögliche Faktoren zu identifizieren, die die Immunantwort gegenüber *H. pylori* und dem CagA-Protein beeinflussen.

1.7 Aufgabenstellung

Auf der Basis der dargestellten Literaturergebnisse und Befunde, welche die Komplexität der bakteriellen Pathogenitätsfaktoren des *H. pylori* widerspiegeln und deren Rolle zu verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen erfassen, soll zum einen der *cagA*-Genpolymorphismus und die EPIYA-Motive des CagA-Proteins untersucht, deren Assoziation zu Erkrankungen analysiert und die Ergebnisse mit anderen Forschungsarbeiten verglichen und diskutiert werden. Zum anderen soll die Arbeitshypothese überprüft werden, dass die CagA-Antikörperkonzentration im Patientenserum ein diagnostischer Marker ist und die CagA-Seropositivität mit einem erhöhten Krankheitsrisiko assoziiert ist. Abschließend soll analysiert werden, ob andere Virulenzfaktoren, wie der *vacA*-Genpolymorphismus bzw. das VacA-Protein die Immunantwort des Patienten auf eine *H. pylori*-Infektion und die Krankheitsschwere beeinflussen.

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen war die Bearbeitung folgender Teilaufgaben vorgesehen:

- Extraktion bakterieller DNA des *H. pylori* aus mikrobiologischen Isolaten von Patienten mit verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen und Charakterisierung des *cagA*-Gens hinsichtlich Variationen in den EPIYA-Motiven mittels Polymerasekettenreaktion und Sequenzierung
- Untersuchung der *H. pylori*- und CagA-Antikörperkonzentrationen im Patientenserum mittels ELISA und Analyse einer möglichen Assoziation bzw. Korrelation zum histopathologischen Befund der Patientenbiopsien
- Analyse des *vacA*-Genpolymorphismus und Identifikation einer Assoziation zwischen dem Pathogenitätspotential des Bakteriums und der Immunantwort des Patienten

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Im Rahmen der HELDIVPAT- Studie erfolgte die Untersuchung von *H. pylori* hinsichtlich seiner Rolle in der Pathogenese, der Antibiotikaresistenz und der Umgehung natürlicher und impfstoffinduzierter Immunreaktionen. Diese Studie wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen des ERA-NET PathoGenoMics Projekts gefördert. Das Studienprotokoll wurde gemäß der „Deklaration von Helsinki - Ethische Grundsätze für die Medizinische Forschung am Menschen“ erstellt und von der Ethikkommission der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg genehmigt (Studennummer 80/11). Zwischen Juli 2011 und April 2014 wurden 413 Patienten in das Studienkollektiv aufgenommen. Es nahmen 141 Männer und 236 Frauen mit einem Durchschnittsalter von 56,1 Jahren \pm 15,8 Jahren teil. Eingeschlossen wurden Patienten mit verschiedenen *H. pylori* assoziierten Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes. Nach einer ausführlichen Aufklärung in Bezug auf die Durchführung und Komplikationen, sowie Unterzeichnung einer schriftlichen Einwilligungserklärung, erhielt jeder Patient eine Blutentnahme und eine Gastroskopie mit Biopsieentnahme an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten mit einem instabilen Krankheitszustand, wie einer akuten Blutung und Patienten mit einer immunsuppressiven oder antibiotischen Therapie in den letzten 2 Wochen vor Beginn der Studie. Auch Patienten mit Voroperationen im Bereich des Magens, einer Antikoagulationstherapie und Patienten, bei denen eine Krebserkrankung außerhalb des Gastrointestinaltraktes bekannt war (z.B. Mammakarzinom), wurden von der Studie ausgeschlossen.

2.2 Biopsie Protokoll und histopathologische Beurteilung

Bei der Gastroskopie wurden den Patienten je sechzehn Magenschleimhautbiopsien (je 2-3 mm) von unterschiedlichen Lokalisationen innerhalb des Magens entnommen. Es wurden Proben aus dem Magenantrum (A), dem Magenkorpus (C) und der Incisura angularis (I) isoliert. Zwei Biopsien (1xA/1xC) dienten dem indirekten Nachweis des *H. pylori* mittels *Helicobacter*-Urease Test (CLOtest, Kimberly Clark, USA). Zwei Proben (1xA/1xC) wurden zur mikrobiologischen Anzucht des Bakteriums am Institut für Medizinische Mikrobiologie

und Krankenhaushygiene der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg verwendet. Weitere sechs Proben (3xA/3xC) wurden für molekulargenetische Untersuchungen im Labor der Gastroenterologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg entnommen. Patienten mit dem Verdacht auf ein Magenkarzinom erhielten zusätzlich vier Biopsien vom Tumor und aus der Tumorumgebung. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C eingelagert. Zur histologischen Beurteilung wurden 6 Biopsien (2xA/2xC/2xI) verwendet. Das Magenschleimhautgewebe wurde in Formalin fixiert. Im Institut für Pathologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg erfolgte die Anfertigung von Gewebeschnitten und die Färbung mit Hämatoxylin, Eosin und PAS, sowie der Nachweis des *H. pylori* mit der modifizierten Giemsa Färbung. Die Sydney Klassifikation diente zur Bestimmung der Gastritisform (Dixon et al. 1996). In die Beurteilung flossen dabei die Ätiologie, die Topografie und die Entzündungsmorphologie, wie Schweregrad, Aktivität, Atrophie und intestinale Metaplasie ein. Bei Patienten mit der Diagnose eines Magenkarzinoms erfolgte die Klassifikation des Wachstumsverhaltens nach Laurén in drei Typen (Intestinaler Typ, Diffuser Typ und Mischtyp).

2.3 Diagnostik und Anzucht von *H. pylori*

Die Identifikation des *H. pylori* erfolgte mittels *Helicobacter*-Urease Test (CLOtest, Kimberly Clark, USA), Histologie, Mikrobiologie und Serologie. Ein Patient galt als *H. pylori* infiziert, wenn eines der Verfahren positiv ausfiel. *H. pylori* negative Patienten mussten in allen Nachweismethoden negative Befunde aufweisen. Diese Patienten wurden als Kontrollgruppe in die Studie einbezogen. Zum mikrobiologischen Nachweis des Bakteriums wurden die Biopsien zunächst in 1,0 ml 0,9 %ige isotonische Natriumchlorid Lösung (Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland) überführt und in das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg gebracht. Dort erfolgte die Anzucht von *H. pylori* auf 37 °C vorgewärmten Blutagarplatten (Biomérieux, Marcy l'Étoile, Frankreich). Als Nährmedium diente eine Columbia-Agar-Basis, mit oder ohne Zusatz von Antibiotika (Vancomycin (10 mg/ml); Nystatin (1 mg/ml); Trimethoprim (5 mg/ml), die außerdem 10 % menschliche Erythrozyten und 10 % Pferdeserum als native Eiweißquelle enthielt (Megraud et al. 2007, Wueppenorts et al. 2009). Die Agarplatten wurden in Anaerobiertöpfen (Oxoid, Wesel, Deutschland) unter mikroaerophilen Bedingungen (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂) mittels CampyGen Gaspacks (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) bei 37 °C im Brutschrank (Thermo, Hereaus, Hanau, Deutschland) inkubiert. Die Untersuchung der Platten auf eine bakterielle Besiedlung mit *H. pylori* erfolgte alle 2-3 Tage bis zu 10 Tage lang. Der Keim wurde anhand seiner typischen Morphologie, der grau - weißlich, runden leicht erhabenen Gramnegativen

Kolonien mit leichter Hämolyse, sowie mittels Urease-, Oxidase- und Katalase-Tests identifiziert. Positive Kulturen wurden in 0,9 vol% isotonischer Natriumchloridlösung suspendiert und nach Zentrifugation als Zellpellets bei -30 °C eingefroren.

Material: Biopsien (1xA/1xC), Natriumchloridlösung (0,9 vol%, Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland); Blutagarplatten (Biomérieux, Marcy l'Étoile, Frankreich); Anaerobiertöpfe (Oxoid, Wesel, Deutschland); CampyGen Gaspacks (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)

2.4 ELISA zur Quantifizierung *H. pylori* spezifischer Antikörper

Den Patienten wurden je ein Serum-, ein Citrat- und ein EDTA-Blut Röhrchen abgenommen. Im Patientenblut erfolgte die serologische Bestimmung von *H. pylori* spezifischen Antikörpern mittels ELISA. Der ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ist eine antikörperbasierte Methode, dessen Prinzip auf eine enzymatische Farbreaktion beruht. Er diente zum indirekten Nachweis von *H. pylori*. Der serologische Nachweis des Bakteriums erfolgte mit dem *H. pylori*-IgG ELISA (Biohit, Helsinki, Finnland) und dem CagA-IgG ELISA Kit (Genesis Diagnostics, Cambridgeshire, Großbritannien). Beide Methoden wurden nach der Herstellerempfehlung durchgeführt und ähneln sich im Ablauf. Beispielhaft wird hier der *H. pylori*-IgG ELISA beschrieben. Das Verfahren orientiert sich an der Technik der Enzym-Immunoassays mit teilweise gereinigtem *H. pylori* Antigen. Dieses wurde auf einem Mikrotiter fixiert und durch Zugabe eines mit HRP (Meerrettichperoxidase) markiertem Antikörper bestimmt (Biohit Oyj, *H. pylori* IgG, Instructions for use, Helsinki, Finnland). Für den *H. pylori*-IgG ELISA (Biohit, Helsinki, Finnland) wurden folgende Reagenzien je Probe verwendet: 6x350 µl Waschpufferkonzentrat; 100 µl Verdünnungspuffer; 100 µl Kalibrator; 100 µl Negativkontrolle; 100 µl Positivkontrolle; 100 µl Konjugatlösung; 100 µl Substratlösung und 100 µl Stopplösung. Zur Vorbereitung wurden die Mikrotiterplatten und alle Reagenzien auf Raumtemperatur (23 °C) gebracht und das Waschpufferkonzentrat 1 zu 10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Das nach der Gerinnung abgesonderte Patientenserum wurde im Verhältnis 1 zu 200 mit dem Verdünnungspuffer verdünnt und danach gemischt. Je 100 µl aus dem Verdünnungspuffer, dem Kalibrator, der Negativkontrolle, der Positivkontrolle und den verdünnten Proben wurden jeweils als Doppelbestimmung einzeln in die Mikrotiterplatten pipettiert. An der Polystyroloberfläche dieser Platte befand sich gereinigtes *H. pylori* Antigen, welches die *H. pylori* Antikörper aus der Probe binden konnte. Nach Abdecken der Platte mit Abdeckfolie erfolgte die Inkubation für 30 min bei 37 °C. Im darauffolgenden Arbeitsschritt wurden die Streifen mit 3x350 µl verdünnter Waschlösung gereinigt. Anschließend wurden 100 µl der gemischten

Verdünnung (1 zu 100) der Konjugatlösung mit einer 8-Kanalpipette in die Vertiefungen gegeben, die Platte erneut abgedeckt und 30 min bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit konnte das HRP-markierte monoklonale nicht-menschliche IgG die *H. pylori* Antikörper aus der Probe binden. Der nachfolgende Arbeitsschritt beinhaltete die erneute Reinigung mit verdünnter Waschlösung (3x350 µl). Zur Substratlösung wurden 100 µl dieses Reagenz (TMB-Substrat) mit einer 8-Kanalpipette in alle geleerten Vertiefungen gegeben und der Ansatz 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieses Arbeitsschrittes wurde die Platte vor Licht geschützt. Das Substrat konnte nun durch das Enzym oxidiert werden, was zu einem blauen Farbumschlag führte. Zur Beendigung der Enzymreaktion wurden 100 µl Stopplösung in die Vertiefungen pipettiert und anschließend die Absorption bei 450 nm gemessen. Die Bestätigung der korrekten Testdurchführung wurde durch den Absorptionswert des Kalibrators angezeigt. Dieser Wert sollte >1000 U/ml betragen. Der Mittlere Absorptionswert konnte mit folgender Formel bestimmt werden:

$$\frac{X(\text{AProbe}) - X(\text{ABlank})}{X(\text{AKalibrator}) - X(\text{ABlank})} \times 100 = \text{Probe U/ml (Enzym-Immunoheiten)}$$

Serumproben, die einen Wert größer als 30 U/ml aufwiesen und deren Proben sich gelb färbten wurden als Anti-*H. pylori*-IgG positiv klassifiziert. Bei dem CagA-IgG ELISA Kit (Genesis Diagnostics, Cambridgeshire, Großbritannien) galten Patienten mit einem Wert >6,25 U/ml als Anti-CagA-IgG positiv.

Material: Patientenblut aus Serumröhrchen; *H. pylori*-IgG ELISA (Biohit, Helsinki, Finland): Waschpufferkonzentrat (120 ml 10-fach konzentrierter Phosphatpufferlösung mit Tween 20 und 0,1 % ProClin als Konservierungsmittel), Verdünnungspuffer (100 ml Phosphatpuffer mit Blockierungsprotein, Tween 20, 0,1 % ProClin300 als Konservierungsmittel und rotem Farbstoff), Kalibrator (enthält 1,5 ml menschlichen serumbasierten *H. pylori*-IgG Kalibrator mit 0,1 % Proclin300 als Konservierungsmittel), Negativkontrolle (enthält 1,5 ml menschliche serumbasierte *H. pylori*-IgG Negativkontrolle mit 0,1 % Proclin300 als Konservierungsmittel), Positivkontrolle (enthält 1,5 ml menschliche serumbasierte *H. pylori* IgG Positivkontrolle mit 0,1 % Proclin300 als Konservierungsmittel), Konjugatlösung (0,2 ml Meerrettichperoxidase, (HRP)-gekoppelte monoklonales nicht menschliches IgG in Stabilisierungspuffer mit 0,02 % Methylisothiazolon, 0,02 % Bromonitrodioxan und 0,002 % aktive Isothiazolone als Konservierungsmittel), Substratlösung (15 ml Tetramethylbenzidin in wässriger Lösung), 100 µl Stopplösung (15 ml 0,1 mol/l Schwefelsäure); CagA IgG ELISA Kit (Genesis Diagnostics, Cambridgeshire, Großbritannien)

2.5 DNA Isolation aus *H. pylori*

Die DNA Extraktion aus *H. pylori* erfolgte mit dem DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Für eine Extraktion wurden ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen, ein „Spin Column“ und drei „Collection Tubes“ verwendet. Die Probe wurde zunächst auf Zimmertemperatur (23 °C) aufgetaut, unter Zugabe von 180 µl Buffer ATL resuspendiert und anschließend mit 20 µl Proteinase K zur Proteolyse versetzt und für ca. 15 Sekunden mittels Vortexer (RS-V110, Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland) vermischt. Danach wurde die Probe bei 56 °C für 60 min in einem Thermomixer (Eppendorf Thermomixer Compact, Wilke & Witzel, Hamburg, Deutschland) überführt und gemischt. Nach Zugabe von 200 µl Buffer AL und erneuter Mischung wurde das Zellysate 10 min bei 70 °C im Thermomixer inkubiert, danach mit 200 µl 100 % Ethanol aufgefüllt, 15 Sekunden gemischt und der gesamte Inhalt in ein „Spin Column“ gegeben. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland) des Lysates (1 min, 8000 xg). Das „Spin Column“ wurde in ein neues Collection Tube überführt und der Durchfluss entfernt. Nach Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW1 und Zentrifugation (1 min, 8 000 xg) wurde dieser Arbeitsschritt mit 500 µl Puffer AW2 aus dem DNA Mini Kit wiederholt. Diese Mischung wurde ebenfalls zentrifugiert (3 min, 13000 xg), in ein neues Collection Tube gegeben und die Probe 1 min bei 13 000 xg zentrifugiert. Das „Spin Column“ wurde mit 100 µl Puffer AE in ein 1,5 ml Röhrchen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 min erfolgte die Zentrifugation der Probe (1 min, bei 8000 xg). Dieser letzte Arbeitsschritt wurde wiederholt und die extrahierte DNA portioniert. Das Eppendorf-Röhrchen wurde anschließend mit Datum, Isolatnummer und dem Schriftzug „DNA - *Helicobacter pylori*“ versehen und bei -30 °C eingelagert.

Material: DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), Ethanol (96-100 %)

2.6 Qualitative PCR zur Amplifikation *H. pylori*-spezifischer Gene

Die Polymerasekettenreaktion als enzymabhängiges Verfahren ermöglichte die Amplifikation von DNA. Es wurde ein Mastermix aus den folgenden Reagenzien hergestellt: 15 µl HotStar Taq Plus DNA-Polymerase Mix (enthält Taq-Polymerase und dNTP-Mix); 9,6 µl RNase-freies Wasser bzw. für die EPIYA-Motive 11,6 µl RNase-freies Wasser; 0,2 µl Forward Primer (50 µM) und 0,2 µl Reverse Primer (50 µM). Wie in *Tabelle 2.1* illustriert, wurden insgesamt 5 Primer-Sets verwendet: *cagA* (Peek, JR et al. 1995), EPIYA (Yamaoka et al. 1998), *vacA s*, *vacA m* (Ryberg et al. 2008) und *glmM* (Shahamat et al. 2004). 25 µl

des Mastermix wurden zusammen mit 5 µl DNA bzw. 5 µl RNase-freiem Wasser für die Negativkontrolle in jede Vertiefung gegeben. Für die Polymerasekettenreaktion wurden die Proben (30 µl) in den Thermocycler transferiert (Biometra, Göttingen, Deutschland). Dort fanden folgende Reaktionen statt: Zunächst erfolgte die Denaturierung (15 min). Dabei wurde die doppelsträngige DNA auf 95 °C erhitzt, somit die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Strängen gelöst und die Taq-Polymerase im Gemisch aktiviert. Danach folgte die Primerhybridisierung durch Abkühlung des Versuchsansatzes auf die spezifische Annealingtemperatur des jeweiligen Primers (30 Sekunden). In der Elongation synthetisierte die DNA-Polymerase vom Primer aus in 5`-3`-Richtung den komplementären Strang (1 min bei 72 °C). Um die neu synthetisierten Ketten zu schmelzen und die erneute Anlagerung der Primer zu ermöglichen, erfolgte die Denaturierung bei 95 °C (30 Sekunden). Dieser Vorgang wurde 40 Zyklen wiederholt. Den Abschluss bildete eine längere Elongationsphase bei 72 °C. Nach Vollendung der PCR wurden die Reaktionsansätze auf 4 °C gekühlt.

Material: HotStar Taq Plus DNA-Polymerase Mix (Qiagen, Hilden, Deutschland), RNase-freies Wasser, Primerpaare (*cagA*, *vacA s/m*, *glmM*, *EPIYA*)

Tabelle 2.1: Auflistung der Primer für die qualitative PCR. Für die Analyse der Gene *cagA*, *vacA s/m*, *glmM* und die *EPIYA*-Motive des *cagA*- Gens des *H. pylori* wurden 5 Primerpaare aus der Literatur verwendet: *cagA* (Peek, JR et al. 1995), *EPIYA* (Yamaoka et al. 1998), *vacA s*, *vacA m* (Ryberg et al. 2008) und *glmM* (Shahamat et al. 2004). Neben der Primersequenz sind die zugehörige Annealing Temperatur und die Basenlänge der einzelnen Subtypen aufgeführt.

Gen	Richtung	Primersequenz (5` → 3`)	Annealing Temperatur	Produkt (bp)
<i>cagA</i>	F	GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG	56 °C	349
	R	CTGCAAAAGATTGTTTGCCAGA		
<i>vacA s</i>	F	ATGGAAATACAACAAACACAC	56 °C	s1: 259 s2: 286
	R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC		
<i>vacA m</i>	F	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	56 °C	m1: 570 m2: 645
	R	GCGTCTAATAATTCCAAGG		
<i>glmM</i>	F	AGGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT	56 °C	293
	R	AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC		
EPIYA	F	ACCCTAGTCGGTAATGGGTTA	50 °C	AB 500 ABC 600 ABCC 700 ABCCC 800
	R	GTAATTGTCTAGTTTCGC		

2.7 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente zur Kontrolle der PCR Produkte. Die DNA Fragmente wiesen eine spezifische Basenpaarlänge (bp) auf. Zur Identifikation der Fragmente wurde ein DNA-Längenstandard mitgeführt. Zur Herstellung des Gels wurde 1,3 %ige (1,3 g) Agarose NEEO Ultra-Qualität in 100 ml 1xTBE Puffer gelöst und für 2 min in der Mikrowelle erhitzt. Nach Zugabe von 0,54 µl Ethidiumbromid wurde das flüssige Gel blasenfrei in den Gelträger gegeben, der vorher mit zwei 20-Well-Kämmen bestückt wurde. Das Gel härtete 20 bis 30 min aus. Bevor die PCR-Proben in die Geltaschen überführt werden konnten, wurde zu jeder Probe 10 µl LB-Puffer zugegeben. Für den Nachweis von *cagA*, *vacA s/m* und *glmM* wurden 10 µl des Gemisches bzw. für das EPIYA Motiv 15 µl in je eine Geltasche pipettiert. Zur Bestimmung der Basenlänge wurde 5 µl des Molekulargewichtsmarkers (HyperLadder IV, Bionline, Luckenwalde, Deutschland) an den Seiten mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Gleichspannung von 95 V für 90 min für die Gene *cagA*, *vacA s/m* und *glmM* und 130 V für 120 min für die EPIYA-Motive des *cagA*-Gens. Die PCR Produkte wurden mit UV-Licht (Herolab, Wiesloch, Deutschland) überprüft und photographisch dokumentiert.

Material: Agarose NEEO Ultra-Qualität (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 1xTBE-Puffer: 20 ml 50 xTBE-Puffer auf 1 l Aqua dest, (1xTBE-Puffer [10,8 g (89 mM) TRIS; 0,7 g (2 mM) Na₂EDTA (ph 8,0); 5,5 g (89 mM) Borat; mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt), Ethidiumbromid 1 % (10 mg/ml), LB-Puffer (1,5 ml 10xTBE + 5 ml Glycerol (Roth, Karlsruhe) mit Bromphenolblau (Merck, Darmstadt) und 8,5 ml Aqua dest.), Molekulargewichtsmarker (Hyperladder IV, Bionline, Luckenwalde, Deutschland)

2.8 Aufreinigung der PCR Produkte

Zur Vorbereitung der Sequenzierung wurden die PCR Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt. Dieser Schritt entfernte die während der PCR benötigten Oligonukleotide, dNTPs, Salze, Polymerase und Puffer und war Voraussetzung für eine effiziente Restriktion und Ligation der PCR-Produkte. Je Probe wurde ein „QIAquick column“ und ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen benötigt. Der erste Arbeitsschritt bestand aus der Zugabe von 75 µl Puffer PB zu 15 µl PCR-Produkt. Dieses Gemisch wurde in das „QIAquick Column“ überführt und zur Fixierung der DNA zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland, 1 min, 13 000 xg). Der Durchfluss wurde entfernt, 750 µl Waschpuffer PE zugeführt und nochmals zentrifugiert (1 min, 13 000 xg). Nachdem der Durchfluss wiederholt verworfen wurde, erfolgte eine Trockenzentrifugation

(1 min, 13 000 xg). Das „QIAquick Column“ wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen platziert, 30 µl Puffer EB zur Elution der DNA hinzugefügt und 1 min bei 13 000 xg zentrifugiert.

Material: QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen

2.9 Klonierung

Die Klonierung diente der Vervielfältigung einzelner DNA Fragmente im *H. pylori*-Isolat. Dazu wurden die aufbereiteten Genfragmente in einen Klonierungsvektor eingefügt und das rekombinante DNA-Molekül in Bakterienzellen (*E. coli*) transformiert. In diesen Wirtszellen konnten sich die DNA Moleküle vermehren. Nach einer Inkubationszeit entstanden durch Mitosen Bakterienkolonien, die aus Zellen mit identischem genetischem Inhalt bestanden und als Klone bezeichnet wurden. Die Arbeitsschritte der Klonierung werden in den folgenden Abschnitten detailliert beschrieben.

2.9.1 Vorbereitung der Nährböden

Die Agarplatten wurden frisch hergestellt, um ein optimales Wachstum der Klone zu gewährleisten. Dazu wurden folgende Reagenzien benötigt: 1 µl Ampicillin (100 mg/ml A.d.) /ml Agar; 0,4 µl IPTG (1 M in A.d.) /ml Agar und 0,8 µl X-β-Gal (20 mg/ml DMSO) /ml Agar. Je PCR Produkt wurden drei Agarplatten vorbereitet. Dazu wurde 35 g LB-Agar (Lennox Agar, Sigma, Hannover, Deutschland) in 1 l destilliertes Wasser gegeben und gemischt. Anschließend wurde das Medium autoklaviert und nach dem Abkühlen bei 4 °C gelagert. Der vorgekochte Agar wurde zunächst 15 min bei 400 Watt in der Mikrowelle erwärmt. Danach erfolgte die Abkühlung des Gels auf 55 °C und die Zuführung der Reagenzien. Das Agargemisch wurde geschwenkt und die Masse in Petrischalen (Schale 94/16 L.MG.ON. Steril, Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland) gegossen, bis der gesamte Boden bedeckt war. Danach kühlten die Agarplatten 30 min ab. Als Orientierungshilfe wurde der Deckel der Petrischale zur Hälfte aufgesetzt und so lange gewartet, bis dieser nicht mehr beschlagen war. Die Agarplatten wurden bis zur Weiterverwendung bei 4 °C mit dem Deckel nach unten gelagert (Haltbarkeit maximal 14 Tage).

Material: LB-Agar (Lennox Agar, Sigma, Hannover, Deutschland), Ampicillin (Roth, Karlsruhe, Deutschland), IPTG (Roth, Karlsruhe, Deutschland); X- β-Gal (Roth, Karlsruhe, Deutschland), Petrischalen (Schale 94/16 L.MG.ON. Steril, Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland)

2.9.2 Ligation

Die Ligation diente der Einführung der in den PCR-Produkten enthaltenen DNA- Fragmente in einen Klonierungsvektor. Die zur Amplifikation (PCR) verwendete Taq-Polymerase verfügte über eine terminale Transferase-Aktivität, wodurch am 3`-Ende der PCR-Fragmente Adenin angehängt wurde. Diese Adenin-Überhänge konnten direkt an den Uracil-Überhängen des linearisierten Vektors p-Dive binden. Die Herstellung des Ligationsansatzes erfolgte mit dem QIAGEN PCR Cloning Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Folgende Reagenzien wurden verwendet: QIAGEN PCR Cloning Kit: 1 µl p-Drive Vektor und 5 µl 2-fach Ligation Master Mix. Die Bestandteile wurden mit 4 µl des gereinigten PCR-Produktes zu insgesamt 10 µl vermischt und der gesamte Reaktionsansatz zwei Stunden bei 10 °C im Eppendorf Thermomixer Compact (Wilke & Witzel, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 10 min in ein 65 °C Wasserbad gegeben. Dies führte zur Aktivierung der Ligase, welche das PCR-Produkt mit dem Klonierungsvektor vereinte. Die Proben wurden anschließend auf Eis gelagert.

