

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
des Universitätsklinikums Magdeburg

Einfluss von *Helicobacter pylori* auf die Hydrophobizität von TSMC-Zellen

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Claudia Wenke

aus Magdeburg

Magdeburg 2003

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Wenke, Claudia:

Einfluß von *Helicobacter pylori* auf die Hydrophobizität von TSMC-Zellen. –2003.-77 Bl., 34 Abb., 5 Tab., 5 Anlagen

Kurzreferat

In dieser Arbeit wird der Einfluss von *Helicobacter pylori* anhand von 25 verschiedenen Stämmen auf die Hydrophobizität einer humanen Adenokarzinom-Zelllinie beschrieben. Zur Messung der Hydrophobizität der Zellmembran wurde die Methode der Goniometrie angewandt. Um mögliche Ursachen für die nach einer *H.p.*-Infektion auftretenden Veränderungen der Hydrophobizität zu eruieren, wurden zusätzlich Bestimmungen der Adhäsionsrate und der Zytotoxizität des jeweiligen *H.p.*-Stammes durchgeführt. Weiterhin wurde die PGE₂- und LTB₄-Sekretionsleistung der Zellen vor und nach der Inkubation mit *H.p.* gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass das verwendete *in vitro*-Modell gut geeignet ist, Untersuchungen zur Hydrophobizität der Magenzellmembran durchzuführen. Es zeigte sich, dass eine Inkubation mit *H.p.* zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Hydrophobizität führte. Diese Abnahme stand in einem signifikanten Zusammenhang mit der Adhäsionsrate des Stammes. Die Zytotoxizität des Stammes sowie die durch *H.p.* induzierte Veränderung der Membransyntheseleistung der Zelle sind nach diesen Untersuchungen nicht ursächlich für die Veränderung der Hydrophobizität.

Schlüsselwörter

Helicobacter pylori; Hydrophobizität; Kontaktwinkel; Goniometrie; mucogastrale Barriere;
Leucotriene; Prostaglandine; Adhäsionsrate; Histologische H.p.-Dichte; Zytotoxizität;
Vakuolisierung; CagA; TSMC

Inhaltsverzeichnis

Dokumentationsblatt	i
Schlüsselwörter	ii
Inhaltsverzeichnis	iii
Abkürzungsverzeichnis.....	v
Abbildungsverzeichnis.....	vi
Tabellenverzeichnis.....	viii
1 Einführung.....	1
1.1 Die Entdeckung von <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.2 Spektrum <i>Helicobacter pylori</i> - assoziierter Erkrankungen.....	3
1.3 Aufbau und Abwehrmechanismen der Magenschleimhaut.....	5
1.4 Die Hydrophobizität des Gastroduodenaltraktes.....	6
1.5 Virulenzfaktoren von <i>Helicobacter pylori</i>	8
1.6 Pathogenese der <i>Helicobacter pylori</i> - Infektion	10
1.7 Fragestellungen der Arbeit.....	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Untersuchungsmaterial.....	14
2.2 Genereller Versuchsaufbau.....	14
2.3 Anzüchtung der <i>H.p.</i> -Stämme und Beurteilung der <i>H.p.</i> -Dichte.....	18
2.4 Kultivierung und Verwendung der TSMC	18
2.5 Herstellung der Bakteriensuspension, Inkubation der TSMC.....	19
2.6 Goniometrie.....	20
2.6.1 Physikalische Grundlagen	20
2.6.2 Kontaktwinkelmessung.....	22
2.7 Fluoreszenzfärbung	23
2.8 Enzyme-Immunoassay	26
2.9 Beurteilung der Zytotoxizität des Stammes	29
2.9.1 Sichtbare Vakuolisierung.....	29
2.9.2 Expression von <i>CagA</i>	29
2.10 Statistik	32
2.10.1 Deskriptive Statistik	32

2.10.2	Statistische Testverfahren.....	33
3	Ergebnisse	36
3.1	Hydrophobizität	36
3.2	LTB ₄ - und PGE ₂ -Sekretion der TSMC	42
3.3	Adhäsionsrate	45
3.4	Zytotoxizität bzw. <i>CagA</i>	49
3.5	Endoskopischer Befund (Ulcerus/Gastritis).....	51
3.6	Histologische <i>H.p.</i> -Dichte.....	51
3.7	Zusammenfassung	51
4	Diskussion	53
5	Zusammenfassung.....	61
6	Literaturverzeichnis	63
7	Danksagung.....	70
8	Erklärung	71
9	Lebenslauf.....	72
10	Anhang.....	73
10.1	Untersuchungsdaten.....	73
10.2	Gram-Färbung	74
10.3	Testung des <i>H.p.</i> -Stammes auf Katalase-, Oxidase- und Urease-Aktivität	75
10.4	Wasch- und Färbelösungen für die Fluoreszenzfärbung.....	76
10.5	Immunoblot – Lösungen.....	77

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
CagA	Cytotoxin-associated Gene A
H.p.	<i>Helicobacter pylori</i>
IL	Interleukin
LTB₄	Leukotrien B ₄
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
PAF	Platelet activating factor
PGE₂	Prostaglandin E ₂
SEM	Mittlerer Fehler des Mittelwertes
TNFα	Tumor necrosis factor α
TSMC	Tumor surface mucus cell

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Prävalenz der <i>H.p.</i> -Infektion bei verschiedenen gastroduodenalen Erkrankungen (nach Pretolani 1996)	3
Abbildung 2 : Ablauf der <i>H.p.</i> -Infektion nach Malfertheiner 1994	12
Abbildung 3 : Versuchsplanung zur Bestimmung der ausgewählten Kriterien	16
Abbildung 4 : Schematische Darstellung des Kontaktwinkels	20
Abbildung 5 : Zunahme des Kontaktwinkels θ mit steigender Hydrophobizität	21
Abbildung 6 : Schritte der Fluoreszenzfärbung	23
Abbildung 7 : Aufbau des mikroskopischen Präparates	24
Abbildung 8 : Mikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 1:1000) von TSMC nach erfolgter Fluoreszenzfärbung , Inkubation mit <i>H.p.</i> -Stamm mit geringer Adhäsionsrate (ZK = Zellkern)	25
Abbildung 9 : Mikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 1:1000) von TSMC nach erfolgter Fluoreszenzfärbung , Inkubation mit <i>H.p.</i> -Stamm mit mittlerer Adhäsionsrate (ZK = Zellkern)	25
Abbildung 10 : Mikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 1:1000) von TSMC nach erfolgter Fluoreszenzfärbung , Inkubation mit <i>H.p.</i> -Stamm mit hoher Adhäsionsrate (ZK = Zellkern)	26
Abbildung 11 : Bestandteile der Ellman's Reagenz und ablaufende enzymatische Reaktionen	27
Abbildung 12 : Prinzip des Immunoassays zur Messung der LTB ₄ /PGE ₂ -Konzentration	28
Abbildung 13 : Mikroskopisches Bild der TSMC nach Inkubation mit zytotoxischen Stamm	29
Abbildung 14 : Schema des Blot-Aufbaus	30
Abbildung 15 : Elektrophorese-Folie mit Darstellung des Molekulargewichtsmarkers sowie drei exemplarischen <i>H.p.</i> -Stämmen	31
Abbildung 16 : Mittlere relative Kontaktwinkelabnahme und SEM über alle Stämme nach Inkubation mit <i>H.p.</i> -Stämmen	37
Abbildung 17 : Zusammenhang zwischen relativer LTB ₄ Sekretion und relativer Kontaktwinkelabnahme	38
Abbildung 18 : Beziehungen zwischen relativer PGE ₂ -Sekretion und relativer Kontaktwinkelabnahme	38
Abbildung 19 : Zusammenhang zwischen Adhäsionsrate und relativer Kontaktwinkelabnahme	39
Abbildung 20 : Mittlere relative Kontaktwinkelabnahme und deren Standardabweichung von vakuolisierenden und nichtvakuolisierenden Stämmen	40

Abbildung 21 : Mittlere relative Kontaktwinkelabnahme und deren Standardabweichung bei Gastritis- und Ulcusstämmen	40
Abbildung 22 : Zusammenhang zwischen histologischer <i>H.p.</i> -Dichte und relativer Kontaktwinkelabnahme.....	41
Abbildung 23 : Mittlere relative PGE ₂ - und LTB ₄ -Sekretion sowie SEM nach <i>H.p.</i> -Inkubation über alle Stämme.....	42
Abbildung 24 : Relative PGE ₂ - und LTB ₄ -Sekretion bei Inkubation mit exemplarischem Stamm 1	43
Abbildung 25 : Relative PGE ₂ - und LTB ₄ -Sekretion bei Inkubation mit exemplarischem Stamm 2	43
Abbildung 26 : Zusammenhang zwischen relativer LTB ₄ -Sekretion und histologischer <i>H.p.</i> - Dichte.....	45
Abbildung 27 : Zusammenhang zwischen Adhäsionsrate und LTB ₄ -Sekretion nach 24 h.....	46
Abbildung 28 : Zusammenhang zwischen Adhäsionsrate und relativer PGE ₂ -Sekretion.....	47
Abbildung 29 : Mittlere Adhäsionsrate und deren Standardabweichung von <i>CagA</i> -positiven und <i>CagA</i> -negativen Stämmen	48
Abbildung 30 : Mittlere Adhäsionsrate und deren Standardabweichung von Ulcus- und Gastritis- Stämmen	48
Abbildung 31 : Zusammenhang zwischen Adhäsionsrate und <i>H.p.</i> -Dichte.....	49
Abbildung 32 : Relative Häufigkeit der <i>CagA</i> -positiven sowie vakuolisierenden Stämme bei Patienten mit Ulcus oder Gastritis.....	50
Abbildung 33 :Zusammenhang zwischen Kriterien <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	54
Abbildung 34 : Synthese der Eicosanoide	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 : Helicobacter-Spezies nach Malfertheiner 1994	2
Tabelle 2 : Untersuchungskriterien und ihre Verfahren	15
Tabelle 3 : <i>H.p.</i> -Dichtegrade	18
Tabelle 4 : Beziehung zwischen Phasen und Oberflächenenergien.....	20
Tabelle 5 :Zusammenhang zwischen den Untersuchungskriterien.....	52

1 Einführung

1.1 Die Entdeckung von *Helicobacter pylori*

Bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts beobachteten mehrere Autoren unabhängig voneinander bei mikroskopischer Betrachtung des Gastrointestinaltraktes verschiedener Säugetierarten eine Besiedlung der Magenschleimhaut mit „Spirillen“ bzw. „Spirochäten“ (Bizzozero 1893, Salomon 1896, Balfour 1906, Lucet 1910).

1906 bzw. 1917 beschrieben Kreinitz und Luger erstmals das Auftreten von „Spirochäten“ im Magen beim Menschen, und zwar an der Oberfläche von ulzerierten Magenkarzinomen sowie im Magensaft (Kreinitz 1906). Doenges konnte 1939 zeigen, dass in mehr als 40 % aller von ihm untersuchten Magenautopsien Spirochäten nachzuweisen waren. 1940 untersuchten Freedberg und Barron Proben von Magenresektionen und fanden in ca. 40 % der Fälle eine Besiedlung mit Spirochäten, die assoziiert mit peptischen Ulzera oder Karzinomen auftrat (Freedberg 1940). 1979 wurden von Fung et al. Bakterien im Magen von Patienten mit chronischer Gastritis nachgewiesen.

Dem Auftreten dieser Bakterien im Magen wurde jedoch keine Bedeutung im Sinne einer pathogenen Infektion bzw. Verursachung von Magenkrankungen beigemessen. Dies lag zum einen daran, dass die Bakterien nie intrazellulär beobachtet wurden, zum anderen gelang es keinem der Autoren, die Bakterien anzuzüchten.

Das Erkennen der Bedeutung dieser Bakterien für das Auftreten einer chronischen Gastritis wurde 1983 durch Warren und Marshall möglich. Sie fanden heraus, dass die Mehrzahl ihrer endoskopischen Biopsien von Patienten mit chronischer Gastritis bzw. peptischen Ulzera mit campylobakterartigen Bakterien besiedelt waren (Warren 1983). Ihnen gelang es erstmalig, die Bakterien von Magenbiopsien auf unselektiven Nährmedien anzuzüchten. Marshall bewies 1985 in einem Selbstversuch, dass der Keim alle Koch'schen Postulate erfüllt. Nach Selbstinfektion mit dem Keim trat nach 14 Tagen eine Gastritis auf, und von seiner endoskopisch gewonnenen Magenbiopsie konnte der Keim wieder angezüchtet werden. Nach Einnahme von Antibiotika verschwand die Gastritis komplett, der Keim war nicht mehr nachweisbar.

Nachdem dieser Keim zuerst der Gattung *Campylobacter* zugeordnet worden war, wurde 1989 durch Goodwin et al. angeregt, den Keim einer eigenen Gattung zuzuordnen, da doch beträchtliche Unterschiede zur Gattung *Campylobacter* zu finden waren (Goodwin 1989). Seitdem

besteht die eigene Gattung *Helicobacter*. In der Folgezeit wurden neben *Helicobacter pylori* bei einer Reihe von Säugetieren weitere Vertreter der Gattung *Helicobacter* gefunden. Einige dieser Spezies sind auch vom Menschen isoliert wurden, stammen dabei jedoch entweder nicht aus den Magen (z.B. *H.cinaedi* oder *H.fennelliae*), oder konnten nur vereinzelt im menschlichen Magen beobachtet, aber nicht angezüchtet werden („*H.Heilmannii*“). Zur Zeit werden unter der Gattung *Helicobacter* 9 Spezies subsummiert (Malfertheiner 1994, siehe Tabelle 1)

Tabelle 1 : Helicobacter-Spezies nach Malfertheiner 1994

<i>Helicobacter</i>-Spezies	Wirt
<i>H. pylori</i>	Mensch
<i>H. mustelae</i>	Frettchen
<i>H. felis</i>	Hund, Katze
<i>H. nemestrinae</i>	Affe
<i>H. acinonyx</i>	Gepard
„ <i>H. Heilmannii</i> “	Hund, Katze, Mensch
<i>H. cinaedi</i>	Mensch
<i>H. fennelliae</i>	Mensch
<i>H. muridarum</i>	Nagetiere

Helicobacter pylori ist ein gramnegatives Stäbchen, dass je nach Stamm 1,5 – 5 µm lang ist und einen Durchmesser von 0,3 - 0,5 µm hat. Es tritt, abhängig von den jeweiligen Umweltbedingungen, in verschiedenen Formen auf. In günstiger Umgebung ist es S- oder kommaförmig, bei Verschlechterung der äußeren Bedingungen wird es ringförmig bzw. kokkoid. Das Bakterium besitzt 4 -6 Geißeln und ist monopolar polytrich begeißelt.

Helicobacter pylori lebt mikroanaerophil und benötigt für gutes Wachstum einen CO₂ - Partialdruck von 5 – 10 % bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C. Auf Agarplatten wächst der Keim als transparente, 0,5 - 1,5 mm breite Kolonie.

1.2 Spektrum *Helicobacter pylori* - assoziierter Erkrankungen

Die Bedeutung von *Helicobacter pylori* als kausaler Faktor für die Entstehung bestimmter Erkrankungen des oberen Verdauungstraktes ist heute unumstritten. Eine Infektion mit *H.p.* ist mit der chronischen Gastritis vom Typ B, duodenalen und gastralen Ulzera sowie dem Auftreten des Magenkarzinoms (Adenokarzinom, MALT-Lymphom) vergesellschaftet. Die Prävalenz der *H.p.*-Infektion bei diesen Erkrankungen zeigt Abbildung 1.

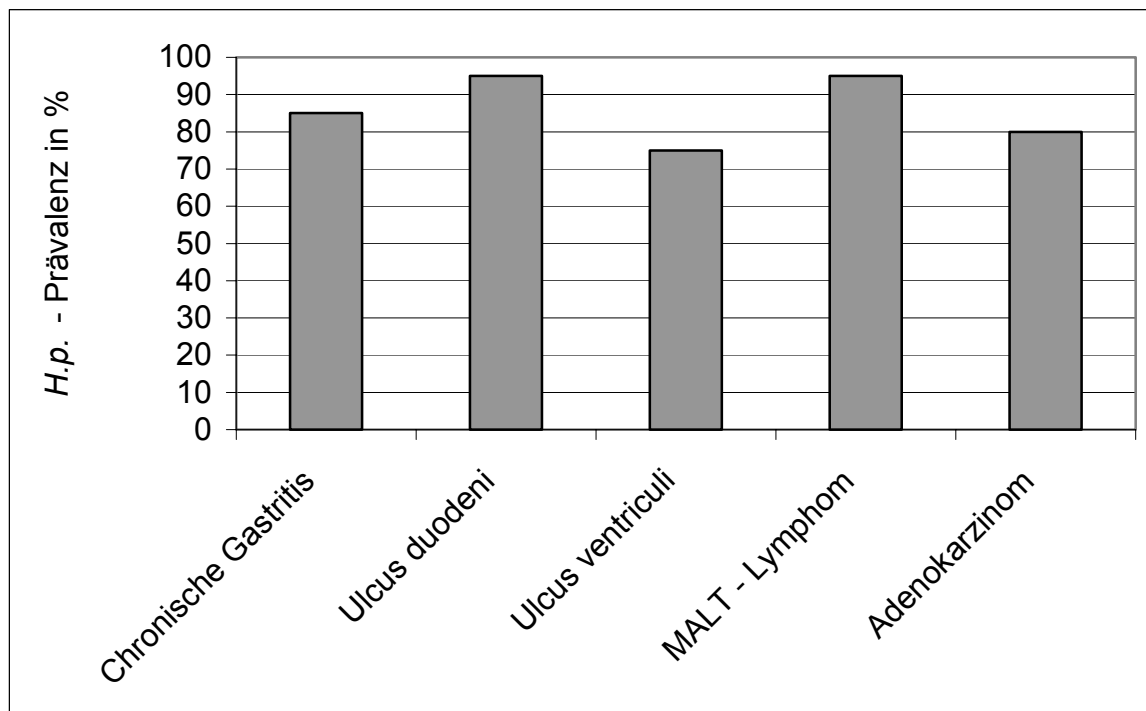


Abbildung 1 : Prävalenz der *H.p.*-Infektion bei verschiedenen gastroduodenalen Erkrankungen (nach Pretolani 1996)

Die kausale Rolle von *H.p.* bei der Entstehung einer **chronischen Gastritis** zeigt sich daran, dass eine Ingestion von *H.p.* eine solche zur Folge hat (Morris 1989) und dass *H.p.* nie ohne pathologische Veränderungen der Schleimhaut im Sinne einer Entzündungsreaktion vorkommt. Die chronische Besiedlung der Magenschleimhaut mit *H.p.* führt zu einem partiellen Ersatz des Oberflächenepithels durch Regeneratepithel, zu Schleimdepletion, zur Bildung von Lymphfollikeln, zu fokalen Drüsenatrophien und zu intestinalen Metaplasien. Die Entzündung ist in allen Magenabschnitten zu beobachten, im Antrum jedoch meist am stärksten ausgeprägt. Sie ist zugleich chronisch (Infiltration mit Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen) sowie aktiv (Infiltration mit neutrophilen Granulozyten). Abhängig von der Pathogenität des Keims bzw. der Resistenzlage des Wirtes kann das Ausmaß und die Schwere der Entzündung variieren. Eine antibiotische Therapie führt regelmäßig zu einem Rückgang der Entzündung. Eine *H.p.*-Infektion lässt sich bei 80 – 90 % der chronischen Gastritiden nachweisen (Caspary 1996).

Die Besiedlung v.a. der antralen Mucosa mit *H.p.* steht weiterhin in engem Zusammenhang mit dem Auftreten **duodenaler Ulzera**. Fast alle Patienten, die an einem Ulcus duodeni leiden, weisen eine chronische Gastritis im distalen Magen auf. Vermutlich prädisponiert eine *H.p.*-Infektion des Magens auch zur Entwicklung von Magenschleimhautmetaplasien im Duodenum, die dann häufig ebenfalls mit *H.p.* besiedelt werden. So führt *H.p.* auch hier zu einer chronischen Duodenitis und letztlich zum Ulcus duodeni. Neben der Überproduktion von Säure und einem Mangel an protektiven Faktoren ist die *H.p.*-Infektion somit ein wichtiger Faktor in der Ätiopathogenese des Ulcus duodeni. Bei 95 % aller duodenaler Ulzera tritt die *H.p.*-Infektion assoziiert auf (Caspary 1996).

Ulzerationen der Magenschleimhaut entwickeln sich meist auf dem Boden einer aktiven chronischen Gastritis bzw. chronisch-atrophischen Gastritis. Ein Befall mit *H.p.* korreliert eng mit dem Auftreten von Magenulzera bei bestehender Gastritis. So sind fast alle Ulzera, die nicht durch Einnahme nichtsteroidaler Antiphlogistika oder einen duodeno-gastralen Reflux entstanden sind, auf eine *H.p.*-Infektion zurückzuführen (70 – 80 %). Eine Sanierung der *H.p.*-Infektion führt meist zur Ausheilung des Ulcusleidens (Caspary 1996).

Epidemiologische Studien zeigen einen Zusammenhang von gastralem *H.p.*-Befall und dem Auftreten eines **Magenkarzinoms**. Eine *H.p.*-Infektion findet sich in über 90 % der Fälle bei Patienten mit Magenkarzinom (Caspary 1996). Man nimmt an, dass eine *H.p.*-Gastritis im Sinne einer präkanzerösen Kondition zu intestinaler Metaplasie und Atrophie der Magenschleimhaut führt. Dies erhöht das Risiko für die Entstehung eines Adenokarzinoms auf das Sechsfache (Forman 1993). Allerdings scheint die Kanzerogenität des *H.p.* gering zu sein, denn nur 1 ‰ aller *H.p.*-positiven Patienten entwickeln ein Magenkarzinom. So wird eine *H.p.*-Infektion wahrscheinlich erst mit anderen Einflussgrößen (genetische, diätetische Faktoren) gemeinsam bei der Entstehung des Magenkarzinoms wirksam.

In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass **MALT-Lymphome** vermehrt auf dem Boden einer *H.p.*-Gastritis entstehen, die Gastritis also auch hier als präkanzeröse Kondition anzusehen ist. Die Grundlage bildet die Induktion eines MALT-Gewebes im Magen durch *H.p.*. Durch eine Eradikation der Infektion mit Antibiotika können ca. 70 % der niedrig malignen MALT-Lymphome in komplette Remission gebracht werden (Wotherspoon 1993). Jedoch sind sicherlich zusätzliche ätiopathogenetische Faktoren von Bedeutung, denn das MALT-Lymphom entsteht nur selten in einer *H.p.*-Gastritis.

1.3 Aufbau und Abwehrmechanismen der Magenschleimhaut

Die Eigenschaft der Magenschleimhaut, eine protektive Schutzfunktion gegenüber den unterschiedlichsten pathogenen Agentien auszuüben, wird in ihrer Gesamtheit als mucogastrale Barriere bezeichnet. Es lassen sich folgende wesentliche Komponenten, durch die diese Schutzfunktion gewährleistet wird, unterscheiden:

- die Schleim–Bicarbonat–Schicht des Mucus,
- eine surfactantähnliche, hydrophobe Grenzschicht,
- die zellulären Membranen des Oberflächenepithels und
- die Durchblutung der Mucosa.