Material: QIAGEN PCR Cloning Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

2.9.3 Transformation und Vermehrung positiver Klone

Der nachfolgende Arbeitsschritt der Klonierung beinhaltete die Transformation, bei der die Ligationsprodukte in Bakterienzellen eingeschleust wurden. In diesen Wirtszellen wurden die DNA-Moleküle vervielfältigt. Durch Zellteilung entstanden Bakterienkolonien (Klone) mit identischem genetischem Material. Der Transformationsansatz setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen: 25 µl E. coli (RapidTrans™ TAM1 Competent E. coli von Active Motif, La Hulpe, Belgien) und 1,5 µl Ligationsansatz. Die Probe wurde 25 min auf Eis inkubiert. Nach einer Inkubation im Wasserbad (30 Sekunden bei 42 °C) wurde der Ansatz 2 min auf Eis gestellt, um die Aufnahme des Plasmids zu ermöglichen. Unter der Sterilbank (HERAsafe KS Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland) wurden anschließend 350 µl Transformationsmedium dazu pipettiert (Soc-Medium, zunächst im 37 °C Wasserbad erwärmt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt) und der gesamte Ansatz eine Stunde und 15 min bei 37 °C und 500 g im Eppendorf Thermomixer Compact (Wilke & Witzel, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Zur Vorbereitung der Beimpfung wurden die Agarplatten aus dem Kühlschrank genommen und mit Probennummer und Datum beschriftet. Ein Drigalskispatel wurde mit 96 %igem Ethanol abgeflammt. Zunächst erfolgte die Beimpfung von zwei Agarplatten je Probe mit dem Transformationsansatz. Auf die eine Platte wurden 50 µl verteilt, auf die zweite Platte 200 µl. Dafür wurde der Ansatz in die Mitte der Platte pipettiert und von dort aus mit einem Drigalskispatel in kreisförmigen

Bewegungen auf der gesamten Platte verteilt. Über Nacht wurden die Agarplatten bei 37 °C im Bakterienerschrank (Heraeus, Langensfeld, Deutschland) bebrütet. Am nächsten Morgen wurden die Nährmediumplatten zunächst bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt, um eine bessere Farbentwicklung zu ermöglichen. Danach konnte das Bakterienwachstum auf den beimpften Platten kontrolliert werden. Zum „Picken“ der Klone wurden diese mit einer 10 µl Pipettenspitze von der Agarplatte entnommen und eine unbeimpfte Agarplatte mit der Pipettenspitze berührt. Die Spitze wurde in dem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen abgespült, welches 100 µl steriles Wasser enthielt. Für die Schüttelkultur wurde je Klon ein 15 ml Falcon-Röhrchen beschriftet und mit 10 ml LB-Medium und 2 µl Ampicillin/ml Medium bestückt. Zusätzlich erfolgte die Überführung von 10 µl Flüssigkeit aus dem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen in das Falcon-Röhrchen. Nach Fixierung des Deckels mit Leukosilk S (BSN medical GmbH, Hannover, Deutschland) wurden die Proben in einem Styroporständer in den Bakterienerschüttler (Heidolph Unimax 1010, Schwabach, Deutschland) gestellt und die Bakterienkulturen bei 25 °C und 300 xg über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Schüttelkultur entnommen und 10 min bei 3 000 xg zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland). Anschließend wurde der Überstand für die spätere Autoklavierung in eine Flasche überführt und die Bakterien bei -30 °C eingefroren.

Material: 25 µl E. coli (RapidTrans™ TAM1 Competent E. coli von Active Motif, La Hulpe, Belgien), Soc-Medium, Drigalskispatel, 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen, steriles Wasser, LB-Medium, Ampicillin, Falcon-Röhrchen, Leukosilk S (BSN medical GmbH, Hannover, Deutschland)

2.9.4 Plasmid Präparation

Die Plasmid-Isolation ist eine molekularbiologische Methode zur Rückgewinnung der amplifizierten Vektoren aus den positiven Klonen und Aufarbeitung der Plasmid-DNA. Die Plasmid Präparation erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Für jede Probe wurde ein „QIAprep Spin Column“ und zwei 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen verwendet. Zur Resuspension wurde das Bakterienpellet im Falcon-Röhrchen zunächst mit 500 µl Puffer P1 versetzt und 250 µl dieses Produktes in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Die folgenden zwei Prozeduren beinhalteten die Zugabe von 250 µl Puffer P2 und anschließend 350 µl Puffer N3. Nach jedem Arbeitsschritt wurde das Eppendorf-Röhrchen 6x über Kopf gekippt, um eine gleichmäßige Mischung zu erzielen. Dabei durfte eine Zeitspanne von maximal 5 min für alle Proben nicht überschritten werden. Die Proben wurde anschließend 10 min bei 13 000 xg zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland), der Überstand in das „QIAprep Spin Column“ überführt, erneut zentrifugiert (1 min, 13 000 xg), der Durchfluss entfernt und 500 µl Puffer PB dazu

pipettiert. Nach wiederholter Zentrifugation (1 min, 13 000 xg) und Entfernung des Durchflusses erfolgte die Zugabe von 750 µl Puffer PE. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (1 min, 13 000 xg), der Durchfluss entfernt und trocken zentrifugiert (1 min, 13 000 xg). Das „QIAprep Spin Column“ wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gegeben und mit 50 µl Puffer EB versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurde zentrifugiert (1 min, 13 000 xg). Der Überschuss konnte entfernt werden und die Plasmid-DNA bei -30 °C gelagert werden.

Material: QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen, Falcon-Röhrchen

2.9.5 Qualitative PCR/Agarosegelelektrophorese

Die Plasmid-DNA wurde mittels einer qualitativen PCR amplifiziert. Der Versuchsablauf entsprach dabei dem in Gliederungspunkt 2.6 beschriebenen. Zur Vervielfältigung wurden die EPIYA-Primer verwendet (Tabelle 2.1). Anschließend erfolgte der Nachweis der PCR Produkte und die Identifikation der Länge der DNA-Fragmente in der Agarosegelelektrophorese.

2.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung zur Analyse der Nukleotidabfolge der klonierten DNA fand in der Abteilung der Molekulargenetik im Medizinischen Versorgungszentrum für Labormedizin, Mikrobiologie, Hygiene und Humangenetik Prof. Schenk/Dr. Ansorge & Kollegen statt. Um möglichst das gesamte Genfragment zu sequenzieren erfolgte die Analyse der Klone sowohl in 5`-3`, als auch in 3`-5` Richtung. Für jeden Klon entstanden Chromatogramme, die eine spezifische Basenabfolge aufwiesen. Anschließend wurden die Chromatogramme mit dem Computerprogramm Chromas LITE Version 2.1.1 bearbeitet. Nach Vereinigung der „Forward- und Reversesequenzen“ wurden die EPIYA-Sequenzen der einzelnen Klone eines *H. pylori*-Isolates unter Anwendung des CLC-Sequence-Viewer Version 6.8.1 mit katalogisierten *H. pylori*-Stämmen aus der Gendatenbank NCBI verglichen und ausgewertet. Mit dem Programm Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) konnten die Nukleotidsequenzen der einzelnen Klone eines zugehörigen Isolates gegenübergestellt werden und Abweichungen in den Basenabfolgen der EPIYA-Motive identifiziert werden. Das Proteinsequenz-Alignment wurde ebenfalls mit Hilfe des Programmes SIC-Sequence-Viewer Version 6 bzw. des ClustalOmega Programmes ausgewertet (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/slustalo/>).

2.11 Computergestützte Analysen

Die Auswertung der Sequenzanalysen erfolgte mit Hilfe folgender Computerprogramme und Datenbanken:

- Chromas LITE Version 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd, Brisbane, Australia)
- CLC-Sequence-Viewer Version 6.8.1 (CLC bio A/S, A Qiagen Company, USA)
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/slustalo/>
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

2.12 Statistische Analyse

Alle Versuche wurden mit Negativkontrollen durchgeführt. Bei Auftreten von unschlüssigen Ergebnissen, wie z.B. Schlierbanden in der Gelelektrophorese beim Nachweis der PCR Produkte, wurde der Versuchsaufbau wiederholt, bis Bandenmuster sichtbar wurden, die eindeutig einer definierten Basenlänge zuzuordnen waren. Der gesamte Datensatz wurde in einer „Microsoft Excel“-Tabelle dokumentiert. Für die statistische Analyse wurden die Daten in SPSS importiert und aufbereitet. Es wurde die IBM SPSS Statistics Version 22 (International Business Machines Corporation, USA) verwendet. Zunächst wurde ein Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest durchgeführt, um bei den metrischen Daten zwischen normalverteilten und nicht-normalverteilten Daten zu differenzieren. Bei unter 30 Datensätzen wurde der Shapiro-Wilkson-Test angewendet. Das Alter war normalverteilt und die CagA-Serologie war logarithmisch normalverteilt. Bei diesen Daten wurden parametrische Tests, wie z.B. eine ANOVA mit Post-hoc-Test (speziell T-Test) angewandt. Bei nicht metrischen und nicht normalverteilten Daten wurden nichtparametrische Tests durchgeführt. Dazu gehörten der Pearson-Chi-Quadrat und der Exakte-Fisher-Test. Die Korrelationsanalyse zwischen der *H. pylori* Serologie und der CagA-Serologie erfolgte mit dem Spearman-Rho-Test. Beim Vergleich des EPIYA-Status im Antrum und Korpus des Magens wurde der Vorzeichentest wegen verbundenen Stichproben angewendet. Insgesamt wurde für alle Daten ein p-Wert < 0,05 als statistisch signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

Der experimentelle Teil meiner Arbeit bestand im Wesentlichen aus Untersuchungen des CagA-Proteins, insbesondere der Analyse der EPIYA-Motive des CagA-Proteins im Kontext mit anderen Virulenzfaktoren des *H. pylori*, wie dem VacA. Dazu isolierte ich aus 99 *H. pylori*-Isolaten bakterielle DNA und analysierte das *cagA*-Gen, die EPIYA-Motive des *cagA*-Gens und das *vacA*-Gen mittels qualitativer Polymerasekettenreaktion und anschließender Gelelektrophorese. Zur Verifizierung des EPIYA-Status erfolgte von 10 Patienten nach Klonierung eine Sequenzanalyse. Die Sequenzdaten verglich ich mit Hilfe von Referenzsequenzen aus der Gendatenbank NCBI und identifizierte jeweilige Modifikationen des CagA-Proteins. Des Weiteren untersuchte ich die Immunantwort des Wirtsorganismus nach der Infektion mit *H. pylori*. Dazu analysierte ich im Patientenblut mittels ELISA *H. pylori*-IgG Antikörper und Immunglobuline gegen den Virulenzfaktor CagA (siehe Material und Methoden).

3.1 Histopathologische Beurteilung des Biopsiebefundes in Abhängigkeit zur CagA-Serologie

Bei 99 Patienten gelang die Anzucht der *H. pylori*-Stämme aus den Magenbiopsien. Das CagA-Protein gilt als einer der bedeutendsten Virulenzfaktoren des *H. pylori* und induziert durch Stimulation der Freisetzung von Zytokinen (IL-8) und anderen Mediatoren die Entzündung der Magenschleimhaut und beeinflusst die Immunantwort des Wirtsorganismus (Brandt et al. 2005). Das Protein kann die Bildung von Antikörpern vom IgG-Typ induzieren, die im Blut mittels ELISA nachweisbar sind (Wex et al. 2011). Wie in *Tabelle 3.1* illustriert, wiesen 30 Patienten (30,3 %) eine positive Anti-CagA-IgG-Serologie im Blut auf. Zunächst wurde analysiert, ob Unterschiede im Histologiebefund zwischen Anti-CagA-IgG positiven und negativen Patienten vorlagen. Die histopathologische Beurteilung des Gastritistypes erfolgte anhand der Sydney Klassifikation. Der Schweregrad wurde nach Aktivität, Chronizität und Atrophie charakterisiert (Dixon et al. 1996). Wie in *Tabelle 3.1* dokumentiert, ließen sich fünf Krankheitsgruppen abgrenzen. Bei zwei Patienten konnte anhand der Kriterien Chronizität ≤ 1 , keine Aktivität und keine Atrophie histologisch eine normale Mukosa (N) identifiziert werden. 44 Patienten ohne Aktivität, Atrophie und intestinale Metaplasie, jedoch mit einem Chronizitätsindex > 1 , wurden zu der Gruppe chronische Gastritis ohne Atrophie und ohne intestinale Metaplasie (CG) zusammengefasst. 41 Patienten zeigten Merkmale von Atrophie mit oder ohne intestinale

Metaplasie und wurden der Gruppe chronisch atrophische Gastritis \pm intestinale Metaplasie (CAG \pm IM) zugeordnet. Bei 6 Patienten wurde histologisch die Diagnose eines Magenkarzinoms (MaCa) gestellt. Die fünfte Krankheitsgruppe mit insgesamt 6 Patienten beinhaltete solche mit einer gastroduodenalen Ulkuskrankheit, sowie einen Patienten mit einem MALT-Lymphom und einen Patienten mit einem Neuroendokrinen Tumor (PUD/MALT-L./NET). Bei der Bestimmung der Anti-CagA-Immunglobuline zeigten sich im Exakten Fisher-Test signifikante Unterschiede in den Krankheitsgruppen ($p = 0,025$). Die Gruppe der Anti-CagA-IgG positiven Patienten enthielt signifikant mehr Patienten mit einer chronisch atrophischen Gastritis \pm intestinale Metaplasie ($p = 0,017$) und mit einem Magenkarzinom ($p = 0,024$), als solche mit einer chronischen Gastritis (CG) ohne Atrophie und intestinale Metaplasie. Zu der Anti-CagA-IgG negativen Kohorte zählten mehr Patienten mit chronischer Gastritis ohne Atrophie und intestinale Metaplasie (CG), sowie Patienten mit einer gastroduodenalen Ulkuskrankheit (PUD/MALT-L./NET). Im Blut der zwei Patienten mit histologisch gesicherter unauffälliger Mukosa (N) waren ebenfalls keine Anti-CagA-Immunglobuline nachweisbar (*Abbildung 3.1*).

Tabelle 3.1: Analyse der *H. pylori*-CagA-Serologie in Magenbiopsien. Das Studienkollektiv beinhaltete 99 Patienten. Die Tabelle gibt die Verteilung der CagA-Serologie in Bezug zur histologischen Beurteilung der Magenbiopsien wieder. Insgesamt wurden 5 Krankheitsgruppen unterschieden. Die größte Gruppe (chronische Gastritis ohne Atrophie und ohne intestinale Metaplasie) beinhaltete 44 Patienten (44,4 %). Insgesamt wiesen 30 Patienten (30,3 %) eine positive Anti-CagA-IgG-Serologie im Blut auf. In den einzelnen Krankheitsgruppen ergaben sich hinsichtlich der Antikörperproduktion gegen das CagA-Protein signifikante Unterschiede ($p = 0,025$).

	<i>H. pylori</i> + Anti-CagA- IgG – (%)	<i>H. pylori</i> + Anti-CagA- IgG + (%)	Gesamtzahl
Histopathologie			
normale Mukosa (N)	2 (100)	0	2
chronische Gastritis ohne Atrophie und ohne intestinale Metaplasie (CG)	36 (81,8)	8 (18,2)	44
chronisch atrophische Gastritis \pm intestinale Metaplasie (CAG/ \pm IM)	24 (58,5)	17 (41,5)	41
gastroduodenale Ulkuskrankheit oder MALT-Lymphom oder Neuroendokriner Tumor (PUD/MALT-L./NET)	5 (83,3)	1 (16,7)	6
Magenkarzinom (MaCa)	2 (33,3)	4 (66,7)	6
Gesamtzahl	69 (69,7)	30 (30,3)	99

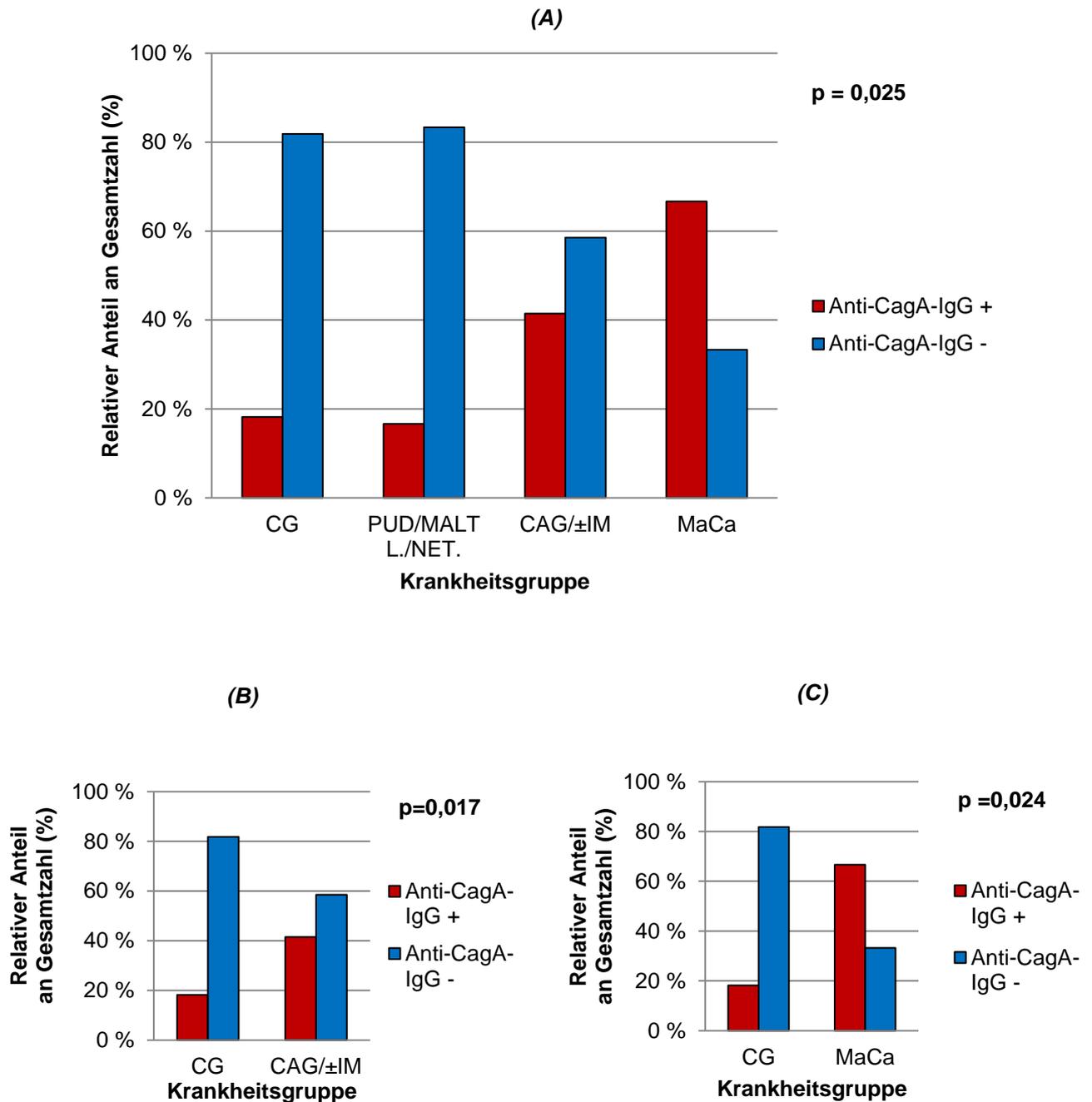


Abbildung 3.1: Graphische Darstellung der Krankheitsgruppen im Zusammenhang zur CagA-Serologie. (A) Abgebildet ist die prozentuale Verteilung des CagA-IgG-Status innerhalb von vier Krankheitsmanifestationen. Die roten Balken repräsentieren den Anteil der Patienten mit einer positiven Anti-CagA-IgG Konzentration, während die blauen Balken die Patienten ohne Antikörper gegen CagA dokumentieren. (B) Der Anteil an Patienten mit einer chronisch atrophischen Gastritis \pm intestinale Metaplasie (CAG/ \pm IM) ist signifikant höher in der Anti-CagA-IgG positiven Gruppe, als die Anzahl an Patienten mit einer chronischen Gastritis ohne Atrophie und intestinale Metaplasie (CG) ($p = 0,017$). (C) Der gleiche Sachverhalt ergibt sich bei Patienten mit einem Magenkarzinom (MaCa) im Vergleich zur Kohorte der chronischen Gastritis (CG) ($p = 0,024$).

3.2 Identifikation des *cagA*-Gen bei Patienten mit oder ohne Anti-CagA-IgG

Das *cagA*-Gen ist am 3'-Ende der *cag*-PAI lokalisiert und kodiert für das CagA-Protein, welches anschließend mit Hilfe des T4SS in die Wirtszelle eingeschleust wird (Hatakeyama 2004). Wir untersuchten zunächst, wie viele *H. pylori*-Stämme der 99 Patienten Träger des *cagA*-Gens waren. Dazu wurden die Antrum- und Korpusbiopsien analysiert. Das Gen wurde mit spezifischen *cagA*-Primern identifiziert und mittels einer Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Um die PCR Produkte nachzuweisen, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die DNA Fragmente wiesen eine spezifische Basenpaarlänge (bp) auf, welche im Vergleich zum mitgeführten DNA-Längenstandard identifiziert wurde. Wie in der *Abbildung 3.2* exemplarisch dargestellt, ergab sich für das *cagA*-Gen in der Gelelektrophorese unter UV-Licht eine sichtbare Bande bei 349 bp. Das *glmM*-Gen, welches jeder *H. pylori*-Stamm besitzt (Sozzi et al. 2005) und eine spezifische Bande bei 293 bp aufweist, fungierte als Referenzgen. Wie in *Tabelle 3.2* illustriert, waren insgesamt 93 Patienten (93,9 %) *cagA*-Gen positiv. Bei 6 Patienten (6,1 %) war kein Gen nachweisbar. 6 Patienten zeigten in den Biopsien aus Antrum und Korpus des Magens einen abweichenden *cagA*-Gen Status, d.h. nur in einer der beiden Proben wurde das *cagA*-Gen nachgewiesen. In diesen Fällen wurde der Patient der *cagA*-Gen positiven Gruppe zugeordnet.

Die Immunreaktion auf CagA hängt sowohl von der Charakteristik des *H. pylori*-Stammes als auch von anderen Virulenzfaktoren des Bakteriums ab. Wie erwartet und in *Tabelle 3.2* abgebildet, hatten alle 6 Patienten ohne nachweisbare Antikörper gegen CagA einen *cagA*-Gen negativen Stamm. Bei allen Patienten mit positiver CagA-Serologie war auch das *cagA*-Gen nachweisbar. Neben Antikörpern gegen das CagA-Protein lassen sich auch Anti-*H. pylori*-IgG nach einer Infektion mit dem Keim nachweisen. Der Anti-*H. pylori*-IgG Status wurde mittels ELISA (Biohit, Helsinki, Finnland) bestimmt und mit dem CagA-IgG Status verglichen. Der „cut off“-Wert lag bei >30 U/ml. Die *Tabelle 3.3* verdeutlicht, dass sowohl Patienten mit, als auch ohne Anti-CagA-IgG meistens über eine positive Immunantwort gegen *H. pylori* verfügen (93 Patienten). 64 Patienten (92,8 %) der Gruppe Anti-CagA-IgG- und 29 Patienten (6,7 %) der Gruppe Anti-CagA-IgG+ waren auch Anti-*H. pylori*-IgG positiv. Die Korrelationsanalyse zwischen der *H. pylori*-IgG und der Anti-CagA-IgG Konzentration zeigte keine Korrelation (*Abbildung 3.3*).

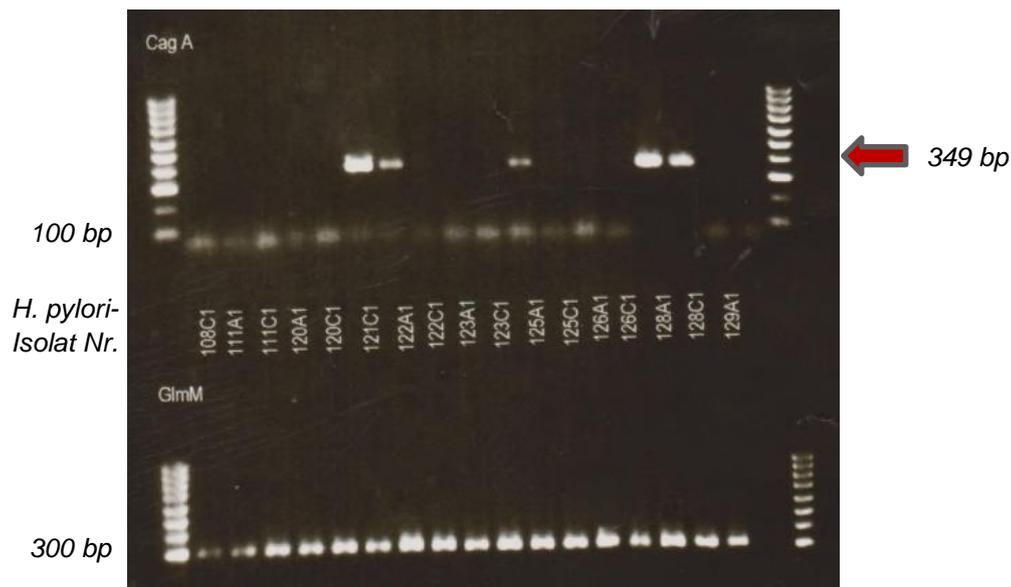


Abbildung 3.2: Agarosegelelektrophorese nach Polymerasekettenreaktion zur Identifikation des *cagA*-Gen. Exemplarisch ist in das Bandenmuster des *cagA*- und *glmM*-Gen im Gel von 17 *H. pylori*-Isolaten aus Antrum (A) und Korpus (C) abgebildet (Isolat 180 C1 - 129 A1). An den Seiten ist der mitgeführte Längenstandard mit den entsprechenden Banden von 100 – 1000 bp zu sehen. Das DNA Fragment des *cagA*-Gens weist eine spezifische Basenpaarlänge von 349 bp auf (roter Pfeil). Die Isolate Nr. 121C1, 122A1, 125A1, 128A1 und 128C1 sind *cagA*-Gen positiv aufgrund einer sichtbaren Bande mit 349 bp. Die anderen hier dargestellten Isolate sind *cagA*-Gen negativ.

Tabelle 3.2: Analyse des *cagA*-Gen bei Patienten mit und ohne Anti-CagA-IgG. (A) Die Anzahl der Patienten, deren *H. pylori*-Stämme ein *cagA*-Gen aufwiesen, lag bei 93 (93,9 %). Alle 6 *cagA*-Gen negativen Patienten hatten eine negative CagA-Serologie. *6 Patienten mit verschiedenen *cagA*+/*cagA*- im Korpus und Antrum wurden der *cagA*-Gen positiven Gruppe zugeordnet.

	<i>H. pylori</i> + Anti-CagA-IgG - (%)	<i>H. pylori</i> + Anti-CagA-IgG + (%)	Gesamtzahl
<i>cagA</i> -Gen* +	63 (67,7)	30 (32,3)	93
<i>cagA</i> -Gen* -	6 (100)	0	6
Gesamtzahl	69 (69,7)	30 (30,3)	99

Tabelle 3.3: Vergleich der CagA- und *H. pylori*-Serologie. Tabellarisch ist der Antikörperstatus gegen *H. pylori* und das CagA-Protein der 99 Patienten illustriert. 93 Patienten waren insgesamt Anti-*H. pylori*-IgG positiv. Bei 64 Patienten wurden zusätzlich Antikörper gegen das CagA-Protein nachgewiesen. 6 Patienten waren Anti-*H. pylori*-IgG negativ und nur bei einem Patienten aus dieser Gruppe wurden Antikörper gegen das CagA-Protein identifiziert.

	<i>H. pylori</i> + Anti-CagA-IgG - (%)	<i>H. pylori</i> + Anti-CagA-IgG + (%)	Gesamtzahl
Anti- <i>H. pylori</i> -IgG + (>30 U/ml)	64 (92,8)	29 (6,7)	93
Anti- <i>H. pylori</i> -IgG - (<30 U/ml)	5 (83,3)	1 (16,7)	6
Gesamtzahl	69 (69,7)	30 (30,3)	99

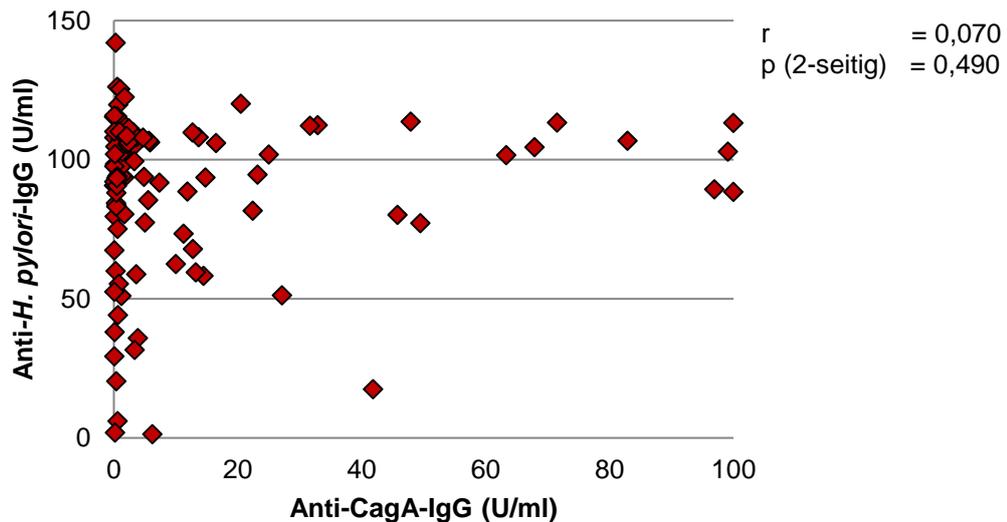


Abbildung 3.3: Korrelationsanalyse zwischen Anti-CagA-IgG und Anti-H. pylori-IgG. Das Diagramm zeigt die Wechselbeziehung zwischen der CagA- und H. pylori-Serologie. Auf der X-Achse ist die Anti-CagA-IgG Konzentration in U/ml graphisch dargestellt. Auf der Y-Achse ist die Anti-H. pylori-IgG Konzentration in U/ml dokumentiert. Unter Anwendung des nicht parametrischen Spearman Tests ergibt sich kein signifikanter Wert. Da der Korrelationskoeffizient mit 0,07 nahe Null liegt, besteht mit hoher Wahrscheinlichkeit kein linearer Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen.

3.3 Nachweis der vacA-Varianten im Kontext mit der CagA-Serologie

Neben dem CagA- ist das VacA-Protein ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor des *H. pylori* (Backert und Tegtmeyer 2010). Die folgende Untersuchung galt der Analyse des vacA-Gens im Studienkollektiv. Für dieses Gen ist ein Polymorphismus mit der Existenz der drei Subtypen vacA s1m1, s1m2 und s2m2 bekannt. Zur Identifikation wurde eine qualitative Polymerasekettenreaktion mit spezifischen vacA s/m-Primern durchgeführt und das amplifizierte Produkt in der Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. 42 Patienten (42,4 %) hatten den Subtyp vacA s1/m1. Die zweithäufigste Isoform war vacA s2/m2. In der *Tabelle 3.4* sind die vacA-Varianten mit den zugehörigen Patienten angegeben. Insgesamt unterscheiden sich die vacA-Subtypen in ihrer entzündlichen Aktivität. Der vacA s1m1 Subtyp vermittelt die stärkste Toxizität innerhalb der drei Varianten. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass der vacA-Polymorphismus und die CagA-Serologie in einem Zusammenhang stehen (Figueiredo et al. 2001). Wie in *Tabelle 3.4* gezeigt, hatten alle *H. pylori*-Stämme von Patienten mit einer positiven CagA Immunantwort einen vacA s1-Subtyp (mit m1: 54,8 % und m2: 30,4 %). Keiner der Patienten mit einem vacA-Status s2m2 war CagA-seropositiv. Bezüglich der Anti-CagA-IgG Konzentrationen fielen in den vacA-Gruppen charakteristische Unterschiede auf. Die Anti-CagA-IgG Konzentration war im Gegensatz zu Patienten mit dem Subtyp vacA s2m2 (0 %) höher bei Patienten mit *H. pylori*-Stämmen vom Subtyp vacA s1m1 (50 %) und vacA s1m2 (36,8 %). Dies lässt einen Einfluss

des *vacA* als *H. pylori* assoziierten Virulenzfaktor auf die Immunreaktion des Infizierten vermuten (Abbildung 3.4).

Tabelle 3.4: Der *vacA*-Polymorphismus unter Berücksichtigung der CagA-Serologie. In der Tabelle ist der *vacA*-Polymorphismus illustriert. Die Einteilung der Patienten erfolgt in s/m Subtypen. Die Auswertung des *vacA*-Polymorphismus zeigt, dass bei allen Patienten mit einer positiven CagA-Serologie ein *vacA* s1-Subtyp (mit m1: 54,8 % und m2: 30,4 %) vorlag. Die *H. pylori*-Stämme mit dem Subtyp s2m2 führten nicht zu einer Bildung von CagA-Antikörpern im Blut der Patienten. *6 Patienten mit verschiedenen *vacA*-Stämmen im Korpus und Antrum wurden der Gruppe mit dem höchsten Pathogenitätspotential zugeordnet.

	<i>H. pylori</i> + Anti-CagA-IgG - (%) n = 69 (69,7)	<i>H. pylori</i> + Anti-CagA-IgG + (%) n = 30 (30,3)	Gesamtzahl n = 99
<i>vacA</i>-Varianten*			
s1	35 (53,8)	30 (46,2)	65
s2	34 (100)	0	34
m1	19 (45,2)	23 (54,8)	42
m2	50 (87,7)	7 (12,3)	57
s1m1	19 (45,2)	23 (54,8)	42
s1m2	16 (69,6)	7 (30,4)	23
s2m2	34 (100)	0	34

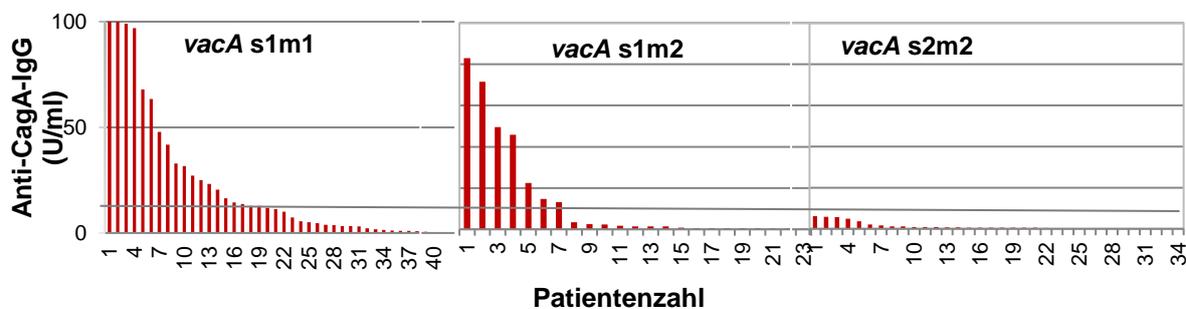


Abbildung 3.4: Anti-CagA-IgG Konzentration der *vacA*-Varianten. Das Diagramm stellt die drei *vacA*-Subtypen mit dem zugehörigen Patientenkollektiv dar (X-Achse). In absteigender Reihenfolge sind die gemessenen Anti-CagA-IgG Konzentrationen in U/ml (Y-Achse) aufgeführt. Bei einer Antikörperkonzentration von >6,25 U/ml im Blut galt der Patient als serologisch positiv für CagA-Antikörper. Die graue Linie gibt den Grenzwert von 6,25 U/ml an. Die Anti-CagA-IgG Konzentrationen weisen deutliche Unterschiede in den drei Gruppen auf. Während alle 34 Patienten mit einem *vacA* s2m2-Status Anti-CagA-IgG negativ waren, konnte bei den anderen beiden Gruppen ein hoher Anteil an Patienten mit einer positiven Anti-CagA-IgG Konzentration identifiziert werden.

3.4 Die Variabilität des CagA-Proteins in *H. pylori*-Stämmen

Die Virulenz des *H. pylori* scheint nicht nur von der Präsenz des CagA-Proteins abzuhängen, sondern auch von der Zusammensetzung der EPIYA-Motive des CagA-Proteins. Diese sich wiederholende Aminosäuresequenzen (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala), welche am C-Terminus jedes CagA-Proteins lokalisiert sind, variieren und haben ein unterschiedliches Pathogenitätspotential. Mit den AB-, ABC-, ABCC- und ABCCC- Motiven sind 4 Isoformen beschrieben, wobei auch andere Subtypen existieren (Hatakeyama 2004; Backert und Tegtmeyer 2010) (siehe Einführung). Die folgenden Analysen beschäftigen sich mit der Untersuchung der EPIYA-Motive in den *H. pylori*-Stämmen unseres Patientenkollektives, um Rückschlüsse hinsichtlich des Einflusses des EPIYA-Status auf die Pathogenität des Bakteriums und die Reaktion im Wirtsorganismus zu ziehen.

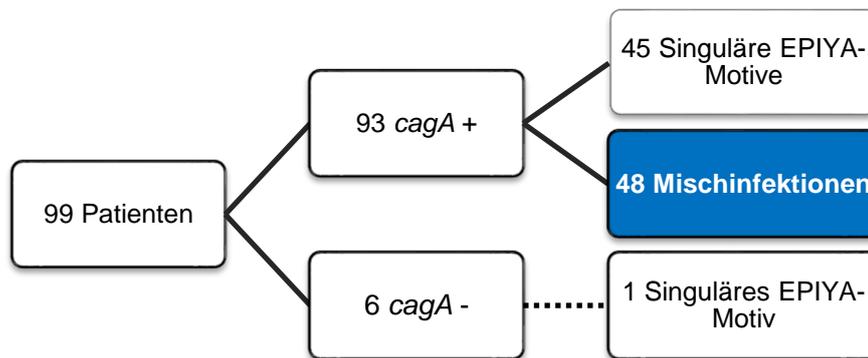
3.4.1 Analyse der EPIYA-Motive des CagA-Proteins

Zunächst wurden die EPIYA-Motive des CagA-Proteins der *H. pylori*-Stämme aller 99 Patienten bestimmt. Für jedes Motiv ist eine Gensequenz mit einer charakteristischen Fragmentlänge im *cagA*-Gen bekannt (siehe Material und Methoden). Die Ermittlung der Gensequenzen erfolgte unter Verwendung spezifischer Primerpaare mit einer qualitativen Polymerasekettenreaktion und anschließender Agarosegelelektrophorese zur Identifikation der Genfragmente. Die *Abbildung 3.5* zeigt, dass sich in allen 93 *cagA*-Gen positiven Stämmen EPIYA-Motive nachweisen ließen. Bei 45 Patienten dieser Gruppe konnte im Gel ein einziges Fragment charakterisiert werden, welches eindeutig einem spezifischen EPIYA-Motiv zuzuordnen war. Bei diesen singulären EPIYA-Motiven handelte es sich entweder um das AB-, ABC-, ABCC- oder ABCCC-Motiv. Wie in *Tabelle 3.5* illustriert, war mit 33 Nachweisen das ABC-Motiv mit Abstand die häufigste Isoform, während z.B. das ABCCC-Motiv nur bei zwei Patienten vorlag. In 48 *cagA*-Gen positiven Proben wurden in der Agarosegelelektrophorese Mehrfachbanden nachgewiesen, was auf eine Mischinfektion hinwies (*Abbildung 3.5*). Die Patienten schienen also mit mehr als nur einem *H. pylori*-Stamm infiziert zu sein, die sich in der Zusammensetzung der PAI, insbesondere der EPIYA-Motive des *cagA*-Gens unterschieden. Auch die 6 *cagA*-Gen negativen Proben wurden als Kontrollgruppe auf EPIYA-Motive untersucht. Da bei diesen Proben das *cagA*-Gen nicht nachweisbar war, hätte auch das entsprechende EPIYA-Motiv fehlen müssen. 5 *cagA*-Gen negative Proben wiesen, wie vermutet, keine EPIYA-Motive auf. Interessanterweise zeigte die *cagA*-Gen negative Probe mit der Isolatnummer 365 ein ABCCC-Motiv. Nach mehrfacher Wiederholung der Bestimmung des *cagA*-Gens ließ sich trotzdem keine Bande bei 349 bp nachweisen. Wir vermuteten deshalb eine Mutation im Bereich der Bindungsstelle des *cagA*-Primers. Anschließend interessierte uns, ob die Variabilität der EPIYA-Motive mit der Bildung von CagA-Immunglobulinen im Patientenblut zusammenhing. In der CagA-Serologie ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

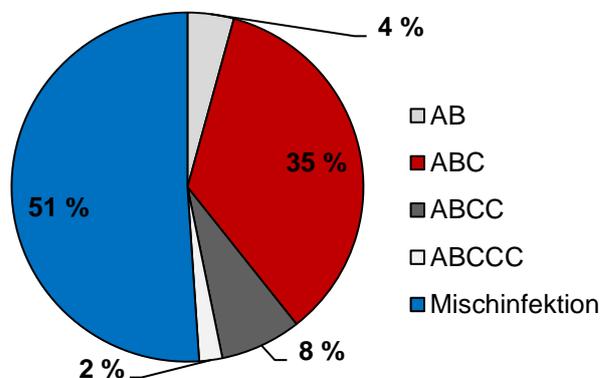
Tabelle 3.5: Die Variabilität der EPIYA-Motive im Hinblick auf den Anti-CagA-IgG-Status. Bei 94 Patienten wurden EPIYA-Motive in *H. pylori*-Stämmen nachgewiesen. Bei den singulären EPIYA-Motiven ergeben sich 4 Isoformen, wobei das ABC Motiv am häufigsten identifiziert wurde. 48 Patienten zeigen Mischinfektionen mit mehreren *H. pylori*-Stämmen. In Bezug auf die CagA-Serologie fanden sich in Bezug auf die Variabilität der EPIYA-Motive in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

	<i>H. pylori</i> + Anti-CagA-IgG – (%)	<i>H. pylori</i> + Anti-CagA-IgG + (%)	Gesamtzahl
EPIYA-Motive*			
negativ	5 (100)	0	5
AB	2 (50)	2 (50)	4
ABC	21 (63,6)	12 (36,4)	33
ABCC	6 (85,7)	1 (14,3)	7
ABCCC	1 (50)	1 (50)	2
Mischinfektion	34 (70,8)	14 (29,2)	48
Gesamtzahl	69 (69,7)	30 (30,3)	99

(A)



(B)



(C)

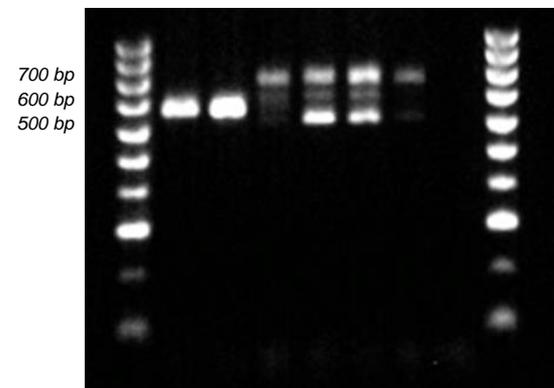


Abbildung 3.5: Charakterisierung des EPIYA-Status und exemplarische Darstellung des Bandenmusters im Gel. (A) Abgebildet ist die Verteilung der EPIYA-Motive. Bei 46 Patienten (49 %) ließ sich ein singuläres EPIYA-Motiv nachweisen, wobei einer der Patienten im Vorfeld als *cagA*-Gen negativ charakterisiert wurde. 48 Patienten (51 %) zeigten Mehrfachbanden im Gel, was auf eine Mischinfektion mit mehreren *H. pylori*-Stämmen hinweist. (B) Im Kreisdiagramm ist die Verteilung der EPIYA-Motive in Prozentwerten angegeben. Insgesamt liegt der Anteil an Mischinfektionen und singulären EPIYA-Motiven ungefähr bei 50 %. Das ABC Motiv ist das häufigste EPIYA-Motiv und findet sich bei 33 Patienten (35 %). (C) Exemplarisch sind die charakteristischen Bandenmuster mit spezifischen Fragmentlängen im Gel nach Amplifikation in der PCR und Agarosegelelektrophorese dargestellt. An den Seiten ist der Längenstandard aufgeführt. Die ersten beiden Banden weisen eine Fragmentlänge von 600 bp auf und entsprechen so einem *H. pylori*-Stamm mit einem EPIYA-ABC Motiv. Es schließen sich 4 Isolate mit Mehrfachbanden (2-3 Banden) an, die vermutlich Mischinfektionen im *cagA*-Gen repräsentieren.

3.4.2 Klonierung und Sequenzanalyse

Um zu überprüfen, ob die 48 Patienten tatsächlich mit mehreren *H. pylori*-Stämmen infiziert waren, wurden 10 Patienten, deren Isolate entsprechende Mehrfachbanden in der PCR-Analyse aufwiesen, ausgewählt und kloniert. Die Anzahl der Banden variierte je *H. pylori*-Isolat und wies auf die Existenz mehrerer EPIYA-Motive hin. Jedes *H. pylori*-Isolat wurde so häufig kloniert, bis mindestens ein Klon mit einem DNA-Fragment jeder Bandenlänge vorlag. Die Anzahl der Klone lag zwischen 2 und 7 je *H. pylori*-Isolat. Anschließend erfolgte

die Sequenzierung der Klone. Die Sequenzanalysen der Klone der 10 *H. pylori*-Isolate und Referenzstämme sind tabellarisch in ausführlicher Form im Anhang aufgeführt (*Tabelle 11.1 im Anhang*). Insgesamt konnte die Existenz mehrerer EPIYA-Motive innerhalb eines *H. pylori*-Isolates bestätigt werden, da die Klone mit unterschiedlich langen DNA-Fragmenten eines identischen Isolates verschiedene EPIYA-Motive aufwiesen. Dies erklärte auch die multiplen Banden im Gel. Bis zu 3 unterschiedliche EPIYA-Motive konnten je Isolat identifiziert werden. Interessanterweise ergaben sich bei der Sequenzanalyse der Isolate einige Basenabweichungen in den EPIYA-Motiven, die im Protein zu weiteren Variationen der Aminosäuresequenzen am C-Terminus führten, wie ein AC-, ein ACCC-, ein ABABC- und ein ABABABC-Muster. Die 10 Isolate und Klone mit den zugehörigen EPIYA-Motiven sind in der *Tabelle 3.6* illustriert. Die Abweichungen in den Gensequenzen der Klone mit DNA-Fragmenten spezifischer Länge der *H. pylori*-Isolate sind in der *Tabelle 3.7* illustriert. Die *Abbildung 3.6* erfasst die Varianten der Gen- und Proteinsequenzen der EPIYA-Motive aller 10 Isolate. Exemplarisch ist die Gen- und Proteinsequenz der EPIYA-Motive der Klone des *H. pylori* Isolat 47C1 in *Abbildung 3.7* dargestellt. Als Kontrolle wurden für dieses Isolat die *H. pylori*-Stämme DAK165 (HM362765.1) und PZ5086 (FJ542241.1) aus der Gendatenbank NCBI ausgewählt.

Tabelle 3.6: EPIYA-Status der 10 *H. pylori*-Isolate. In der Tabelle sind die Ergebnisse der Sequenzanalyse der *H. pylori*-Isolate aufgeführt. Die Anzahl der Klone je Isolat variiert. Die 3 Spalten geben die Menge der EPIYA-Motive in den Isolaten an. Entweder konnten ein, zwei oder drei EPIYA-Motive nachgewiesen werden. Das Isolat 50C1 zeigte in beiden Klonen ein identisches EPIYA-ABC Motiv und wurde deshalb der Gruppe der singulären EPIYA-Motive zugeordnet. Das Isolat 216C wies für das Fragment 550 bp zwei Klone auf. Hier ergab sich ein EPIYA-AC Motiv. Ein weiterer Klon mit einer Fragmentgröße von 650 bp konnte aus technischen Gründen nicht sequenziert werden, weshalb nur ein EPIYA-Motiv für das Isolat identifiziert wurde. Die Isolate 74C1 und 63C1 hatten mit einem ABABC und ABABABC Motiv ein abweichendes EPIYA-Muster, das bisher nicht beschrieben wurde.

Singuläres EPIYA-Motiv	2 EPIYA-Motive	3 EPIYA-Motive
50C1 (2 Klone) ABC	47C1 (2 Klone) ABC, ABCC	54C1 (7 Klone) ABC, ACCC, ABCC
216C (2 Klone) AC	49A1 (3 Klone) ABC, ABCC	63C1 (6 Klone) ABC, ABABC, ABABABC
	95C1 (6 Klone) ABC, ABCC	266C (5 Klone) ABC, ABCC, ABCCC
	99C3 (3 Klone) ABCC, ABCCC	
	74C1 (3 Klone) ABC, ABABC	

Tabelle 3.7: Variationen der EPIYA-A-, -B- und -C-Motive. Die Tabelle stellt die Abweichung der Gensequenzen der EPIYA-A-, -B- und -C-Motive dar. Die in der Literatur beschriebenen Gensequenzen sind mit einem A0, B0 und C0 gekennzeichnet. Für das EPIYA-A-Motiv ergaben sich 3 Abweichungen in den Nukleotiden (A1, A2 und A3). Für das EPIYA-B-Motiv wurden 4 (B1, B2, B3 und B4) und für das C-Motiv 3 Abweichungen (C1, C2, C3) identifiziert (mittlere Spalte). In der rechten Spalte der Tabelle sind die *H. pylori*-Isolate hinsichtlich der Gensequenz im EPIYA-Motiv illustriert. Einige Klone des gleichen *H. pylori*-Isolates zeigten Abweichungen in der Nukleotidsequenz. Dazu zählten die Isolate 54C1, 63C1, 74C1 und 266C. Bei diesen *H. pylori*-Isolaten sind die zugehörigen Klone in Klammern aufgeführt.

EPIYA-Motiv	Gensequenz	<i>H. pylori</i> -Isolatnummer
EPIYA-A	A0	47C1
	A1	49A1; 50C1; 54C1 (Klon 1, 15); 74C1 (Klon 2, 3); 95C1; 99C3; 216C; 266C (Klon 11, 12, 22, 23)
	A2	63C1; 74C1 (Klon 19); 266 (Klon 9)
	A3	54C1 (Klon 13, 14, 16, 17, 18)
EPIYA-B	B0	47C1; 49A1; 50C1; 54C1 (Klon 1, 15); 74C1 (Klon 2); 95C1; 99C3; 266 (Klon 9)
	B1	63C1 (Klon 32, 34, 36, 39, 40); 74C1 (Klon 19)
	B2	63C1 (Klon 32, 34, 36, 39, 40); 74C1 (Klon 19); 266 (Klon 11, 12, 22, 23)
	B3	54C1 (Klon 13, 14, 16, 17, 18)
	B4	74C1 (Klon 3)
EPIYA-C	C0	47C1; 54C1 (Klon 13, 14, 16, 17, 18); 63C1; 74C1 (Klon 2, 3); 95C1; 99C3; 216C; 266C
	C1	49A1
	C2	50C1; 54C1 (Klon 1, 15)
	C3	74C1 (Klon 19)

10 *H. pylori*-IsolateEPIYA-A

Proteinsequenz: E P I Y A K V N K K K T G Q
 Gensequenz: **A0** GAA CCC ATT TAT GCT AAA GTT AAT AAA AAG AAA ACA GGA CAA

Proteinsequenz: E P I Y A K V N K K K **A** G Q
 Gensequenz: **A1** GAA CCC ATT TAT GCT AAA GTT AAT AAA AAG AAA **GCA GGG** CAA
A2 GAA CCC ATT TAT GCT AAA GTT AAT AAA AAG AAA **GCA** GGA CAA

Proteinsequenz: E P I Y A **Q** V N K K K T G Q
 Gensequenz: **A3** GAA CCC ATT TAT GCT **CAG** GTT AAT AAA AAG AAA ACA GGA CAA

EPIYA-B

Proteinsequenz: E P I Y A Q V A K K V
 Gensequenz: **B0** GAA CCC ATT TAC GCT CAA GTT GCT AAA AAG GTA
B1 GAA CCC ATT TAT GCT CAA GTT GCT AAA AAG **GTG**
B2 GAA CCC ATT TAT GCT CAA GTT GCT AAA AAG GTA

Proteinsequenz: E P I Y **T** Q V A K **N** **G**
 Gensequenz: **B3** GAA CCC ATT TAT **ACT** CAA GTT GCT AAA AAT **GGA**

Proteinsequenz: E P I Y **T** Q V A K K V
 Gensequenz: **B4** GAA CCC ATT TAT **ACT** CAA GTT GCT AAA AAG GTA

EPIYA-C

Proteinsequenz: E P I Y A T I D D L G
 Gensequenz: **C0** GAA CCC ATT TAT GCT ACG ATT GAT GAT CTC GGC
C1 GAA CCC ATT TAT GCT ACG ATT GAT GAT CTC **GGT**

Proteinsequenz: E P I Y A T I D D L **S**
 Gensequenz: **C2** GAA CCC ATT TAC GCT ACG ATT GAT GAT CTC **AGT**

Proteinsequenz: E P I Y A T I D D L -
 Gensequenz: **C3** GAA CCC ATT TAT GCT ACG ATT GAT GAT CT- **---G**

Abbildung 3.6: Analyse der Gen- und Proteinsequenzen von 10 *H. pylori*-Isolaten mit Mehrfachbanden in der Agarosegelelektrophorese. Schematisch sind die Variationen der Gen- und Proteinsequenzen der EPIYA-A-, -B- und -C-Motive der 10 *H. pylori*-Isolate dargestellt. Die Abweichungen der Gensequenzen von der Literatur werden für das EPIYA-A-Motiv mit A1, A2 und A3, für das EPIYA-B-Motiv mit B1, B2, B3 und B4 und für das C-Motiv mit C1, C2, C3 beziffert. In roten Buchstaben sind die Basenabweichungen in den Gensequenzen der 10 *H. pylori*-Isolate dokumentiert. Teilweise führten diese Unterschiede in den Basen bei der Translation auch zu Veränderungen der Aminosäuresequenz der EPIYA-Motive, welche jeweils oberhalb der Gensequenz abgebildet sind. Die jeweils abweichende Aminosäure ist rot markiert. Einige Nukleotidabweichungen im Basentriplett führten nach Translation nicht zu einer Veränderung der Aminosäuren, wie exemplarisch bei der Gensequenz A1 und A2.