Der von den schleimproduzierenden Zellen des Oberflächenepithels produzierte Mucus ist ein wichtiger Abwehrmechanismus der Mucosa. Der Schleimmantel ist eine heterogene Mischung aus Proteinen, Glykoproteinen (v.a. Mucin) und Lipiden in Form eines Gels, das mit H_2O und Elektrolyten durchtränkt ist. Er verzögert die Rückdiffusion von H^+ -Ionen und Pepsin und schützt die Mucosazellen vor dem niedrigen luminalen pH. Die Konstanz des pH-Gradienten über dem Schleim und das durch Bicarbonat neutralisierte Mikromilieu an der Zelloberfläche sind wichtige Elemente des Zellschutzes. Im Gegensatz zum sauren Milieu des Magensaftes (pH 1 - 2) existiert direkt an der Zelloberfläche ein pH-Wert von 6,6 - 7. Weiterhin stellt der Schleim eine unspezifische Barriere zwischen im Magen vorhandenen Bakterien und der epithelialen Zellschicht dar. Im Mucus enthaltene Glykoproteine formen ein Netzwerk, welches Lektin-ähnliche Adhäsine enthält, die eine Penetration von Bakterien durch den Schleim erschweren.

Wie elektronenmikroskopisch demonstriert werden konnte, liegt auf dem Oberflächenepithel eine hydrophobe Grenzschicht aus Phospholipiden, die eine getrennte Einheit bezüglich der Komponenten des Magenschleims darstellen (Hills 1992). Diesen oberflächenaktiven Phospholipiden wird eine eigenständige protektive Funktion zugesprochen (Lichtenberger 1983, Kay 1987). So weisen sie beispielsweise eine gewisse Resistenz gegenüber wasserlöslichen Stoffen wie Säure oder Pepsin auf. Die Phospholipidschicht wird von den Magendrüsen produziert und sezerniert.

Von den Parietalzellen wird HCl in das foveoläre Lumen sowie gleichzeitig Bicarbonat in die Kapillaren sezerniert. Nach Transport zum Oberflächenepithel trägt das sezernierte Bicarbonat zum neutralen Mikromilieu an den Epithelzellen bei. Der kontinuierliche Ersatz der spezialisierten Epithelzellen wird durch die Drüsenhalszellen gewährleistet. So kann die Integrität

der Schleimhaut bei Schädigung durch exogene Noxen schnell wiederhergestellt werden. Über die Kapillaren wird die Mucosa mit Nährstoffen versorgt, gleichzeitig werden metabolische Endprodukte und toxische Substanzen abtransportiert. Aus dem Blut können Entzündungszellen einwandern. Die G-Zellen im Magen produzieren als Teil des endokrinen Systems Gastrin als Antwort auf komplexe Stimuli. Gastrin wiederum stimuliert die Parietalzellen und damit die Säuresekretion.

Cytoprotektion der Magenschleimhaut durch Prostaglandine

Weiterhin werden von den Oberflächenepithelzellen Prostaglandine aus langkettigen, ungesättigten Fettsäuren der Zellmembran gebildet. Die Synthese der Prostaglandine wird durch Reize verschiedenster Art, v. a. durch zellschädigende Noxen, ausgelöst. Im Gastrointestinaltrakt bewirken sie über rezeptorvermittelte, cAMP-abhängige Mechanismen eine Stimulation der Schleimsekretion. Über eine gleichzeitige Hemmung der Sekretion von Magensaft wirken sie somit zytoprotektiv. Die Durchblutung der Kapillaren der Mucosa wird vor allem durch PGE₂ vermittelt, welches zu einer Senkung des arteriellen Tonus und damit zu einer Steigerung der Durchblutung führt.

1.4 Die Hydrophobizität des Gastroduodenaltraktes

Die physikalische Eigenschaft der Hydrophobizität der Mucosa ist das Ergebnis sämtlicher auf ihrer Oberfläche befindlicher Komponenten und Stoffwechselforgänge. Dazu gehören die Mucus-Schicht, die phospholipidreiche Zone und die Zellmembranen ebenso wie der Blutfluss und die Diffusionsvorgänge in beide Richtungen. Sie beruht im Wesentlichen auf den Lipid- und Proteinkomponenten der obengenannten Strukturen. Unterschiede in der Zusammensetzung der verschiedenen Komponenten des Schleims spiegeln sich in unterschiedlicher Hydrophobizität wieder. So steigt die Hydrophobizität mit steigendem Gehalt an kovalent gebundenen Fettsäuren bzw. assoziierten Lipiden des Mucins an, wogegen sie mit steigendem Gehalt an Proteinen oder Kohlenhydraten fällt. Wahrscheinlich tragen die kovalent gebundenen Fettsäuren zu den hydrophoben Eigenschaften des Mucins mehr bei als die assoziierten Lipide, die mit dem Mucin über nichtglykosylierte Regionen interagieren (Slomiany 1993). Von einigen Autoren werden die hydrophoben Eigenschaften der Mucosaoberfläche vor allem den oberflächenaktiven Phospholipiden zugeschrieben (Lichtenberger 1983, Kay 1987, Hills 1992).

Bereits 1983 wurde von Hills et al. die Hydrophobizität des Gastrointestinaltraktes bei Hunden gemessen (Hills 1983). Sie wiesen nach, dass die Hydrophobizität im Magen wesentlich höher als im Duodenum ist. 1989 konnte gezeigt werden, dass dieser Sachverhalt, wenn auch in geringerem

Maße, auch beim Menschen anzutreffen ist (Spychal 1989). Proximale Bereiche des Gastrointestinaltraktes wie der Magen oder das proximale Duodenum weisen durch ihre relativ hohe Hydrophobizität eine ausgeprägte Resistenz gegenüber der Penetration hydrophiler Substanzen wie HCl auf, wogegen den distaleren Dünndarmregionen ihre geringere Hydrophobizität eine Aufnahme lipophiler Substanzen wie z. B. der Gallenbestandteile möglich macht (Slomiany 1993). Goggin konnte belegen, dass die Hydrophobizität der Magenschleimhaut bei Besiedelung mit *H.p.* deutlich sinkt (Goggin 1991). Nach Eradikation des Keims nahm die Hydrophobizität wieder zu.

Goniometrie

Das Ausmaß der Hydrophobizität einer Membran kann über eine Kontaktwinkelmessung mittels Goniometer bestimmt werden. Diese Methode hat ihren Ursprung in den physikalischen Wissenschaften, wo sie zur Messung der Eigenschaften fester Oberflächen Verwendung fand. Sie lässt sich aber auch anwenden, um die Oberflächeneigenschaften biologischer Systeme zu charakterisieren.

So wurden Messungen an Zellen, Parasiten, Bakterien, Protein-Schichten oder Phospholipid-Vesikeln durchgeführt (Menge 1984, Neumann 1983, van Oss 1975, van Oss 1981, van Loosdrecht 1987), aber auch an menschlichem bzw. tierischem Gewebe (Butler 1983, Goggin 1991, Hills 1983, Spychal 1989, Spychal 1990a). Nach der Entdeckung von *H.p.* galt das besondere Interesse in diesen Studien auch der mucogastralen Schutzschicht, ihrem Aufbau und Abwehrmechanismus sowie den Faktoren, die ihre Hydrophobizität beeinflussen. Meist wurde der Kontaktwinkel in diesen Studien an Biopsien aus dem Magen-Darm-Trakt gemessen. So ließen sich unterschiedliche Kontaktwinkel zwischen *H.p.* (+) und *H.p.* (-) Patienten, Patienten mit Ulcuserkrankungen bzw. Gastritiden und gesunden Kontrollgruppen, Patienten vor und nach *H.p.*-Eradikation aufzeigen. Unterschiedliche Regionen des Magen-Darm-Traktes weisen ebenfalls verschiedene Kontaktwinkel auf (Goggin 1991, Goggin 1992, Spychal 1989, Spychal 1990a).

Einige Studien wurden *in vitro* an Monolayern durchgeführt, so z. B. an auf Deckgläschen aufgetragenen Schichten von Lipiden, Lecithinen oder Mucus (Lichtenberger 1990, Ottlecz 1993, Spychal 1990b). So war es möglich, einzelne Komponenten der mucogastralen Schutzschicht genauer zu untersuchen, aber auch Untersuchungen zur Aktivität bestimmter Enzyme von *H.p.* durchzuführen. Es gibt Studien zum Vergleich der Enzymaktivitäten verschiedener Bakterien bzw. *H.p.*-Stämme oder auch zur Bestimmung der Enzyminhibition durch spezifische Inhibitoren oder Medikamente (Ottlecz 1993).

1.5 Virulenzfaktoren von *Helicobacter pylori*

Als Virulenzfaktoren bezeichnet man die Eigenschaften eines pathogenen Bakteriums, die ihm die Fähigkeit geben, eine bestimmte ökologische Nische im Körper des Wirtes zu kolonisieren und sich dort trotz Immunantwort und unspezifischer Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus zu vermehren. Das Spektrum der klinischen Manifestationen, die mit einer *H.p.*-Infektion verknüpft sind, wird durch verschiedene Faktoren mitbestimmt. Das Ausmaß der Entzündung und der Schädigungsgrad der Mucosa hängen vor allem von zwei Faktoren ab. Dies sind wirtsabhängige Faktoren und stammspezifische Unterschiede in der Virulenz von *H.p.* Folgende Virulenzfaktoren von *H.p.* sind dabei von Bedeutung:

- Urease
- Spiralförmigkeit und Flagellen
- Spezifische Adhärenz
- Produktion von Zytotoxinen
- bestimmte DNA-Segmente („pathogenicity island“, *VacA*)
- Katalase, Superoxiddismutase
- Phospholipase

Von *H.p.* wird das Enzym **Urease** produziert, welches die Spaltung des im Magen in geringen Konzentrationen vorkommenden Harnstoffs in Ammoniak und Kohlendioxid katalysiert. In unmittelbarer Umgebung des Bakteriums wird durch den Ammoniak die Säure des Magensaftes neutralisiert, so dass ein alkalisches Mikroklima entsteht, in dem der Keim überleben kann. Weiterhin besitzt der entstandene Ammoniak selbst einen zytotoxischen Effekt, der sich in einer intrazellulären Vakuolisierung der Epithelzellen zeigt (Xu 1990). *In vitro* wird *H.p.* durch ein Kulturmedium mit niedrigem pH schnell abgetötet, wenn dieses keinen Harnstoff enthält. Setzt man dem Medium wieder Harnstoff zu, so erhöht dies die Säurestabilität des Keims beträchtlich. Eine Mutante von *H.p.*, bei der ein Urease-Gen inaktiviert wurde, erwies sich im Tiermodell als unfähig, die Magenschleimhaut zu kolonisieren (Malfertheiner 1994).

Die **Spiralförmigkeit** von *H.p.* und seine **Flagellen** ermöglichen dem Keim eine außergewöhnlich hohe Motilität. Dadurch ist das Bakterium in der Lage, sich im viskosen Mucus zu bewegen, das Glykoproteinnetz des Mucus zu durchdringen und letztendlich die Epithelzellen zu erreichen. Die Gene *flaA* und *flaB* kodieren dabei für die beiden Proteine, aus denen das Geißelfilament zusammengesetzt ist. Weniger gut bewegliche Stämme von *H.p.* zeigen im Tiermodell eine gerin-

gere Kolonisierungsrate. Die für die Spezies *Helicobacter* typischen Flagellenhüllen dienen wahrscheinlich dem Schutz der säurelabilen Filamente.

Ultrastrukturelle Untersuchungen von *H.p.*-infizierten Schleimhäuten zeigen entweder eine enge Zell-zu-Zell **Adhärenz** zwischen *H.p.* und Epithelzelle oder eine mehr distanzierte Assoziation mit deutlichem Zwischenraum. Die Adhärenz von *H.p.* an Epithelzellen dient zum einen dazu, den Keim vor den peristaltischen Bewegungen des Magens zu schützen, zum anderen ist dadurch die lokale Wirkung der toxischen Virulenzfaktoren auf die Epithelzelle besonders stark. Der Keim bildet dazu besondere Strukturen aus, die eine feste und spezifische Bindung an Rezeptoren der Zielzelle vermitteln. Dabei handelt es sich um spezifische Oberflächenmoleküle von *H.p.*, welche mit bestimmten carbohydrate Strukturen löslicher Glykokonjugate im Magenschleim bzw. auf epithelialen Zellen interagieren. Diese Adhäsine lassen sich drei großen Gruppen zuordnen: oberflächliche fimbriale und afimbriale Haemagglutinine, Lipid-bindende Adhäsine sowie Sulphomucin-bindende Proteine (Wadström 1996).

Bei den Unterschieden in der Virulenz von *H.p.* ist weiterhin ein enger Bezug zum Vorhandensein bestimmter Sequenzen der DNA zu erkennen: Das **VacA-Gen** kodiert für das sogenannte „**Vacuolating cytotoxin**“, ein Protein der Größe von 87 kDa. Dieses Zytotoxin induziert die Bildung von Vakuolen in epithelialen Zellen (Cover 1992). Obwohl *VacA* bei allen *H.p.*-Stämmen vorhanden ist, produzieren nur etwa 50 - 65 % der Stämme das aktive Protein (Blaser 1996). Diese „giftigen Stämme“ lassen sich überdurchschnittlich häufig bei Patienten mit Ulcuserkrankungen finden, ihr Anteil liegt hier 30 - 40 % höher als bei Gastritikern (Figura 1989).

Die Fähigkeit zur Bildung des Zytotoxins scheint weiterhin in Zusammenhang mit dem Vorkommen des **CagA-Gens** zu stehen. Dieses Gen ist nur bei ca. 60 % der Stämme vorhanden, und sein Auftreten korreliert eng mit der Produktion des VacA – Zytotoxins. So tragen die meisten zytotoxinproduzierenden Stämme zugleich auch das *CagA*-Gen, dessen Ort auf dem Bakterienchromosom weit entfernt liegt (Blaser 1996). Das Gen codiert für ein großes 128 kDa-Protein, dessen exakte Funktion noch unklar ist. Bei einem *CagA*-positiven Stamm sind jedoch die hervorgerufenen Gewebeschäden und Entzündungsreaktionen besonders stark (Cover 1990, Atherton 1995). Ca. 50 – 60 % der Patienten mit Gastritis beherbergen einen *CagA*-positiven Stamm, von denen mit einer duodenalen Ulcuserkrankung fast jeder (Blaser 1996). Bei einem Zudem erhöht eine derartige Infektion das Risiko für die Entstehung eines Magenkarzinoms um das Doppelte (Nomura 1991). Das *CagA*-Gen ist Bestandteil der sogenannten „pathogenicity island“. Dies sind bestimmte Sequenzen auf der DNA, die u. a. für Proteine codieren, die für die Virulenz des Stammes von Bedeutung sind. Diejenigen *H.p.*-Stämme, die das VacA-Toxin

produzieren und das *CagA*-Gen besitzen, werden auch als Typ I-Stämme bezeichnet, um sie von den weniger virulenten *VacA*- und *CagA*-negativen Typ II-Stämmen zu unterscheiden.

Weiterhin produziert *H.p.* noch eine Reihe anderer extrazellulärer Enzyme, die als Virulenzfaktoren wirken. So setzen **Phospholipasen** die Viskosität des Mucus herab. Die Zerstörung von Phospholipiden durch die Phospholipase A₂ oder C spielt dabei eventuell zu Beginn der *H.p.*-Infektion eine wichtige Rolle, da durch sie die hydrophobe surfactantähnliche Grenzschicht bzw. die hydrophoben Schichten der Epithelzelloberfläche angegriffen werden (Wadström 1996). **Katalase** und **Superoxiddismutase** erhöhen die Resistenz des Keims gegenüber der Phagozytose durch Abwehrzellen. Andere produzierte Toxine, wie z.B. **Haemolysine**, spielen eine Rolle für das intrazelluläre Überleben von *H.p.* in Neutrophilen und Macrophagen (Wadström 1996).

1.6 Pathogenese der *Helicobacter pylori* - Infektion

Die Übertragung von *H.p.* erfolgt auf oralem bzw. fäkal-oralem Wege. Nach Passage des Oesophagus gelangt der Keim in das saure Milieu des Magens. Die Spaltung des hier vorkommenden Harnstoffs zu Ammoniak und Kohlendioxid mittels seiner Urease ermöglicht ihm das Überleben in einem günstigen alkalischen Mikromilieu.

Interaktionen mit dem Mucus und der hydrophoben Phospholipidschicht

Nach Eindringen in den Mucus bewegt sich *Helicobacter pylori* durch chemotaktische Orientierung entlang des pH-Gradienten zwischen Magenumen (pH 1 - 2) und Mucosaoberfläche (pH 6,6 - 7) in Richtung Magenepithel. Dabei ermöglichen ihm seine Spiralform und seine Begeißelung eine sehr gute Beweglichkeit. Auf seinem Weg durch den Mucus orientiert sich *H.p.* an verschiedenen Rezeptoren des Mucus, die z.T. aus Glykoproteinen und Glykolipiden bestehen. Andere artifizielle Rezeptoren sind z.B. Laminin, Collagen oder Vitronectin (Lingwood 1989, Valkonen 1993, Ringner 1992, Trust 1991). Eine wichtige Rolle spielen dabei die von *H.p.* produzierten Haemagglutinine, die an Erythrozytenmembranen und Schleimbestandteile binden können (Wadström 1990). Daneben werden von *H.p.* weitere Faktoren gebildet, die die Mucusintegrität stören. So wird durch den Abbau der Lipide und Phospholipide des Schleims durch die *H.p.*-Lipase bzw. Phospholipase die Säureabwehrfunktion gestört sowie die Hydrophobizität des Mucus verringert. Der Anstieg der Lysolecithine führt zusätzlich zu einer lytischen Wirkung an den Zellwänden des Magenepithels (Slomiany 1993). Über die Aktivierung verschiedener Zytokine (PAF, TNF α , Interleukine, Leukotriene) werden verschiedene Entzündungszellen

angelockt; es kommt zu einer Infiltration des Gewebes mit polymorphen Neutrophilen, Makrophagen und Lymphozyten.

Durch Phosphatasen und Phospholipasen wird die surfactantähnliche hydrophobe Phospholipidschicht abgebaut, die als letzte Barriere vor den Epithelzellen liegt (Mauch 1993). So wird eine direkte Adhärenz an die Epithelzellen möglich. Dabei beobachtet man eine ausschließliche Adhärenz an die schleimsezernierenden Zellen des Magenepithels. Außerhalb des Magens wurde *H.p.* bisher nur in Bereichen mit gastraler Metaplasie angetroffen. In ultrastrukturellen Untersuchungen zeigt sich ein direkter Zell-zu-Zell Kontakt zwischen *H.p.* und Epithelzelle. Dabei werden durch einige *H.p.*-Stämme sog. „adhesion pedestals“ von den Magenepithelzellen ausgebildet. Dies ist als Ausdruck erhöhter Pathogenität des Stammes anzusehen, da eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Epitheldegeneration und der Anzahl dieser „adhesion pedestals“ besteht (Hessey 1990).

Schädigung der epithelialen Zellschicht

Ein direktes Eindringen von *H.p.* in die Epithelzellen wurde bisher nur vereinzelt beschrieben. Der Keim neigt dazu, sich an die apikalen Zellmembranen nahe der „tight junctions“ zu heften. Im direkten Kontakt mit der Zelloberfläche entfaltet *H.p.* seine gewebsschädigende Wirkung, zum einen durch Ausschüttung von spezifischen Zytotoxinen und Enzymen, zum anderen durch die nachfolgende entzündliche Reaktion. Phosphatasen und Phospholipasen führen zur Bildung toxischer Produkte (Lysolecithine) aus Phospholipidstrukturen der Mucosabarriere. Leukotriene werden entweder von *H.p.* selbst oder von der Magenepithelzelle als Antwort auf von *H.p.* sezernierte Faktoren gebildet. Sie wirken chemotaktisch auf Neutrophile und Eosinophile und unterhalten so die entzündliche Reaktion. *H.p.* gibt auch zellschädigende Proteine ab, die von den Magenepithelzellen aufgenommen werden (Nilius 1994). Diese Oberflächenproteine aus der bakteriellen Zellwand locken Leukozyten an (Mai 1992).

Entzündung und immunologische Reaktion

Als Ausdruck einer lokalen Immunantwort findet man im Magenschleim und Magensaft *H.p.*-infizierter Patienten Antikörper gegen *H.p.*-Antigene, v.a. IgA und IgG. Die Besetzung von *H.p.* mit IgA ist als Opsonierungseffekt zu verstehen. Neben dieser lokalen findet auch eine humorale Immunantwort statt, vorherrschende Antikörper sind hier IgG.

Von *H.p.* werden aktiv oder passiv (durch Zelluntergang) eine Reihe von chemotaktischen Substanzen freigesetzt. Diese Faktoren werden in die Schleimhaut absorbiert und ziehen Entzündungszellen der akuten Antwort (neutrophile Granulozyten) an. Andererseits werden aufgrund des toxischen Effekts von *H.p.* auf die Epithelzellen auch von diesen selbst

Chemotaxine freigesetzt. Die Aktivierung von polymorphen Granulozyten führt zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen und anderen aggressiven Enzymen (Elastase, Lysozym). Da die immunologischen und entzündlichen Mechanismen jedoch nicht zur Elimination des Keims führen, persistiert die Entzündung und es kommt zur Migration mononukleärer Zellen (chronisch entzündliche Antwort). Es wurde gezeigt, dass lösliche Proteine, die aus *H.p.* extrahiert wurden, Monozyten und Macrophagen zur Produktion von IL-1 und TNF α anregen (Mai 1991). Auch die Aktivität der Neutrophilen kann durch Zytokine modifiziert werden (Steinbeck 1989). Weitere Mediatoren der Entzündungsreaktion, die von *H.p.* produziert werden, sind PAF und Leukotriene. PAF wirkt chemotaktisch auf Granulozyten, ist bei der Lymphozytenproliferation beteiligt und hat eine TNF α -induzierende Wirkung.

Die wichtigsten Schritte im Ablauf der *H.p.*-Infektion sind zusammenfassend in Abbildung 2 beschrieben.

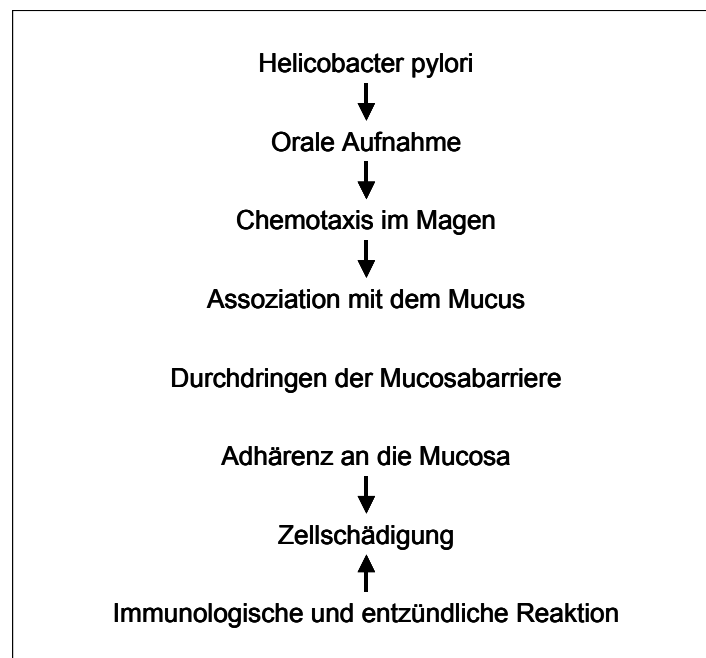


Abbildung 2 : Ablauf der *H.p.*-Infektion nach Malfertheiner 1994

1.7 Fragestellungen der Arbeit

Goniometrische Messungen wurden bisher in mehreren Studien zur Quantifizierung der Oberflächenhydrophobizität von Magenschleimhautbiopsien verwendet (Goggin 1991, Goggin 1992, Lichtenberger 1998). Im Rahmen eines *in vitro*-Modells ist die Hydrophobizität gezüchteter Magenschleimhautzellen bisher nur in einer Studie untersucht worden (Preiß 1998). Deshalb galt es zuerst einmal festzustellen, ob das verwendete *in vitro*-Modell für die Messung der **Hydrophobizität** von Schleimhautepithelzellen hinreichend geeignet ist. Anschließend wurde untersucht, ob nach Inkubation mit *H.p.* Veränderungen im Ausmaß der Hydrophobizität auftreten und welcher Art diese Veränderungen sind.

Weiterhin war zu klären, ob diese Veränderungen stammspezifisch sind. Dabei wurde der mögliche Einfluss der folgenden Charakteristika von *H.p.* untersucht :

- die **Zytotoxizität** des Stammes,
- das Vorhandensein von ***CagA***,
- die **Adhäsionsrate** von *H.p.* an Magenepithelzellen und
- der histologische *H.p.*-Befall bzw. die histologische ***H.p.*-Dichte**.

Weiterhin sollte festgestellt werden, ob eine Inkubation der Zellen mit *H.p.* Veränderungen des **Prostaglandin E₂**- bzw. **Leukotrien B₄**-Stoffwechsels der Zellmembran verursacht und ob diese Veränderungen im Zusammenhang mit der Hydrophobizität stehen.

Da die **Gastritis** und das **gastroduodenale Ulcus** die häufigsten Erkrankungen sind, bei denen eine *H.p.*-Infektion auftritt, wurden die Patienten, von denen die Biopsien zur Anzucht der *H.p.*-Stämme entnommen wurden, dementsprechend in zwei Gruppen eingeteilt. Durch die durchgeführten Untersuchungen sollte ein eventueller Bezug der obengenannten Kriterien zum endoskopischen Befund (Gastritis bzw. gastroduodenales Ulcus) nachgewiesen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Ausgangsmaterial für die nachfolgenden Untersuchungen waren 25 *Helicobacter pylori*-Stämme. Alle Stämme wurden aus endoskopisch gewonnenen Magenbiopsien *H.p.*-positiver Patienten der Universitätsklinik Magdeburg angezüchtet und auf speziellen *H.p.*-Kulturplatten kultiviert.

Zur Untersuchung der Einflüsse von *H.p.* auf das Magenepithel wurden als Modell humane Adenokarzinomzellen des Magens der von Barranco et al. charakterisierten epithelialen Zelllinie ATCC CRL 1739 AGS verwendet (Barranco 1983). Diese Zellen werden auch als TSMC (Tumor surface mucus cells) bezeichnet. Sie kommen in ihren Eigenschaften den oberflächlichen Epithelzellen des humanen Magens besonders nahe (Nilius 1994).

2.2 Genereller Versuchsaufbau

Folgende Kriterien wurden im Hinblick auf die obengenannten Fragestellungen festgelegt:

- Hydrophobizität der TSMC
- Endoskopischer Befund (Ulcer/Gastritis)
- Adhäsionsrate der Bakterien an TSMC
- Histologische *H.p.*-Dichte
- Zytotoxizität des Stammes (sichtbare Vakuolisierung der TSMC sowie Expression von *CagA*)
- Sekretion von LTB_4 der Epithelzelle
- Sekretion von PGE_2 der Epithelzelle.

In Tabelle 2 sind die zur Messung dieser Kriterien verwendeten Untersuchungsverfahren noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 2 : Untersuchungskriterien und ihre Verfahren

Untersuchungskriterium	Verfahren
Ulcus/Gastritis	endoskopische Beurteilung
Hydrophobizität	Goniometrie
Adhäsionsrate	Fluoreszenzfärbung
Histologische <i>H.p.</i> -Dichte	mikroskopische Beurteilung
<i>CagA</i>	Electrophorese und Immunoblot
Sichtbare Vakuolisierung	mikroskopische Beurteilung
LTB ₄ /PGE ₂	ELISA

Einen Überblick über die im Folgenden beschriebene Versuchsplanung gibt Abbildung 3.

Gewinnung der *in vivo* – Daten

Während der Endoskopie erfolgte eine makroskopische Beurteilung der Magenschleimhaut im Hinblick auf das Vorliegen eines Ulcus oder einer Gastritis. Die entnommenen Schleimhautbiopsien wurden histologisch aufgearbeitet und der *H.p.*-Dichtegrad bestimmt (siehe 2.3). Aus den Biopsie erfolgte weiterhin die Anzüchtung der einzelnen *H.p.*-Stämme auf speziellen *H.p.*-Kulturplatten (siehe 2.3).

Gewinnung der *in vitro* - Daten

Eine geringe Menge des kultivierten Stammes wurde zur späteren elektrophoretischen Untersuchung auf das Vorhandensein von *CagA* tiefgefroren (siehe 2.9.2). Mit einem weiteren Teil der Kultur wurde unter photospektrometrischer Messung eine Bakteriensuspension der optischen Dichte 0,2 hergestellt, mit der die TSMC anschließend in einer Verdünnung von 1:20 inkubiert wurden. Diese relativ geringe Inkubationsdichte wurde gewählt, um den physiologischen Verhältnissen bei einer *H.p.*- Infektion des Magens möglichst nahe zu kommen. Die TSMC wurden dazu vorher in zwei definierten Zellzahlen in six-well-Platten mit einliegenden Deckgläschen ausgesät und kultiviert (siehe 2.4). Da für die Bestimmung der Adhäsionsrate möglichst einzelne Zellen bzw. Zellinseln benötigt wurden, wurde hierfür eine relativ geringe Zellzahl von 10^5 Zellen/2 ml Kulturmedium/well eingesät. So ließ sich eine Konfluenzrate der TSMC von weniger als 50% erzielen. Die Adhäsionsrate wurde anschließend nach 6-stündiger Inkubation mit obengenannter Bakteriensuspension und nachfolgender Färbung mit Acridinorange im Fluoreszenzmikroskop ausgezählt (siehe 2.7).

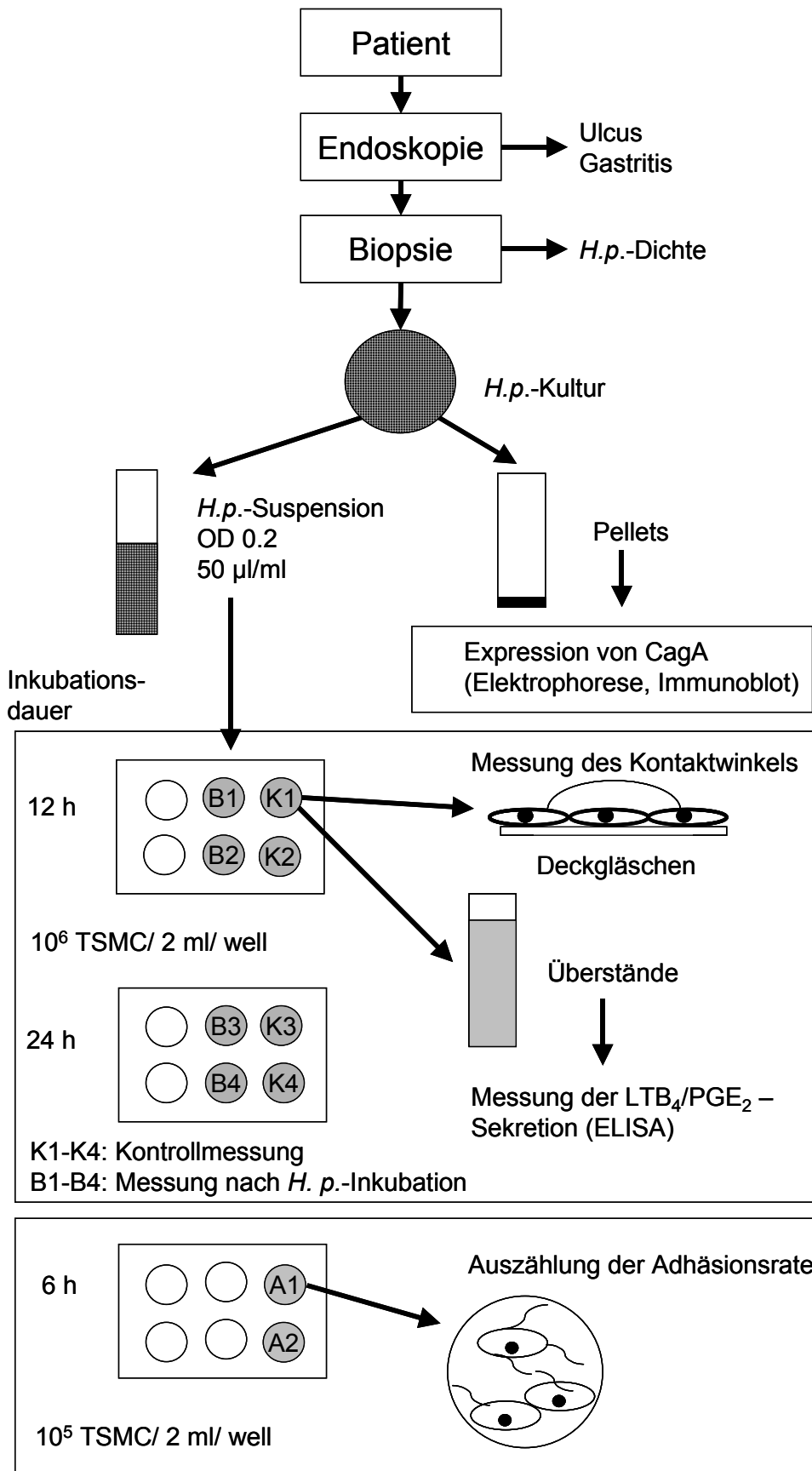


Abbildung 3 : Versuchsplanung zur Bestimmung der ausgewählten Kriterien

Für die Messung des Kontaktwinkels sowie der Sekretion von $\text{LTB}_4/\text{PGE}_2$ wurden TSMC – Monolayer benötigt. Um stabile Zellmonolayer auf den Deckgläschen anzuzüchten, wurden hier 106 Zellen/2 ml Kulturmedium/well eingesetzt. Um die Veränderungen des Kontaktwinkels durch Inkubation mit *H.p.* messen zu können, wurden weiterhin Vorversuche zur möglichen Dauer der Inkubationszeit durchgeführt. Hier zeigte sich nach 24 h eine Abnahme des Kontaktwinkels, wogegen nach 48 h bereits wieder ein Anstieg des Kontaktwinkels zu messen war. Um die Abnahme des Kontaktwinkels über diese 24 h noch detaillierter zu bestimmen, wurde im Versuchsablauf eine erste Messung bereits nach 12 h vorgenommen, die zweite nach 24 h.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden zum einen Kontrollmessungen an TSMC-Monolayern, die nicht mit *H.p.* inkubiert waren durchgeführt, zum anderen die Messungen an den mit *H.p.* inkubierten TSMC. Der Kontaktwinkel wurde goniometrisch durch Aufbringen eines NaCl-Tropfens auf die Monolayer gemessen.

Aus den Überständen der jeweiligen Kammern einer 6-well-Platte, in denen sich die Kontrollansätze bzw. die Ansätze mit *H.p.*-Inkubation befanden, wurde mittels eines Enzym-Immunoassays die Konzentration von LTB_4 bzw. PGE_2 bestimmt.

In den nachfolgenden Abschnitten werden diese Abläufe detailliert beschrieben.

2.3 Anzuchtung der *H.p.*-Stämme und Beurteilung der *H.p.*-Dichte

Direkt nach Entnahme der Biopsie im Rahmen der gastrokopischen Untersuchung wurde diese auf einer speziell zur Anzuchtung von *H.p.* geeigneten Agarplatte (Pylori-Agar) ausgestrichen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Kulturplatte im Brutschrank bei 37 °C unter anaerophilen Verhältnissen (CO₂-Partialdruck 5%) für 2 - 5 Tage. Die nach dieser Zeit gewachsenen Kolonien wurden mittels Gram-Färbung sowie den Enzymtests zum Nachweis der Katalase-, Oxidase- und Ureaseaktivität getestet (siehe Anhang 10.3 sowie 10.4).

Auf einer weiteren Biopsie des Patienten erfolgte die Beurteilung der histologischen *H.p.*-Dichte routinemäßig im pathologischen Institut der Universitätsklinik Magdeburg. Dazu wurde nach Fixierung der Biopsie in 4% Formalin das Präparat mit einer modifizierten Giemsa-Färbung angefärbt. Anschließend wurde in Anlehnung an die Sydney Klassifikation eine Einteilung in 4 Grade vorgenommen (Price 1991). Diese Einteilung ist aus Tabelle 3 ersichtlich. Beide Biopsien wurden aus eng benachbarten Magenschleimhautregionen eines Patienten gewonnen. Die Beurteilung der histologischen Dichte erfolgte zunächst getrennt für das Antrum und den Corpus. Aus diesen beiden Werten wurde durch Summation ein Gesamtwert für den Magen gebildet.

Tabelle 3 : *H.p.*-Dichtegrade

Grad der <i>H.p.</i> -Dichte	Anzahl der vorhandenen Bakterien
0	Keine
1	Wenig
2	Mittelmäßig viele
3	Sehr viele

2.4 Kultivierung und Verwendung der TSMC

Die Kultivierung der TSMC erfolgte unter Verwendung des Zellkultur-Flüssigmediums DMEM (Dulbeco`s Modified Eagle Medium) mit 10% Anteil FCS (fetal calf serum) in einem Feuchtbrutschrank (Firma Heraeus) bei 37 °C mit einem CO₂-Partialdruck von 5 % . Im Hinblick auf die spätere Inkubation der Zellen mit *H.p.* war unbedingt zu beachten, das Medium **ohne Zusatz von Antibiotika** zu verwenden.

Ein Umsetzen der Zellen erfolgte alle zwei Tage. Dazu wurden die Zellen mit 10 ml Trypsin vom Boden der Kulturflasche abgelöst und dreimal durch abwechselndes Zentrifugieren über 10 min

bei 800 U/min und Resuspendieren in obengenannter Kulturlösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in neuem Nährmedium kultiviert.

Nach Einlegen eines sterilen Deckgläschens in je eine Kammer einer 6-well-Platte wurden diese mit 2 ml des Mediums gefüllt. Für die nachfolgenden Versuchsansätze war es notwendig, die Zellen in zwei unterschiedlichen Dichten auf die Deckgläschen aufzubringen. Zur Bestimmung des Kontaktwinkels wurden die TSMC in Form eines Monolayers verwendet; zur Ermittlung der Adhäsionsrate wurden Zellinseln bzw. einzeln liegende Zellen benötigt. Um eine dichte, möglichst einlagige Zellschicht für die nachfolgenden Kontaktwinkelmessungen zu erhalten, wurden pro well 10^6 TSMC eingesät. Für die Bestimmung der Adhäsionsrate von *H.p.* erwies sich das Einsäen einer Menge von 10^5 TSMC pro well als ausreichend. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte jeweils in der Neubauer-Zählkammer.

Die anschließende Kultivierung der Zellen über 24 h im Brutschrank bei 37 °C führte zum Anwachsen der Zellen in den beiden gewünschten Dichten auf den Deckgläschen. Eine orientierende Überprüfung der bewachsenen Deckgläschen wurde mittels Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung vorgenommen.

2.5 Herstellung der Bakteriensuspension, Inkubation der TSMC

Die verschiedenen *H.p.*-Stämme wurden auf speziellen *H.p.*-Kulturplatten (*H.p.*-Agar der Firma BioMérieux) angezüchtet und vermehrt. Zur sicheren Identifizierung der *H.p.*-Stämme wurde neben der Kulturmorphologie die Katalase-, Oxidase- und Urease-Aktivität mittels handelsüblicher Tests geprüft (siehe Anhang 10.3). Im Hinblick auf die Auszählung der Adhäsionsrate war es notwendig, dass *H.p.* in Form vitaler Stäbchen vorlag. Dies wurde durch Mikroskopieren eines angefertigten Gram-Präparates des jeweiligen Stammes bei 1000-facher Vergrößerung sichergestellt (siehe Anhang 10.3).

Mittels Flüssigkulturmedium wurde nach Aufnahmen der Bakterien von der Kulturplatte unter photospektrometrischer Messung eine Bakteriensuspension der optischen Dichte 0,2 bei einer Wellenlänge von 540 nm hergestellt (Photospektrometer SPECORD von Zeiss).

Mit dieser *H.p.*-Suspension wurden die vorbereiteten TSMC in einer Konzentration von 50 µl/ml Medium versetzt und über 12 h bzw. 24 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Adhäsionsrate von *H.p.* an TSMC wurde bereits nach 6 h Inkubation ausgezählt.

2.6 Goniometrie

2.6.1 Physikalische Grundlagen

Die Möglichkeit goniometrischer Messungen beruht auf folgenden physikalischen Grundlagen:

Tropft man die jeweils gleiche Flüssigkeit auf feste Oberflächen mit unterschiedlichen Oberflächenenergien, so ergeben sich unterschiedliche Tropfenformen. Diese sind das Resultat der Wechselwirkung verschiedener Oberflächenenergien, die sich zwischen den drei Phasen fest, flüssig und gasförmig bilden. Die Beziehungen zwischen den Phasen und den Oberflächenenergien zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4 : Beziehung zwischen Phasen und Oberflächenenergien

Oberflächenenergie	Zwischen den Phasen	
E_{ff}	Fest	Flüssig
E_{fg}	Fest	Gasförmig
E_{gfl}	Gasförmig	Flüssig

Der Kontaktwinkel θ entsteht zwischen der festen Oberfläche und der Tangente an den aufgebracht Tropfen am sog. „triple point“. Dieser „triple point“ ergibt sich am Zusammentreffen der drei unterschiedlichen Oberflächenenergien. Eine schematische Darstellung dieser Verhältnisse zeigt Abbildung 4.

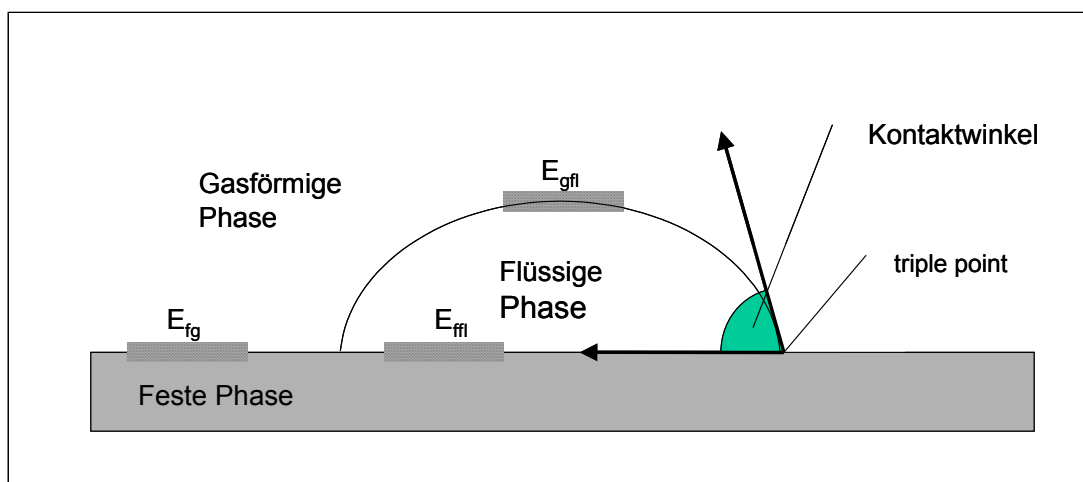


Abbildung 4 : Schematische Darstellung des Kontaktwinkels

Nach Young besteht zwischen den beschriebenen Größen folgender Zusammenhang (siehe Gleichung 1)

Gleichung 1

$$E_{fg} - E_{ff} = E_{gf} \cdot \cos \theta = \Delta E$$

Mit ΔE wird die freie Oberflächenenergie einer festen Phase bezeichnet.

Zwischen dem Kontaktwinkel θ und der freien Oberflächenenergie ΔE besteht eine inverse Beziehung. Mit steigender Oberflächenenergie ΔE sinkt der Kontaktwinkel θ . Hydrophobe feste Oberflächen mischen sich gut mit der gasförmigen Phase, so dass die Energie E_{fg} klein ist. Andererseits ist eine hydrophobe Oberfläche weniger mischbar mit Wasser und die Energie E_{ff} ist somit hoch, so dass im Ergebnis ΔE klein ist.

Bei gleichbleibender Oberflächenspannung des Tropfens, ausgedrückt durch E_{gf} , und sinkendem ΔE steigt der Kontaktwinkel θ an. Das bedeutet, dass der Kontaktwinkel eine direkte Schätzung des Grades der Hydrophobizität ermöglicht. Je größer die Hydrophobizität einer festen Phase ist, um so größer ist auch der Kontaktwinkel. Dieser Zusammenhang zwischen dem Kontaktwinkel und dem Grad der Hydrophobizität ist noch einmal schematisch in Abbildung 5 verdeutlicht.

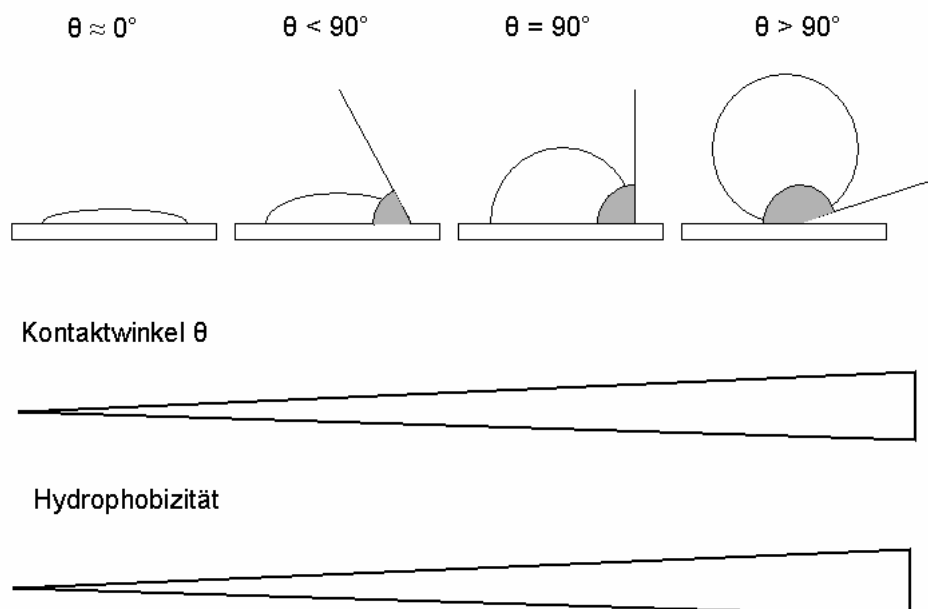


Abbildung 5 : Zunahme des Kontaktwinkels θ mit steigender Hydrophobizität

2.6.2 Kontaktwinkelmessung

Die Kontaktwinkelmessungen wurden an TSMC-Monolayern durchgeführt. Die Herstellung der Monolayer und ihre Inkubation mit den *H.p.*-Stämmen wurden in den vorigen Abschnitten beschrieben.