H. pylori-Isolat 47C1**(1) Gensequenz:**

```

1/      ACAATGGTCTCAAAAACGGCAAGGATAAAGGACCTGAAGAACCCATTTATGCTAAAGTT
2/      ACAATGGTCTCAAAAACGGCAAGGATAAAGGACCTGAAGAACCCATTTATGCTAAAGTT
HM362765.1  ATAATGGTCTCAAAAACGGCAAGGATAAAGGACCTGAAGAACCCATTTATGCTCAGGTT
FJ542241.1  ATAATGGTCTCAAAAACGGCAAGGATAAAGGACCTGAAGAACCCATTTATGCTCAAGTT

1/      AATAAAAAGAAAACAGGACAAGTAGCTAGCCCTGAAGAACCCATTACGCTCAAGTTGC
2/      AATAAAAAGAAAACAGGACAAGTAGCTAGCCCTGAAGAACCCATTACGCTCAAGTTGC
HM362765.1  AATAAAAAGAAAACAGGACAAGTAGCTAGCCCTGAAGAACCCATTATGCTCAAGTTGC
FJ542241.1  AATAAAAAGAAAACAGGACAAGTAGCTAGCCCTGAAGAACCCATTATCTCAAGTTGC

1/      TAAAAGGTAAATGCAAAAATTGACCGACTCAATCAAATAGCAAGTGGTTTGGGTGGTG
2/      TAAAAGGTAAATGCAAAAATTGACCGACTCAATCAAATAGCAAGTGGTTTGGGTGGTG
HM362765.1  TAAAAGGTAAATGCAAAAATTGACCGACTCAATCAAATAGCAAGTGGTTTGGGTGGTG
FJ542241.1  TAAAAGGTAAATGCAAAAATTGACCGACTCAATCAAATAGCAAGTGGTTTGGGTGGTG

1/      TAGGGCAAG---CGGGCTTCCCTTTGAAAAGGCATGATAAAGTTGATGATCTCAGTAAG
2/      TAGGGCAAG---CGGGCTTCCCTTTGAAAAGGCATGATAAAGTTGATGATCTCAGTAAG
HM362765.1  TAGGGCAAGCAGCGGGCTTCCCTTTGAAAAGGCATGATAAAGTTGAAAGATCTCAGTAAG
FJ542241.1  TAGGGCAAGCAGCGGGCTTCCCTTTGAAAAGGCATGATAAAGTTGATGATCTCAGTAAG

1/      GTAGGGCGGATCAGTTAGCCCTGAACCCATTTATGCTACGATTGATGATCTCGGCGGAC
2/      GTAGGGCGGATCAGTTAGCCCTGAACCCATTTATGCTACGATTGATGATCTCGGCGGAC
HM362765.1  GTAGGGCGGATCAGTTAGCCCTGAACCCATTTATGCTACGATTGATGATCTCGGCGGAC
FJ542241.1  GTAGGGCGGATCAGTTAGCCCTGAACCCATTTATGCTACAATTGATGATCTCGGCGGAC

1/      CTTTCCCTTTGAAAAGGCATGATAAAGTTGATGATCTCAGTAAGGTAGGGCGATCAGTT
2/      CTTTCCCTTTGAAAAGGCATGATAAAGTTGATGATCTCAGTAAGGTAGGGC-----
HM362765.1  CTTTCCCTTTGAAAAGGCATGCTAAAGTTGAAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCGATCAGTT
FJ542241.1  CTTTCCCTTTGAAAAGGCATGATAAAGTTGATGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTCAAGG

1/      AGCCCTGAACCCATTTATGCTACGATTGATGATCTCGGCGGACCTTCCCTTTGAAAAG
2/      -----
HM362765.1  AGCCCTGAACCCATTTATGCTACGATTGATGATCTCGGCGGACCTTCCCTTTGAAAAG
FJ542241.1  GAGC-----

```

(2) Proteinsequenz:

```

1/      TLVGNLSGIEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNN-NNGLKNGKDKGPEEPIYAKV
2/      TLVGNLSGIEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNN-NNGLKNGKDKGPEEPIYAKV
HM362765.1  TLVGNLSGIEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNN-NNGLKNGKDKGPEEPIYAQV
FJ542241.1  TLVGNLSGIEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNN-NNGLKNGKDKGPEEPIYAQV

1/      NKKKTGQVASPEEPIYAQVAKVNAKIDRLNQIASGLGGVQA-GFPLKRHDKVDL
2/      NKKKTGQVASPEEPIYAQVAKVNAKIDRLNQIASGLGGVQA-GFPLKRHDKVDL
HM362765.1  NKKKTGQVASPEEPIYTQVAKVNAKIDRLNQIASGLGGVQAAGFPLKR-----
FJ542241.1  NKKKTGQVASPEEPIYAQVAKVNAKIDRLNQIASGLGGVQAAGFPLKHKDKVEDL

1/      SKVGRSVSPEEPIYATIDDLGGFPLKRHDKVDL SKVGRSVSPEEPIYATIDDLGGF
2/      SKVGRSVSPEEPIYATIDDLGGFPLKRHDKVDL SKVGLSREQLTQKIDNLNQA
HM362765.1  -----DKVDL SKVGRSVSPEEPIYATIDDLGGF
FJ542241.1  SKVGRSVSPEEPIYATIDDLGGFPLKRHDKVDL SKVGRSVSPEEPIYATIDDLGGF

```

Abbildung 3.7.: Gen- und Proteinsequenz von H. pylori-Isolat 47C1. Exemplarisch sind die Gen- (1) und Proteinsequenzen (2) der zwei Klone von H. pylori-Isolat 47C1 abgebildet. HM362765.1 und FJ542241.1 bezeichnen die Schlüsselnummern für H. pylori-Stämme aus der Gendatenbank NCBI. Es wurden zwei verschiedene EPIYA-Motive identifiziert, ein ABC- und ein ABCC-Motiv mit geringen Abweichungen in den Nukleotiden bzw. Aminosäuren (rote Markierung).

3.4.3 Demographische Datenanalyse

Die nachfolgende Analyse untersuchte die Verteilung der CagA-Varianten im Hinblick auf Alter und Geschlecht der Patienten (Tabelle 3.8). Das Durchschnittsalter des Studienkollektives lag bei $54,1 \pm 14,0$ Jahren. Bezüglich des Alters zeigten sich in der ANOVA hinsichtlich des EPIYA-Status keine signifikanten Unterschiede. Es fiel allerdings auf, dass der Altersgradient in den Gruppen *cagA*-Gen negativ, singuläres EPIYA-Motiv und Mischinfektionen zunahm. Patienten mit Mischinfektionen waren im Durchschnitt am ältesten (Mittelwert $56,1 \pm 15,7$ Jahre). Die Patienten, die mit *H. pylori*-Stämmen singulärer EPIYA-Motive infiziert waren, hatten einen Altersdurchschnitt von $52,7 \pm 12,3$ Jahren gegenüber Patienten mit *cagA*-Gen negativen Stämmen, die $48,2 \pm 10,0$ Jahre alt waren (Abbildung 3.8). Auch hinsichtlich der CagA-Serologie zeigte sich ein zunehmender Altersgradient in der Gruppe der Patienten mit einem singulären EPIYA-Motiv ($51,9 \pm 11,8$ Jahren) und denen mit einer Mischinfektion ($58,7 \pm 17,6$ Jahren) (Tabelle 3.8).

Von den 99 Patienten waren 72 (72,7 %) weiblich und 27 (27,3 %) Patienten männlich. Alle 6 *cagA*-Gen negativen Patienten waren Frauen. Mit insgesamt 66 Patienten waren ca. zwei Drittel der 93 *cagA*-Gen positiven Patienten weiblich und 27 Patienten männlich. Bei der Untersuchung des EPIYA-Status ergab sich in der statistischen Analyse (Exakter Fisher-Test) kein signifikanter Unterschied in der Geschlechterverteilung. Bei Frauen lag der Anteil singulärer EPIYA-Motive/Mischinfektion bei 52,2 % zu 47,8 %, während bei Männern der analoge Anteil 40,7 % zu 59,3 % betrug. Auch in Bezug auf den CagA-IgG Status zeigten Frauen und Männer ein ähnliches Verteilungsmuster.

Tabelle 3.8: Analyse der Verteilung von Alter und Geschlecht. Tabellarisch sind die demographischen Daten Alter und Geschlecht in der Gesamtpopulation des Studienkollektives und angesichts des Anti-CagA-IgG Status abgebildet. Für beide Aspekte ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den EPIYA- und Anti-CagA-IgG Status. Beim Vergleich des Alters zeigt sich ein zunehmender Altersgradient bei komplexeren EPIYA-Motiven. In Bezug auf das Geschlecht ergeben sich bei der Analyse der CagA-Immunglobuline im Patientenblut in den drei Patientengruppen *cagA*-Gen negativ, singuläres EPIYA-Motiv und Mischinfektion keine signifikanten Unterschiede.

	<i>H. pylori</i> + Anti-CagA-IgG - (%)	<i>H. pylori</i> + Anti-CagA-IgG + (%)	Gesamtzahl
Alter (Mittelwert \pm SD)	$53,7 \pm 13,7$	$55,1 \pm 15,0$	$54,1 \pm 14,1$
<i>cagA</i> -Gen -	$48,2 \pm 10,0$	-	$48,2 \pm 10,0$
Singuläres EPIYA-Motiv	$53,1 \pm 12,7$	$51,9 \pm 11,8$	$52,7 \pm 12,3$
Mischinfektion	$54,8 \pm 14,9$	$58,7 \pm 17,6$	$56,2 \pm 15,7$
Geschlecht			
Männlich	18 (66,7)	9 (33,3)	27
Weiblich	51 (70,8)	21 (29,2)	72
Gesamtzahl	69 (69,7)	30 (30,3)	99

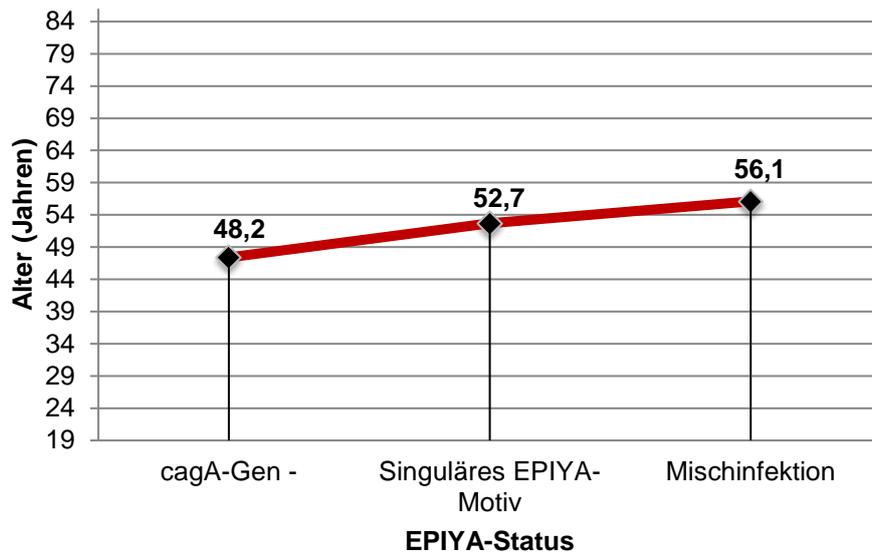


Abbildung 3.8: Altersverteilung in Bezug zum EPIYA-Status. Hinsichtlich des EPIYA-Status ergeben sich drei Gruppen, die auf der X-Achse abgebildet sind. Für jede der drei Manifestationen wurde der Altersdurchschnitt bestimmt und graphisch dargestellt. Die Mittelwerte des Alters sind in jeder Gruppe aufgeführt (schwarze Markierung). Es ergibt sich ein Anstieg des Altersgradienten im Hinblick auf einen komplexeren EPIYA-Status. Die Patienten mit einer Mischinfektion sind im Durchschnitt am ältesten.

3.4.4 Variabilität des EPIYA-Status in den Biopsien aus Korpus und Antrum bei individuellen Patienten

Die Entnahme der Biopsien erfolgte aus unterschiedlichen Regionen des Magens (siehe Material und Methoden). Nach Erfassung aller Biopsien aus dem Antrum und Korpus ergaben sich für die 99 Patienten insgesamt 175 *H. pylori*-Isolate. Bei 25 Patienten konnte nur eine Biopsie, entweder aus Antrum oder Korpus ausgewertet werden. Bei 74 Patienten lag mindestens eine Probe aus beiden Lokalisationen vor. Im Folgenden untersuchten wir, ob der EPIYA-Status der *H. pylori*-Stämme eines Patienten in den Biopsien aus beiden Lokalisationen identisch war, oder ob Unterschiede in den Proben vorlagen. Der zweiseitig betrachtete Vorzeichentest zur Untersuchung verbundener Stichproben ergab, dass der EPIYA-Status der *H. pylori*-Isolate aus Korpus- und Antrumbiopsien nicht immer übereinstimmte. Insgesamt identifizierten wir bei 16 Patienten einen abweichenden EPIYA-Status in den Korpus- und Antrumbiopsien. Diese Analyse war nicht signifikant. Die Patienten mit unterschiedlichen EPIYA-Motiven in den Biopsien wurden in der Gesamtuntersuchung zu der Gruppe der Mischinfektionen gezählt. In *Abbildung 3.9* sind die identifizierten EPIYA-Motive in den Korpus- und Antrumbiopsien illustriert. Bei dem Vergleich der Biopsien hinsichtlich des EPIYA-Status betrug der Anteil an Mischinfektionen 42 % (36 Isolate) und der Anteil an singulären EPIYA-Motiven 58 % (49 Isolate), wobei der Anteil an ABC Motiven am höchsten war. Im Antrum war der Anteil an Mischinfektionen mit

39 % (30 Isolate) geringer und der Anteil an singulären EPIYA-Motiven lag bei 61 % (48 Isolate).

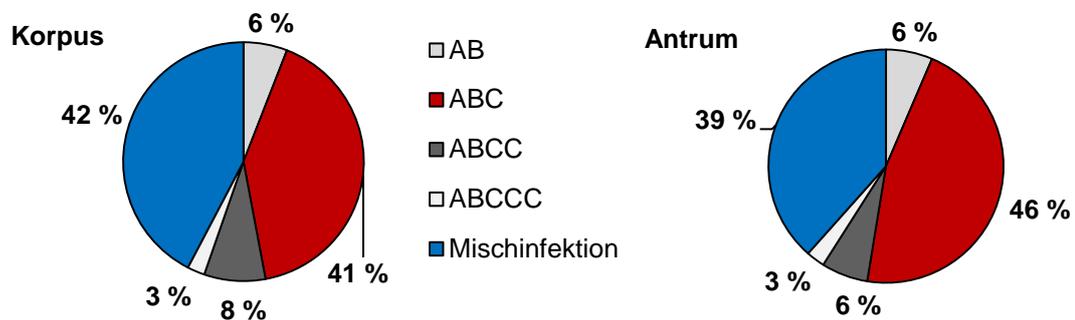


Abbildung 3.9: Grafische Darstellung des EPIYA-Status in den Biopsien aus Magenkorpus und -antrum. In den beiden Tortendiagrammen sind singuläre EPIYA-Motive und der Anteil an Mischinfektionen in Prozentwerten (%) illustriert. Die Verteilung der EPIYA-Varianten war zwischen Antrum und Korpusbiopsien vergleichbar.

3.4.5 Analyse des EPIYA-Status im Hinblick auf den histopathologischen Befund der Biopsien

Die anschließenden Überlegungen beschäftigten sich mit der Frage, ob der EPIYA-Status eine Bedeutung für die Manifestation gastrointestinaler Erkrankungen hat. Dazu wurde der EPIYA-Status innerhalb der vier Krankheitsgruppen analysiert. Wie die *Abbildung 3.10* veranschaulicht, ergaben sich bei dieser Analyse unter Anwendung des Exakten Fisher-Tests keine signifikanten Unterschiede. Es ist in der Literatur beschrieben, dass mit Anzahl der EPIYA-C Motive die Pathogenität des *H. pylori*-Stammes steigt und es eine Korrelation zwischen der Anzahl an C-Motiven und dem Risiko ein Magenkarzinom zu entwickeln gibt (Ferreira et al. 2012c). Diese Hypothesen konnten für unser Patientenkollektiv nicht eruiert werden. Einerseits war die Anzahl an Patienten mit mehr als einem EPIYA-C Motiv zu gering. Andererseits erschwerte die limitierte Menge an Magenkarzinompatienten im Studienkollektiv eine adäquate Aussage. Deswegen erfolgte eine Analyse des EPIYA-Status nur in den zwei Krankheitsmanifestationen „chronische Gastritis ohne intestinale Metaplasie und ohne Atrophiezeichen“ (CG) und „chronisch atrophische Gastritis mit oder ohne intestinale Metaplasie“ (CAG ± IM). Beim Vergleich der Patienten mit einer CG in den Magenbiopsien (39 Patienten) und den Patienten mit einer CAG ± intestinale Metaplasie (40 Patienten) ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des EPIYA-Status (Chi-Quadrat-Test). Der Anteil an Mischinfektionen war bei der Patientengruppe mit chronischer Gastritis (CG) geringfügig, aber nicht signifikant höher, als bei den Patienten mit CAG ± IM (Chi-Quadrat-Test).

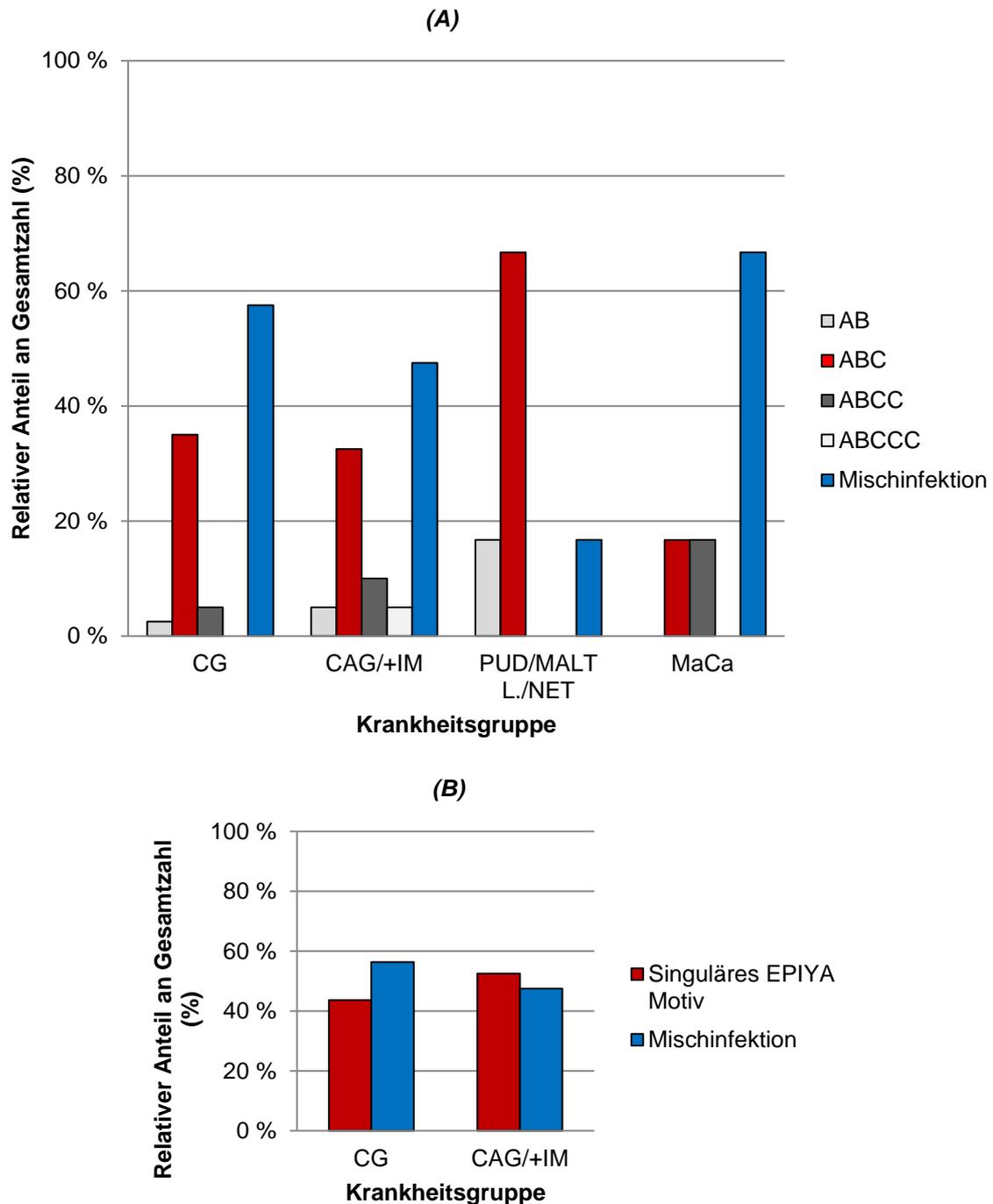


Abbildung 3.10: Verteilung der EPIYA-basierten Varianten bei Patienten mit verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen. (A) Im Säulendiagramm ist der Anteil der EPIYA-Motive in prozentualer Verteilung innerhalb von vier verschiedenen Krankheitsgruppen aufgeführt. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die EPIYA-Motive in den einzelnen Gruppen. Der Anteil an Patienten mit *H. pylori*-Stämmen, deren CagA-Protein mehr als ein EPIYA-C Motiv besitzt, ist in unserem Patientenkollektiv zu gering. Die Hypothese hinsichtlich der erhöhten Pathogenität mit ansteigendem C Motiv konnte deshalb weder widerlegt noch belegt werden. **(B)** Zur Vereinfachung der Analyse wurde der EPIYA-Status in zwei Gruppen untergliedert und nur die zwei Krankheitsgruppen „chronischen Gastritis ohne intestinale Metaplasie und ohne Atrophiezeichen“ (CG) und „chronisch atrophische Gastritis mit oder ohne intestinale Metaplasie (CAG ± IM) untersucht. Der Anteil an Patienten mit *H. pylori*-Stämmen mit singulären EPIYA-Motiven lag bei der CAG ± intestinale Metaplasie bei 52,5 % gegenüber 43,6 %. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant.

3.4.6 Zusammenhang zwischen EPIYA-Status und *vacA*-Polymorphismus

Da sich in den vorangegangenen Analysen herausgestellt hat, dass die CagA-IgG Konzentration im Blut der Patienten durch den Polymorphismus des *vacA*-Gens signifikant beeinflusst wird, interessierte uns nun die Bedeutung dessen auf den EPIYA-Status des *cagA*-Gens. Folglich stellten wir bei allen Patienten die einzelnen *vacA*-Subtypen dem *cagA* EPIYA-Status gegenüber und untersuchten einen möglichen Zusammenhang. Auch Patienten mit *H. pylori* ohne nachweisbares *cagA*-Gen wurden eingeschlossen. Wie in *Abbildung 3.11* dokumentiert, wies der Hauptteil der 99 Patienten ein Bakterium mit einer *vacA* s1m1-Isoform auf (43 %). Die wenigsten Patienten waren mit einem Keim infiziert, der über die *vacA*-Isoform s1m2 verfügte (23 %). In der statistischen Analyse, unter Anwendung des Exakten Fisher-Tests, stellte sich ein signifikanter Unterschied des EPIYA-Status in Bezug auf die unterschiedlichen *vacA*-Isoformen dar ($p = 0,029$). Patienten mit einem *H. pylori* der *vacA*-Isoform s1m1 hatten am häufigsten ein singuläres EPIYA-Motiv im *cagA*-Gen. Der Anteil an Patienten mit Mischinfektionen war signifikant geringer. Kein Patient mit einem Bakterium der Gruppe *cagA*-Gen negativ wies den *vacA*-Subtyp s1m1 auf. Es ist bekannt, dass der Subtyp *vacA* s1m1 die stärkste entzündliche Aktivität innerhalb der drei *vacA*-Varianten vermittelt. Aufgrund der Analysen lässt sich vermuten, dass Patienten mit einem *H. pylori*-Stamm mit der *vacA*-Isoform s1m1 und einem singulären EPIYA-Motiv im *cagA*-Gen das höchste Pathogenitätspotential besitzen. Gestützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass Patienten mit einem Bakterium der *vacA*-Isoform s2m2, welche als Subtyp mit der geringsten entzündlichen Aktivität gilt, den höchsten Anteil an *cagA*-Gen negativen Patienten ausmachen. Auch der Anteil an Mischinfektionen ist in diesem Kollektiv im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen (*vacA* s1m1 und *vacA* s1m2) am höchsten. Dies könnte dafürsprechen, dass im Laufe der Lebenszeit des *H. pylori* im Wirtsorganismus verschiedene Faktoren zu genetischen Veränderungen im Keim führen, welche in einer Entwicklung von Subpopulationen resultiert, die insgesamt ein geringeres Pathogenitätspotential besitzen und eine schwächere Immunantwort im Infizierten auslösen. Auch die Infektion eines Patienten mit mehreren *H. pylori*-Stämmen könnte zu einer Abschwächung der Pathogenität des einzelnen Stammes und der daraus resultierenden Immunantwort führen.

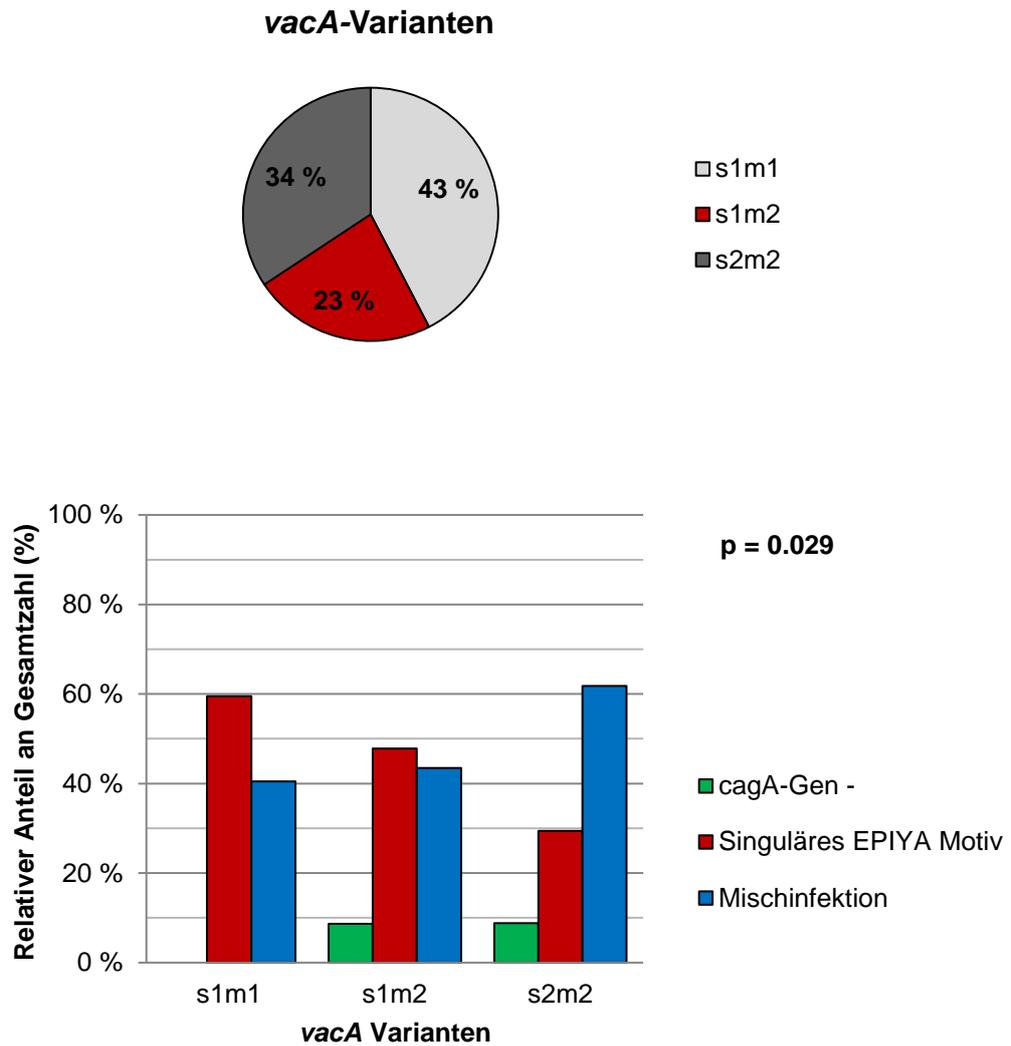


Abbildung 3.11: Verteilung des vacA-Polymorphismus im Hinblick auf den EPIYA-Status. (A) Das Kreisdiagramm repräsentiert die prozentuale Verteilung der vacA-Isoformen bei 99 Patienten. **(B)** Im Säulendiagramm sind die *H. pylori*-Stämme anhand der vacA-Subtypen in 3 Gruppen gegliedert und die prozentuale Verteilung des EPIYA-Musters in jeder Gruppe illustriert. In der statistischen Analyse ergaben sich signifikante Unterschiede des EPIYA-Status hinsichtlich der verschiedenen vacA-Varianten ($p = 0,029$).