Um den Kontaktwinkel direkt auf der Zelloberfläche messen zu können, mussten die folgenden vorbereitenden Schritte in Anlehnung an Nilius (Nilius 1996) ausgeführt werden:

1. Die jeweiligen Überstände der Kammern wurden einzeln mittels Pipette abgesaugt und für nachfolgende Bestimmungen der Prostaglandin- bzw. Leukotrien-Konzentration bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Kryoröhrchen tiefgefroren.
2. Die Deckgläschen wurden unter vorsichtiger Zugabe von destilliertem Wasser (2 ml/well) und nachfolgender langsamer Bewegung der Zellkulturplatte per Hand für etwa 30 sec dreimal gewaschen, um Überreste des Flüssigmediums möglichst vollständig zu entfernen.
3. Anschließend wurden die Deckgläschen herausgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Diese Trocknung war notwendig, da der Kontaktwinkel direkt nach Inkubation und Waschen der Deckgläschen aufgrund der feuchten Oberfläche nicht messbar war. Die Trocknungszeit spielt für die korrekte Messung des Kontaktwinkels eine wesentliche Rolle. Preiß konnte zeigen, dass der Kontaktwinkel auf nicht mit *H.p.* inkubierten TSMC im Verlauf von 48 h kontinuierlich ansteigt (Preiß 1999). Da davon auszugehen ist, dass bei sehr langer Trocknungszeit die Zelloberfläche durch natürliche Autolyse in Mitleidenschaft gezogen ist, wurden die TSMC in Anlehnung an Preiß über 12 h bis maximal 24 h luftgetrocknet. Die Zelloberfläche wies nach dieser Zeitspanne keine makro- bzw. mikroskopisch sichtbaren Beeinträchtigungen auf.

Die Bestimmung des Kontaktwinkels erfolgte mittels Goniometer.

Zur Messung wurde 1 μl einer 0,9 % NaCl-Lösung mit einer Hamilton-Spritze auf die TSMC-Monolayer aufgetropft. Für die Messungen wurden die folgenden Kriterien angewandt (Nilius 1996) :

- An jedem Tropfen wurde der Kontaktwinkel sowohl auf der rechten als auch auf der linken Seite gemessen. Die Messung wurde verworfen, wenn die Differenz zwischen den Kontaktwinkeln beider Seiten mehr als 5° betrug.
- Die Messung musste innerhalb von 10 sec vorgenommen werden, da anderenfalls der Kontaktwinkel durch die Verdunstung des Tropfens zu schnell abnahm.

Der Kontaktwinkel wurde pro Stamm nach 12 h bzw. 24 h Inkubation mit *H.p.* auf jeweils zwei mit TSMC beschichteten Deckgläschen gemessen. Zusätzlich wurden sowohl für 12 h als auch für 24 h jeweils zwei mit TSMC beschichtete Deckgläschen mitgeführt, die nicht mit *H.p.* inkubiert waren und als Kontrollmessungen dienten. Pro Deckgläschen wurden mindestens 10 NaCl-Tropfen aufgebracht. Dieses Vorgehen führte bei beidseitiger Messung des Tropfens zu jeweils 40 Messwerten für eine Kontrollmessung sowie 40 Messwerten nach *H.p.*-Inkubation. Nach Bildung des arithmetischen Mittelwertes für die Kontrollmessungen sowie die Messungen nach *H.p.*-Inkubation wurde anschließend die relative Kontaktwinkelabnahme in % der zugehörigen Kontrollen bestimmt (siehe 3.1).

2.7 Fluoreszenzfärbung

Zur Bestimmung der Adhäsionsrate, d. h. der Anzahl von *H.p.*-Bakterien pro Zelle, wurden die TSMC-Zellen und deren adhärenente *H.p.* angefärbt. Abbildung 6 zeigt die Schritte der durchgeführten Fluoreszenzfärbung, die im Folgenden detaillierter beschrieben werden.



Abbildung 6 : Schritte der Fluoreszenzfärbung

Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist aus dem Anhang zu entnehmen (siehe 10.4).

Waschen

Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Deckgläschen unter Zugabe von PBS-Lösung (2 ml pro well) auf einem mechanischen Schüttler 15 sec lang mit 150 rpm dreimal gewaschen. Dies führte zu einem nahezu vollständigen Entfernen nichtadhärenter Bakterien unter Bestehenbleiben der Adhäsionskräfte zwischen den Bakterien und der Zelle.

Fixieren

Anschließend erfolgte das Fixieren der adhärenen Bakterien mittels Fixierlösung bei 4 °C über Nacht (mindestens 12 Stunden). Diese Fixierlösung wurde unter dreimaligem Waschen mit gekühltem Cacodylatpuffer (4 °C) ausgewaschen (3 ml/well; 40 sec bei 150 rpm).

Färben

Nach Absaugen der Fixierlösung erfolgte die eigentliche Färbung mittels Acridinorange - Lösung (1 ml/well, 3 min Einwirkzeit). Nach erneutem dreimaligen Waschen der Deckgläschen mit Cacodylatpuffer (4 °C, 2 ml/well, 20 sec bei 150 rpm) wurden die Deckgläschen ca. 30 min luftgetrocknet.

Einbetten

Zur anschließenden Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop wurden sie sodann in DePeX (Einbettungsmedium der Firma SERVA Electrophoresis GmbH) eingebettet auf einen Objektträger aufgebracht und mindestens zwei Tage bei 4 °C aufbewahrt, um ein Aushärten des DePeX zu erreichen. Den schematischen Aufbau eines fertigen Präparates zeigt Abbildung 7.

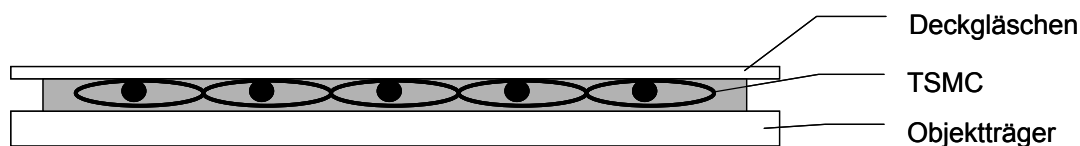


Abbildung 7 : Aufbau des mikroskopischen Präparates

Die Adhäsionsrate/Zelle wurde durch Zählen der adhärenen Bakterien bei 1000-facher Vergrößerung an 200 TSMC-Zellen und anschließender Berechnung des arithmetischen Mittelwertes bestimmt. Abbildung 8, Abbildung 9 und Abbildung 10 zeigen mikroskopische Aufnahmen von TSMC nach erfolgter Fluoreszenzfärbung. Die Bilder veranschaulichen exemplarisch unterschiedliche Adhäsionsraten am Beispiel von drei *H.p.*-Stämmen.

Vereinfachend erfolgte hier durch subjektive Einschätzung die Einteilung in geringe, mittlere und hohe Adhäsionsraten.

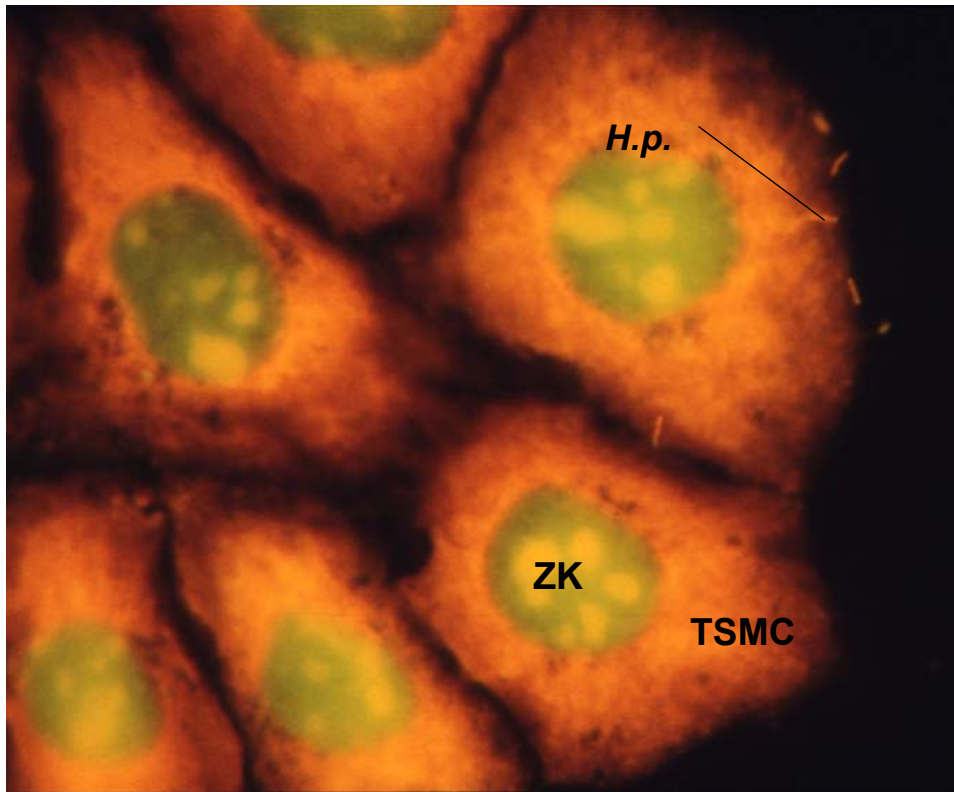


Abbildung 8 : Mikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 1:1000) von TSMC nach erfolgter Fluoreszenzfärbung ,
Inkubation mit *H.p.*-Stamm mit geringer Adhäsionsrate (ZK = Zellkern)

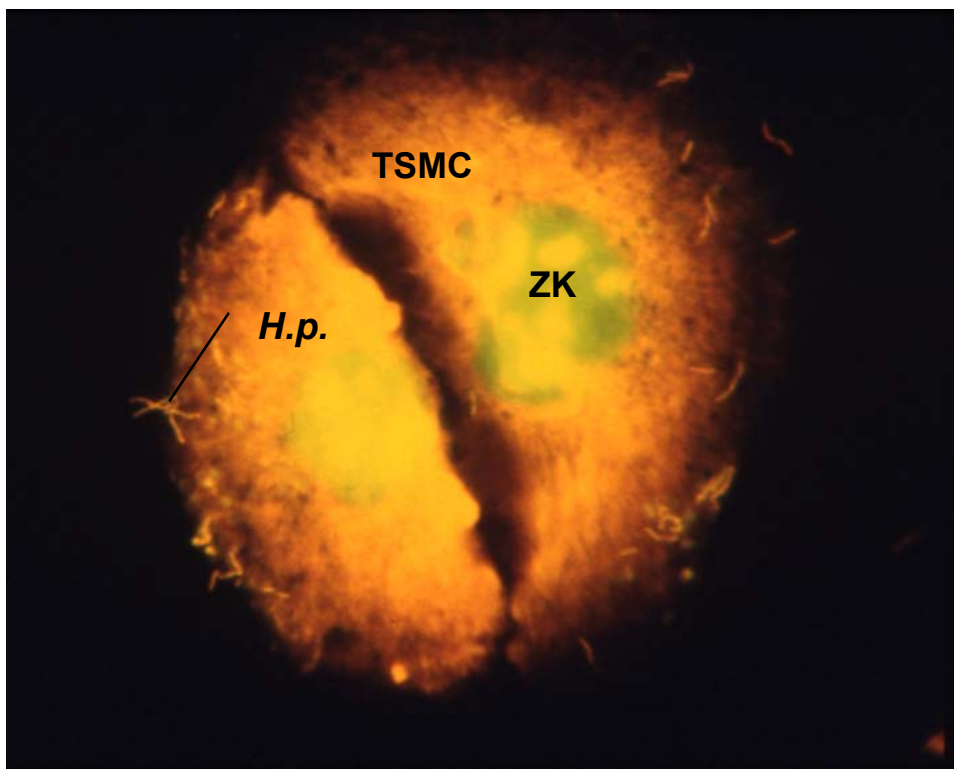


Abbildung 9 : Mikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 1:1000) von TSMC nach erfolgter Fluoreszenzfärbung ,
Inkubation mit *H.p.*-Stamm mit mittlerer Adhäsionsrate (ZK = Zellkern)

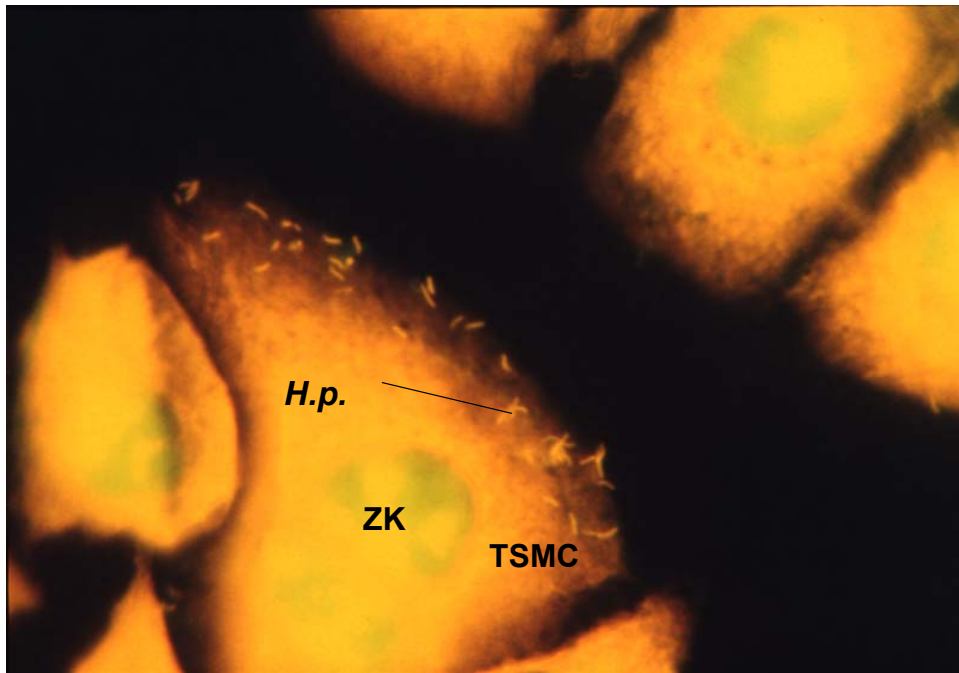


Abbildung 10 : Mikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 1:1000) von TSMC nach erfolgter Fluoreszenzfärbung , Inkubation mit *H.p.*-Stamm mit hoher Adhäsionsrate (ZK = Zellkern)

2.8 Enzyme-Immunoassay

Aus den Überständen der Versuchsansätze (nach 12 h bzw. 24 h Inkubation mit *H.p.*) bzw. der Kontrollansätze (nach 12 h bzw. 24 h ohne *H.p.*) wurde die von den TSMC sezernierte Menge an Leukotrien B₄ bzw. Prostaglandin E₂ mittels eines Enzym-Immunoassays bestimmt. Nachfolgend soll das Prinzip dieses Verfahrens kurz erläutert werden.

Das zu bestimmende freie LTB₄ konkurriert mit einem sogenannten LTB₄-Tracer (d. h. LTB₄ gebunden an Acetylcholinesterase) um eine begrenzte Anzahl von Antiserum-Bindungsplätzen, welche LTB₄ spezifisch sind. Die Konzentration an LTB₄-Tracer ist konstant, wogegen die Menge an freiem LTB₄ variiert. Je mehr freies LTB₄ die Bindungsstellen besetzt, umso weniger LTB₄-Tracer kann gebunden werden. Somit ist die Menge an LTB₄-Tracer, die an die Antiserum-Bindungsstellen bindet, indirekt proportional zur Menge an freiem LTB₄.

Der Antiserum-LTB₄ (freies oder Tracer)-Komplex bindet an einen monoklonalen Antikörper von Mäusen, mit welchem die Reaktionsvertiefungen der Zellkulturplatte beschichtet waren. Die wells werden anschließend gewaschen, um alle ungebundenen Reagenzien zu entfernen. Nach Zugabe von Ellmans-Reagenz, welche das Substrat für die enzymatische Reaktion der Acetylcholinesterase enthält, bildet sich ein Produkt mit typischer gelber Farbe und einem Absorptionsmaximum bei 412 nm. Eine detaillierte Beschreibung dieser enzymatischen Reaktion ist in Abbildung 11 aufgezeigt.

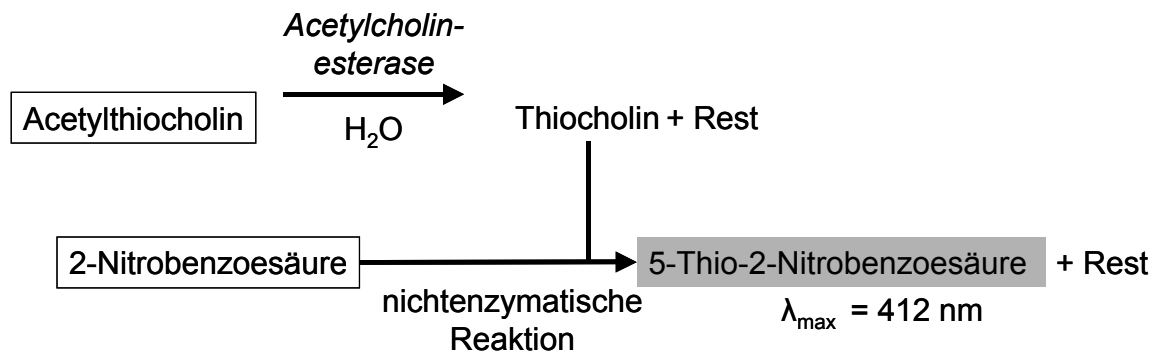


Abbildung 11 : Bestandteile der Ellman's Reagenz und ablaufende enzymatische Reaktionen

Die Intensität dieser Farbe, gemessen mit dem Photospektrometer, ist proportional der Menge an LTB₄-Tracer, welcher an den well gebunden ist, und somit indirekt proportional zur Menge an freiem LTB₄. Die beschriebenen proportionalen Beziehungen zeigt Gleichung 2 .

Gleichung 2

$$c_{LTB_4} \sim \frac{1}{c_{LTB_4-Tracer}} \sim \frac{1}{Intensität} \sim \frac{1}{Absorption}$$

Die Messung der Prostaglandin E₂-Konzentration erfolgte nach dem gleichen Prinzip, wobei jedoch polyklonale Ziegen-Antikörper auf die wells aufgebracht wurden. Diese reagieren wiederum mit dem Antiserum-PGE₂-Komplex, der aus der kompetitiven Bindung von freiem PGE₂ bzw. PGE₂-Tracer mit Kaninchen-Antiserum gebildet wurde. Nach Zugabe von Ellmans-Reagenz, wodurch die enzymatische Reaktion abläuft, wird die Intensität der gelben Farbe des Produkts photospectrometrisch gemessen. Es gilt wiederum folgende Gleichung :

Gleichung 3

$$c_{PGE_2} \sim \frac{1}{c_{PGE_2-Tracer}} \sim \frac{1}{Intensität} \sim \frac{1}{Absorption}$$

Das detaillierte Vorgehen beim Entwickeln der Assays ist den Begleitheften der Kits (Cayman a, Cayman b) zu entnehmen. Einen schematischen Überblick über den Ablauf des Assays gibt Abbildung 12.

Die absolut gemessenen Konzentrationen nach *H.p.*-Inkubation wurden wiederum in Relation zu den absoluten Kontrollmessungen ohne *H.p.*-Inkubation gesetzt.

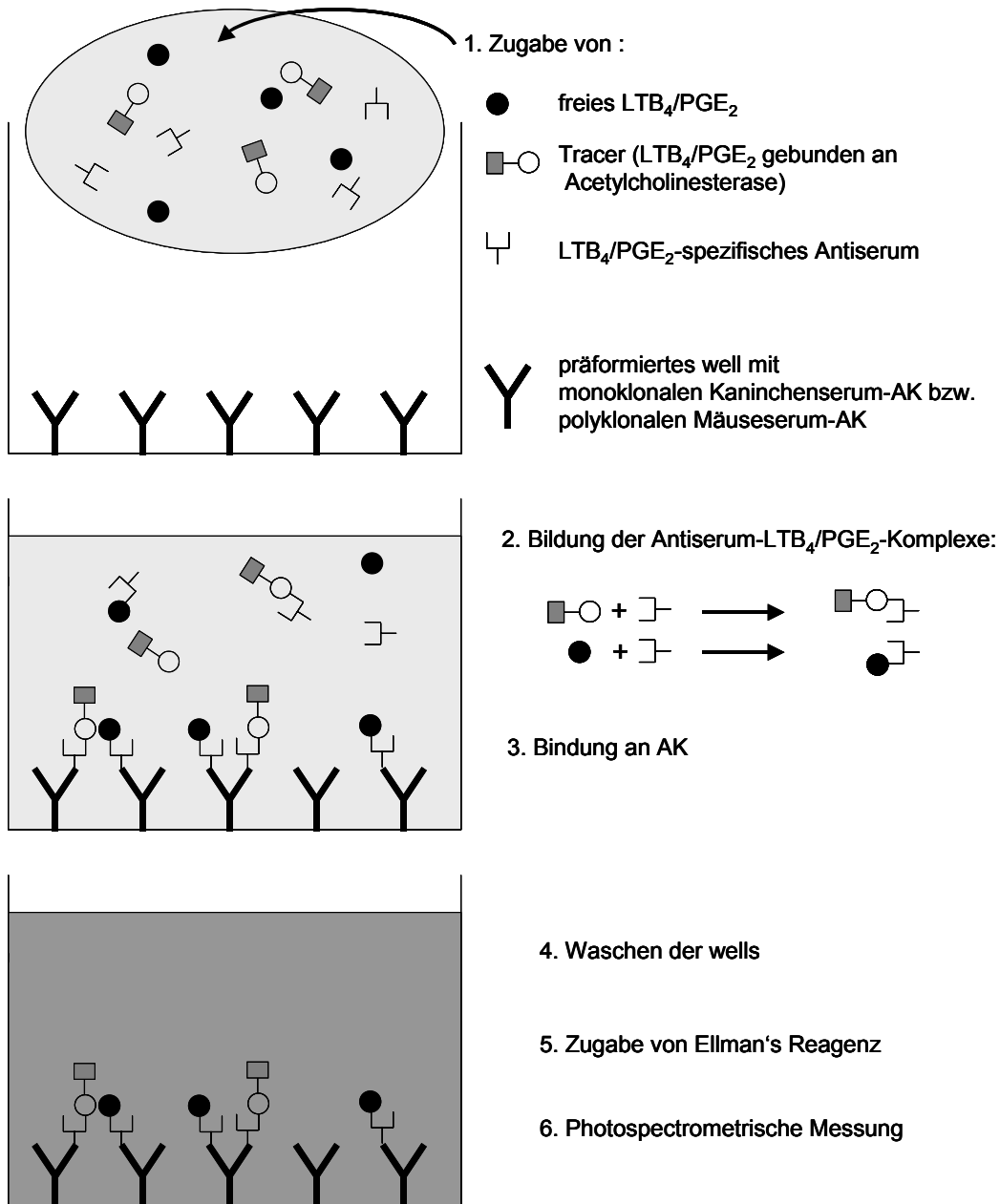


Abbildung 12 : Prinzip des Immunoassays zur Messung der LTB₄/PGE₂-Konzentration

2.9 Beurteilung der Zytotoxizität des Stammes

2.9.1 Sichtbare Vakuolisierung

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 24 h erfolgte eine Betrachtung der TSMC im Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung. Wenn eine deutliche Vakuolisierung von mehr als 80 % der TSMC sichtbar war, wurde dies als Beweis für die Zytotoxizität dieses Stammes gewertet. Abbildung 13 zeigt beispielhaft das mikroskopische Bild der TSMC nach Inkubation mit einem vakuolisierenden Stamm.

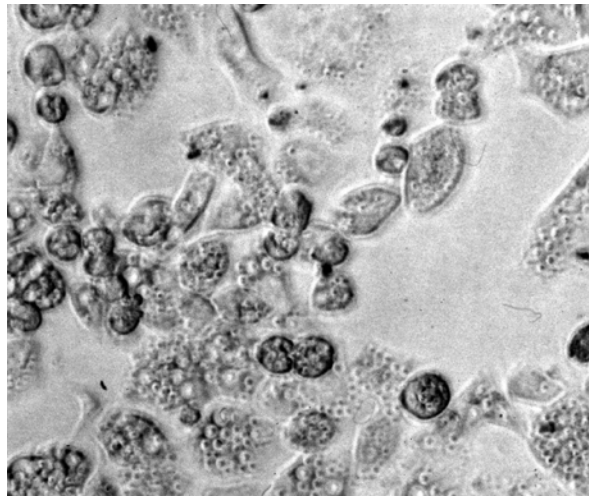


Abbildung 13 : Mikroskopisches Bild der TSMC nach Inkubation mit zytotoxischen Stamm

2.9.2 Expression von *CagA*

Die Expression von *CagA* wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung der bakteriellen Proteine und anschließendem Immunoblot-Verfahren überprüft. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist aus dem Anhang 10.5 zu ersehen. Neben den einzelnen Proben lief bei der Durchführung der Elektrophorese ein Molekulargewichtsmarker (Firma Novex) mit. Nach Aufnahme eines kleinen Teils der Bakterienkolonie in 0,9% NaCl-Lösung wurde diese mittels Ultraschallbeherdung auf Eis lysiert (20 Stöße bei einem output – level von 40 %). Anschließend wurde dieser Probe ein Puffer im Verhältnis Probe : Puffer = 1 : 2 zugesetzt. Die Probe wurde über 5 – 10 min bei 100 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Dann wurde über 3-5 min bei 13000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein 4 – 20 % Polyacrylamid-Gradientengel elektrophoretisch bei 120 Volt, 40 mA/Gel sowie 10 Watt aufgetrennt. Nachdem die Brom-Phenolblau-Bande das untere Gelende erreicht hatte

(nach ca. 2 h), wurde das Gel entnommen und ein Immunoblot nach der Methode von Khyse-Anderson durchgeführt.

Mit dieser Methode wurden die Proteine in einem Semidry-Blotting-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Folie mit einer Porengröße von 45 µm geblottet. Die Stromstärke betrug dabei 0,8 mA pro cm² Gel. Als Transferpuffer wurde ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet (siehe Anhang 10.5). Den schematischen Aufbau des Blots zeigt Abbildung 14. Nach ca. 30 min wurde die Folie entnommen und in 10% Magermilchpulver-PBS-Lösung für 1 h inkubiert.

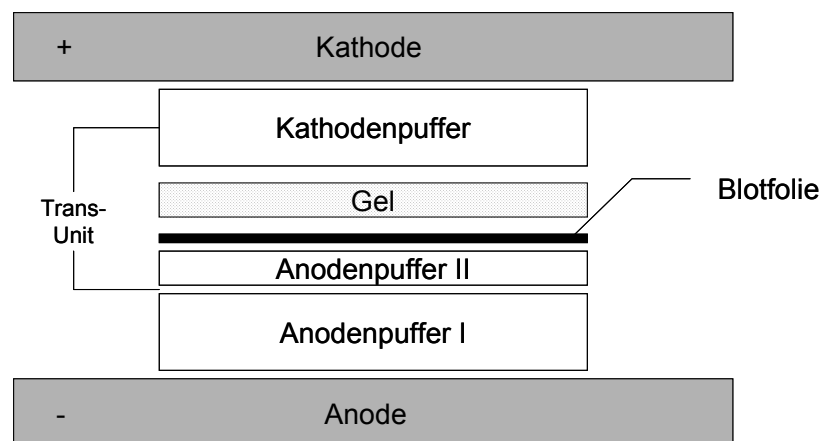


Abbildung 14 : Schema des Blot-Aufbaus

Anschließend wurde die Membran mit einer Lösung aus 3 ml 10% Magermilchpulver-PBS-Lösung und 20 µl Serum eines *H.p.*-positiven, anti-CagA-positiven sowie anti-VacA-positiven Patienten für 1 h unter Schütteln inkubiert. Dies führte u.a. zur Bindung zwischen den CagA-Proteinen auf der Blot-Folie und dem humanen anti-CagA-Antikörper des Patientenserums. Nichtgebundene Valenzen wurden dann durch dreimaliges Waschen der Folie über jeweils 10 min in 0,05% PBS-Tween 20 entfernt. Anschließend wurde die Folie mit einem Kaninchen-anti-human-IgG-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 für 1 h inkubiert und wiederum dreimal wie oben beschrieben gewaschen. Dann wurde die Folie über 30 min mit einem Anti-Kaninchen-Antikörper in einer Konzentration von 10 µl Antikörper pro ml 10% Magermilchpulver-PBS-Lösung versetzt. Daran schloss sich nach dreimaligen Waschen eine 30-minütige Inkubation der Folie mit PAP-Kaninchen (Peroxidase-Anti-Peroxidase-Kaninchen) in einer Konzentration von 3 µl pro ml Milch-PBS-Lösung an. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Folie erfolgte die Substratinkubation mit einer Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Wasserstoffperoxid-Lösung. Durch die über die Peroxidase vermittelte Spaltung des Wasserstoffperoxids erfolgte eine Umwandlung des Diaminobenzidintetrahydrochlorids in einen sichtbaren Farbstoff, der somit über die verschiedenen Antikörper-Antikörper-Bindungen das

Vorhandensein u.a. des CagA-Proteins nachwies. Nach Entwicklung der Farbreaktion (Dauer maximal 10 min und optische Kontrolle) wurde die Reaktion mit Leitungswasser gestoppt und die Folie getrocknet.

Ein Vergleich der angefärbten Banden mit dem mitgelaufenen Molekulargewichtsmarker zeigte das ungefähre Molekulargewicht der angefärbten Proteine. Bei Kenntnis des Molekulargewichts von CagA (ca. 128 kDa) lässt sich bei Vorhandensein eines Bandes an dieser Stelle auf die Expression von *CagA* rückschließen. Eine entwickelte Elektrophorese-Folie zeigt Abbildung 15.

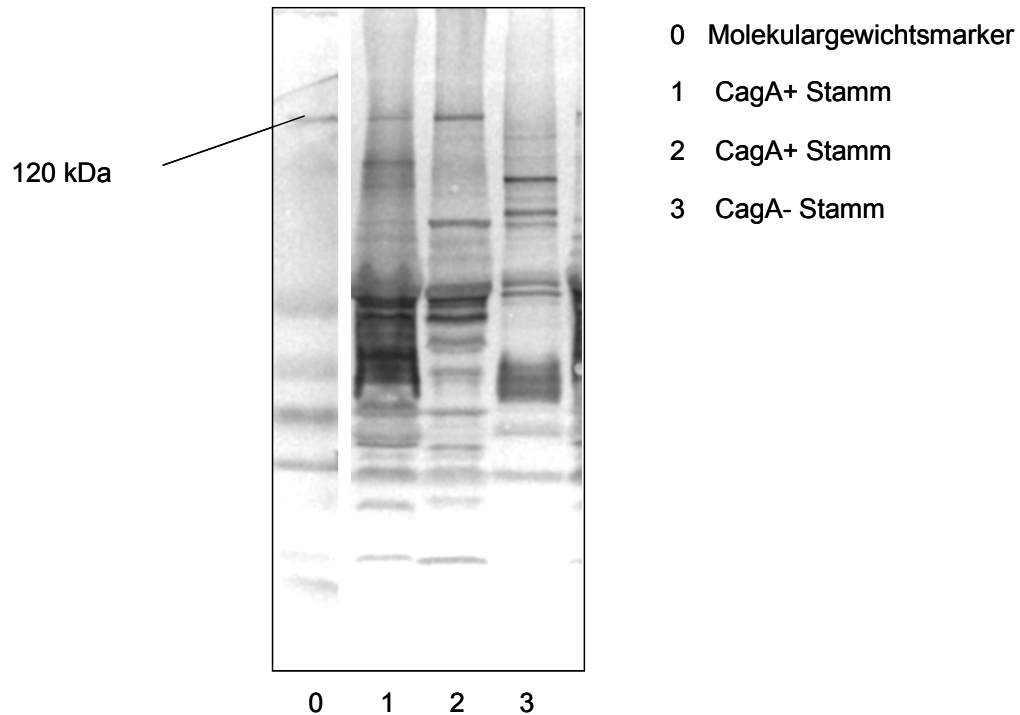


Abbildung 15 : Elektrophorese-Folie mit Darstellung des Molekulargewichtsmarkers sowie drei exemplarischen *H.p.*-Stämmen

2.10 Statistik

2.10.1 Deskriptive Statistik

Mittelwert, Standardabweichung, Varianz und mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM) wurden nach den allgemein bekannten Gleichungen der deskriptiven Statistik bestimmt.

Der **Korrelationskoeffizient r** zweier Messwertreihen ermöglicht eine Abschätzung der Stärke eines eventuellen Zusammenhangs zwischen diesen Messwertreihen. Er liegt im Bereich zwischen -1 und +1. Negative Werte kennzeichnen eine negative Korrelation und positive Werte eine positive. Der absolute Betrag des Korrelationskoeffizienten gibt die Stärke des Zusammenhangs an (kein Zusammenhang $r=0$; starker Zusammenhang $r=1$). Bei Verwendung von metrischen Messwerten wird der Korrelationskoeffizient nach **Pearson und Bravais** mittels Gleichung 4 berechnet.

Gleichung 4

$$r_P = \frac{S_{xy}}{S_x * S_y}$$

r_P	Korrelationskoeffizient nach Pearson und Bravais
S_{xy}	Kovarianz von x und y
S_x	Standardabweichung von x
S_y	Standardabweichung von y

Für ordinale Daten ergibt sich der Rangkorrelationskoeffizient nach **Spearman** entsprechend Gleichung 5.

Gleichung 5

$$r_s = 1 - \frac{6}{n(n^2 - 1)} \sum_{i=1}^n (R_{ix} - R_{iy})^2$$

r_s	Korrelationskoeffizient nach Spearman
N	Stichprobenumfang
R_{ix}	Rangzahlen von x
R_{iy}	Rangzahlen von y

2.10.2 Statistische Testverfahren

Grundsätzlich wird bei statistischen Tests von einer Verteilungshypothese H ausgegangen. Anschließend wird geprüft, ob die gemessenen Werte eine Bestätigung dieser Hypothese darstellen oder ob sie unter H höchstens als extreme Besonderheit verständlich sind. Die Hypothese wird entsprechend angenommen oder abgelehnt. Bei einer Ablehnung der Hypothese H wird sich dann für die alternative (entgegengesetzte) Hypothese A entschieden. Die Teststatistik muss so gewählt werden, dass eine gute Unterscheidung zwischen der Hypothese H und der Alternative A möglich wird. Mit α (Fehler 1. Art) wird das sog. Signifikanzniveau, d.h. die Wahrscheinlichkeit einer Annahme von A , obwohl H richtig ist, bezeichnet.

Zur Ablehnung von H und der Annahme von A , d. h. einer bestehenden Signifikanz, muss der errechnete Testwert größer gleich einem kritischen Wert des verwendeten Testes sein. Dieser kritische Testwert ist abhängig vom Signifikanzniveau und dem Stichprobenumfang

Die Berechnung der Tests wurde, wenn nicht anders vermerkt, mittels des Statistikprogramms InStat (InStat 1994) durchgeführt. Dieses Programm berechnet für jeden Test eine sog. Überschreitungswahrscheinlichkeit P . Es gilt bei einem $\alpha = 0,05$:

$P \leq 0,05$ Ablehnung von H und somit Annahme von A

$P > 0,05$ Annahme von H

1. Korrelationstests

Korrelationstests dienen der Überprüfung des ermittelten Korrelationskoeffizienten. Als Hypothese H wurde angenommen, dass die Korrelation $\rho = 0$ ist. Die Alternative A beschreibt die Korrelation mit $\rho \neq 0$.

2. Tests für zwei voneinander abhängige Stichproben

Diese Tests wurden zum Vergleich der Differenzen verbundener Messungen gegen Null verwendet. Beispiele für solche verbundenen Messreihen sind die Kontaktwinkelmessungen vor und nach Inkubation mit *H.p.* bzw. die PGE₂/LTB₄-Sekretion vor und nach *H.p.*-Inkubation.

a) t-Test

Hypothese H: Der Mittelwert der Differenzen beider Messreihen ist Null

Alternative A: Der Mittelwert der Differenzen beider Messreihen ist ungleich Null

Testgröße t
$$t = \sqrt{n} \frac{\bar{x}}{s}$$

b) Nichtmetrischer Wilcoxon-Test

Hypothese H Der Mittelwert der Differenzen beider Messreihen ist Null

Alternative A Der Mittelwert der Differenzen beider Messreihen ist ungleich Null

Testgröße ω Summe der Rangzahlen der positiven Werte x_i in der Folge der geordneten Beträge $|x_i|$

3. Tests für zwei voneinander unabhängige Stichproben

Zum Vergleich der Mittelwerte zweier voneinander unabhängiger Messwertreihen (z.B. Abnahme des Kontaktwinkels bei Ulcus- oder Gastritis-Stämmen) wurden nachfolgend genannte Testverfahren genutzt.

a) Standard t-Test

Voraussetzung dieses Tests ist eine annähernde Normalverteilung der Population, aus der die Messwerte stammen sowie eine annähernd gleiche Streuung der beiden Messwertreihen.

Hypothese H Die Mittelwerte beider Messreihen sind identisch

Alternative A Die Mittelwerte beider Messreihen sind unterschiedlich

b) Robuster t-Test (Welch-Test)

Dieser Test ist bei beliebigen stetigen Verteilungen anwendbar, auch wenn die Varianzen nicht übereinstimmen.

Hypothese H Die Mittelwerte beider Messreihen sind identisch

Alternative A Die Mittelwerte beider Messreihen sind unterschiedlich

c) Nichtmetrischer Mann-Whitney-Test (U-Test)

Dieser Test wird bei der Nutzung von Rangzahlen aus Messreihen angewandt.

Hypothese H Die Mediane beider Messreihen sind identisch

Alternative A Die Mediane beider Messreihen sind unterschiedlich

4. Tests für Stichproben mit dichotomen Variablen(Vierfeldertafel)

Zum Test der Abhängigkeit dichotomer Variablen (kategoriale Merkmale) voneinander wurden deren Häufigkeiten in einer Vierfeldertafel aufbereitet. Auf Grund des teilweise geringen Stichprobenumfangs ($n < 5$) wurde der Fisher's Exact Test benutzt.

Hypothese H Die Merkmale sind voneinander unabhängig

Alternative A Die Merkmale sind voneinander abhängig

3 Ergebnisse

3.1 Hydrophobizität

Die Hydrophobizität der TSMC vor und nach Inkubation mit *H.p.* wurde mittels der bereits beschriebenen goniometrischen Messungen bestimmt (siehe Abschnitt 2.6.2). Der Kontaktwinkel ließ sich unter Beachtung der von Preiß aufgestellten Kriterien (Messung stets durch denselben Untersucher, konstante Trocknungszeit der TSMC, beidseitige Messung des Tropfens) gut bestimmen. Der arithmetische Mittelwert der gemessenen Kontaktwinkel aller Kontrollen lag bei 42,5 °.

Da für die weitere Beurteilung der Ergebnisse nicht die absolute Größe des gemessenen Kontaktwinkels, sondern seine Abnahme nach Inkubation mit *H.p.* von Bedeutung war, wurden die gemessenen Absolutwerte in Relation zu den zugehörigen Kontrollwerten (Kontrolle = 100%) gesetzt. Die Berechnung der relativen Kontaktwinkelabnahme wurde nach Gleichung 6 vorgenommen. Anschließend erfolgte durch Bildung des Mittelwertes über alle Stämme die Bestimmung der mittleren relativen Kontaktwinkelabnahme.

Gleichung 6

$$KWA_{rel} = 1 - \frac{KW_K - KW_M}{KW_K}$$

KWA_{rel}	Relative Kontaktwinkelabnahme
KW_K	Kontaktwinkel der Kontrollmessung
KW_M	Kontaktwinkel nach <i>H.p.</i> -Inkubation

Eine **Inkubation mit *H.p.*** führte bei allen verwendeten Stämmen ($n = 25$) zu einer signifikanten Abnahme des gemessenen Kontaktwinkels ($t = 10$, $t_{\alpha=0,95(24)} = 1,72$ im t-Test). Diese betrug im arithmetischen Mittel über alle Stämme nach 12 h 8,4 ° und nach 24 h 11,4 °.

Abbildung 16 zeigt diese mittlere relative Kontaktwinkelabnahme.

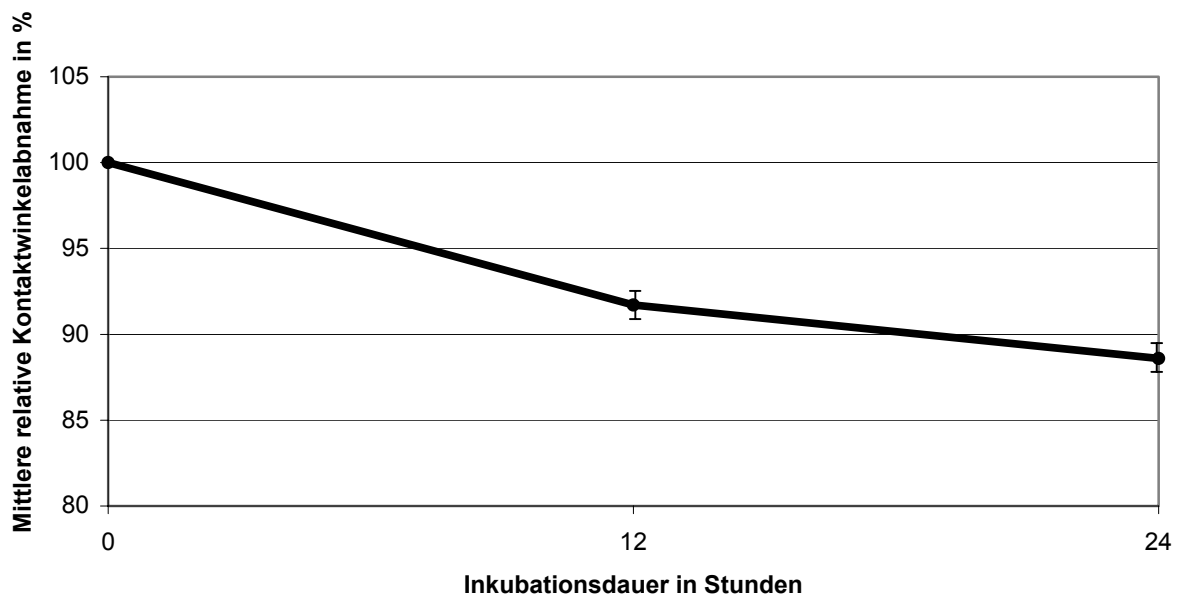


Abbildung 16 : Mittlere relative Kontaktwinkelabnahme und SEM über alle Stämme nach Inkubation mit *H.p.*-Stämmen

Es lässt sich erkennen, dass die Hydrophobizität vor allem in den ersten 12 h der Inkubation abnahm, in den folgenden 12 h kam es nur noch zu einer leichten Veränderung des Kontaktwinkels im Sinne einer weiteren Abnahme.

Zwischen der relativen **LTB₄-Sekretion** der TSMC und der relativen Kontaktwinkelabnahme nach 24 h Inkubation mit *H.p.* ließ sich lediglich ein tendenzieller Zusammenhang finden, der jedoch nicht signifikant war ($P = 0,34$; $n = 12$). Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman betrug 0,3. Abbildung 17 veranschaulicht diesen Zusammenhang.

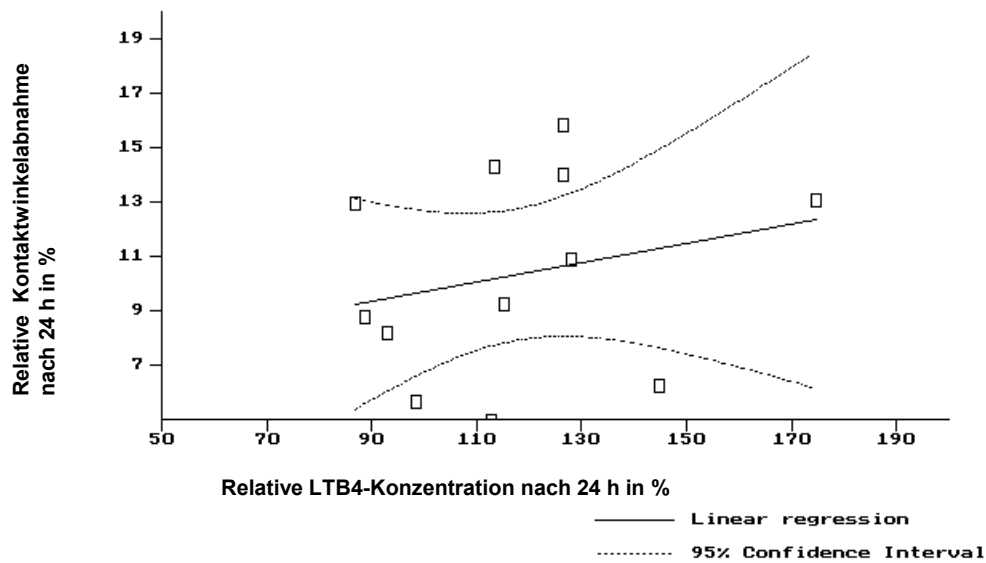


Abbildung 17 : Zusammenhang zwischen relativer LTB₄ Sekretion und relativer Kontaktwinkelabnahme

Die relative **PGE₂-Sekretion** der TSMC, gemessen nach 24 h Inkubation mit *H.p.*, zeigte ebenfalls keinen Zusammenhang zur relativen Kontaktwinkelabnahme (Korrelationskoeffizient nach Pearson $r = 0,04$ und $P = 0,87$; $n = 13$).