4 Diskussion

Das Bakterium *H. pylori* infiziert ca. die Hälfte der Weltbevölkerung. Seit der Entdeckung des Keims vor mehr als 3 Jahrzehnten wurden zahlreiche Erkenntnisse über die Infektion und ihre Schlüsselrolle bei der Pathogenese der Gastritis, der gastroduodenalen Ulkuskrankheit und der Tumorgenese im Gastrointestinaltrakt gewonnen. Wie bereits in der Einführung beschrieben, existiert ein Zusammenhang zwischen der klinischen Ausprägung, der Intensität der Entzündung und den Pathogenitätsfaktoren (z.B. CagA, VacA) des *H. pylori*. Trotzdem sind diese komplexen Interaktionen zwischen dem Bakterium und dem Wirtsorganismus noch nicht abschließend geklärt. Von besonderem Interesse ist hierbei eine noch exaktere Charakterisierung der Virulenzfaktoren des *H. pylori*, um das Pathogenitätspotential einzelner *H. pylori*-Stämme zu ermitteln und ihren Einfluss auf die Krankheitsmanifestation und die Immunantwort des Wirts besser zu verstehen. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen die Untersuchung des *cagA*-Gens und seines Translationsproduktes, sowie die Assoziation zu dem Virulenzfaktor VacA. Da in früheren Studien eine Korrelation zwischen einigen Varianten der EPIYA-Motive des CagA-Proteins und der Entstehung gastraler Neoplasien gezeigt werden konnte, entschlossen wir uns diese Sequenzen in den *H. pylori*-Stämmen unseres Patientenkollektivs zu untersuchen und einen möglichen Pathogenitätszusammenhang zu verifizieren (Ferreira et al. 2012c; Vaziri et al. 2015). Des Weiteren zeigen epidemiologische Studien verschiedener Nationen nicht nur einen allgemeinen Rückgang der *H. pylori*-Infektion in den letzten Jahren, sondern auch den Aspekt einer Keim-spezifischen, individuellen Immunantwort des Wirtsorganismus auf die Infektion mit *H. pylori*. Einige Forschungsergebnisse wiesen in der Vergangenheit eine Diskrepanz zwischen der Existenz des *cagA*-Gens und dem Anti-CagA-IgG-Status nach (Figueiredo et al. 2001; Rhead et al. 2007; Basso et al. 2008). Deshalb führten wir nicht nur systematische Analysen von *H. pylori* und den Virulenzfaktoren CagA und VacA durch, sondern untersuchten insbesondere die Antikörperproduktion gegen das CagA-Protein im Blut unserer Patienten, um eine mögliche Erklärung für die fehlende Anti-CagA-IgG-Seropositivität zu finden. Des Weiteren beschäftigten sich unsere Auswertungen nicht nur mit den histomorphologischen Veränderungen innerhalb der Magenschleimhaut unserer Patienten im Zusammenhang mit den EPIYA-Motiven des CagA-Proteins, sondern auch mit einer möglichen Verknüpfung des Erkrankungsgeschehen und dem Anti-CagA-IgG-Status im Patientenserum.

4.1 Abweichungen zwischen *cagA*-Gen positiven *H. pylori*-Stämmen und der CagA-Serologie

Die Datenlage hinsichtlich eines positiven Anti-CagA-IgG-Status zeigt regionale Unterschiede. Bei *H. pylori*-Infizierten in Asien lässt sich in fast 100 % der *H. pylori*-Stämme das *cagA*-Gen nachweisen und auch die Seroprävalenz CagA-spezifische Antikörper im Blut der infizierten Patienten ist sehr hoch. In europäischen Ländern ist dagegen nicht nur die Prävalenz einer *H. pylori*-Infektion deutlich geringer, sondern auch der Anteil an *cagA*-Gen positiven *H. pylori*-Stämmen und die Anti-CagA-IgG-Konzentration im Patientenserum. Studien der letzten Jahre zeigen eine Korrelation zwischen der Existenz des *cagA*-Gens im *H. pylori*-Stamm und der positiven Immunantwort im Wirtsorganismus. Frühere Analysen an unserer Klinik konstatierten, dass nur 36-43 % der untersuchten Patienten einen positiven CagA-IgG Antikörpertiter aufwiesen (Miehlke et al. 1998; Wex et al. 2011; Selgrad et al. 2014b). Die Daten der aktuellen Studie zeigen mit 30,3 % der *cagA*-Gen positiven *H. pylori*-Stämme eine ähnlich geringe Seroprävalenz für Anti-CagA-IgG. Auch eine kürzlich durchgeführte Studie von den Hollander et al, in der über 4000 Kinder in den Niederlanden hinsichtlich des Anti-CagA-IgG-Status untersucht wurden, zeigt eine ähnliche Prävalenz der CagA-Serologie (32 %) und geht damit trotz des jüngeren Alters der untersuchten Probanden mit unseren Analysen konform (den Hollander et al. 2015). Basierend auf der Erkenntnis, dass die Infektion mit *H. pylori* schon im frühen Kindesalter erfolgt und der Anteil an Anti-CagA-IgG-Seropositiven unseres Studienkollektivs mit einem Durchschnittsalter von 55,1 Jahren ($\pm 15,0$ Jahren) mit den Seroprävalenzen der untersuchten Kinder von den Hollander et al. korreliert, lässt vermuten, dass die spezifische Immunantwort des Wirts sich schon beim initialen Kontakt mit dem Keim manifestiert. Bei Persistenz des Bakteriums und einer fehlenden Sekundärinfektion mit einem anderen *H. pylori*-Stamm scheint die erste Konfrontation der Immunzellen mit dem CagA-Protein des Bakteriums den Immunstatus während des gesamten Lebens zu bestimmen.

Ob der Wirtsorganismus überhaupt eine Immunantwort auf die Infektion mit *H. pylori* entwickelt, hängt von zahlreichen Faktoren ab. Genetische Prädispositionen des Wirts scheinen dabei eine entscheidende Rolle zu spielen. Es konnten einige Wirtsfaktoren und genetische Polymorphismen (z. B. HLA) identifiziert werden, die mit einer Anfälligkeit oder Resistenz gegenüber *H. pylori* einhergehen (Gonzalez et al. 2002). Auch der TLR1 (Toll-like-receptor 1) und das Il-1 β sind mit der Seroprävalenz von *H. pylori* assoziiert und sollten als potentielle Einflussfaktoren auf den IgG-Status in Betracht gezogen werden (El-Omar et al. 2000; Mayerle et al. 2013). Zusätzlich zu den genetischen Wirtsfaktoren ist auch der Mechanismus der Immunreaktion selbst ein Ansatzpunkt, der hinterfragt werden sollte, um das Fehlen einer Immunantwort auf das CagA-Protein bei Patienten, die mit einem *H. pylori*-Stamm mit einem nachweisbaren *cagA*-Gen infiziert sind, zu erklären. Experimente mit *H. pylori*-Impfstoffen aus rekombinanten CagA-, VacA- und NAP-Antigenen (Neutrophil-

activating protein) zeigen, dass die Immunantwort gegenüber dem CagA-Protein ein komplexer und vulnerabler Mechanismus ist. In einer Phase-1-Studie an Gesunden mit diesen Impfstoffen, führte die intramuskuläre Injektion des Impfstoffes immer zu einer starken systemischen Immunreaktion in allen Probanden, registriert am positiven Anti-CagA-IgG-Status im Patientenblut (Malfertheiner et al. 2008). Im Grunde genommen mündet also jeder Kontakt von körpereigenen Entzündungszellen mit dem intakten CagA-Protein und anschließender Antigenpräsentation zu einer Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten. Für eine ungenügende CagA-Antigenpräsentation gegenüber den Immunzellen des Wirts, die letztendlich nicht oder nur in geringem Maße zu einer Produktion CagA-spezifischer Antikörper führt, können zahlreiche Prozesse im Rahmen der Besiedlung des Magens durch *H. pylori* verantwortlich sein (Salama et al. 2013). Eine Schlüsselrolle spielen Modifikationen auf Gen- und Proteinebene des *H. pylori*. Mutationen im *cagA*-Gen und eine fehlerhafte Expression des CagA-Proteins modulieren die Krankheitsmanifestation und Immunantwort des Wirtsorganismus (Sozzi et al. 2005). Auch Einflüsse in unmittelbarer Umgebung des *H. pylori*, wie der pH-Wert verändern die Expression des CagA-Proteins (Karita et al. 1996). Des Weiteren können auch Deletionen innerhalb anderer Gene der *cag*-PAI, welche unter anderem für Komponenten des T4SS kodieren und so für den Sekretionsmechanismus des CagA-Proteins durch das T4SS in die Wirtszelle essentiell sind, zu einer fehlenden Immunantwort des Wirts beitragen (Sozzi et al. 2005). Eine *cag*-PAI-Heterogenität im Genom verschiedener *H. pylori*-Stämme konnte von Sozzi et al. identifiziert und deren Einfluss auf den klinischen Phänotyp und die Immunantwort der *H. pylori*-Infizierten belegt werden. Die Forschungsgruppe analysierte dazu zusätzlich zum *cagA*-Gen auch andere *cag*-Gene als Bestandteile der *cag*-PAI, wie *cagE* und *virB11* und charakterisierte Gendeletionen, die mit einem Funktionsverlust der *cag*-PAI und deren Translationsprodukten einhergehen und so auch eine mögliche Erklärung für eine fehlende Produktion CagA-spezifischer Antikörper bieten (Sozzi et al. 2005). Im Allgemeinen geht man davon aus, dass Patienten mit *H. pylori*-Stämmen, die kein *cagA*-Gen besitzen auch keine CagA-spezifischen Antikörper produzieren. Unsere Analysen bestätigen diese Vermutung, denn wir identifizierten bei den 6 Patienten unseres Studienkollektivs, die kein *cagA*-Gen in der PCR ihrer *H. pylori*-Stämme aufwiesen, eine negative CagA-Serologie. Im Gegensatz dazu zeigten Sozzurri et al. in ihrem Patientenkollektiv einen positiven Anti-CagA-IgG-Status trotz negativem *cagA*-Gen, was darauf schließen lässt, dass die Funktionalität aller Gene der *cag*-PAI eine entscheidende Bedeutung bei der Reaktion des Wirts auf die *H. pylori*-Infektion beizumessen ist (Sozzi et al. 2005).

4.2 Der *cagA*-Status und Validierung des Nachweisverfahrens CagA-spezifischer Antikörper

In unseren Analysen wiesen 6 Patienten einen abweichenden *cagA*-Status in den Biopsien aus dem Antrum und Korpus des Magens auf. Dieses Phänomen wurde schon in anderen Studien nachgewiesen und könnte der Beweis für die Koexistenz von *H. pylori*-Stämmen in einer Person und somit die Kolonisation *cagA*-Gen positiver und *cagA*-Gen negativer *H. pylori*-Stämme in der Magenschleimhaut eines Patienten sein (Figura et al. 1998; Enroth et al. 1999). Es wird auch diskutiert, dass sich Patienten primär mit einem singulären *H. pylori*-Stamm infizieren und bei Persistenz des Keims im Magen durch Genmutationen und Rekombinationen verschiedene Koloniesubtypen mit unterschiedlichen *cagA*-Genotypen entwickeln (Kersulyte et al. 1999; Kraft et al. 2006). Sozzi et al. haben herausgefunden, dass bei Patienten, die mit genetisch homogenen *H. pylori*-Stämmen infiziert sind, die CagA-Serologie ein verlässlicher Marker ist (Sozzi et al. 2005). Da in unserem Patientenkollektiv nur ein Drittel der *cagA*-Gen Positiven einen positiven Anti-CagA-IgG-Status aufwies, ist es möglich, dass in unseren Patienten mehrere *H. pylori*-Stämme koexistierten oder rekombinante *H. pylori*-Stämme vorlagen, die die Immunantwort beeinflussen und so ursächlich für die diskrepanten Ergebnisse zwischen dem *cagA*-Genotyp und der CagA-Serologie waren. Insgesamt sind detaillierte genetische Analysen verschiedener Kolonien eines Patienten erforderlich, um das Pathogenitätspotential *cagA*-Gen positiver *H. pylori*-Stämme besser zu erklären.

Auch das Testverfahren zum Nachweis spezifischer CagA-Antikörper im Serum der *H. pylori*-Infizierten sollte ebenfalls als potentieller Faktor für den geringen Anteil Anti-CagA-IgG positiver Patienten hinsichtlich Sensitivität und Spezifität hinterfragt werden. In der Vergangenheit konnte die Abhängigkeit des Antikörperstatus *H. pylori*-infizierter Patienten vom Nachweisverfahren gezeigt werden (Figueiredo et al. 2001). Das für unsere Analysen verwendete ELISA-Verfahren weist eine hohe Sensitivität in Bezug auf die Identifikation einer *H. pylori*-Infektion in unserer Region auf und wurde schon in der Vergangenheit in Studien an unserem Institut erfolgreich erprobt (Wex et al. 2011; Selgrad et al. 2014b). Da alle Patienten mit einer positiven CagA-Serologie im ELISA auch das *cagA*-Gen in der PCR aufwies, ist auch eine hohe Spezifität des Verfahrens anzunehmen. Bei der Untersuchung der Antikörper gegen *H. pylori* wiesen 93,9 % einen positiven Anti-*H. pylori*-Status auf und die Korrelationsanalyse zwischen dem Anti-*H. pylori*-IgG- und dem Anti-CagA-IgG-Status zeigte keinen Zusammenhang beider Parameter. Dies lässt darauf schließen, dass die Produktion CagA-spezifischer Antikörper unabhängig von der Anti-*H. pylori*-IgG-Produktion stattfindet und vor allem die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Faktoren den Anti-CagA-IgG-Status beeinflussen.

4.3 Die Assoziation zwischen CagA-spezifischen Antikörpern und dem Erkrankungsmuster im Wirt

Zahlreiche Analysen zeigen, dass die Anti-CagA-IgG-Positivität mit der Krankheitsaktivität im Wirtsorganismus korreliert. In unserem Studienkollektiv ist ebenfalls eine Assoziation des Anti-CagA-IgG-Status mit den histomorphologischen Veränderungen in der Magenschleimhaut erkennbar. In den Untersuchungen wiesen signifikant mehr Patienten mit einem positiven Anti-CagA-IgG-Status eine chronische Gastritis mit Merkmalen von Atrophie und intestinaler Metaplasie im Biopsiefund auf, während Patienten mit negativem CagA-Antikörperstatus in den Magenschleimhautproben keine Auffälligkeiten der Mukosa bzw. Charakteristika einer chronischen Gastritis ohne präneoplastische Veränderungen zeigten. Frühere Studien wiesen ein erhöhtes Risiko für die gastroduodenale Ulkuskrankheit und dem Auftreten des Magenkarzinoms bei Anti-CagA-IgG-Positivität nach (Blaser et al. 1995; Cover et al. 1995; Huang et al. 2003), was unsere Analysen, möglicherweise aufgrund der geringen Anzahl an Patienten mit einer erfolgreichen *H. pylori*-Kultivierung in diesen beiden Krankheitsgruppen weder bestätigen, noch widerlegen. Deshalb hat in unserer Studie der Anti-CagA-IgG-Status in Bezug auf die Vorhersage des gastroduodenalen Ulkusleiden und des Magenkarzioms nur eine begrenzte Aussagekraft.

4.4 Die Modulation der systemischen *H. pylori*-CagA Immunantwort durch bakterielle *vacA*-Varianten

Eine hohe Evidenz zeigt der *vacA*-Polymorphismus bezüglich gastrointestinaler Erkrankungen (Basso et al. 2008). Vor allem die *vacA*-Genotypen s1/m1 und s1/m2 sind mit der gastroduodenalen Ulkuskrankheit und insbesondere die s1/m1-Variante mit dem Magenkarzinom assoziiert (Atherton et al. 1995). Auch die i-Region des *vacA*-Gens scheint das Pathogenitätspotential des *H. pylori* zu beeinflussen (Rhead et al. 2007; Basso et al. 2008). Der Vergleich der *vacA*-Genotypen von verschiedenen *H. pylori*-Stämmen in Bezug auf die Immunantwort des Wirts zeigte in der Vergangenheit eine Assoziation zwischen dem *vacA* s1-Genotyp und der Produktion CagA-spezifischer Antikörper im Serum der Infizierten und geht mit der Behauptung einher, dass *cagA*-Gen positive *H. pylori*-Stämme häufiger einen *vacA* s1-Subtyp aufweisen (Figueiredo et al. 2001). Systematische Analysen der *vacA*-Varianten hinsichtlich des Anti-CagA-IgG-Status zeigen in unserem Studienkollektiv ebenfalls eine starke Abhängigkeit der CagA-Antikörperseropositivität vom *vacA* s1-Genotyp bzw. dem *vacA* s1m1-Polymorphismus. Da der Anti-CagA-IgG-Status auch in unseren Analysen mit einer höheren Krankheitsaktivität assoziiert zu sein scheint und ein Zusammenhang zwischen der Produktion CagA-spezifischer Antikörper und dem *vacA* s1m1-Subtyp besteht, lässt darauf schließen, dass der s1m1-Polymorphismus die

höchste entzündliche Aktivität aufweist. Des Weiteren zeigen alle Patienten mit *H. pylori*-Stämmen mit dem *vacA* s2m2-Subtyp einen negativen CagA-Antikörperstatus, was ebenfalls den Einfluss des VacA-Polymorphismus in Bezug auf die Immunantwort des Wirtsorganismus belegt und die Hypothese, dass diese *vacA*-Variante ein geringes entzündliches Potential besitzt bestätigt. Auch die Antikörperkonzentrationen gegen das CagA-Protein zeigen ein charakteristisches Profil. Die höchsten Konzentrationen fanden sich bei Patienten mit *H. pylori*-Stämmen der *vacA* s1m1-Variante, gefolgt von Bakterienstämmen der *vacA* s1m2-Isoform. Unterhalb des cut off-Wertes lagen die Konzentrationen CagA-spezifischer Antikörper von Patienten mit Keimen mit dem *vacA* s2m2-Subtyp. Dies lässt ebenfalls vermuten, dass die Immunantwort auf das CagA-Protein durch den *vacA*-Genotyp und dem entzündlichen Effekt des jeweiligen VacA-Proteins auf die Magenschleimhaut des Infizierten getriggert sein könnte. Im Grunde genommen scheint das Zusammenspiel der Entzündungsreaktion, der Zelltoxizität und der Apoptose durch das VacA-Protein die Interaktion des CagA-Proteins mit dem Immunsystem und so die Immunantwort zu bestimmen. Die Interaktionen zwischen dem CagA- und VacA-Protein sind allerdings komplex. Beide Proteine können sich gegenseitig regulieren oder antagonisieren und die Wechselwirkung zwischen der Wirtszelle und dem Bakterium beeinflussen (Backert und Tegtmeyer 2010; Salama et al. 2013). Die beste Möglichkeit, um zukünftig die Interaktionen zwischen dem CagA- und VacA-Protein besser zu verstehen, scheint die Untersuchung der Wechselbeziehungen beider Proteine im Tiermodell, bei der auch gleichzeitig die systemischen und lokalen Immunantworten des infizierten Organismus beobachtet werden können.

4.5 Die hohe Prävalenz an Mischinfektionen und Diskussion möglicher Ursachen

Wie für *H. pylori*-Infizierte aus Mitteleuropa vermutet, weisen alle *cagA*-Gen positiven *H. pylori*-Stämme unseres Patientenkollektivs einen dominierenden westlichen Typ (Western CagA) hinsichtlich der EPIYA-Motive des CagA-Proteins und eine variable Anzahl der C-Segmente am C-Terminus des CagA-Proteins auf. Das singuläre ABC-Motiv ist in unseren Bakterienstämmen die häufigste Variante. Dieses Ergebnis korreliert mit den Auswertungen anderer Studien (Sgouras et al. 2009; Yadegar et al. 2015). Interessanterweise finden sich bei 51% der Proben mehrere EPIYA-Motive in einem *H. pylori*-Isolat. Dieser Aspekt ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Individuen entweder durch mehrere oder durch einen singulären *H. pylori*-Stamm infiziert sein können und die primäre Besiedlung mit einem einzigen Bakterienstamm über die Zeit durch Mutationen und genetische Rekombinationen zur Entstehung von multiplen *H. pylori*-Subpopulationen führt (Matteo et al. 2007; Reyes-Leon et al. 2007, Olbermann et al. 2010, 2010). Beide Hypothesen sind mögliche Erklärungen für die nachgewiesenen Mischinfektionen in unseren Analysen. Der Beweis

der ersten Hypothese, dass mehrere *H. pylori*-Stämme den Magen gleichzeitig besiedeln, wird durch die Tatsache erschwert, dass diese an unterschiedlichen Bereichen der gastralen Mukosa lokalisiert sein könnten und so möglicherweise bei der Biopsieentnahme gar nicht alle Stämme erfasst werden (Wang et al. 1998). Unsere Auswertungen lassen allerdings die Existenz von multiplen Stämmen vermuten, da beim Vergleich der *H. pylori*-Isolate eines Patienten aus Antrum und Korpus des Magens, einige Proben einen abweichenden *cagA*- und EPIYA-Status aufweisen. Die zweite Hypothese hinsichtlich genetischer Modifikationen eines singulären *H. pylori*-Stammes durch Mutationen und Rekombinationen im Genom des Keims während der chronischen Infektion der Magenmukosa durch den Mikroorganismus konnte im Vorfeld in einigen Studien bestätigt werden (Kersulyte et al. 1999; Kraft et al. 2006; Suerbaum und Josenhans 2007). Diese Mutationen und Rekombinationen im *H. pylori*-Genom gelten als verantwortlich für die Entwicklung einer enormen Stammvielfalt. Als Ursache für die genetischen Veränderungen eines singulären *H. pylori*-Stammes könnte die Anpassung des Bakteriums an einen Stressor, wie z. B. an eine ineffektive antimikrobielle Therapie diskutiert werden. Eine fehlerhafte Eradikationstherapie oder subinhibitorische Konzentrationen der verwendeten Antibiotika können so durch Genmodifikationen die Entwicklung von resistenten Stämmen induzieren (Bjorkholm et al. 2001; Wueppenhorst et al. 2009). Secka et al. haben herausgefunden, dass die Anzahl an Mischinfektionen im Erwachsenenalter zunimmt und Kinder mit *H. pylori*-Stämmen infiziert sind, welche im Verlauf des Lebens unter dem Selektionsdruck aufgrund genetischer Wirts- und bakterieller Faktoren verschiedene *H. pylori*-Genotypen generieren, die dann im Erwachsenenalter prädominieren (Secka et al. 2011b). Die Ergebnisse hinsichtlich eines steigenden Altersgradienten in Bezug auf Mischinfektionen korrelieren mit unseren Analysen, wobei auch der Anteil CagA-spezifischer Antikörper bei den Mischinfektionen mit höherem Alter zunimmt.

Insgesamt ist die Prävalenz der Mischinfektionen in unserem Studienkollektiv für unsere Region mit 51 % unerwartet hoch. Die Prävalenzen variieren je nach geographischer Herkunft weltweit zwischen 5-68 %. Bisherige Studien zeigten deutliche Unterschiede zwischen Industrienationen mit Prävalenzen < 10 % und Entwicklungsländern, in denen ein Anteil an Mischinfektionen von > 50 % nachgewiesen wurde (Boyanova et al. 2009; Kim et al. 2009; Secka et al. 2011a). Allerdings scheinen neben der geographischen Herkunft der *H. pylori*-Infizierten auch das zu untersuchende Material und die Methodik zur Bestimmung der *H. pylori*-Stämme für die unterschiedlichen Prävalenzen verantwortlich zu sein (Secka et al. 2011a; Karlsson et al. 2012). Karlsson et al. haben die Bestimmung des EPIYA-Status aus der Biopsie und aus der Zellkultur verglichen und in 20 % der Proben Unterschiede hinsichtlich der Existenz singulärer EPIYA-C-Motive und Mischinfektionen festgestellt. Die Forschungsgruppe argumentierte, dass die Anpassung individueller *H. pylori*-Stämme an die unterschiedlichen Umweltbedingungen über die Zeit (Biopsie vs. Zellkultur) für die beobachteten Diskrepanzen verantwortlich ist. Die Forschungsgruppe um Kim et al. zeigte

ebenfalls abweichende Ergebnisse der *cagA*-Genotypen der *H. pylori*-DNA aus der Zellkultur und den Biopsien in 16 % der Proben (Kim et al. 2009). Auch in anderen Studien wurde diskutiert, ob die PCR-basierte Genotypisierung direkt aus den Biopsien die Prävalenz von *H. pylori*-Virulenzgenen unterschätzt (Park et al. 2003; Secka et al. 2011b). Als Ursache für die Unterschiede werden hohe Konzentrationen zellulärer genomischer DNA, die als Amplifikationsinhibitoren fungieren und die Existenz von PCR-Inhibitoren oder potenten Nukleasen in den Magenbiopsien vermutet (Park et al. 2003). Diese Faktoren sind im Rahmen der Bestimmung des EPIYA-Status in unserem Studienkollektiv weniger von Bedeutung, da wir ausschließlich Zellkulturen mit aufgereinigter *H. pylori*-DNA untersuchten. Aber auch unsere Methodik sollte kritisch hinterfragt werden, da beispielsweise das Auftreten von Schlierbanden in der qualitativen PCR uneindeutige Ergebnisse lieferte. Deshalb argumentierten wir, dass die Klonierung der *cagA*-Gen-Amplifikationsprodukte und die anschließenden Sequenzierungsanalysen für die exakte Identifikation des EPIYA-Status bedeutsam sind. Unsere Sequenzierungsanalysen betätigten die Existenz von Mischinfektionen, denn die Klone, welche einem singulären *H. pylori*-Isolat entstammten, zeigten einen Genpolymorphismus am C-Terminus des *cagA*-Virulenzgens. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass auch in unserem Studienkollektiv multiple *H. pylori*-Stämme bzw. *H. pylori*-Subpopulationen einen Patientenmagen besiedeln. Im Gegensatz dazu haben Miehle et al. 1999 demonstriert, dass Patienten mit einem Magenkarzinom von einem einzigen prädominanten *H. pylori*-Stamm besiedelt werden (Miehle et al. 1999). Diese Unterschiede scheinen durch den erhöhten Konsum an Antibiotika in den letzten Jahren erklärbar, weshalb vermutlich hochvirulente *H. pylori*-Stämme mit einer erhöhten genetischen Variabilität entstanden sind, die auch mit einem erhöhten gastralen Pathogenitätspotential assoziiert sind. Diese genetische Variabilität des Mikroorganismus zur Anpassung an den Wirtsorganismus trägt auch zur Vermeidung einer Keim-spezifischen Immunantwort durch den infizierten Wirt bei und scheint damit auch eine mögliche Erklärung für die geringe Prävalenz CagA-spezifischer Antikörper zu sein. Diese Tatsache begünstigt einerseits das Überleben des Keims und andererseits die Entstehung schwerwiegender Komplikationen der *H. pylori*-Infektion, wie dem Magenkarzinom.

4.6 Die Variation der EPIYA-Motive des *H. pylori* bei Patienten mit verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen

Die Existenz des *cagA*-Gens des *H. pylori* beeinflusst die Virulenz des Mikroorganismus und ist mit einem höheren Risiko für die Entwicklung präneoplastischer Veränderungen und dem Magenkarzinom verbunden (Parsonnet et al. 1997; Wroblewski et al. 2010). Dabei haben sich in den letzten 15 Jahren zahlreiche Studien mit dem *cagA*-Genpolymorphismus und dem CagA-Protein auseinandergesetzt und diskutiert, ob Varianten in den EPIYA-Motiven dieses Proteins die Pathogenität des *H. pylori*-Stammes beeinflussen und sich der

EPIYA-Status des Bakteriums auf die Krankheitsschwere des infizierten Patienten auswirkt. Insgesamt wird dieser Aspekt sehr kontrovers diskutiert und es existiert bis heute keine eindeutige Meinung hinsichtlich des Zusammenhangs des EPIYA-Status des *H. pylori* und dem histopathologischen Befund des Infizierten. Die *Abbildung 4.1* veranschaulicht das gesamte Spektrum an bisher durchgeführten Forschungsarbeiten zu diesem Themengebiet weltweit und zeigt die Anzahl an Studien in den einzelnen Ländern und deren Ergebnisse hinsichtlich einer möglichen oder keiner Assoziation zwischen der Variabilität der EPIYA-Motive des CagA-Proteins und dem Erkrankungsmuster im Wirtsorganismus. In der *Tabelle 4.1* sind die Studien nach dem Jahr der Veröffentlichung, dem Ursprungsland, der Forschungsgruppe und den assoziierten Erkrankungen aufgeführt. Ca. zwei Drittel der Arbeiten haben sowohl in klinischen Studien, als auch in Experimenten am Tiermodell einen positiven Zusammenhang aufgedeckt. Es wurde herausgefunden, dass mit steigender Anzahl der EPIYA-C-Motive der Phosphorylierungsgrad des CagA-Proteins zunimmt und bei der Existenz von repetitiven C-Segmenten (EPIYA-ABCC; -ABCCC) die Virulenz des Proteins und das Risiko für die Entstehung der atrophischen Gastritis, der intestinalen Metaplasie und dem Magenkarzinom erhöht ist (*siehe Tabelle 4.1*). Studien aus Asien, in denen *H. pylori*-Stämme mit einem ABD-Motiv (East-Asian CagA) verbreitet sind, haben auch für diesen Typ eine Assoziation zum Magenkarzinom identifiziert (Yamaoka et al. 1998; Azuma et al. 2002; Jones et al. 2009). Die Ursache scheint sowohl bei Trägern des EPIYA-D-Motivs, als auch multipler C-Motive das hohe Phosphorylierungspotential dieser Motive zu sein, was mit einer erhöhten Aktivierung der SHP-2-Tyrosinphosphatase durch das CagA-Protein einhergeht und so vermehrt Zellveränderungen induziert werden, die Malignitätscharakter besitzen (Higashi et al. 2002). Des Weiteren werden cagA-Gen positive *H. pylori*-Stämme häufig bei Infizierten mit einer gastroduodenalen Ulkuskrankheit im histopathologischen Befund isoliert (Panayotopoulou et al. 2010; Beltran-Anaya et al. 2014; Vianna et al. 2015). Dies scheint im ersten Moment etwas irreführend, da im Allgemeinen gilt, dass Patienten mit einem Duodenalulkus vor der Entwicklung eines Magenkarzinoms geschützt sind (Uemura 2003). Die Studie um Batista et al. hat auch bestätigt, dass Patienten mit einer hohen Anzahl an EPIYA-C-Motiven zwar ein höheres Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms ausweisen aber nicht für das Ulkusleiden (Batista et al. 2011). Insgesamt zeigen sich für diesen Aspekt diskrepante Ergebnisse. Im Gegensatz zu allen anderen europaweiten Studien haben unsere Analysen keine Assoziation zwischen dem EPIYA-Status und dem histopathologischen Befund der *H. pylori*-Infizierten ergeben. Eine mögliche Ursache könnte die geringe Anzahl an Proben mit mehr als einem EPIYA-C-Segment darstellen. Außerdem begrenzt auch die geringe Zahl an Patienten mit einem Ulkusleiden bzw. einem Magenkarzinom und die geringe Prävalenz an singulären EPIYA-Motiven (49 % der Proben) die Aussage hinsichtlich des Pathogenitätspotentials des EPIYA-Status in unserem Studienkollektiv. Aber auch geographische Einflüsse, genetische Wirts- und Umweltfaktoren, welche in unseren

Analysen nicht untersucht wurden, sollten als Einflussfaktoren in Betracht gezogen werden. Bei der Sequenzierungsanalyse charakterisierten wir in unserer Region *H. pylori*-Stämme mit ABABC und ABABABC-Motiven am C-Terminus des CagA-Proteins und identifizierten für das B-Motiv eine A/T-Abweichung in der Aminosäuresequenz. Dieser Polymorphismus ist von Zhang et al. 2015 in Experimenten an AGS-Zellen untersucht worden, die mit *H. pylori*-Stämmen, welche ein EPIYT-B-Motiv aufwiesen infiziert wurden. Dabei stellte sich heraus, dass diese Abweichung in der Aminosäuresequenz des B-Motivs die Aktivität des CagA-Proteins beeinflusst und mit einer erhöhten Freisetzung von IL-8 und dem „Hummingbird Phänotyps“ einhergeht und Signalwege induziert, die die Karzinogenese fördern (Zhang et al. 2015b). Letztendlich haben auch unserer Analysen gezeigt, dass der Polymorphismus des *cagA*-Gens und seines Translationsprodukts sehr komplex ist und die Auswirkungen auf den Wirtsorganismus nicht abschließend geklärt sind, weshalb dessen Untersuchung auch zukünftig einen hohen Stellenwert in der *H. pylori*-Forschung darstellen, sollte.



Abbildung 4.1: Darstellung der veröffentlichten Studien zur Charakterisierung des EPIYA-Status des *H. pylori* und eines möglichen Pathogenitätszusammenhangs im Wirt. Auf der Weltkarte sind alle Länder aufgeführt, in denen Studien zur Variabilität der EPIYA-Motive des CagA-Proteins durchgeführt wurden. Dabei wurde in 33 Studien untersucht, ob die Anzahl an EPIYA-C-Motiven bzw. die Existenz des ABD-Motivs das Pathogenitätspotential des CagA-Proteins beeinflusst und Auswirkungen auf das Erkrankungsmuster des Patienten besitzt. Unter den Flaggen der Länder ist die Zahl der Studien und in Klammern das Ergebnis (+/-) aufgeführt.

Tabelle 4.1: Strukturierte Illustration der Studien von 1998-2016 hinsichtlich der Fragestellung einer Assoziation des EPIYA-Status mit der gastrointestinalen Erkrankung des *H. pylori*-Infizierten. Die erste Spalte zeigt den Veröffentlichungszeitpunkt. In der zweiten und dritten Spalte der Tabelle sind die Studien anhand der Forschungsgruppe, dem Land (grün) und hinsichtlich des histopathologischen Befundes (rot) dargestellt.

Jahr	+	-
1998	• (Yamaoka et al. 1998); Japan; MaCa	
2002	• (Azuma et al. 2002); Japan; CAG, MaCa	
2008	• (Basso et al. 2008); Italien; MaCa	
2009	• (Jones et al. 2009); Südkorea; MaCa	
2010	• (Salih et al. 2010); Türkei; PUD • (Quiroga et al. 2010); Kolumbien; MaCa • (La Sicinski et al. 2010); Kolumbien; IM, D • (Panayotopoulou et al. 2010); Griechenland; PUD	• (Acosta et al. 2010); Kolumbien • (Shokrzadeh et al. 2010); Iran
2011	• (Batista et al. 2011); Italien; MaCa	
2012	• (Ferreira et al. 2012c); Portugal, MaCa • (Karlsson et al. 2012); Schweden; CAG • (Queiroz et al. 2012); Brasilien; MaCa	• (Le Torres et al. 2012); Kuba • (Chattopadhyay et al. 2012); Indien • (Breurec et al. 2012); Senegal
2013	• (Kalaf et al. 2013); Irak, GU • (Chen et al. 2013); Iran; MaCa • (Vaziri et al. 2013); Iran; MaCa	• (Ogorodnik und Raffaniello 2013, 2013); USA • (Kita et al. 2013); Japan • (Fajardo et al. 2013); Kolumbien
2014	• (Beltran-Anaya et al. 2014); Mexiko; PUD, MaCa	• (Qadri et al. 2014); Indien
2015	• (Honarmand-Jahromy et al. 2015); Iran; GU • (Rocha et al. 2015); Brasilien; MaCa • (Vianna et al. 2015); Brasilien; PUD • (Ferreira et al. 2015); Brasilien; CG • (Haddadi et al. 2015); Iran; GU, MaCa • (Vaziri et al. 2015); Iran; IM, MaCa	• (Zhang et al. 2015a); China
2016	• (Junior et al. 2016); Polen; CG	

4.7 Der Einfluss von Mischinfektionen und anderen Virulenzfaktoren des *H. pylori*

Bei der Gegenüberstellung der Patienten mit einer *H. pylori*-Infektion mit einem singulären EPIYA-Motiv und einer Mischinfektion zeigen sich in den Krankheitsgruppen nur geringe Unterschiede, so dass argumentiert werden kann, dass sich durch die Infektion mit mehreren *H. pylori*-Stämmen bzw. *H. pylori*-Subpopulationen in unserem Studienkollektiv das Pathogenitätspotential nicht verändert. Im Gegensatz dazu hat die Forschungsgruppe um Secka et al. festgestellt, dass bei einer Koexistenz von *cagA*-Gen positiven und negativen *H. pylori*-Stämmen innerhalb eines Patienten, diese signifikant weniger Krankheitsmanifestationen aufweisen, als solche mit ausschließlich *cagA*-Gen positiven oder *cagA*-Gen negativen *H. pylori*-Stämmen. Als Ursache wird angenommen, dass *H. pylori*-Mischinfektionen vor der Entwicklung gastroduodener Erkrankungen schützen (Secka et al. 2011a). Die Existenz eines *cagA*-Gen negativen *H. pylori*-Stammes scheint

das Pathogenitätspotential des virulenteren Stammes zu mildern und so dessen Einfluss auf den Wirtsorganismus zu reduzieren. Eventuell besitzen *cagA*-Gen negative Stämme Faktoren, die den Einfluss von Virulenzproteinen, wie dem CagA-Protein verringern und im Rahmen einer Koexistenz dominieren. Allgemeiner argumentiert scheint eine erhöhte Komplexität an Immunreaktionen während einer chronischen *H. pylori*-Mischinfektion die immunologische Wirkung des individuellen, virulenten Stammes zu verringern und damit auch das Resultat an Pathologien im Wirtsgewebe. Diese Idee geht auch mit der Tatsache einher, dass das Risiko für die Entwicklung eines stärkeren Krankheitsgeschehens höher in Individuen zu sein scheint, welche nur mit einem singulären *H. pylori*-Stamm infiziert sind, auch wenn dieser *cagA*-Gen negativ ist, als ein Individuum mit einer *H. pylori*-Mischinfektion (Secka et al. 2011a). Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem *vacA*-Polymorphismus und dem EPIYA-Status in unserem Studienkollektiv findet sich nicht nur eine Assoziation zwischen beiden Virulenzfaktoren, sondern auch die Hypothese, dass *H. pylori*-Mischinfektionen ein geringeres entzündliches Potential besitzen, als singuläre *H. pylori*-Stämme scheint bestätigt. Die Patienten mit einer Mischinfektion hinsichtlich des EPIYA-Status weisen signifikant häufiger die weniger inflammatorische *vacA*-Variante s2m2 auf, während Individuen mit einem Single-EPIYA-Motiv signifikant häufiger die *vacA*-Isoform s1m1 besitzen. Allerdings sollte bei unseren Analysen kritisch hinterfragt werden, ob die Existenz eines Single-EPIYA-Motivs auch gleichzeitig bedeutet mit einem einzelnen *H. pylori*-Stamm infiziert zu sein. Auch multiple Bakterienstämme könnten Träger des gleichen EPIYA-Motivs sein, werden aber in unseren Analysen nicht als Mischinfektion erfasst. Um zu identifizieren, ob eine Mischinfektion oder eine Infektion mit einem singulären *H. pylori*-Stamm vorliegt sind molekulare Fingerprint-Methoden zur Identifikation identischer Genomstrukturen im Rahmen unserer Studie durchgeführt worden. Die Daten konnten aber aufgrund von Verunreinigungen der Primer nicht ausgewertet werden und sind deshalb nicht aufgeführt. Insgesamt sollten hinsichtlich der Erfassung des Pathogenitätspotentials des Keims auch andere Faktoren in Betracht gezogen werden. Dazu gehört nicht nur die Analyse des *cagA*-Genpolymorphismus, sondern auch die Beurteilung der Funktionalität andere Gene der *cag*-PAI und somit die Charakterisierung weiterer Komponenten des T4SS, sowie der Bestimmung der CagA-Proteinexpression. Denn auch wenn der *H. pylori*-Stamm *cagA*-Gen positiv ist, muss sein Translationsprodukt nicht exprimiert und in die Wirtszelle eingeschleust werden. Auch die Untersuchung einer möglichen posttranslationalen Prozessierung des CagA-Proteins, welche ebenfalls die Aktivität des Proteins verändert, wäre ein weiterer Forschungsansatz, denn bisher existieren dazu nur wenige Studien (Chang et al. 2016). Auch andere Bestandteile der analysierten Pathogenitätsfaktoren, wie beispielsweise die i- und d-Region des *vacA*-Gens und die CM-Region (CagA multimerization region) des CagA-Proteins, sollten zukünftig noch eingehender untersucht werden, um die Virulenz der Faktoren eindeutig zu identifizieren (Braga et al. 2014; Ogorodnik und Raffaniello 2013).

5 Zusammenfassung

Unsere prospektive Studie war die erste in Mitteleuropa, die das *cagA*-Gen in Bezug auf die Variabilität der EPIYA-Motive untersucht hat und die Frage nach einer möglichen Assoziation des EPIYA-Status des CagA-Proteins zum histopathologischen Befund der Patienten stellte. Wir konnten zeigen, dass alle eingeschlossenen Patienten mit einem *cagA*-Gen positiven *H. pylori*-Stamm ein Western CagA-Protein aufwiesen. Unsere Ergebnisse enthüllten außerdem nicht nur eine enorme Variation der EPIYA-Motive (EPIYA-AC, -ABABC), sondern deckten eine unerwartet hohe Anzahl an Mischinfektionen auf, welche durch einen abweichenden *cagA*-Gen-Status und multiple EPIYA-Motive innerhalb eines *H. pylori*-Isolats charakterisiert waren. Unsere Daten bestätigen damit die breite genetische Variabilität von *H. pylori* und befürworten die Notwendigkeit des Nachweises von Virulenzfaktoren des *H. pylori*, um die Schwere der Infektion mit dem Keim besser einschätzen zu können. Trotzdem sollten genetische Wirts- und Umweltfaktoren ebenfalls eruiert werden, da auch diese die Pathogenese gastrointestinaler Erkrankungen im Rahmen der *H. pylori*-Infektion beeinflussen. Als Ursache für die genetische Variabilität vermuten wir die Existenz von multiplen *H. pylori*-Stämmen in einer Biopsie bzw. *H. pylori*-Subpopulationen in einem Patienten, die sich im Rahmen der chronischen Infektion durch genetische Modifikationen an den Wirtsorganismus angepasst haben. Bei der Untersuchung des EPIYA-Status und des möglichen Zusammenhangs zur gastrointestinalen Erkrankung der Patienten konnten wir keine Assoziation feststellen. Allerdings zeigten sich Assoziationen zwischen der Pathogenität und dem *cagA*- und *vacA*-Genpolymorphismus. Dabei stellen wir fest, dass signifikant mehr Patienten mit einem singulären EPIYA-Motiv auch Träger des *vacA* s1m1-Subtyp mit dem höchsten inflammatorischen Potential waren, während Patienten mit Mischinfektionen häufiger die weniger toxische *vacA*-Isoform s2m2 aufwiesen. Bei der Analyse CagA-spezifischer Antikörper im Serum der infizierten Patienten wies ein Drittel einen positiven Anti-CagA-IgG-Status auf. Eine Assoziation zwischen der Immunantwort und dem EPIYA-Status konnte nicht nachgewiesen werden. Wir konnten aber zeigen, dass die Produktion CagA-spezifischer Antikörper von anderen bakteriellen Virulenzfaktoren, wie dem *vacA*-Polymorphismus abhängt. Unsere Daten bestätigen die entscheidende Rolle von bakteriellen und Wirts-abhängigen Faktoren, die gemeinsam die Interaktion mit dem Bakterium *H. pylori* beeinflussen und die Immunantwort und das Erkrankungsmuster modulieren. Insgesamt unterstützen unsere Daten die aktuelle Empfehlung zu Forschungszwecken auf Anti-CagA-IgG zu testen, weil eine Seropositivität wahrscheinlich mit dem Erkrankungsmuster assoziiert ist, was wiederum mit dem Subtyp des *H. pylori* korreliert. Trotzdem kann eine klinische Entscheidung nicht nur vom *cagA*-Gen- und Anti-CagA-IgG-Status getroffen werden (Fischbach et al. 2009).

6 Literaturverzeichnis

1. Abdullahi, Mohamed; Annibale, Bruno; Capoccia, Danila; Tari, Roberto; Lahner, Edith; Osborn, John et al. (2008): The Eradication of *Helicobacter pylori* is Affected by Body Mass Index (BMI). In: *OBES SURG* 18 (11), S. 1450–1454.
2. Acosta, N.; Quiroga, A.; Delgado, P.; Bravo, M. M.; Jaramillo, C. (2010): *Helicobacter pylori* CagA protein polymorphisms and their lack of association with pathogenesis. In: *World journal of gastroenterology* 16 (31), S. 3936–3943.
3. Aebischer, T.; Bumann, D.; Epple, H. J.; Metzger, W.; Schneider, T.; Cherepnev, G. et al. (2008): Correlation of T cell response and bacterial clearance in human volunteers challenged with *Helicobacter pylori* revealed by randomised controlled vaccination with Ty21a-based *Salmonella* vaccines. In: *Gut* 57 (8), S. 1065–1072.
4. Aguemon, B. D.; Struelens, M. J.; Massougbdji, A.; Ouendo, E. M. (2005): Prevalence and risk-factors for *Helicobacter pylori* infection in urban and rural Beninese populations. In: *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 11 (8), S. 611–617.
5. Ahn, H. J.; Lee, D. S. (2015): *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis. In: *World journal of gastrointestinal oncology* 7 (12), S. 455–465.
6. Amieva, Manuel R.; El-Omar, Emad M. (2008): Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. In: *Gastroenterology* 134 (1), S. 306–323.
7. Ando, T.; Perez-Perez, G. I.; Kusugami, K.; Ohsuga, M.; Bloch, K. C.; Blaser, M. J. (2000): Anti-CagA immunoglobulin G responses correlate with interleukin-8 induction in human gastric mucosal biopsy culture. In: *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 7 (5), S. 803–809.
8. Andrzejewska, Joanna; Lee, Sae Kyung; Olbermann, Patrick; Lotzing, Nina; Katzowitsch, Elena; Linz, Bodo et al. (2006): Characterization of the pilin ortholog of the *Helicobacter pylori* type IV cag pathogenicity apparatus, a surface-associated protein expressed during infection. In: *Journal of Bacteriology* 188 (16), S. 5865–5877.
9. Apel, I.; Jacobs, E.; Kist, M.; Bredt, W. (1988): Antibody response of patients against a 120 kDa surface protein of *Campylobacter pylori*. In: *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology* 268 (2), S. 271–276.
10. Argent, Richard H.; Hale, James L.; El-Omar, Emad M.; Atherton, John C. (2008a): Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. In: *Journal of medical microbiology* 57 (Pt 9), S. 1062–1067.
11. Argent, Richard H.; Thomas, Rachael J.; Letley, Darren P.; Rittig, Michael G.; Hardie, Kim R.; Atherton, John C. (2008b): Functional association between the *Helicobacter pylori* virulence factors VacA and CagA. In: *Journal of medical microbiology* 57 (Pt 2), S. 145–150.

12. Atherton, J. C. (2006): The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases. In: *Annual review of pathology* 1, S. 63–96.
13. Atherton, J. C.; Cao, P.; Peek, R. M., JR; Tummuru, M. K.; Blaser, M. J.; Cover, T. L. (1995): Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (30), S. 17771–17777.
14. Azuma, T.; Yamakawa, A.; Yamazaki, S.; Fukuta, K.; Ohtani, M.; Ito, Y. et al. (2002): Correlation between variation of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* and disease outcome in Japan. In: *The Journal of infectious diseases* 186 (11), S. 1621–1630.
15. Backert, Steffen; Clyne, Marguerite; Tegtmeyer, Nicole (2011): Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*. In: *Cell Commun Signal* 9 (1), S. 28.
16. Backert, Steffen; Selbach, Matthias (2005): Tyrosine-phosphorylated bacterial effector proteins. The enemies within. In: *Trends in Microbiology* 13 (10), S. 476–484.
17. Backert, Steffen; Tegtmeyer, Nicole (2010): The Versatility of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin *vacA* in signal transduction and molecular crosstalk. In: *Toxins* 2 (1), S. 69–92.
18. Bai, Yanyan; Wang, Zhaoyue; Bai, Xia; Yu, Ziqiang; Cao, Lijuan; Zhang, Wei; Ruan, Changgeng (2009): Cross-reaction of antibody against *Helicobacter pylori* urease B with platelet glycoprotein IIIa and its significance in the pathogenesis of immune thrombocytopenic purpura. In: *Int J Hematol* 89 (2), S. 142–149.
19. Banić, Marko; Franceschi, Francesco; Babić, Zarko; Gasbarrini, Antonio (2012): Extragastic Manifestations of *Helicobacter pylori* Infection. In: *Helicobacter* 17, S. 49–55.
20. Basso, D.; Zambon, C. F.; Letley, D. P.; Stranges, A.; Marchet, A.; Rhead, J. L. et al. (2008): Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* gene polymorphisms. In: *Gastroenterology* 135 (1), S. 91–99.
21. Batista, S. A.; Rocha, G. A.; Am Rocha; Saraiva, I. E.; Cabral, M. M.; Oliveira, R. C.; Queiroz, D. M. (2011): Higher number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. In: *BMC microbiology* 11, S. 61.
22. Beltran-Anaya, F. O.; Poblete, T. M.; Roman-Roman, A.; Reyes, S.; Sampedro, J. de; Peralta-Zaragoza, O. et al. (2014): The EPIYA-ABCC motif pattern in CagA of *Helicobacter pylori* is associated with peptic ulcer and gastric cancer in Mexican population. In: *BMC gastroenterology* 14, S. 223.
23. Bhat, N.; Gaensbauer, J.; Peek, R. M.; Bloch, K.; Tham, K. T.; Blaser, M. J.; Perez-Perez, G. (2005): Local and systemic immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* strains. In: *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 12 (12), S. 1393–1400.
24. Bjorkholm, B.; Sjolund, M.; Falk, P. G.; Berg, O. G.; Engstrand, L.; Andersson, D. I. (2001): Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (25), S. 14607–14612.

25. Blaser, M. J.; Perez-Perez, G. I.; Kleanthous, H.; Cover, T. L.; Peek, R. M.; Chyou, P. H. et al. (1995): Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. In: *Cancer Research* 55 (10), S. 2111–2115.
26. Boyanova, L.; Markovska, R.; Yordanov, D.; Marina, M.; Ivanova, K.; Panayotov, S. et al. (2009): High prevalence of virulent *Helicobacter pylori* strains in symptomatic Bulgarian patients. In: *Diagnostic microbiology and infectious disease* 64 (4), S. 374–380.
27. Braga, L. L.; Oliveira, M. A.; Goncalves, M. H.; Chaves, F. K.; Benigno, T. G.; Gomes, A. D. et al. (2014): CagA phosphorylation EPIYA-C motifs and the *vacA* i genotype in *Helicobacter pylori* strains of asymptomatic children from a high-risk gastric cancer area in northeastern Brazil. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 109 (8), S. 1045–1049.
28. Brandt, S.; Wessler, S.; Hartig, R.; Backert, S. (2009): *Helicobacter pylori* activates protein kinase C delta to control Raf in MAP kinase signalling: role in AGS epithelial cell scattering and elongation. In: *Cell motility and the cytoskeleton* 66 (10), S. 874–892.
29. Brandt, Sabine; Kwok, Terry; Hartig, Roland; König, Wolfgang; Backert, Steffen (2005): NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (26), S. 9300–9305.
30. Breurec, S.; Michel, R.; Seck, A.; Brisse, S.; Come, D.; Dieye, F. B. et al. (2012): Clinical relevance of *cagA* and *vacA* gene polymorphisms in *Helicobacter pylori* isolates from Senegalese patients. In: *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18 (2), S. 153–159.
31. Brown, L. M. (2000): *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. In: *Epidemiologic reviews* 22 (2), S. 283–297.
32. Cascales, Eric; Christie, Peter J. (2003): The versatile bacterial type IV secretion systems. In: *Nat Rev Micro* 1 (2), S. 137–149.
33. Censini, S.; Lange, C.; Xiang, Z.; Crabtree, J. E.; Ghiara, P.; Borodovsky, M. et al. (1996): *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (25), S. 14648–14653.
34. Chang, C. C.; Kuo, W. S.; Chen, Y. C.; Perng, C. L.; Lin, H. J.; Ou, Y. H. (2016): Fragmentation of CagA Reduces Hummingbird Phenotype Induction by *Helicobacter pylori*. In: *PloS one* 11 (3), S. e0150061.
35. Chang, Y. J.; Wu, M. S.; Lin, J. T.; Pestell, R. G.; Blaser, M. J.; Chen, C. C. (2006): Mechanisms for *Helicobacter pylori* CagA-induced cyclin D1 expression that affect cell cycle. In: *Cellular microbiology* 8 (11), S. 1740–1752.
36. Chattopadhyay, S.; Patra, R.; Chatterjee, R.; de R; Alam, J.; Ramamurthy, T. et al. (2012): Distinct repeat motifs at the C-terminal region of CagA of *Helicobacter pylori* strains isolated from diseased patients and asymptomatic individuals in West Bengal, India. In: *Gut pathogens* 4 (1), S. 4.
37. Chen, C. Y.; Wang, F. Y.; Wan, H. J.; Jin, X. X.; Wei, J.; Wang, Z. K. et al. (2013): Amino acid polymorphisms flanking the EPIYA-A motif of *Helicobacter pylori* CagA C-terminal