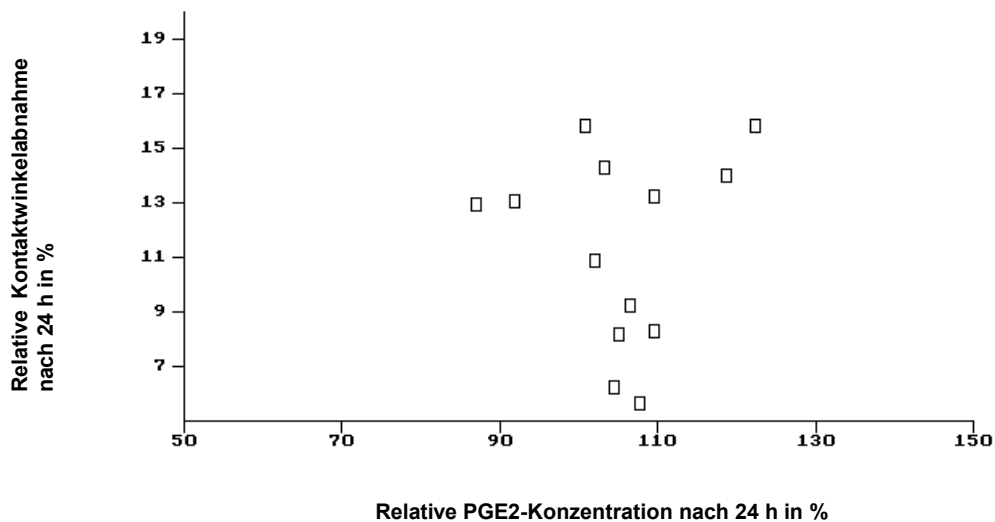


Abbildung 18 : Beziehungen zwischen relativer PGE₂-Sekretion und relativer Kontaktwinkelabnahme

In Bezug auf die untersuchten bakteriellen Charakteristika der einzelnen Stämme ließ sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der **Adhäsionsrate** des Stammes und der relativen Kontaktwinkelabnahme innerhalb 24 h feststellen ($P = 0,03$; $n = 25$). Je höher die Adhäsionsrate des Stammes, desto größer war auch die Abnahme des gemessenen Kontaktwinkels. Der hierbei

bestimmte Korrelationskoeffizient nach Pearson betrug 0,45. Abbildung 19 veranschaulicht diesen Zusammenhang.

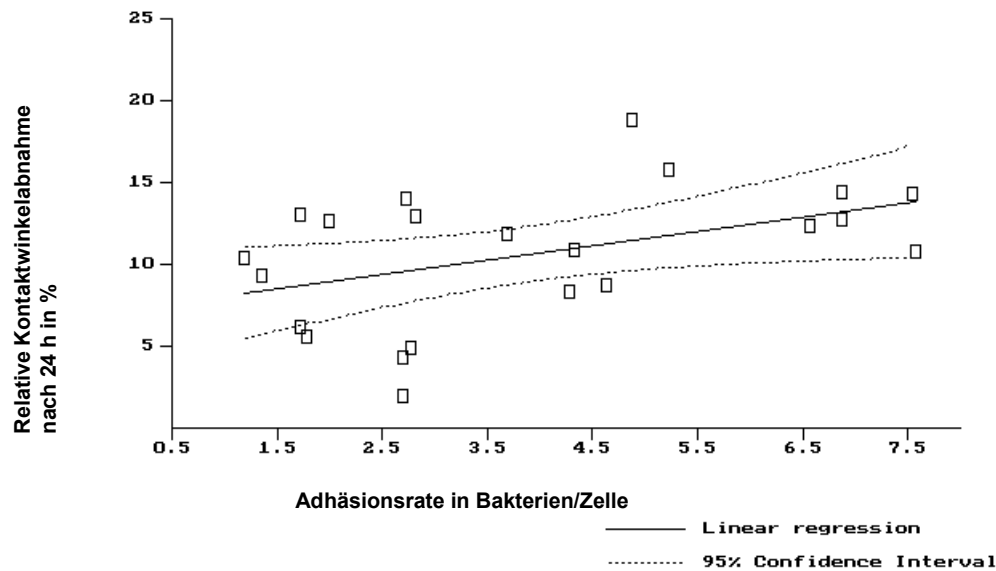


Abbildung 19 : Zusammenhang zwischen Adhäsionsrate und relativer Kontaktwinkelabnahme

Zwischen Kontaktwinkelabnahme und **Zytotoxizität** des Stammes ließ sich kein Zusammenhang finden. Die vakuolisierenden Stämme führten zu einer geringfügig stärkeren Abnahme des Kontaktwinkels als die nichtvakuolisierenden Stämmen, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ($P = 0,28$ in Standard t-Test; $n = 22$). Die mittlere relative Kontaktwinkelabnahme betrug $11,6^\circ$ bei vakuolisierenden Stämmen ($n = 15$) und $9,7^\circ$ bei nichtvakuolisierenden Stämmen ($n = 7$).

Die mittlere relative Kontaktwinkelabnahme betrug bei *CagA*-positiven Stämmen $11,7^\circ$ ($n = 15$) und bei *CagA*-negativen Stämmen $9,7^\circ$ ($n = 3$). Diese Mittelwerte sind ebenfalls nicht signifikant verschieden ($P = 0,47$ im Standard t-Test; $n = 18$). Abbildung 20 veranschaulicht beispielhaft die nur geringen Unterschiede in der Kontaktwinkelabnahme zwischen vakuolisierenden und nichtvakuolisierenden Stämmen.

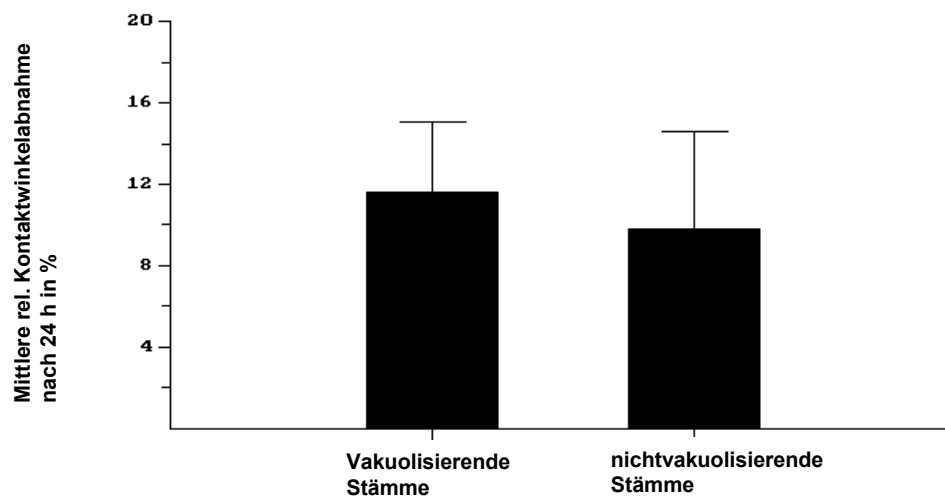


Abbildung 20 : Mittlere relative Kontaktwinkelabnahme und deren Standardabweichung von vakuolisierenden und nichtvakuolisierenden Stämmen

Die **Diagnose** des Patienten hinsichtlich des Auftretens einer Gastritis bzw. eines Ulcus zeigte keine signifikante Beziehung zur mittleren relativen Abnahme des Kontaktwinkels. Die nur geringen Unterschiede in der Abnahme des Kontaktwinkels zwischen den Gastritis- bzw. Ulcusverursachenden Stämmen (10,75 ° bei Gastritisstämmen; $n = 16$ vs. 12,04 ° bei Ulcusstämmen; $n = 9$) waren im Mann-Whitney-Test nicht signifikant ($P = 0,51$; $n = 25$). Abbildung 21 veranschaulicht dieses Ergebnis.

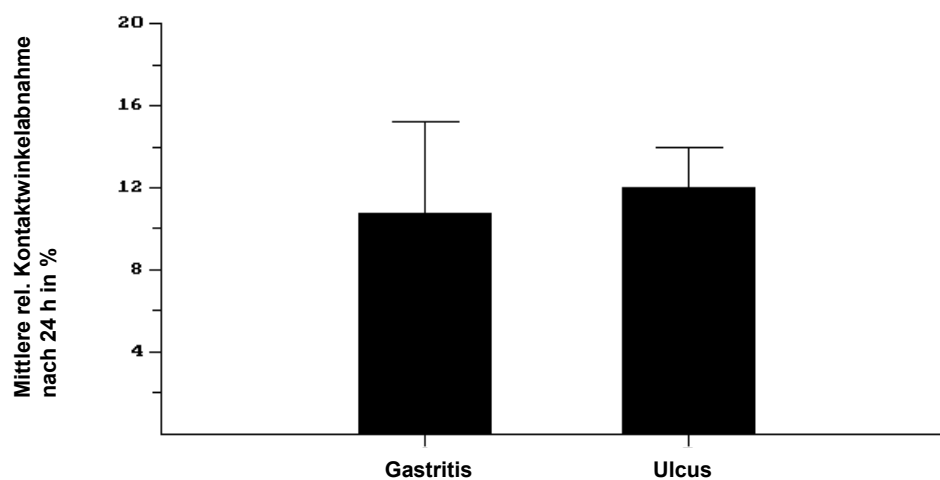


Abbildung 21 : Mittlere relative Kontaktwinkelabnahme und deren Standardabweichung bei Gastritis- und Ulcusstämmen

Zwischen der **histologischen *H.p.*-Dichte** der Bakterien auf den Biopsien und der relativen Kontaktwinkelabnahme zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang ($P = 0,04$; $n = 15$): Eine große histologische *H.p.*-Dichte war mit einer hohen Kontaktwinkelabnahme innerhalb von 24 h verbunden. Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman betrug 0,5. Abbildung 22 verdeutlicht diesen Zusammenhang.

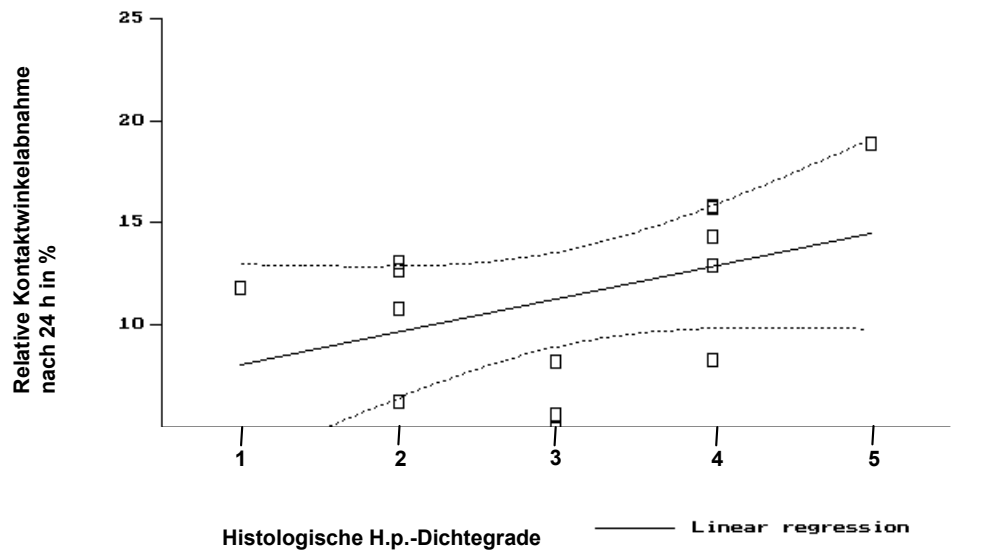


Abbildung 22 : Zusammenhang zwischen histologischer *H.p.*-Dichte und relativer Kontaktwinkelabnahme

3.2 LTB₄ - und PGE₂-Sekretion der TSMC

Initial wurden, um einen generellen Einfluß von *H.p.* auf das Sekretionsverhalten der TSMC sichtbar zu machen, die ermittelten relativen LTB₄-/PGE₂-Konzentrationsänderungen pro Stamm (siehe Abschnitt 2.8) über Bildung des arithmetischen Mittelwertes über alle Stämme gemittelt. Die so gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass die verschiedenen *Helicobacter pylori*-Stämme einen Einfluss sowohl auf die LTB₄- als auch auf die PGE₂-Sekretion haben.

Innerhalb der ersten 12 h nach Inkubation mit *H.p.* kam es zu einem mittleren Anstieg der PGE₂-Sekretion auf 110 % in Bezug auf die Kontrollwerte. Dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant ($\omega = 34$ im Wilcoxon-Test, $\omega_{0,05,9} = 37$; $n = 9$). Nach weiteren 12 h Inkubationszeit war dann eine signifikante Erhöhung der Sekretionsleistung der Zelle auf 105 % der Kontrollwerte zu verzeichnen ($\omega = 72$ im Wilcoxon-Test, $\omega_{0,05,13} = 70$; $n = 13$).

Der Einfluss von *H.p.* auf die LTB₄-Sekretion zeigte sich innerhalb der ersten 12 h in einer leichten mittleren Abnahme der Sekretionsleistung auf 96 % der Kontrollwerte. Diese Abnahme war jedoch nicht signifikant ($\omega = 53$ im Wilcoxon-Test, $\omega_{0,05,14} = 80$; $n = 14$). In den folgenden 12 h kam es dann zu einem signifikanten Anstieg der LTB₄-Sekretion auf 117 % der Kontrollwerte ($\omega = 67$ im Wilcoxon-Test, $\omega_{0,05,12} = 61$; $n = 12$). Abbildung 23 zeigt das mittlere Sekretionsverhalten der TSCM in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

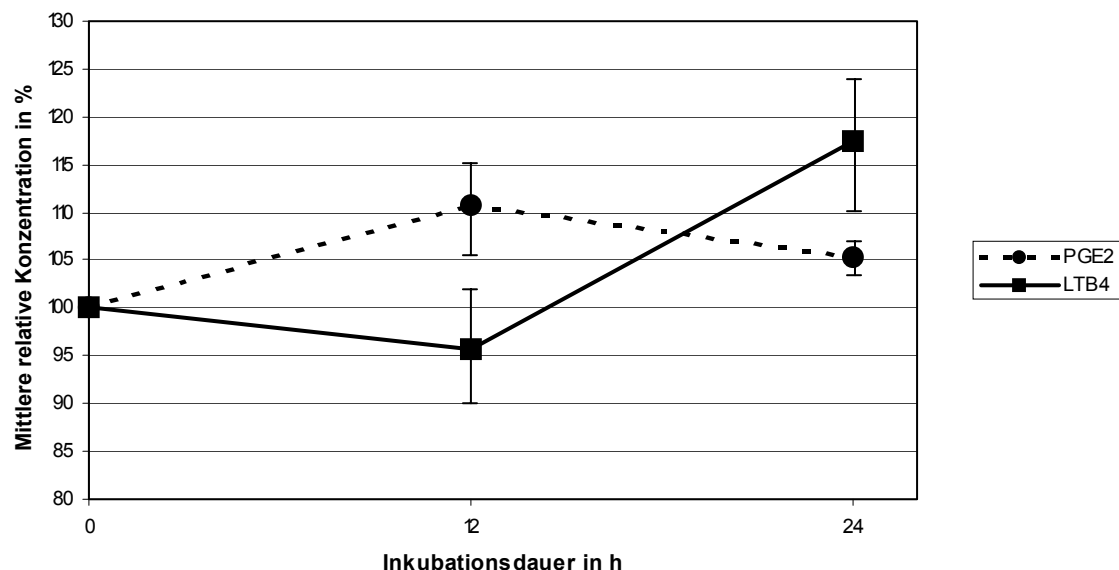


Abbildung 23 : Mittlere relative PGE₂- und LTB₄-Sekretion sowie SEM nach *H.p.*-Inkubation über alle Stämme

Es war zu beobachten, dass die Sekretion von PGE₂ vor allem in den ersten 12 h stimuliert wurde, während dies beim LTB₄ erst nach 24 h der Fall war.

Exemplarisch ist die relative Sekretionsleistung der TSMC nach Inkubation mit zwei *H.p.*-Stämmen in Abbildung 24 und Abbildung 25 dargestellt.

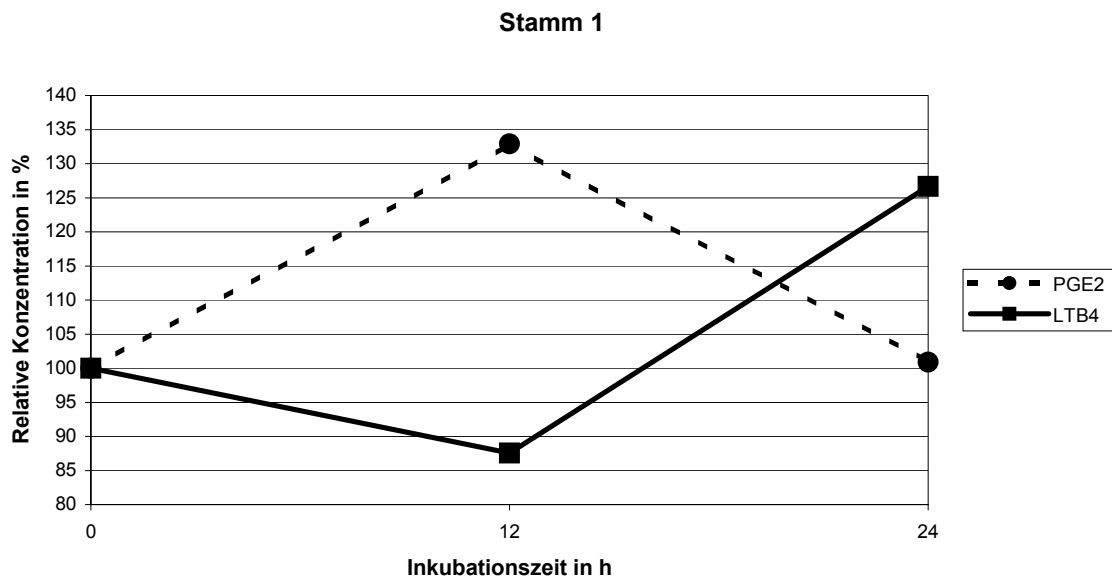


Abbildung 24 : Relative PGE₂- und LTB₄-Sekretion bei Inkubation mit exemplarischem Stamm 1

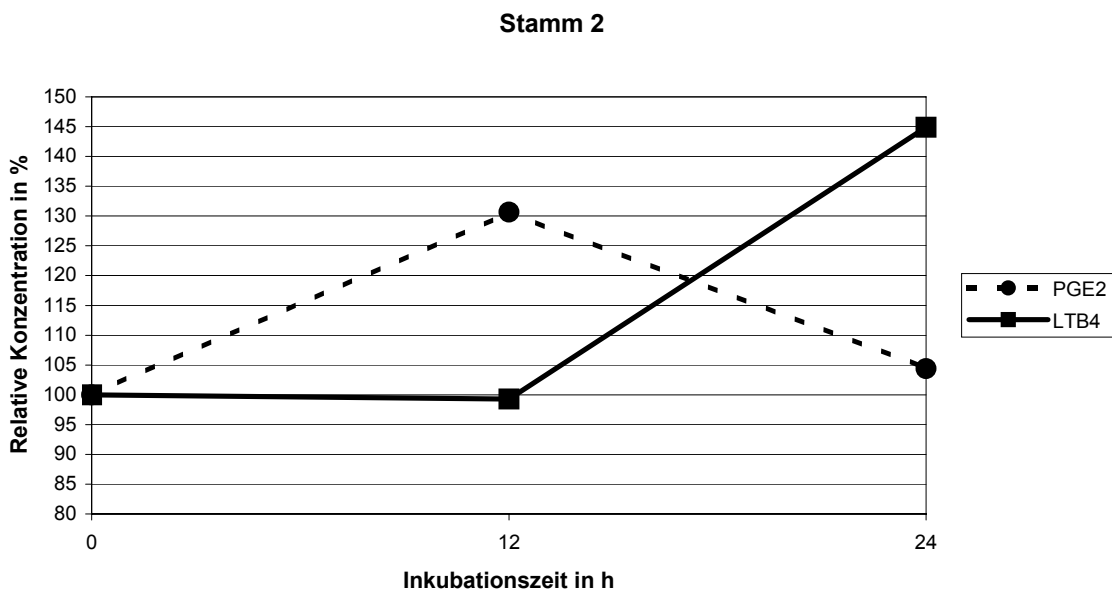


Abbildung 25 : Relative PGE₂- und LTB₄-Sekretion bei Inkubation mit exemplarischem Stamm 2

Der Zusammenhang zwischen relativer PGE₂- bzw. LTB₄-Sekretion und mittlerer relativer **Abnahme des Kontaktwinkels** wurde bereits in Abschnitt 3.1 beschrieben. Zum Einfluss der **Adhäsionsrate** auf die relative PGE₂- und LTB₄-Sekretion siehe Abschnitt 3.3 .

Zwischen der **Zytotoxizität** des Stammes und der relativen LTB₄-Sekretion der Zelle nach 24 h Inkubation mit *H.p.* bestand ebenfalls kein Zusammenhang. Die mittlere relative **LTB₄**-Sekretion bei **vakuolisierenden** Stämmen (n = 8) betrug 117,4 % gegenüber 113,8 % bei nichtvakuolisierenden Stämmen (n = 6) (P = 0,7 im Mann-Whitney-Test). Gleichsam wurde kein Zusammenhang zum Vorhandensein des **CagA**-Gens festgestellt (mittlere LTB₄-Sekretion von 125,6 % bei *CagA*-positiven (n = 7) gegenüber 107,7 % bei *CagA*-negativen Stämmen (n = 5), P = 0,2 im Mann-Whitney-Test).

Im Gegensatz dazu erwiesen sich die *CagA*-positiven bzw. vakuolisierenden Stämme als eher stimulierend auf die **PGE₂**-Sekretion als die **CagA**-negativen bzw. nichtvakuolisierenden Stämme, die PGE₂-Sekretion eher inhibierten. Die mittlere relative PGE₂-Sekretion betrug bei den *CagA*-positiven Stämmen 104,4 % (n = 11) gegenüber 87,6 % bei den *CagA*-negativen Stämmen (n = 2; P = 0,026 im Mann-Whitney-Test). Bei den **vakuolisierenden** Stämmen war eine mittlere relative PGE₂-Sekretion von 107,5 % (n = 8) gegenüber 89,3 % bei nichtvakuolisierenden Stämmen zu verzeichnen (P = 0,044 im Mann-Whitney-Test). Aufgrund der niedrigen Fallzahlen der *CagA*-negativen bzw. nichtvakuolisierenden Stämme (jeweils n = 2) sind die Ergebnisse statistisch jedoch nicht zu werten

Ein Zusammenhang zwischen der relativen PGE₂-Sekretion und der **Diagnose des Patienten** konnte nicht festgestellt werden. Die mittlere relative PGE₂-Sekretion betrug bei den Ulcus-Stämmen 108,8 % (n = 4) vs. 103,7 % bei den Gastritis-Stämmen (n = 9; P = 0,5 im Mann-Whitney-Test). Gleiches gilt für die relative LTB₄-Sekretion (mittlere relative LTB₄-Sekretion von 115,8 % bei Ulcus-Stämmen (n = 3) vs. 115,13 % bei Gastritis-Stämmen (n = 9; P = 0,86 im Mann-Whitney-Test).

Zwischen der histologischen **H.p.-Dichte** und der relativen PGE₂-Sekretion nach 24 h zeigte sich kein Zusammenhang (linearer Korrelationskoeffizient $r = 0,04$; P = 0,9; n = 10). Mit steigender *H.p.*-Dichte verringerte sich jedoch die relative LTB₄-Sekretion der Zelle (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman $r = -0,47$; n = 9). Dieser tendenzielle Zusammenhang war jedoch nicht signifikant (P = 0,19) und ist in Abbildung 26 dargestellt.