- region is associated with gastric cancer in east China: experience from a single center. In: *Journal of digestive diseases* 14 (7), S. 358–365.
38. Christie, P. J. (1997): *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. In: *Journal of Bacteriology* 179 (10), S. 3085. Online verfügbar unter [/pmc/articles/PMC179082/pdf/1793085.pdf](http://pmc/articles/PMC179082/pdf/1793085.pdf).
 39. CORREA, Pelayo; PIAZUELO, M. Blanca (2012): The gastric precancerous cascade. In: *Journal of digestive diseases* 13 (1), S. 2–9.
 40. Covacci, A.; Telford, J. L.; Del, Giudice G.; Parsonnet, J.; Rappuoli, R. (1999): *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. In: *Science (New York, N.Y.)* 284 (5418), S. 1328–1333.
 41. Cover, T. L.; Glupczynski, Y.; Lage, A. P.; Burette, A.; Tummuru, M. K.; Perez-Perez, G. I.; Blaser, M. J. (1995): Serologic detection of infection with *cagA*+ *Helicobacter pylori* strains. In: *Journal of clinical microbiology* 33 (6), S. 1496–1500.
 42. Cover, T. L.; Hanson, P. I.; Heuser, J. E. (1997): Acid-induced dissociation of *VacA*, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. In: *The Journal of cell biology* 138 (4), S. 759–769.
 43. Cover, Timothy L.; Blanke, Steven R. (2005): *Helicobacter pylori* *VacA*, a paradigm for toxin multifunctionality. In: *Nat Rev Micro* 3 (4), S. 320–332.
 44. Dautin, N.; Bernstein, H. D. (2007): Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. In: *Annual review of microbiology* 61, S. 89–112.
 45. den, Hollander W. J.; Holster, I. L.; van Gilst, B.; van Vuuren, A. J.; Jaddoe, V. W.; Hofman, A. et al. (2015): Intergenerational reduction in *Helicobacter pylori* prevalence is similar between different ethnic groups living in a Western city. In: *Gut* 64 (8), S. 1200–1208.
 46. Dixon, M. F.; Genta, R. M.; Yardley, J. H.; Correa, P. (1996): Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. In: *The American journal of surgical pathology* 20 (10), S. 1161–1181.
 47. Domanska, G.; Motz, C.; Meinecke, M.; Harsman, A.; Papatheodorou, P.; Reljic, B. et al. (2010): *Helicobacter pylori* *VacA* toxin/subunit p34: targeting of an anion channel to the inner mitochondrial membrane. In: *PLoS pathogens* 6 (4), S. e1000878.
 48. Egan, Brian J.; Holmes, Kate; O'Connor, Humphrey J.; O'Morain, Colm A. (2007): *Helicobacter pylori* Gastritis, the Unifying Concept for Gastric Diseases. In: *Helicobacter* 12 (2), S. 39-44.
 49. El-Omar, E. M.; Carrington, M.; Chow, W. H.; McColl, K. E.; Bream, J. H.; Young, H. A. et al. (2000): Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. In: *Nature* 404 (6776), S. 398–402.
 50. Enroth, H.; Nyren, O.; Engstrand, L. (1999): One stomach--one strain: does *Helicobacter pylori* strain variation influence disease outcome? In: *Digestive diseases and sciences* 44 (1), S. 102–107.
 51. Fajardo, C. A.; Quiroga, A. J.; Coronado, A.; Labrador, K.; Acosta, N.; Delgado, P. et al. (2013): *CagA* EPIYA polymorphisms in Colombian *Helicobacter pylori* strains and their

- influence on disease-associated cellular responses. In: *World journal of gastrointestinal oncology* 5 (3), S. 50–59.
52. Ferreira, Junior M.; Batista, S. A.; Vidigal, P. V.; Cordeiro, A. A.; Oliveira, F. M.; Lo Prata et al. (2015): Infection with CagA-positive *Helicobacter pylori* strain containing three EPIYA C phosphorylation sites is associated with more severe gastric lesions in experimentally infected Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). In: *European journal of histochemistry: EJH* 59 (2), S. 2489.
53. Ferreira, R. M.; Figueiredo, C.; Bonet, C.; Pardo, M. L.; Liso, J. M.; Alonso, P. et al. (2012a): *Helicobacter pylori vacA* intermediate region genotyping and progression of gastric preneoplastic lesions. In: *The American journal of gastroenterology* 107 (1), S. 145–146.
54. Ferreira, R. M.; Machado, J. C.; Letley, D.; Atherton, J. C.; Pardo, M. L.; Gonzalez, C. A. et al. (2012b): A novel method for genotyping the *Helicobacter pylori vacA* intermediate region directly in gastric biopsy specimens. In: *Journal of clinical microbiology* 50 (12), S. 3983–3989.
55. Ferreira, Rui M.; Machado, Jose C.; Leite, Marina; Carneiro, Fatima; Figueiredo, Ceu (2012c): The number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C tyrosine phosphorylation motifs influences the pattern of gastritis and the development of gastric carcinoma. In: *Histopathology* 60 (6), S. 992–998.
56. Figueiredo, C.; Quint, W.; Nouhan, N.; van den Munckhof, H.; Herbrink, P.; Scherpenisse, J. et al. (2001): Assessment of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes and host serological response. In: *Journal of clinical microbiology* 39 (4), S. 1339–1344.
57. Figura, N.; Vindigni, C.; Covacci, A.; Presenti, L.; Burroni, D.; Vernillo, R. et al. (1998): *cagA* positive and negative *Helicobacter pylori* strains are simultaneously present in the stomach of most patients with non-ulcer dyspepsia: relevance to histological damage. In: *Gut* 42 (6), S. 772–778.
58. Fischbach, W.; Malfertheiner, P.; Hoffmann, J. C.; Bolten, W.; Bornschein, J.; Gotze, O. et al. (2009): S3-guideline "helicobacter pylori and gastroduodenal ulcer disease" of the German society for digestive and metabolic diseases (DGVS) in cooperation with the German society for hygiene and microbiology, society for pediatric gastroenterology and nutrition e. V., German society for rheumatology, AWMF-registration-no. 021 / 001. In: *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 47 (12), S. 1230–1263.
59. Fischer, W.; Puls, J.; Buhrdorf, R.; Gebert, B.; Odenbreit, S.; Haas, R. (2001): Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. In: *Molecular microbiology* 42 (5), S. 1337–1348.
60. Fischer, Wolfgang (2011): Assembly and molecular mode of action of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion apparatus. In: *FEBS Journal* 278 (8), S. 1203–1212.
61. Franco, A. T.; Israel, D. A.; Washington, M. K.; Krishna, U.; Fox, J. G.; Rogers, A. B. et al. (2005): Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (30), S. 10646–10651.

62. Franco, A. T.; Johnston, E.; Krishna, U.; Yamaoka, Y.; Israel, D. A.; Nagy, T. A. et al. (2008): Regulation of Gastric Carcinogenesis by Helicobacter pylori Virulence Factors. In: *Cancer Research* 68 (2), S. 379–387.
63. Gebert, B.; Fischer, W.; Weiss, E.; Hoffmann, R.; Haas, R. (2003): Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. In: *Science (New York, N.Y.)* 301 (5636), S. 1099–1102.
64. Glynn, M. Kathleen; Friedman, Cindy R.; Gold, Benjamin D.; Khanna, Bhawna; Hutwagner, Lori; Iihoshi, Naomi et al. (2002): Seroincidence of Helicobacter pylori infection in a cohort of rural Bolivian children: acquisition and analysis of possible risk factors. In: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 35 (9), S. 1059–1065.
65. Gonzalez, C. A.; Sala, N.; Capella, G. (2002): Genetic susceptibility and gastric cancer risk. In: *International journal of cancer* 100 (3), S. 249–260.
66. Gonzalez-Rivera, C.; Gangwer, K. A.; McClain, M. S.; Im Eli; Chambers, M. G.; Ohi, M. D. et al. (2010): Reconstitution of Helicobacter pylori VacA toxin from purified components. In: *Biochemistry* 49 (27), S. 5743–5752.
67. Haddadi, M. H.; Bazargani, A.; Khashei, R.; Fattahi; Bagheri, Lankarani K.; Moini, M.; Rokni, Hosseini S. M. (2015): Different distribution of Helicobacter pylori EPIYA- cagA motifs and dupA genes in the upper gastrointestinal diseases and correlation with clinical outcomes in Iranian patients. In: *Gastroenterology and hepatology from bed to bench* 8 (Suppl 1), S. S37-46.
68. Hanada, K.; Uchida, T.; Tsukamoto, Y.; Watada, M.; Yamaguchi, N.; Yamamoto, K. et al. (2014): Helicobacter pylori Infection Introduces DNA Double-Strand Breaks in Host Cells. In: *Infection and Immunity* 82 (10), S. 4182–4189.
69. Hatakeyama, Masanori (2004): Oncogenic mechanisms of the Helicobacter pylori CagA protein. In: *Nature reviews. Cancer* 4 (9), S. 688–694.
70. Hatakeyama, Masanori (2009): Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. In: *Journal of gastroenterology* 44 (4), S. 239–248.
71. Hayashi, T.; Morohashi, H.; Hatakeyama, M. (2013): Bacterial EPIYA effectors--where do they come from? What are they? Where are they going? In: *Cellular microbiology* 15 (3), S. 377–385.
72. Higashi, H.; Tsutsumi, R.; Muto, S.; Sugiyama, T.; Azuma, T.; Asaka, M.; Hatakeyama, M. (2002): SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein. In: *Science (New York, N.Y.)* 295 (5555), S. 683–686.
73. Hilleringmann, M.; Pansegrau, W.; Doyle, M.; Kaufman, S.; MacKichan, M. L.; Gianfaldoni, C. et al. (2006): Inhibitors of Helicobacter pylori ATPase CagAlpha block CagA transport and cag virulence. In: *Microbiology (Reading, England)* 152 (Pt 10), S. 2919–2930.
74. Honarmand-Jahromy, S.; Siavoshi, F.; Malekzadeh, R.; Sattari, T. N.; Latifi-Navid, S. (2015): Multiple repeats of Helicobacter pylori CagA EPIYA-C phosphorylation sites predict risk of gastric ulcer in Iran. In: *Microbial pathogenesis* 89, S. 87–92.

75. Huang, J. Q.; Zheng, G. F.; Sumanac, K.; Irvine, E. J.; Hunt, R. H. (2003): Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. In: *Gastroenterology* 125 (6), S. 1636–1644.
76. Huang, J. Y.; Sweeney, E. G.; Sigal, M.; Zhang, H. C.; Remington, S. J.; Cantrell, M. A. et al. (2015): Chemodetection and Destruction of Host Urea Allows *Helicobacter pylori* to Locate the Epithelium. In: *Cell Host & Microbe* 18 (2), S. 147–156.
77. Hunt, R. H.; Camilleri, M.; Crowe, S. E.; El-Omar, E. M.; Fox, J. G.; Kuipers, E. J. et al. (2015): The stomach in health and disease. In: *Gut* 64 (10), S. 1650–1668.
78. Ilver, D.; Arnqvist, A.; Ogren, J.; Im Frick; Kersulyte, D.; Incecik, E. T. et al. (1998): *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. In: *Science (New York, N.Y.)* 279 (5349), S. 373–377.
79. Ishijima, N.; Suzuki, M.; Ashida, H.; Ichikawa, Y.; Kanegae, Y.; Saito, I. et al. (2011): BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (28), S. 25256–25264.
80. Ishimoto, T.; Nagano, O.; Yae, T.; Tamada, M.; Motohara, T.; Oshima, H. et al. (2011): CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. In: *Cancer cell* 19 (3), S. 387–400.
81. Israel, D. A.; Salama, N.; Krishna, U.; Rieger, U. M.; Atherton, J. C.; Falkow, S.; Peek, R. M., JR (2001): *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (25), S. 14625–14630.
82. Jain, P.; Luo, Z. Q.; Blanke, SR (2011): *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin A (VacA) engages the mitochondrial fission machinery to induce host cell death. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (38), S. 16032–16037.
83. Jiménez-Soto, Luisa F.; Kutter, Stefan; Sewald, Xaver; Ertl, Claudia; Weiss, Evelyn; Kapp, Ulrike et al. (2009): *Helicobacter pylori* Type IV Secretion Apparatus Exploits β 1 Integrin in a Novel RGD-Independent Manner. In: *PLoS Pathog* 5 (12), S. e1000684.
84. Jones, K. R.; Joo, Y. M.; Jang, S.; Yoo, Y. J.; Lee, H. S.; Chung, I. S. et al. (2009): Polymorphism in the CagA EPIYA motif impacts development of gastric cancer. In: *Journal of clinical microbiology* 47 (4), S. 959–968.
85. Junior, M. F.; Batista, S. A.; Barbuto, R. C.; Gomes, A. D.; Queiroz, D. M.; Araujo, I. D.; Caliari, M. V. (2016): CagA-positive *Helicobacter pylori* strain containing three EPIYA C phosphorylation sites produces increase of G cell and decrease of D cell in experimentally infected gerbils (*Meriones unguiculatus*). In: *Advances in medical sciences* 61 (2), S. 231–236.
86. Juttner, Stefan; Vieth, Michael; Miehke, Stephan; Schneider-Brachert, Wulf; Kirsch, Christian; Pfeuffer, Thilo et al. (2004): Reliable detection of macrolide-resistant *Helicobacter pylori* via fluorescence in situ hybridization in formalin-fixed tissue. In: *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 17 (6), S. 684–689.
87. Kalaf, E. A.; Al-Khafaji, Z. M.; Yassen, N. Y.; Al-Abbudi, F. A.; Sadwen, S. N. (2013): Study of the cytotoxin-associated gene a (CagA gene) in *Helicobacter pylori* using gastric

- biopsies of Iraqi patients. In: *Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association* 19 (2), S. 69–74.
88. Karita, M.; Tummuru, M. K.; Wirth, H. P.; Blaser, M. J. (1996): Effect of growth phase and acid shock on *Helicobacter pylori* cagA expression. In: *Infection and Immunity* 64 (11), S. 4501–4507.
89. Karlsson, A.; Ryberg, A.; Nosouhi, Dehnoei M.; Borch, K.; Monstein, H. J. (2012): Variation in number of cagA EPIYA-C phosphorylation motifs between cultured *Helicobacter pylori* and biopsy strain DNA. In: *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 12 (1), S. 175–179.
90. Keilberg, Daniela; Ottemann, Karen M. (2016): How *Helicobacter pylori* senses, targets and interacts with the gastric epithelium. In: *Environmental microbiology* 18 (3), S. 791–806.
91. Kersulyte, D.; Chalkauskas, H.; Berg, D. E. (1999): Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. In: *Molecular microbiology* 31 (1), S. 31–43.
92. Kim, S. Y.; Lee, Y. C.; Kim, H. K.; Blaser, M. J. (2006): *Helicobacter pylori* CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8. In: *Cellular microbiology* 8 (1), S. 97–106.
93. Kim, Y. S.; Kim, N.; Kim, J. M.; Kim, M. S.; Park, J. H.; Lee, M. K. et al. (2009): *Helicobacter pylori* genotyping findings from multiple cultured isolates and mucosal biopsy specimens: strain diversities of *Helicobacter pylori* isolates in individual hosts. In: *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 21 (5), S. 522–528.
94. Kita, M.; Yokota, K.; Okada, H.; Take, S.; Takenaka, R.; Kawahara, Y. et al. (2013): The genetic diversity of *Helicobacter pylori* virulence genes is not associated with gastric atrophy progression. In: *Acta medica Okayama* 67 (2), S. 93–98.
95. Kivi, M.; Johansson, A. L. V.; Reilly, M.; Tindberg, Y. (2005): *Helicobacter pylori* status in family members as risk factors for infection in children. In: *Epidemiology and infection* 133 (4), S. 645–652.
96. Korwin, Jean-Dominique de (2014): Epidémiologie de l'infection à *Helicobacter pylori* et du cancer gastrique. In: *La Revue du praticien* 64 (2), S. 189–193.
97. Kraft, C.; Stack, A.; Josenhans, C.; Niehus, E.; Dietrich, G.; Correa, P. et al. (2006): Genomic changes during chronic *Helicobacter pylori* infection. In: *Journal of Bacteriology* 188 (1), S. 249–254.
98. Kutter, S.; Buhrdorf, R.; Haas, J.; Schneider-Brachert, W.; Haas, R.; Fischer, W. (2008): Protein Subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag Type IV Secretion System Revealed by Localization and Interaction Studies. In: *Journal of Bacteriology* 190 (6), S. 2161–2171.
99. Kwok, Terry; Zabler, Dana; Urman, Sylwia; Rohde, Manfred; Hartig, Roland; Wessler, Silja et al. (2007): *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. In: *Nature* 449 (7164), S. 862–866.
100. La Sicinschi, Correa, P.; Peek, R. M.; Camargo, M. C.; Piazzuelo, M. B.; Romero-Gallo, J. et al. (2010): CagA C-terminal variations in *Helicobacter pylori* strains from Colombian

- patients with gastric precancerous lesions. In: *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16 (4), S. 369–378.
101. Le Torres; Gonzalez, L.; Melian, K.; Alonso, J.; Moreno, A.; Hernandez, M. et al. (2012): EPIYA motif patterns among Cuban *Helicobacter pylori* CagA positive strains. In: *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud* 32 (1), S. 23–31.
102. Lertsethtakarn, P.; Ottemann, K. M.; Hendrixson (2011): Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. In: *Annual review of microbiology* 65, S. 389–410.
103. Link, A.; Langner, C.; Schirrmeister, W.; Habendorf, W.; Weigt, J.; Venerito, M.; Tammer, I.; Schlüter, D.; Roessner, A.; Schlaermann, P.; Meyer, T. F.; Wex, T.; Maltertheiner, P. (2016): *H. pylori vacA* genotype is a predominant determinant of Immunologic response to *H. pylori* CagA. In *Revision (World journal of gastroenterology)*
104. Mahdavi, J.; Sonden, B.; Hurtig, M.; Olfat, F. O.; Forsberg, L.; Roche, N. et al. (2002): *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. In: *Science (New York, N.Y.)* 297 (5581), S. 573–578.
105. Malfertheiner, Peter; Schultze, Viola; Rosenkranz, Bernd; Kaufmann, Stefan H.E.; Ulrichs, Timo; Novicki, Deborah et al. (2008): Safety and Immunogenicity of an Intramuscular *Helicobacter pylori* Vaccine in Noninfected Volunteers. A Phase I Study. In: *Gastroenterology* 135 (3), S. 787–795.
106. Marshall, B. J.; Armstrong, J. A.; McGeachie, D. B.; Glancy, R. J. (1985): Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. In: *The Medical journal of Australia* 142 (8), S. 436–439.
107. Marshall, B. J.; Warren, J. R. (1984): Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. In: *Lancet (London, England)* 1 (8390), S. 1311–1315.
108. Matteo, Mario Jose; Granados, Gabriela; Perez, Cecilia Valeria; Olmos, Martin; Sanchez, Cristian; Catalano, Mariana (2007): *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island genotype diversity within the gastric niche of a single host. In: *Journal of medical microbiology* 56 (Pt 5), S. 664–669.
109. Mayerle, J.; den, Hoed C. M.; Schurmann, C.; Stolk, L.; Homuth, G.; Peters, M. J. et al. (2013): Identification of genetic loci associated with *Helicobacter pylori* serologic status. In: *JAMA* 309 (18), S. 1912–1920.
110. McColl, K. E.; Gillen, D.; El-Omar, E. (2000): The role of gastrin in ulcer pathogenesis. In: *Bailliere's best practice & research. Clinical gastroenterology* 14 (1), S. 13–26.
111. Memon, A. A.; Hussein, N. R.; Miendje, Deyi V. Y.; Burette, A.; Atherton, J. C. (2014): Vacuolating cytotoxin genotypes are strong markers of gastric cancer and duodenal ulcer-associated *Helicobacter pylori* strains: a matched case-control study. In: *Journal of clinical microbiology* 52 (8), S. 2984–2989.
112. Merrell, D. S.; Goodrich, M. L.; Otto, G.; Tompkins, L. S.; Falkow, S. (2003): pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. In: *Infection and Immunity* 71 (6), S. 3529–3539.

113. Miehle, S.; Go, M. F.; Kim, J. G.; Graham, D. Y.; Figura, N. (1998): Serologic detection of *Helicobacter pylori* infection with *cagA*-positive strains in duodenal ulcer, gastric cancer, and asymptomatic gastritis. In: *Journal of gastroenterology* 33 Suppl 10, S. 18–21.
114. Miehle, S.; Thomas, R.; Guitierrez, O.; Graham, D. Y.; Go, M. F. (1999): DNA fingerprinting of single colonies of *Helicobacter pylori* from gastric cancer patients suggests infection with a single predominant strain. In: *Journal of clinical microbiology* 37 (1), S. 245–247.
115. Mimuro, H.; Suzuki, T.; Tanaka, J.; Asahi, M.; Haas, R.; Sasakawa, C. (2002): Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. In: *Molecular Cell* 10 (4), S. 745–755.
116. Mueller, D.; Tegtmeyer, N.; Brandt, S.; Yamaoka, Y.; Poire, E. de; Sgouras, D. et al. (2012): c-Src and c-Abl kinases control hierarchic phosphorylation and function of the CagA effector protein in Western and East Asian *Helicobacter pylori* strains. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (4), S. 1553–1566.
117. Murata-Kamiya, N. (2011): Pathophysiological functions of the CagA oncoprotein during infection by *Helicobacter pylori*. In: *Microbes and infection / Institut Pasteur* 13 (10), S. 799–807.
118. Murata-Kamiya, N.; Kurashima, Y.; Teishikata, Y.; Yamahashi, Y.; Saito, Y.; Higashi, H. et al. (2007): *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. In: *Oncogene* 26 (32), S. 4617–4626.
119. Nilsson, C.; Sillen, A.; Eriksson, L.; Strand, M.-L.; Enroth, H.; Normark, S. et al. (2003): Correlation between *cag* Pathogenicity Island Composition and *Helicobacter pylori*-Associated Gastrointestinal Disease. In: *Infection and Immunity* 71 (11), S. 6573–6581.
120. Odenbreit, S.; Faller, G.; Haas, R. (2002): Role of the *alpAB* proteins and lipopolysaccharide in adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. In: *International journal of medical microbiology: IJMM* 292 (3-4), S. 247–256.
121. Odenbreit, S.; Till, M.; Hofreuter, D.; Faller, G.; Haas, R. (1999): Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. In: *Molecular microbiology* 31 (5), S. 1537–1548.
122. Ogiwara, H.; Sugimoto, M.; Ohno, T.; Vilaichone, R.-K.; Mahachai, V.; Graham, D. Y.; Yamaoka, Y. (2009): Role of Deletion Located between the Intermediate and Middle Regions of the *Helicobacter pylori vacA* Gene in Cases of Gastrointestinal Diseases. In: *Journal of clinical microbiology* 47 (11), S. 3493–3500.
123. Ogorodnik, E.; Raffaniello, R. D. (2013): Analysis of the 3'-variable region of the *cagA* gene from *Helicobacter pylori* strains infecting patients at New York City hospitals. In: *Microbial pathogenesis* 56, S. 29–34.
124. Oh, J. D.; Karam, S. M.; Gordon, J. I. (2005): Intracellular *Helicobacter pylori* in gastric epithelial progenitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (14), S. 5186–5191.
125. Ohnishi, N.; Yuasa, H.; Tanaka, S.; Sawa, H.; Miura, M.; Matsui, A. et al. (2008): Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and

- hematopoietic neoplasms in mouse. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (3), S. 1003–1008.
126. Olbermann, Patrick; Josenhans, Christine; Moodley, Yohan; Uhr, Markus; Stamer, Christiana; Vauterin, Marc et al. (2010): A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. In: *PLoS genetics* 6 (8), S. e1001069.
127. Oliveira, M. J.; Am Costa; Costa, A. C.; Ferreira, R. M.; Sampaio, P.; Machado, J. C. et al. (2009): CagA associates with c-Met, E-cadherin, and p120-catenin in a multiproteic complex that suppresses *Helicobacter pylori*-induced cell-invasive phenotype. In: *The Journal of infectious diseases* 200 (5), S. 745–755.
128. O'Toole, P. W.; Lane, M. C.; Porwollik, S. (2000): *Helicobacter pylori* motility. In: *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2 (10), S. 1207–1214.
129. Ottemann, K. M. (2002): *Helicobacter pylori* Uses Motility for Initial Colonization and To Attain Robust Infection. In: *Infection and Immunity* 70 (4), S. 1984–1990.
130. Pajavand, H.; Alvandi, A.; Mohajeri, P.; Bakhtyari, S.; Bashiri, H.; Kalali, B. et al. (2015): High Frequency of vacA s1m2 Genotypes Among *Helicobacter pylori* Isolates From Patients With Gastroduodenal Disorders in Kermanshah, Iran. In: *Jundishapur journal of microbiology* 8 (11), S. e25425.
131. Panayotopoulou, E. G.; Sgouras, D. N.; Papadakos, K. S.; Petraki, K.; Breurec, S.; Michopoulos, S. et al. (2010): CagA and VacA polymorphisms are associated with distinct pathological features in *Helicobacter pylori*-infected adults with peptic ulcer and non-peptic ulcer disease. In: *Journal of clinical microbiology* 48 (6), S. 2237–2239.
132. Papadakos, Konstantinos S.; Sougleri, Ioanna S.; Mentis, Andreas F.; Hatziloukas, Efstathios; Sgouras, Dionyssios N. (2013): Presence of terminal EPIYA phosphorylation motifs in *Helicobacter pylori* CagA contributes to IL-8 secretion, irrespective of the number of repeats. In: *PloS one* 8 (2), S. e56291.
133. Park, C. Y.; Kwak, M.; Gutierrez, O.; Graham, D. Y.; Yamaoka, Y. (2003): Comparison of genotyping *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens and genotyping from bacterial cultures. In: *Journal of clinical microbiology* 41 (7), S. 3336–3338.
134. Parsonnet, J.; Friedman, G. D.; Orentreich, N.; Vogelmann, H. (1997): Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. In: *Gut* 40 (3), S. 297–301.
135. Pattis, I.; Weiss, E.; Laugks, R.; Haas, R.; Fischer, W. (2007): The *Helicobacter pylori* CagF protein is a type IV secretion chaperone-like molecule that binds close to the C-terminal secretion signal of the CagA effector protein. In: *Microbiology (Reading, England)* 153 (Pt 9), S. 2896–2909.
136. Peek, R. M., JR; Miller, G. G.; Tham, K. T.; Perez-Perez, G. I.; Cover, T. L.; Atherton, J. C. et al. (1995): Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. In: *Journal of clinical microbiology* 33 (1), S. 28–32.
137. Pillinger, M. H.; Marjanovic, N.; Kim, S. Y.; Lee, Y. C.; Scher, J. U.; Roper, J. et al. (2007): *Helicobacter pylori* stimulates gastric epithelial cell MMP-1 secretion via CagA-dependent and -independent ERK activation. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (26), S. 18722–18731.