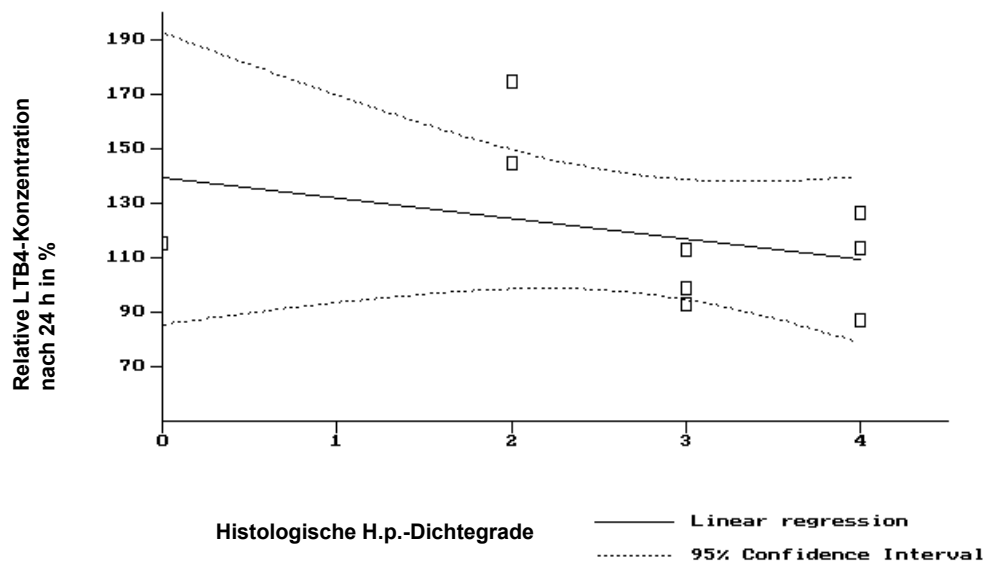


Abbildung 26 : Zusammenhang zwischen relativer LTB₄-Sekretion und histologischer H.p.-Dichte

3.3 Adhäsionsrate

Die Adhäsionsrate (Bakterien/Zelle) des jeweiligen *H.p.*-Stammes ergab sich durch Berechnung des arithmetischen Mittelwertes der pro Stamm an 200 TSMC im Fluoreszenzmikroskop ausgezählten adhärennten Bakterien. Die verschiedenen Stämme wiesen dabei mittlere Adhäsionsraten zwischen 1,18 und 12,79 Bakterien/Zelle auf.

Der positiv korrelierende, signifikante Zusammenhang zwischen Adhäsionsrate und relativer **Abnahme des Kontaktwinkels** wurde bereits in Abschnitt 3.1 beschrieben.

Zwischen der Adhäsionsrate des Stammes und der relativen **LTB₄-Sekretion** der TSMC ließ sich ein tendenzieller Zusammenhang nach 24 h Inkubation mit *H.p.* zeigen, der jedoch nicht signifikant war ($P = 0,17$; $n = 10$). Mit steigender Adhäsionsrate verringerte sich die LTB₄-Sekretion (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman = -0,4). Abbildung 27 veranschaulicht diesen Zusammenhang.

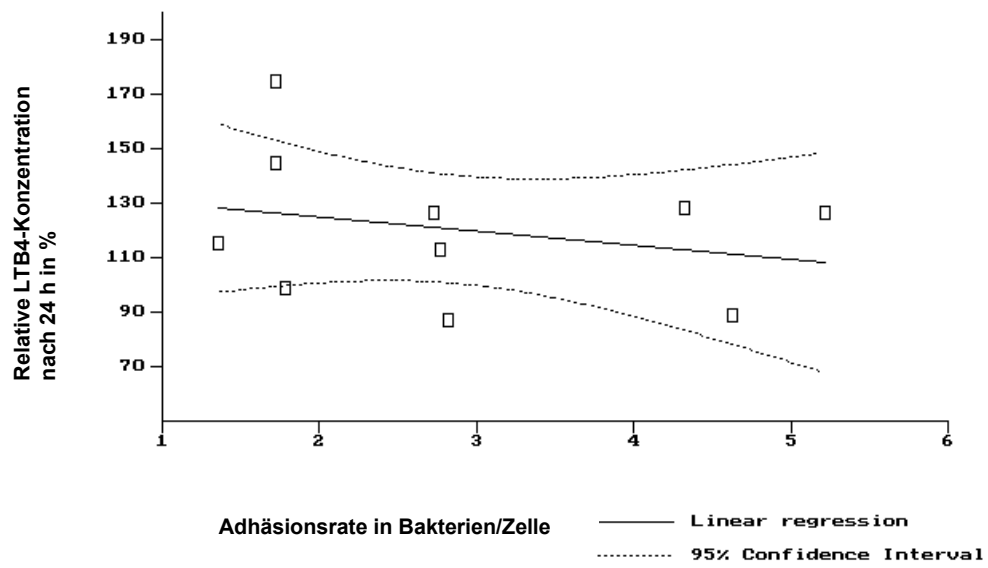


Abbildung 27 : Zusammenhang zwischen Adhäsionsrate und LTB4-Sekretion nach 24 h

Ein Zusammenhang zwischen der Adhäsionsrate und der relativen **PGE₂-Sekretion** konnte nicht nachgewiesen werden (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman = -0,11 und P = 0,7; n = 11). Abbildung 28 verdeutlicht dieses Ergebnis.

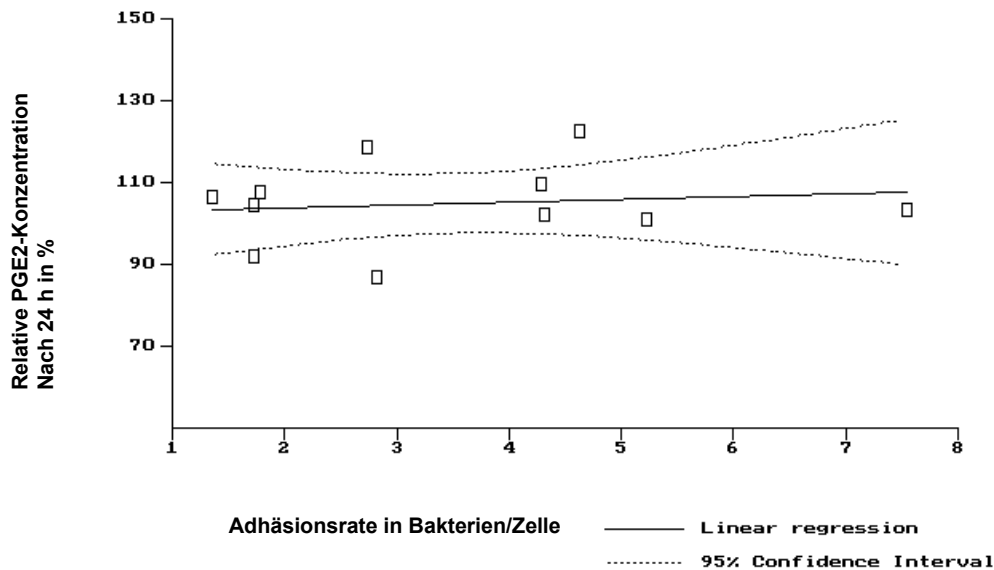


Abbildung 28 : Zusammenhang zwischen Adhäsionsrate und relativer PGE₂-Sekretion

Die Adhäsionsrate des Stammes zeigte ebenfalls keine Beziehung zur **Zytotoxizität** bzw. dem Vorhandensein von **CagA**. Die vakuolisierenden Stämme (n = 13) wiesen eine mittlere Adhäsionsrate von 4,4 Bakterien/Zelle gegenüber 4,6 Bakterien/Zelle bei nichtvakuolisierenden Stämme (n = 5) auf. Bei den *CagA*-positiven Stämmen (n = 15) betrug die mittlere Adhäsionsrate 4,2 gegenüber 4,4 Bakterien/Zelle bei *CagA*-negativen Stämmen (n = 3). In den entsprechenden Standard t-Tests waren die geringen Unterschiede der Adhäsionsraten in Bezug auf o.g. Kriterien nicht signifikant (P = 0,9 für die Parameter sichtbare Zytotoxizität bzw. *CagA*). Beispielhaft sind die mittleren Adhäsionsraten von *CagA*-positiven und *CagA*-negativen Stämmen in Abbildung 29 dargestellt.

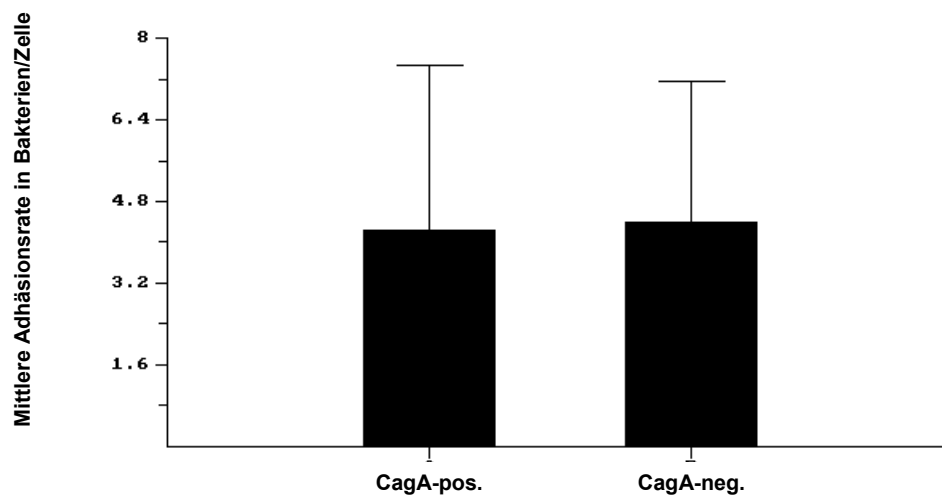


Abbildung 29 : Mittlere Adhäsionsrate und deren Standardabweichung von *CagA*-positiven und *CagA*-negativen Stämmen

Die Adhäsionsrate stand jedoch in einem signifikanten Zusammenhang mit der **Diagnose des Patienten**. Die verwendeten Gastritis-Stämme ($n = 16$) wiesen mit 3,16 Bakterien/Zelle eine signifikant niedrigere mittlere Adhäsionsrate auf als die Ulcus-Stämme ($n = 9$) mit 5,52 Bakterien/Zelle ($P = 0,02$ im Mann-Whitney-Test). Abbildung 30 verdeutlicht diese Unterschiede.

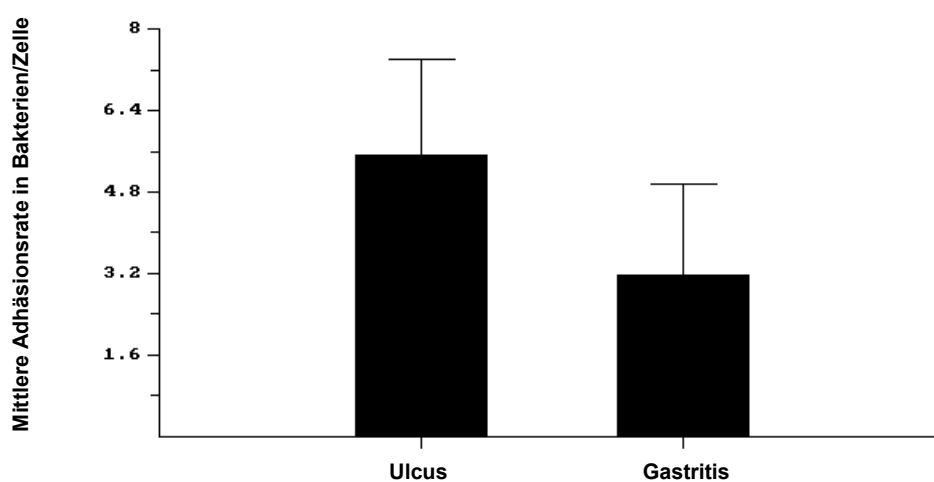


Abbildung 30 : Mittlere Adhäsionsrate und deren Standardabweichung von Ulcus- und Gastritis-Stämmen

Zwischen der *in vitro* bestimmten Adhäsionsrate und der *in vivo* bestimmten histologischen *H.p.*-**Dichte** zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang ($P = 0,04$; $n = 12$): Eine große histologische *H.p.*-Dichte war mit einer hohen Adhäsionsrate des Stammes verbunden. Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman betrug 0,53. Diese Beziehung ist in Abbildung 31 verdeutlicht:

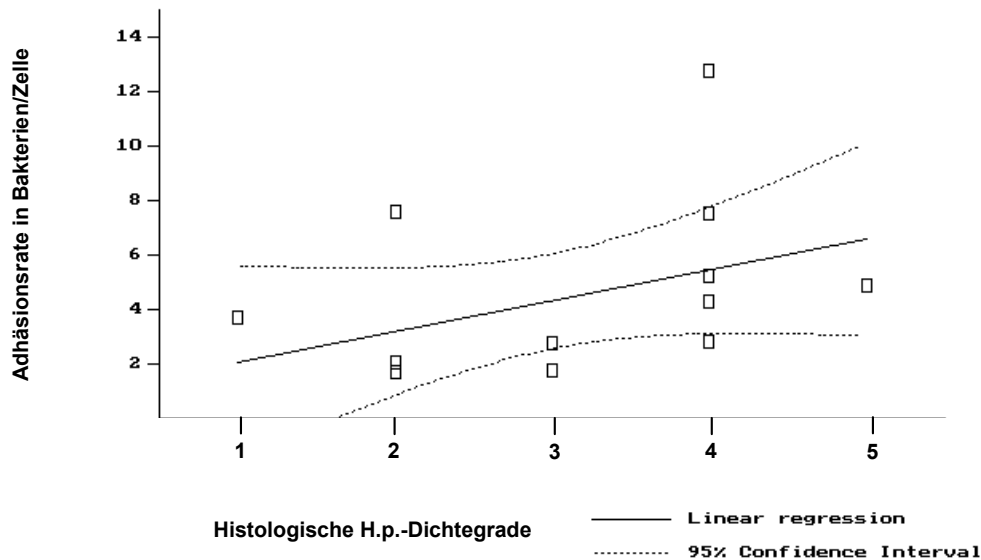


Abbildung 31 : Zusammenhang zwischen Adhäsionsrate und *H.p.*-Dichte

3.4 Zytotoxizität bzw. *CagA*

Als Ausdruck der Zytotoxizität des *H.p.*-Stammes wurde zum einen das Vorhandensein von *CagA*, zum anderen eine durch den *H.p.*-Stamm hervorgerufene, lichtmikroskopisch sichtbare Vakuolisierung der TSMC gewertet. Von den untersuchten Stämmen ($n = 18$) waren 83,3 % *CagA*-positiv (entspricht $n = 15$) und 16,6 % *CagA*-negativ (entspricht $n = 3$). Die verwendeten Stämme ($n = 22$) riefen in 68,2 % der Fälle eine deutlich sichtbare Vakuolisierung der TSMC hervor (entspricht $n = 15$).

Die *CagA*-positiven ($n = 15$) Stämme führten wesentlich häufiger zu einer **Vakuolisierung** der Epithelzellen als die *CagA*-negativen Stämme ($n = 3$). 86,6 % der *CagA*-positiven Stämme vakuolisierten die TSMC, wogegen kein einziger *CagA*-negativer Stamm eine Vakuolisierung hervorrief. Dieser Zusammenhang war im Fisher's Exact Test signifikant ($P = 0,01$).

Die oben beschriebenen Marker für die Zytotoxizität des Stammes hatten im Hinblick auf die Diagnose **Ulcer/Gastritis** folgende Auftretenshäufigkeiten: Bei den Gastritis-Stämmen ($n = 11$) waren 75 % *CagA* - positiv gegenüber 85 % *CagA*- positiven Ulcer-Stämmen ($n = 7$). Eine

Vakuolisierung der TSMC trat mit 88,8 % bei den Ulcus-Stämmen ebenfalls häufiger auf als bei Gastritis-Stämmen mit 53,8 % .Diese Unterschiede in der Zytotoxizität zwischen Ulcus- und Gastritis-Stämmen waren aber nicht signifikant ($P = 1,0$ in Bezug auf *CagA* sowie $P = 0,16$ in Bezug auf die Vakuolisierung im Fisher's Exact Test). Abbildung 32 veranschaulicht diese Zusammenhänge.

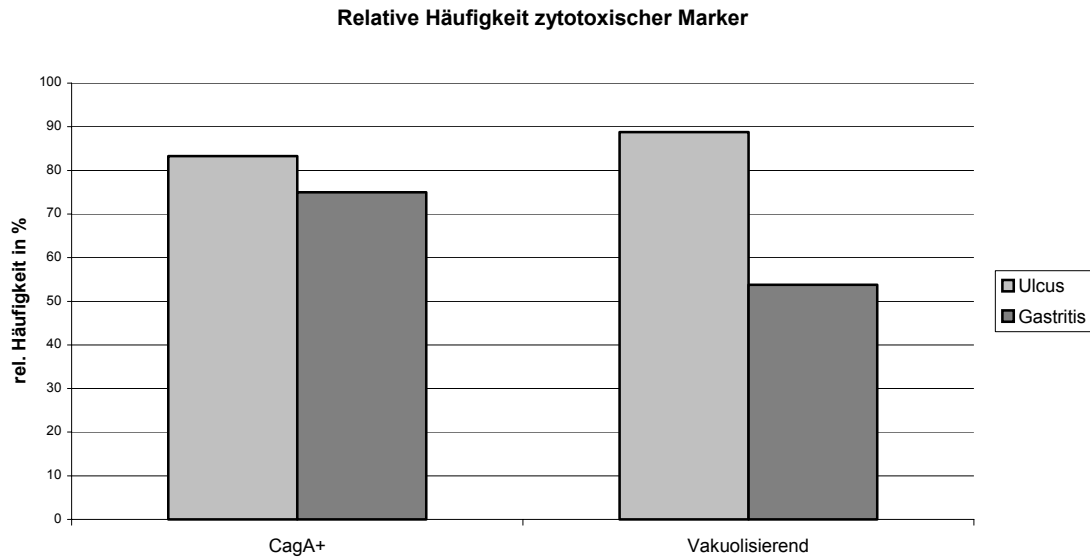


Abbildung 32 : Relative Häufigkeit der *CagA*-positiven sowie vakuolisierenden Stämme bei Patienten mit Ulcus oder Gastritis

Ein Zusammenhang zwischen der histologischen ***H.p.-Dichte*** und der Zytotoxizität bestand nicht ($P = 0,9$; $n = 13$ für *CagA* sowie $P = 1,0$; $n = 13$ für die Vakuolisierung im t-Test).

Zum Zusammenhang zwischen Zytotoxizität und relativer **Abnahme des Kontaktwinkels** siehe Abschnitt 3.1, zwischen Zytotoxizität und relativer **PGE₂/LTB₄-Sekretion** Abschnitt 3.2 sowie zwischen Zytotoxizität und **Adhäsionsrate** Abschnitt 3.3 .

3.5 Endoskopischer Befund (Ulcus/Gastritis)

Von den 25 verwendeten *H.p.*-Stämme stammten 16 Stämme von Patienten mit einer chronischen Gastritis und 9 Stämme von Patienten mit gastroduodenalen Ulzera. Die Diagnose wurde während der endoskopischen Untersuchung gestellt, bei der auch die Biopsien zur Anzüchtung der *H.p.*-Stämme gewonnen wurden.

In den durchgeführten Untersuchungen zeigten sich zwischen den Ulcus- und den Gastritis-Stämmen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Abnahme des gemessenen **Kontaktwinkels** (siehe Abschnitt 3.1), auf die Beeinflussung der **PGE₂-/LTB₄**-Sekretion (siehe Abschnitt 3.2) oder auf das Vorhandensein der Marker für die **Zytotoxizität** des *H.p.*-Stammes (siehe Abschnitt 3.4). Die verwendeten Gastritis-Stämme wiesen jedoch eine signifikant niedrigere **Adhäsionsrate** auf als die Ulcus-Stämme (siehe Abschnitt 3.3).

Eine signifikant unterschiedliche histologische **H.p.-Dichte** war zwischen den Ulcus-bzw. Gastritis-Stämmen nicht zu beobachten (mittlere *H.p.*-Dichte von 3 bei Gastritis-Stämmen (n = 12) vs. mittlere *H.p.*-Dichte von 2 bei Ulcus-Stämmen (n = 3; P = 0,22 im Standard t-Test).

3.6 Histologische *H.p.*-Dichte

Die Dichte des *H.p.*-Befalls in vivo wurde histologisch anhand der Biopsien beurteilt. Nach Price wurde anschließend eine Einteilung in 4 Grade vorgenommen (siehe Abschnitt 2.3).

Die *H.p.*-Dichte zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die relative **PGE₂/LTB₄**-Sekretion (siehe Abschnitt 3.2). Der signifikante, positiv korrelierende Zusammenhang mit der mittleren relativen Abnahme des **Kontaktwinkels** ist in Abschnitt 3.1 beschrieben. Ebenfalls bestand eine signifikante positive Korrelation zur **Adhäsionsrate** des Stammes (siehe Abschnitt 3.3). Ein Zusammenhang zwischen *H.p.*-Dichte und **Zytotoxizität** des Stammes bestand nicht (siehe Abschnitt 3.4). Zwischen den **Ulcus- und Gastritis**-Stämmen bestanden keine signifikant unterschiedlichen *H.p.*-Dichten (siehe Abschnitt 3.5).

3.7 Zusammenfassung

In Tabelle 5 sind die ermittelten statistischen Parameter über die Zusammenhänge der verschiedenen Untersuchungskriterien in Form einer Matrix zusammengestellt.

Tabelle 5 :Zusammenhang zwischen den Untersuchungskriterien

	Kontaktw.	PGE ₂	LTB ₄	Adh.rate	Vakuol.	CagA	Diagnose
PGE ₂	r _p = 0,04 P = 0,96						
LTB ₄	r _s = 0,3 P = 0,34						
Adh.rate	r _p = 0,45 P = 0,03	r _s = -0,1 P = 0,7	r _s = -0,4 P = 0,17				
Vakuol.	P = 0,28	P = 0,04	P = 0,7	P = 0,9			
CagA	P = 0,47	P = 0,03	P = 0,2	P = 0,8	P = 0,01		
Diagnose	P = 0,51	P = 0,5	P = 0,86	P = 0,02 G<U	P = 0,16	P = 1,0	
H.p.-Dichte	r _s = 0,5 P = 0,04	r _p = 0,04 P = 0,9	r _s = -0,5 P = 0,19	r _s = 0,53 P = 0,04	P = 1,0	P = 0,9	P = 0,23



Tendenzieller Zusammenhang



Signifikanter Zusammenhang

4 Diskussion

Die Existenz einer phospholipidreichen Schicht als Bestandteil der mucogastralen Barriere wurde bereits 1983 von Hills et al. beschrieben (Hills 1983). Dadurch besitzt die luminale Oberfläche des Magens und auch des übrigen Gastrointestinaltraktes eine gewisse Hydrophobizität, die der Schleimhaut einen Schutz vor Erosionen durch Magensäure oder andere hydrophile Agenzien verleiht. 1992 konnte diese phospholipidreiche Zone, von der sich Teile innerhalb der Epithelzellen, auf der Epitheloberfläche sowie in Verbindung mit dem Mucus befinden, elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden (Hills 1992). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass durch eine Infektion mit *Helicobacter* die Hydrophobizität der Schleimhaut sinkt und der Keim zu einer elektronenmikroskopisch sichtbaren Zerstörung der Phospholipidschicht führt (Goggin 1991, Hackelsberger 1998, Goggin 1992, Mauch 1993). Dass die Veränderungen der Hydrophobizität, die in Zusammenhang mit einer *H.p.*-Infektion auftreten, durch das Bakterium verursacht sind, wird dadurch deutlich, dass nach *H.p.*-Eradikation die Hydrophobizität wieder auf Werte nicht-infizierter Kontrollgruppen ansteigt (Goggin 1992). Die Hydrophobizität wird auch von einer Reihe weiterer Faktoren beeinflusst. So tritt z.B. eine Abnahme der Hydrophobizität mit dem Alter (Hackelsberger 1998), durch Einnahme von nichtsteroidalen Antiphlogistika (Gyires 1994) oder Ethanol (Sierra 1986) sowie durch Reflux von Gallensäuren (Goggin 1991) auf.