138. Qadri, Q.; Afroze, D.; Rasool, R.; Gulzar, G. M.; Naqash, S.; Siddiqi, M. A.; Shah, Z. A. (2014): CagA subtyping in *Helicobacter pylori* isolates from gastric cancer patients in an ethnic Kashmiri population. In: *Microbial pathogenesis* 66, S. 40–43.
139. Qu, Xin-Hua; Huang, Xiao-Lu; Xiong, Ping; Zhu, Cui-Ying; Huang, You-Liang; Lu, Lun-Gen et al. (2010): Does *Helicobacter pylori* infection play a role in iron deficiency anemia? A meta-analysis. In: *World journal of gastroenterology* 16 (7), S. 886–896.
140. Queiroz, D. M.; Silva, C. I.; Goncalves, M. H.; Braga-Neto, M. B.; Fialho, A. B.; Am Fialho et al. (2012): Higher frequency of cagA EPIYA-C phosphorylation sites in *H. pylori* strains from first-degree relatives of gastric cancer patients. In: *BMC gastroenterology* 12, S. 107.
141. Quiroga, A. J.; Huertas, A.; Combata, A. L.; Bravo, M. M. (2010): Variation in the number of EPIYA-C repeats in CagA protein from Colombian *Helicobacter pylori* strains and its ability middle to induce hummingbird phenotype in gastric epithelial cells. In: *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud* 30 (2), S. 251–258.
142. Reyes-Leon, Adriana; Atherton, John C.; Argent, Richard H.; Puente, J. L.; Torres, J. (2007): Heterogeneity in the activity of Mexican *Helicobacter pylori* strains in gastric epithelial cells and its association with diversity in the cagA gene. In: *Infection and Immunity* 75 (7), S. 3445–3454.
143. Rhead, J. L.; Letley, D. P.; Mohammadi, M.; Hussein, N.; Mohagheghi, M. A.; Eshagh, Hosseini M.; Atherton, J. C. (2007): A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. In: *Gastroenterology* 133 (3), S. 926–936.
144. Rieder, Gabriele; Merchant, Juanita L.; Haas, Rainer (2005): *Helicobacter pylori* cag-type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian gerbils. In: *Gastroenterology* 128 (5), S. 1229–1242.
145. Rocha, G. A.; Am Rocha; Gomes, A. D.; Faria, C. L., JR; Melo, F. F.; Batista, S. A. et al. (2015): STAT3 polymorphism and *Helicobacter pylori* CagA strains with higher number of EPIYA-C segments independently increase the risk of gastric cancer. In: *BMC cancer* 15, S. 528.
146. Rohde, Manfred; Puls, Jurgen; Buhrdorf, Renate; Fischer, Wolfgang; Haas, Rainer (2003): A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. In: *Molecular microbiology* 49 (1), S. 219–234.
147. Roosendaal, R.; Kuipers, E. J.; Buitenwerf, J.; van Uffelen, C.; Meuwissen, S. G.; van Kamp, G. J.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. (1997): *Helicobacter pylori* and the birth cohort effect: evidence of a continuous decrease of infection rates in childhood. In: *The American journal of gastroenterology* 92 (9), S. 1480–1482.
148. Ryberg, Anna; Borch, Kurt; Sun, Yi-Qian; Monstein, Hans-Jürg (2008): Concurrent genotyping of *Helicobacter pylori* virulence genes and human cytokine SNP sites using whole genome amplified DNA derived from minute amounts of gastric biopsy specimen DNA. In: *BMC Microbiol* 8 (1), S. 175.
149. Salama, Nina R.; Hartung, Mara L.; Müller, Anne (2013): Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. In: *Nature reviews. Microbiology* 11 (6), S. 385–399.

150. Salih, B. A.; Bolek, B. K.; Arikan, S. (2010): DNA sequence analysis of *cagA* 3' motifs of *Helicobacter pylori* strains from patients with peptic ulcer diseases. In: *Journal of medical microbiology* 59 (Pt 2), S. 144–148.
151. Sanders, L.; Andermann, T. M.; Ottemann, K. M. (2013): A supplemented soft agar chemotaxis assay demonstrates the *Helicobacter pylori* chemotactic response to zinc and nickel. In: *Microbiology (Reading, England)* 159 (Pt 1), S. 46–57.
152. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994 (1994). In: *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer* 61, S. 1–241.
153. Schreiber, Soren; Bucker, Roland; Groll, Claudia; Azevedo-Vethacke, Marina; Garten, Desiree; Scheid, Peter et al. (2005): Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen in vivo. In: *Infection and Immunity* 73 (3), S. 1584–1589.
154. Schwarzer, A.; Lottspeich, C.; Russmann, H.; Ossiander, G.; Koletzko, S. (2007): Evaluation of a novel rapid one-step monoclonal chromatographic immunoassay for detection of *Helicobacter pylori* in stool from children. In: *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 26 (7), S. 475–480.
155. Secka, O.; Antonio, M.; Berg, D. E.; Tapgun, M.; Bottomley, C.; Thomas, V. et al. (2011a): Mixed infection with *cagA* positive and *cagA* negative strains of *Helicobacter pylori* lowers disease burden in The Gambia. In: *PloS one* 6 (11), S. e27954.
156. Secka, O.; Antonio, M.; Tapgun, M.; Berg, D. E.; Bottomley, C.; Thomas, V. et al. (2011b): PCR-based genotyping of *Helicobacter pylori* of Gambian children and adults directly from biopsy specimens and bacterial cultures. In: *Gut pathogens* 3 (1), S. 5.
157. Selbach, Matthias; Paul, Florian Ernst; Brandt, Sabine; Guye, Patrick; Daumke, Oliver; Backert, Steffen et al. (2009): Host cell interactome of tyrosine-phosphorylated bacterial proteins. In: *Cell Host & Microbe* 5 (4), S. 397–403.
158. Selgrad, M.; Meyer, F.; Malfertheiner, P. (2014a): *Helicobacter pylori*. Kurzaufsatz zu ausgewählten historischen Etappen des Erkenntnisprozesses und ihre Bedeutung für die klinische Medizin, insbesondere auch die Chirurgie – was der (Allgemein-/Viszeral-) Chirurg wissen sollte. In: *Zentralbl Chir* 139 (04), S. 399–405.
159. Selgrad, Michael; Bornschein, Jan; Kandulski, Arne; Hille, Carla; Weigt, Jochen; Roessner, Albert et al. (2014b): *Helicobacter pylori* but not gastrin is associated with the development of colonic neoplasms. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer* 135 (5), S. 1127–1131.
160. Selgrad, Michael; Meissle, Julia; Bornschein, Jan; Kandulski, Arne; Langner, Cosima; Varbanova, Mariya et al. (2013): Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in central Germany and its relationship with the number of eradication therapies. In: *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 25 (11), S. 1257–1260.
161. Sgouras, D. N.; Panayotopoulou, E. G.; Papadakos, K.; Martinez-Gonzalez, B.; Roumbani, A.; Panayiotou, J. et al. (2009): *CagA* and *VacA* polymorphisms do not correlate with severity of histopathological lesions in *Helicobacter pylori*-infected Greek children. In: *Journal of clinical microbiology* 47 (8), S. 2426–2434.

162. Shahamat, M.; Alavi, M.; Watts, J. E. M.; Gonzalez, J. M.; Sowers, K. R.; Maeder, D. W.; Robb, F. T. (2004): Development of two PCR-based techniques for detecting helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. In: *Journal of clinical microbiology* 42 (8), S. 3613–3619.
163. Shiota, Seiji; Suzuki, Rumiko; Yamaoka, Yoshio (2013): The significance of virulence factors in *Helicobacter pylori*. In: *Journal of digestive diseases* 14 (7), S. 341–349.
164. Shokrzadeh, L.; Baghaei, K.; Yamaoka, Y.; Dabiri, H.; Jafari, F.; Sahebekhtiari, N. et al. (2010): Analysis of 3'-end variable region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolated from Iranian population. In: *Journal of gastroenterology and hepatology* 25 (1), S. 172–177.
165. Sozzi, M.; Tomasini, M. L.; Vindigni, C.; Zanussi, S.; Tedeschi, R.; Basaglia, G. et al. (2005): Heterogeneity of *cag* genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. In: *The Journal of laboratory and clinical medicine* 146 (5), S. 262–270.
166. Suerbaum, S.; Smith, J. M.; Bapumia, K.; Morelli, G.; Smith, N. H.; Kunstmann, E. et al. (1998): Free recombination within *Helicobacter pylori*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (21), S. 12619–12624.
167. Suerbaum, Sebastian; Josenhans, Christine (2007): *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. In: *Nature reviews. Microbiology* 5 (6), S. 441–452.
168. Sugimoto, M.; Yamaoka, Y. (2009): The association of *vacA* genotype and *Helicobacter pylori*-related disease in Latin American and African populations. In: *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15 (9), S. 835–842.
169. Sugimoto, M.; Zali, Yamaoka, Y. (2009): The association of *vacA* genotypes and *Helicobacter pylori*-related gastroduodenal diseases in the Middle East. In: *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 28 (10), S. 1227–1236.
170. Suzuki, Masato; Mimuro, Hitomi; Suzuki, Toshihiko; Park, Morag; Yamamoto, Tadashi; Sasakawa, Chihiro (2005): Interaction of *CagA* with *Crk* plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. In: *The Journal of experimental medicine* 202 (9), S. 1235–1247.
171. Suzuki, N.; Murata-Kamiya, N.; Yanagiya, K.; Suda, W.; Hattori, M.; Kanda, H. et al. (2015): Mutual reinforcement of inflammation and carcinogenesis by the *Helicobacter pylori* *CagA* oncoprotein. In: *Scientific reports* 5, S. 10024.
172. Suzuki, Takeshi; Matsuo, Keitaro; Ito, Hidemi; Sawaki, Akira; Hirose, Kaoru; Wakai, Kenji et al. (2006): Smoking increases the treatment failure for *Helicobacter pylori* eradication. In: *The American journal of medicine* 119 (3), S. 217–224.
173. Szabo, I.; Brutsche, S.; Tombola, F.; Moschioni, M.; Satin, B.; Telford, J. L. et al. (1999): Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin *VacA* of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. In: *The EMBO journal* 18 (20), S. 5517–5527.
174. Talebi Bezmin Abadi, Amin (2014): The *Helicobacter pylori* *dupA*. A Novel Biomarker for Digestive Diseases. In: *Front. Med.* 1 (3), S. 7.

175. Tan, S.; Noto, J. M.; Romero-Gallo, J.; Peek, R. M., JR; Amieva (2011): Helicobacter pylori perturbs iron trafficking in the epithelium to grow on the cell surface. In: *PLoS pathogens* 7 (5), S. e1002050.
176. Tanaka, Jiro; Suzuki, Toshihiko; Mimuro, Hitomi; Sasakawa, Chihiro (2003): Structural definition on the surface of Helicobacter pylori type IV secretion apparatus. In: *Cellular microbiology* 5 (6), S. 395–404.
177. Tegtmeyer, Nicole; Wessler, Silja; Backert, Steffen (2011): Role of the cag-pathogenicity island encoded type IV secretion system in Helicobacter pylori pathogenesis. In: *FEBS Journal* 278 (8), S. 1190–1202.
178. Tkachenko, Mikhail A.; Zhannat, Nurgalieva Z.; Erman, Lev V.; Blashenkova, Elena L.; Isachenko, Sergey V.; Isachenko, Olga B. et al. (2007): Dramatic changes in the prevalence of Helicobacter pylori infection during childhood: a 10-year follow-up study in Russia. In: *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 45 (4), S. 428–432.
179. Tohidpour, Abolghasem (2016): CagA-mediated pathogenesis of Helicobacter pylori. In: *Microbial pathogenesis* 93, S. 44–55.
180. Tsugawa, Hitoshi; Suzuki, Hidekazu; Saya, Hideyuki; Hatakeyama, Masanori; Hirayama, Toshiya; Hirata, Kenro et al. (2012): Reactive Oxygen Species-Induced Autophagic Degradation of Helicobacter pylori CagA Is Specifically Suppressed in Cancer Stem-like Cells. In: *Cell Host & Microbe* 12 (6), S. 764–777.
181. Tsutsumi, Ryouhei; Higashi, Hideaki; Higuchi, Megumi; Okada, Masato; Hatakeyama, Masanori (2003): Attenuation of Helicobacter pylori CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (6), S. 3664–3670.
182. Tsutsumi, Ryouhei; Takahashi, Atsushi; Azuma, Takeshi; Higashi, Hideaki; Hatakeyama, Masanori (2006): Focal Adhesion Kinase Is a Substrate and Downstream Effector of SHP-2 Complexed with Helicobacter pylori CagA. In: *Mol. Cell. Biol.* 26 (1), S. 261–276.
183. Uemura, Naomi (2003): H. pylori infection and the development of gastric cancer in Japan. In: *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine* 61 (1), S. 25–29.
184. Vaziri, F.; Najar, Peerayeh S.; Alebouyeh, M.; Molaei, M.; Maghsoudi, N.; Zali (2013): Determination of Helicobacter pylori CagA EPIYA types in Iranian isolates with different gastroduodenal disorders. In: *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 17, S. 101–105.
185. Vaziri, F.; Peerayeh, S. N.; Alebouyeh, M.; Maghsoudi, N.; Azimzadeh, P.; Siadat, S. D.; Zali, M. R. (2015): Novel effects of Helicobacter pylori CagA on key genes of gastric cancer signal transduction. A comparative transfection study. In: *Pathogens and Disease* 73 (3), S. ftu021-ftu021.
186. Venerito, M.; Wex, T.; Malfertheiner, P. (2011): Helicobacter pylori related and non-related lesions in the stomach. In: *Minerva gastroenterologica e dietologica* 57 (4), S. 395–403.
187. Viala, J.; Chaput, C.; Boneca, I. G.; Cardona, A.; Girardin, S. E.; Moran, A. P. et al. (2004): Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. In: *Nature immunology* 5 (11), S. 1166–1174.

188. Vianna, J. S.; Ramis, I. B.; Halicki, P. C.; Gastal, O. L.; Silva, R. A.; Junior, J. S. et al. (2015): Detection of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA in gastric biopsy specimens and its relation to gastric diseases. In: *Diagnostic microbiology and infectious disease* 83 (2), S. 89–92.
189. Wang, G.; Jiang, Q.; Taylor, D. E. (1998): Genotypic characterization of clarithromycin-resistant and -susceptible *Helicobacter pylori* strains from the same patient demonstrates existence of two unrelated isolates. In: *Journal of clinical microbiology* 36 (9), S. 2730–2731.
190. Wex, Thomas; Venerito, Marino; Kreutzer, Juliane; Götze, Tobias; Kandulski, Arne; Malfertheiner, Peter (2011): Serological prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Saxony-Anhalt, Germany, in 2010. In: *Clinical and vaccine immunology: CVI* 18 (12), S. 2109–2112.
191. Winter, Jody A.; Letley, Darren P.; Cook, Katherine W.; Rhead, Joanne L.; Zaitoun, Abed A. M.; Ingram, Richard J. M. et al. (2014): A role for the vacuolating cytotoxin, VacA, in colonization and *Helicobacter pylori*-induced metaplasia in the stomach. In: *The Journal of infectious diseases* 210 (6), S. 954–963.
192. Wroblewski, L. E.; Peek, R. M.; Wilson, K. T. (2010): *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer. Factors That Modulate Disease Risk. In: *Clinical Microbiology Reviews* 23 (4), S. 713–739.
193. Wueppenhorst, N.; Stueger, H. P.; Kist, M.; Glocker, E. (2009): Identification and molecular characterization of triple- and quadruple-resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates in Germany. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 63 (4), S. 648–653.
194. Yadegar, A.; Alebouyeh, M.; Zali (2015): Analysis of the intactness of *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island in Iranian strains by a new PCR-based strategy and its relationship with virulence genotypes and EPIYA motifs. In: *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 35, S. 19–26.
195. Yamaoka, Y.; Kodama, T.; Gutierrez, O.; Kim, J. G.; Kashima, K.; Graham, D. Y. (1999): Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. In: *Journal of clinical microbiology* 37 (7), S. 2274–2279.
196. Yamaoka, Y.; Kodama, T.; Kashima, K.; Graham, D. Y.; Sepulveda, A. R. (1998): Variants of the 3' region of the cagA gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different H. pylori-associated diseases. In: *Journal of clinical microbiology* 36 (8), S. 2258–2263.
197. Yamaoka, Y.; Ojo, O.; Fujimoto, S.; Odenbreit, S.; Haas, R.; Gutierrez, O. et al. (2006): *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. In: *Gut* 55 (6), S. 775–781.
198. Yamaoka, Yoshio (2010): Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 7 (11), S. 629.
199. Yamazaki, S.; Yamakawa, A.; Ito, Y.; Ohtani, M.; Higashi, H.; Hatakeyama, M.; Azuma, T. (2003): The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. In: *The Journal of infectious diseases* 187 (2), S. 334–337.

200. Zhang, X.; Zhang, J.; Lin, Y.; Xu, K.; Li, N.; Chen, H.; She, F. (2015a): Analysis of the relationship between invasive capability of *Helicobacter pylori* and gastroduodenal diseases. In: *Journal of medical microbiology* 64 (Pt 5), S. 498–506.
201. Zhang, X. S.; Tegtmeyer, N.; Traube, L.; Jindal, S.; Perez-Perez, G.; Sticht, H. et al. (2015b): A specific A/T polymorphism in Western tyrosine phosphorylation B-motifs regulates *Helicobacter pylori* CagA epithelial cell interactions. In: *PLoS pathogens* 11 (2), S. e1004621.

7 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Wiebke Habendorf
Geburtsdatum: 10.04.1987
Geburtsort: Stendal
Familienstand: ledig

Schulbildung und Studium:

09/1993 – 08/1997 Grundschule „Am Stadtsee“, Stendal
09/1997 – 08/1999 Sekundarschule VII, Stendal
09/1999 – 03/2006 Rudolf-Hildebrand-Gymnasium, Stendal
Abitur-Note: 1,9
12/2006 – 03/2007 Ausbildung zur Rettungssanitäterin an der Sanitäts-
schule Nord in Hutzfeld; Gesamtnote: sehr gut
08/2007 – 01/2009 Studium der Humanmedizin an der Semmelweis
Universität Budapest (3 Fachsemester)
10/2009 – 03/2010 Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-
Universität Jena (1 Fachsemester)
04/2010 – 12/2015 Studium der Humanmedizin an der Otto-von-
Guericke-Universität Magdeburg (12 Fachsemester);
Gesamtnote: 2,0
02/2012 – 06/2016 Anfertigung der experimentellen Dissertation mit dem
Thema: Charakterisierung *H. pylori* assoziierter
Virulenzfaktoren, insbesondere die EPIYA-Motive des
CagA-Proteins in Bezug auf Variabilität und
Pathogenität, bei Patienten mit verschiedenen
gastrointestinalen Erkrankungen; Klinik für
Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der
Medizinischen Fakultät der Ott-von-Guericke-
Universität Magdeburg, Prof. Dr. med. habil Dr. h. c.
Peter Malfertheiner; Betreuer: Prof. Dr. rer. nat.
Thomas Wex

Berufliche Laufbahn:

seit 05/2016 Assistenzärztin in Weiterbildung in der Gynäkologie
und Geburtshilfe am Klinikum Oldenburg

8 Verzeichnis der Wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Link A.; Langner C.; Schirrmeister W.; Habendorf W.; Weigt J.; Venerito M.; Tammer I.; Schlüter D.; Roessner A.; Schlaermann P.; Meyer T. F.; Wex T.; Malfertheiner P. (2016): *H. pylori vacA* genotype is a predominant determinant of Immunologic response to *H. pylori* CagA. (In: *World journal of gastroenterology*), Germany, September 2016.

- Originalartikel (In Revision) -

Langner C.; Wex T.; Varbanova M.; Tammer I.; Habendorf W.; Bornschein J.; Selgrad M.; Kuester D.; Malfertheiner P.: Prevalence of bacterial virulence factors in *H. pylori* strains isolated in patients with gastrointestinal diseases in a prospectively enrolled cohort in Magdeburg (East Germany) 2011 and 2012. In: *European Helicobacter Study Group, XXVth International Workshop*. Ljubljana, Slowenien, 13.-15. September 2012.

-Poster-

Langner C.; Habendorf W.; Link A.; Varbanova M.; Tammer I.; Jechorek D.; Wex T. and Malfertheiner P.: Systematic characterization of CagA in *H. pylori* isolates from patients with gastric disorders: prospective study. In: *European Helicobacter Study Group, XXVIth International Workshop*. Madrid, Spanien, 12-14. September 2013.

-Poster-

Langner C.; Link A.; Habendorf W.; Tammer I.; Wex T. and Malfertheiner P.: Immunologic response to *H. pylori* CagA is strongly dependent on *vacA* polymorphism. In: *European Helicobacter Study Group, XXVIIth International Workshop*. Rom, Italien, 11.-13. September 2014.

-Poster-

Langner C.; Link A.; Habendorf W.; Varbanova M.; Tammer I.; Jechorek D.; Wex T. and Malfertheiner P.: Systematic characterization of CagA in *H. pylori* isolates from patients with gastric disorders: prospective study. In: *European GI Bridging Meeting in Gastroenterology*. Berlin, Germany, 15.-16. November 2013.

-Vortrag-

Link A.; Langner C.; Schirrmeister W.; Habendorf W.; Tammer I.; Schlueter D.; Roessner A.; Schlaermann P.; Meyer T.; Wex T. and Malfertheiner P.: Systemic Immunologic Response to *H. pylori* CagA Is Modulated by Bacterial vacA Genotypes (2440734). *Digestive Disease Week (DDW)*, San Diego, Kalifornien, USA, 21-24 Mai 2016.

-Poster-

9 Danksagung

Mein Dank gilt allen voran Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wex für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung dieser Promotionsarbeit. Seine stetige Erreichbarkeit, Diskussionsbereitschaft, Flexibilität und zügige Korrekturen haben zur Fertigstellung der Arbeit in großem Maße beigetragen und waren für mich alles andere als selbstverständlich.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. med. habil Dr. h.c. Peter Malfertheiner für die Möglichkeit der Durchführung meiner Dissertation an seinem Institut. Speziell möchte ich Ihm für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in seiner Klinik danken.

Ein großes Dankeschön auch an Dr. med. Alexander Link, Cosima Langner und an die Medizinisch-Technischen Assistentinnen des Forschungslabors für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie: Frau Marion Holley, Frau Ursula Stolz, Frau Simone Phillipsen und Frau Anneliese Schindel für die tatkräftige Unterstützung beim Erlernen der praktischen Fertigkeiten und das freundliche Arbeitsklima. Herzlichen Dank auch für die Geduld und hilfreichen Auskünfte bei größeren und kleineren Problemen im Laboralltag.

Herzlichst danke ich meinem Freund Tim Riemland für seine unermüdlichen Bemühungen und seinen Rückhalt. Als Statistiker hat er mich auch mit fachlichen Ratschlägen und konstruktiven Anmerkungen unterstützt und mir beim Gelingen der Arbeit zur Seite gestanden.

Abschließend gebührt mein außerordentlicher Dank meinen Eltern, Thomas und Katrin Habendorf, die mich stets in allen Belangen auf meinem bisherigen Lebensweg unterstützt haben. Sie haben mir diese akademische Ausbildung erst ermöglicht und so auch in besonderer Weise zum vorliegenden Werk beigetragen.

10 Ehrenerklärung

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

Charakterisierung *H. pylori* assoziierter Virulenzfaktoren, insbesondere die EPIYA-Motive des CagA-Proteins in Bezug auf Variabilität und Pathogenität, bei Patienten mit verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen

in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. habil Dr. h.c. Peter Malfertheiner

und mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wex

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-und ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 22.05.2016

Wiebke Habendorf

11 Anhang

Tabelle 11.1 Ausführliche Darstellung der Sequenzanalysen der Klone der 10 *H. pylori*-Isolate und der zugehörigen Referenzstämme. In der Spalte „EPIYA-Motiv“ sind die Gensequenzen der EPIYA-A-, -B- und -C-Motive mit den jeweiligen Nukleotidabweichungen gezeigt. Die in der Literatur beschriebenen Gensequenzen sind mit einem A0, B0 und C0 gekennzeichnet. Für das EPIYA-A-Motiv ergaben sich 3 Abweichungen in den Nukleotiden (A1, A2 und A3). Für das EPIYA-B-Motiv wurden 4 (B1, B2, B3 und B4) und für das C-Motiv 3 Abweichungen (C1, C2, C3) identifiziert. Die zugehörigen Aminosäuresequenzen der jeweiligen EPIYA-A-, -B-, und -C-Motive werden in der letzten Spalte aufgeführt. Hier zeigen sich einige Abweichungen, wie beispielsweise beim B-Motiv, wodurch sich ein EPIYT-B-Motiv ergibt. Insgesamt wurde die Existenz mehrerer EPIYA-Motive innerhalb eines *H. pylori*-Isolates festgestellt.

<i>H. pylori</i> - Isolat	Klon	Fragment (bp)	Referenzstamm	Schlüsselnummer Gendatenbank NCBI	EPIYA-Motiv	Proteinsequenz		
						EPIYA-A	EPIYA-B	EPIYA-C
54C1	1	600	CR 7	AF289437.1	A1B0C2	EPIYAKVNKKKAGQ	EPIYAQVAKKV	EPIYATIDDL S
	15		HP 89	AM292582.1				
	17	650	RIGLD-HC119	JX428769.1	A3B3C0	EPIYAQVNKKKAGQ	EPIYTQVAKNG	EPIYATIDDLG
	18	700	646c10	EF552424.1	A3C0C0C0	EPIYAQVNKKKAGQ	-	EPIYATIDDLG (3x)
	13	750	India99	AF222809.1	A3B3C0C0	EPIYAQVNKKKAGQ	EPIYTQVAKNG	EPIYATIDDLG (2x)
	14							
	16							
16								
74C1	2	650	PD4086K	EF450136.1	A1B0C0	EPIYAKVNKKKAGQ	EPIYAQVAKKV	EPIYATIDDLG
	3		RIGLD-HC93	JX428767.1	A1B4C0	EPIYAKVNKKKAGQ	EPIYTQVAKKV	EPIYATIDDLG
	19	> 1000	P310	DQ011620.1	A2B1A2B2C3	EPIYAKVNKKKAGQ (2x)	EPIYAQVAKKV (2x)	EPIYATIDDL-
99C3	4	750	PZ5038	FJ542259.1	A1B0C0C0	EPIYAKVNKKKAGQ	EPIYAQVAKKV	EPIYATIDDLG (2x)
	5							
	20	850	C048/RU	GQ845004.1	A1B0C0C0C0	EPIYAKVNKKKAGQ	EPIYAQVAKKV	EPIYATIDDLG (3x)
216C	6	550	IRQ8-17	JX164100.1	A1C0	EPIYAKVNKKKAGQ	-	EPIYATIDDLG
	7							

266C	11	650	PZ5106	FJ542251.1	A1B2C0	EPIYAKVNKKKAGQ	EPIYAQVAKKV	EPIYATIDDLG
	12							
	9	670	PZ5086	FJ542241.1	A2B0C0C0	EPIYAKVNKKKAGQ	EPIYAQVAKKV	EPIYATIDDLG (2x)
	22	750	01-1086	JQ318034.1	A1B2C0C0	EPIYAKVNKKKAGQ	EPIYAQVAKKV	EPIYATIDDLG (2x)
47C1	23	850	RIGLD-OC149	JX428784.1	A1B2C0C0C0	EPIYAKVNKKKAGQ	EPIYAQVAKKV	EPIYATIDDLG (3x)
	2	671	PZ5086	HM362765.1	A0B0C0	EPIYAKVNKKKTGQ	EPIYAQVAKKV	EPIYATIDDLG
49A1	1	733	DAK165	FJ542241.1	A0B0C0C0	EPIYAKVNKKKTGQ	EPIYAQVAKKV	EPIYATIDDLG (2x)
	12	653	Arizona2	AB057075.1	A1B0C1	EPIYAKVNKKKAGQ	EPIYAQVAKKV	EPIYATIDDLG
	16				A1B0C1C1			
50C1	11	755	PZ5038	FJ542259.1		EPIYAKVNKKKAGQ	EPIYAQVAKKV	EPIYATIDDLG (2x)
	22	611	CR 7	AF289437.1	A1B0C2	EPIYAKVNKKKAGQ	EPIYAQVAKKV	EPIYATIDDLG
63C1	28							
	33	674	P 310	DQ011620.1	A2B2C0	EPIYAKVNKKKAGQ	EPIYAQVAKKV	EPIYATIDDLG
	39	893			A2B1A2B2C0	EPIYAKVNKKKAGQ (2x)	EPIYAQVAKKV (2x)	EPIYATIDDLG
	32	>1000			A2B1A2B1A2B2C0	EPIYAKVNKKKAGQ (3x)	EPIYAQVAKKV (3x)	EPIYATIDDLG
	34							
	39							
95C1	40							
	2	656	RIGLD-OC217	JX428778.1	A1B0C0	EPIYAKVNKKKAGQ	EPIYAQVAKKV	EPIYATIDDLG
	5alt							
	3	758	RIGLD-HC139	JX428783.1	A1B0C0C0	EPIYAKVNKKKAGQ	EPIYAQVAKKV	EPIYATIDDLG (2x)
	6							
	8							
	26alt							