Um die Wirkung von *H.p.* auf die Hydrophobizität der Schleimhaut isoliert betrachten zu können, wurden die vorliegenden Kontaktwinkelmessungen *in vitro* an einer humanen Adenokarzinom-Zelllinie des Magens vorgenommen. Diese Zellen werden auch als TSMC (Tumor surface mucus cells) bezeichnet. Derartige *in vitro*-Untersuchungen sind bisher in der Literatur nur in einem weiteren Fall beschrieben (Preiß 1998). Neben der Hydrophobizität wurden noch einige andere Faktoren *in vitro* bestimmt (Adhäsionsrate, Zytotoxizität, PGE₂/LTB₄-Sekretion). Um die Validität des Modells überprüfen und Vergleiche mit anderen Arbeiten durchführen zu können, wurden weitere Faktoren auch *in vivo* untersucht. Dazu gehört zum einen die *H.p.*-Dichte und zum anderen der endoskopische Befund (Ulcus/Gastritis). Die Beziehungen der verschiedenen *in vitro* untersuchten Kriterien untereinander sowie zu den *in vivo* untersuchten Kriterien stellt Abbildung 33 dar.

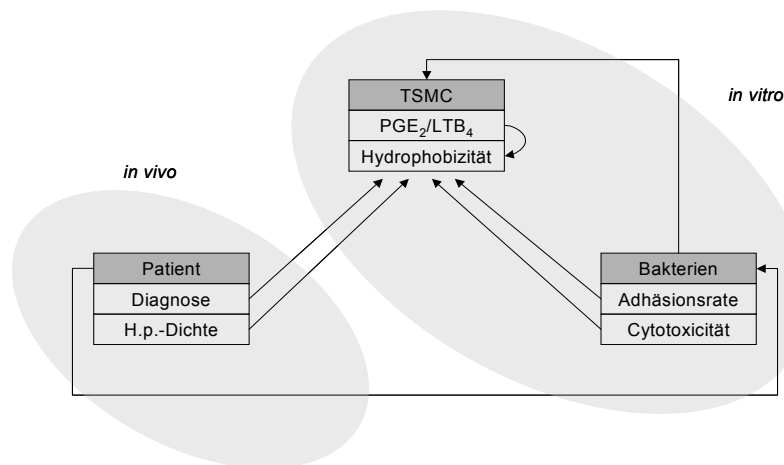


Abbildung 33 :Zusammenhang zwischen Kriterien *in vitro* und *in vivo*

Die Methode der Goniometrie, die bereits in mehreren Studien zur Quantifizierung der Oberflächenhydrophobizität von Biopsien verwendet wurde (Goggin 1991, Goggin 1992, Lichtenberger 1999), wurde dabei auf Messungen an humanen Magenepithelzellen übertragen. Dabei wurde auf Erfahrungen, die in diesem Labor durch die von Preiß erstmalig durchgeführten goniometrischen *in vitro* - Messungen gesammelt werden konnten, zurückgegriffen (Preiß 1998).

Nach Inkubation der TSMC-Monolayer mit verschiedenen *H.p.*-Stämmen kam es in allen Fällen zu einer signifikanten Abnahme des Kontaktwinkels. Dabei ließ sich eine Abhängigkeit der Kontaktwinkelabnahme von der Inkubationsdauer zeigen. Innerhalb der ersten 12 h sank der Kontaktwinkel stärker als in den folgenden 12 Stunden. Diese Ergebnisse stimmen sowohl mit den *in vitro*-Messungen von Preiß als auch mit den von anderen Autoren durchgeführten *in vivo* Messungen an Biopsien überein, bei denen *H.p.* ebenfalls zu einer Abnahme des Kontaktwinkels führte (Goggin 1991, Goggin 1992, Lichtenberger 1999). Dies zeigt zum einen, dass der Einfluss von *H.p.* auf die Hydrophobizität der Schleimhaut mit dem verwendeten *in vitro*-Modell untersucht werden kann, zum anderen wird deutlich, dass es allein durch das Vorhandensein von *H.p.* zu einer Veränderung der Zelloberfläche von Magenepithelzellen kommt.

Um zu prüfen, ob diese Abnahme der Hydrophobizität mit bestimmten Virulenzfaktoren von *H.p.* in Zusammenhang steht, wurde in den vorliegenden Untersuchungen die Adhäsionsrate der *H.p.*-Stämme bestimmt. Dies geschah zum einen durch direktes Auszählen der Anzahl adhärenter Bakterien pro Zelle *in vitro*, zum anderen durch histologische Beurteilung der *H.p.*-Dichte auf den Biopsien. Dabei zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang sowohl zwischen der Adhäsionsrate

in vitro als auch der *H.p.*-Dichte *in vivo* und der Abnahme des Kontaktwinkels. Die inverse Korrelation zwischen der *H.p.*-Dichte und der Hydrophobizität ist auch von anderen Autoren bei Messungen an Biopsien beschrieben worden (Asante 1997, Goggin 1992), *in vitro*-Untersuchungen existieren dazu bisher nicht. So ist diese Übereinstimmung der vorliegenden Ergebnisse mit der vorhandenen Literatur sowie der aufgefundenen signifikante, positiv korrelierende Zusammenhang zwischen *H.p.*-Dichte auf der Biopsie und der Adhäsionsrate der Bakterien *in vitro* wiederum als ein Beweis für die Validität des verwendeten Modells zu sehen.

Da eine positive Korrelation zwischen der *H.p.*-Dichte auf der Biopsie und dem Schweregrad der histologischen Entzündung besteht (Khulusi 1995, Hessey 1990), könnte vermutet werden, dass die Beziehung zwischen der Infektionsdichte und der Hydrophobizität vor allem über die Entzündungsreaktion vermittelt wird. Dies scheint jedoch nicht so zu sein. Go et al. konnten anhand von Kontaktwinkelmessungen an Biopsien zeigen, dass nach einer *H.p.*-Eradikation das Zurückgehen der histologischen Entzündungszeichen dem Wiederanstieg der reduzierten Hydrophobizität um einige Tage vorausgeht (Go 1993). Lichtenberger et al. wiesen im Tiermodell nach, dass die Abnahme der Hydrophobizität nach Infektion mit *Helicobacter* dem Auftreten histologischer Entzündungszeichen zeitlich vorausgeht (Lichtenberger 1999). Da sich auch im vorliegenden *in vitro*-Modell, wo eine Entzündungsreaktion keine Rolle spielt, zwischen Adhäsionsrate und Kontaktwinkelabnahme ein signifikanter Zusammenhang zeigt, konnte somit nachgewiesen werden, dass es direkt durch eine Infektion mit *H.p.* zur Veränderung der Schleimhauthydrophobizität kommt.

In diesem Zusammenhang lässt sich weiterhin diskutieren, ob allein durch die Anwesenheit von *Helicobacter pylori* eine Verringerung der Hydrophobizität auftreten kann, da der Keim selbst hydrophile Oberflächeneigenschaften besitzt (Smith 1990). Dafür spricht, dass die Abnahme des Kontaktwinkels bei den Stämmen am größten war, die eine hohe Adhäsionsrate aufwiesen. Bei den vorliegenden Inkubationsversuchen wurde jedoch zu einem relativ geringen Anteil an Bakterien verwendet, die sicherlich nicht ausreicht, um allein durch ihr Vorhandensein eine signifikante Veränderung der Hydrophobizität zu verursachen. Weiterhin wurden die inkubierten Monolayer vor Messung des Kontaktwinkels mehrmals gewaschen, so dass die wenigen eventuell noch verbliebenen Bakterien sicher nicht Ursache der Hydrophobizitätsverringerung sind.

Es stellt sich nun die Frage, ob die Veränderungen der Hydrophobizität direkt durch *H.p.*, das heißt durch bakteriell-determinierte Faktoren verursacht werden oder ob eher eine indirekte Beeinflussung über eine durch das Bakterium induzierte Veränderung der Stoffwechselleistung der Zelle ursächlich ist. Die goniometrische Messung allein lässt darüber keine Aussage zu, da mit ihr nur Rückschlüsse auf das quantitative Ausmaß einer Schädigung der hydrophoben Schicht

gezogen werden können, nicht jedoch über mögliche Ursachen. So wurden eine Reihe weitere Faktoren bestimmt.

Neben der Adhäsionsfähigkeit wird der Zytotoxizität eines Stammes eine wichtige Bedeutung für die Virulenz eines Stammes zugesprochen. Unter der Annahme, dass eine Schädigung der hydrophoben Schicht vor allem durch bakterielle Faktoren verursacht wird, wurde deshalb neben der Adhäsionsrate die Zytotoxizität des Stammes bestimmt. Dies geschah zum einen über den Nachweis des *CagA*-Proteins durch Elektrophorese und Immunoblot, zum anderen wurde die Produktion des Zytotoxins über eine direkte morphologische Beurteilung einer Vakuolisierung der TSMC überprüft. Es bestand dabei die Vorstellung, dass eine Bildung von Vakuolen in der Zelle auch die Zelloberfläche dahingehend beeinflusst, dass eine Schädigung der hydrophoben Schicht über eine Messung der Hydrophobizität sichtbar wird. Diese These konnte durch die vorliegenden Untersuchungsergebnisse nicht bestätigt werden. Weder die Expression von *CagA* durch die Bakterien noch die direktmikroskopisch beobachtete Vakuolisierung der TSMC standen in Zusammenhang mit der Abnahme des Kontaktwinkels. Da zu einem Zusammenhang zwischen diesen beiden Kriterien von anderen Autoren weder *in vivo* noch *in vitro* Untersuchungen existieren, lassen sich Vergleiche mit anderen Arbeiten nicht durchführen.

In diesem Zusammenhang ist auch die fehlende Korrelation zwischen der Abnahme der Hydrophobizität *in vitro* und der Diagnose des Patienten, das heißt der endoskopischen Beurteilung der Schleimhautläsionen zu sehen. Die Stämme von Patienten mit gastroduodenalen Ulzera verursachten zwar eine geringfügig stärkere Abnahme des Kontaktwinkels als die Gastritis-Stämme, die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. Vergleiche mit der Literatur zeigen dazu kein einheitliches Bild. Preiß wies in seinen *in vitro*-Untersuchungen nach 12 h Inkubation der Monolayer mit *H.p.* eine geringere Beeinflussung der Hydrophobizität durch Gastritis-Stämme gegenüber Ulcus-Stämmen nach, nach 24 h kam es dann zu einer Angleichung. Aufgrund der geringen Anzahl von *H.p.*-Stämmen, die von Preiß zur Inkubation verwendet wurden, ist dieses Ergebnis jedoch lediglich als Tendenz zu werten, welche durch die vorliegenden Untersuchungen so nicht bestätigt werden kann. Auch zugehörige Messungen an Biopsien zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Goggin und Marrero fanden in ihren Untersuchungen gleiche Kontaktwinkel der antralen Mucosa bei Patienten mit Ulcus duodeni und Gastritis (Goggin 1992), während Asante et al. signifikante Unterschiede zwischen der Hydrophobizität der Antrum-Biopsien bei Patienten mit Ulcus duodeni und Gastritis nachwiesen (Asante 1997).

Somit lässt sich feststellen, dass zwar die Adhäsionsrate als bakteriell-determinierter Faktor einen Einfluss auf die Hydrophobizität der Schleimhaut hat, nicht jedoch die Zytotoxizität des

Stammes. Es sind jedoch eine Reihe weiterer bakterieller Mechanismen denkbar, die zu einer Zerstörung der Phospholipidschicht führen können. Dazu gehört zum Beispiel die Produktion von Phospholipasen durch *H.p.* Es konnte in *in vitro*-Untersuchungen gezeigt werden, dass durch die Aktivität der Phospholipasen A_2 und C_2 eine Phospholipidschicht von einer festen Oberfläche abgelöst werden kann (Ottlecz 1993). Im Magensaft *H.p.*-positiver Patienten konnte jedoch von Asante et al. keine erhöhte Phospholipase A_2 -Aktivität festgestellt werden (Asante 1997). Weiterhin ist von Lichtenberger et al. eine Veränderung der hydrophoben Oberflächeneigenschaften des Magens sowohl im Tierexperiment als auch *in vitro* an einer synthetischen Mucusschicht durch Ammonium-Ionen beschrieben worden (Lichtenberger 1994). Da diese Ionen durch Harnstoffabbau über die bakterienspezifische Urease von *H.p.* in großen Mengen im Mucus gebildet werden, ist eine Reduktion der Hydrophobizität durch *H.p.* auch über diesen Weg vorstellbar.

Um die Möglichkeit zu prüfen, dass eine veränderte Stoffwechsellistung der Zelle Ursache des Abbaus der Phospholipidschicht ist, wurden die Konzentrationen von PGE_2 und LTB_4 im Überstand der Monolayer vor und nach Inkubation mit *H.p.* bestimmt. Grundlage dieser Überlegung bilden nachfolgend genannte Stoffwechselvorgänge an der Zellmembran. Einen hohen Anteil an Membranlipiden, die, wie Lichtenberger und andere vermuten, für die Hydrophobizität der Schleimhaut ursächlich sind, bilden mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Lichtenberger 1992). Diese sind gleichzeitig Vorstufe für die Synthese der Eicosanoide. Dabei werden aus Arachidonsäure mittels des Enzyms Cyclooxygenase die verschiedenen Prostaglandine sowie Thromboxan synthetisiert, gleichzeitig ist die Arachidonsäure Vorstufe für die Bildung der Leukotriene mittels des Enzyms Lipoxygenase. Der genaue Syntheseweg ist aus Abbildung 34 ersichtlich. So ist vorstellbar, dass eine Induktion der Eicosanoidsynthese durch *H.p.* über daraus resultierende Veränderungen des Phospholipidgehaltes und der Zusammensetzung der Fettsäuren in der Zellmembran zur Verringerung der Hydrophobizität führt.

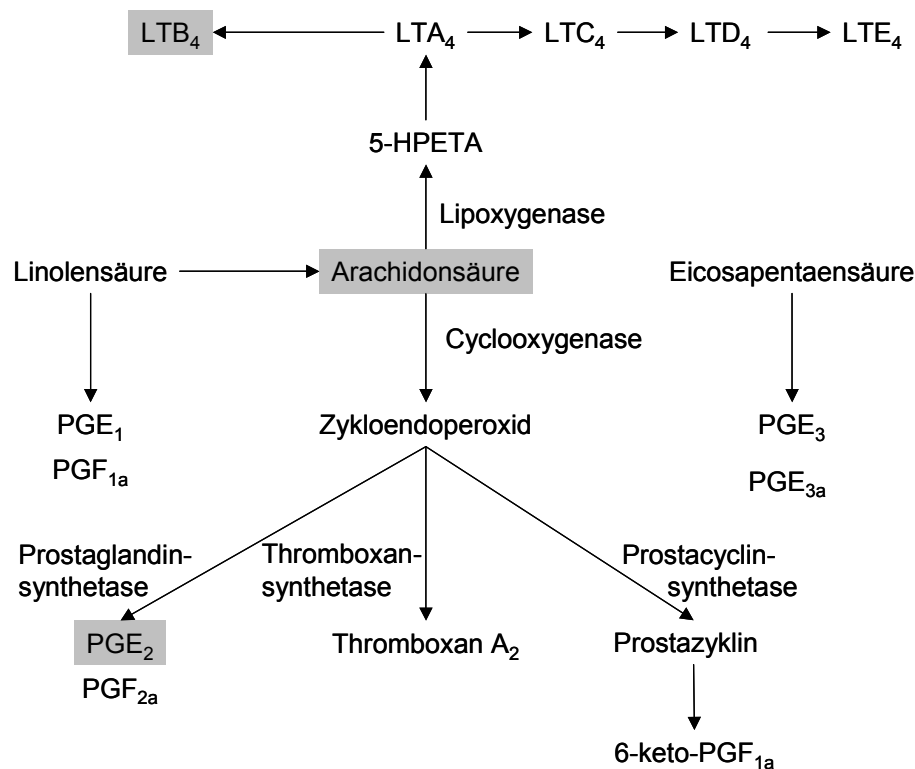


Abbildung 34 : Synthese der Eicosanoide

Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse mehrerer *in vivo*-Studien untermauert. Wakabayashi et al. konnten z.B. zeigen, dass eine Infektion mit *H.p.* bei symptomlosen Patienten mit einer Verringerung des Phosphatidylcholingehaltes und des Gehaltes an Linolensäure sowie einem vermehrten Arachidonsäure – Gehalt der Biopsien aus dem Corpus verbunden war (Wakabayashi 1998). Pomorski et al. beobachteten eine durch *H.p.* induzierte verstärkte Synthese von PGE₂ über die Freisetzung von Arachidonsäure vor allem aus Phosphatidylinositol (Pomorski 2001). Die Freisetzung von Arachidonsäure konnte durch einen Phospholipase A₂ – Inhibitor verhindert werden, so dass eine Aktivierung der cytosolischen Phospholipase A₂ durch *H.p.* als Ursache des PGE₂-Anstiegs vermutet wird. Im Gegensatz zu diesen Studien fanden Asante et al. keine signifikanten Unterschiede des Phospholipid-Gehalts im endoskopisch gewonnenem Mucus zwischen *H.p.*-positiven und *H.p.*-negativen Gruppen (Asante 1997). Gleichsam war der Lysophosphatidylcholin/Phosphatidylcholin-Quotient als Ausdruck einer eventuellen Phospholipolyse bei beiden Gruppen gleich. Die Ergebnisse der obengenannten Studien sind jedoch aufgrund der unterschiedlichen Substrate (Mucus/ Biopsie) nicht unmittelbar vergleichbar. Weiterhin kommt *in vivo* eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die Entzündungskomponente hinzu.

In der vorliegenden Arbeit kam es durch eine Inkubation mit *H.p.* zu einer signifikanten Stimulation der PGE₂- und LTB₄-Synthese der TSMC-Monolayer. Der Vergleich mit der

vorhandenen Literatur zeigt unterschiedliche Ergebnisse. Von einigen Autoren wird *in vivo* an Biopsien eine erhöhte PGE₂-Syntheserate der Mucosa bei *H.p.*-Infektion beschrieben (Oderda 1993, Feldmann 2001). Prelik et al. konnten einen derartigen Zusammenhang jedoch nicht bestätigen (Prelik 1992). Hudson et al. stellten ebenfalls keine Unterschiede der PGE₂-Syntheserate von Biopsien *H.p.*-positiver oder *H.p.*-negativer Patienten fest (Hudson 1993). Durchgeführte *in vitro* Studien zeigen eine Erhöhung der PGE₂-Sekretion der verwendeten Zellen nach *H.p.*-Inkubation (Akhtar 2001, Kim 2001, Romano 1998). Dabei scheint eine Erhöhung von PGE₂ spezifisch bei einer *H.p.*-Infektion aufzutreten, da ein derartiger Effekt von Romano et al. bei Inkubation der Zellen mit *Escherichia coli* nicht beobachtet werden konnte (Romano 1998). Von einigen Autoren der zitierten *in vivo* Studien wird die Vermutung geäußert, dass die Erhöhung der PGE₂-Syntheserate der Mucosa vor allem auf die mit der *H.p.*-Infektion assoziierte Infiltration der Schleimhaut mit Entzündungszellen zurückgeht. So wurde eine Korrelation zwischen der Stärke des entzündlichen Infiltrates und der PGE₂-Synthese der Mucosa beschrieben (Hudson 1993, Taho 1990). Von anderen Autoren kann ein derartiger Zusammenhang wiederum nicht bestätigt werden (Prelik 1992). Die Ergebnisse der zitierten *in vitro*-Studien sowie die der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass durch *H.p.* auch die Prostaglandinsynthese der Mucosazellen selbst beeinflusst wird.

Eine Erhöhung der LTB₄-Konzentration der Mucosa oder des Magensaftes bei *H.p.*-Infektion konnte *in vivo* ebenfalls von einigen Autoren dargestellt werden (Kasirga 1999, Kimura 1993, Fukuda 1990). *In vitro*-Untersuchungen über LTB₄-Veränderungen bei *H.p.*-Inkubation existieren nicht.

Obwohl eine Beeinflussung des Eicosanoid-Stoffwechsels der Zelle durch *H.p.* nachweisbar ist, kann ein Zusammenhang zur Abnahme des Kontaktwinkels nicht dargestellt werden. Dies lässt vermuten, dass der Änderung der Hydrophobizität andere Stoffwechselvorgänge als die mit der Bildung von Eicosanoiden verbundenen an der Zellmembran zu Grunde liegen. Asante et al. diskutieren in ihrer Arbeit aufgrund des fehlenden Zusammenhangs zwischen Hydrophobizität und Phospholipidgehalt im Mucus ebenfalls, dass eher andere Komponenten des Mucus, vielleicht Glykolipide oder Glykoproteine für die Hydrophobizität der Schleimhaut bedeutsam sind (Asante 1997).

Während der Messungen der PGE₂- und LTB₄-Konzentrationen der Überstände wurde deutlich, dass die Stärke der Stimulation zwischen den verwendeten Stämmen z.T. erheblich variierte. Jedoch hatten weder die Adhäsionsrate des Stammes noch die Zytotoxizität Einfluss auf die Sekretionsleistung der Zelle. Diese Ergebnisse schließen jedoch nicht aus, dass andere bakteriell-determinierte Faktoren die Eicosanoidsynthese beeinflussen. So konnte auch von Romano et al.

keine Abhängigkeit der erhöhten PGE₂-Sekretion von der Expression der zytotoxinassoziierten Gene (z.B. *CagA*) festgestellt werden, jedoch zeigten sich in dieser Arbeit isogene Mutanten von *H.p.*, bei denen eine Ausschaltung von *picA* oder *picB* erfolgt war, als weniger effektiv auf die Stimulation der PGE₂-Synthese als *picA*- und *picB*-positive Stämme (Romano 1998). Diese Gene sind ebenfalls Bestandteil der „pathogenicity island“. Da ihre Expression in Zusammenhang mit der Produktion von Cytokinen steht (Tummuru 1995), wäre eine Beeinflussung auch auf diesem Weg denkbar. Allerdings müssen noch andere Faktoren bei diesem Prozess involviert sein, da auch die *picA*-/*picB*-negativen Mutanten zu einer Stimulation der PGE₂-Sekretion führten. Romano et al. vermuten aufgrund ihrer Untersuchungen einen Einfluss EGF-abhängiger Wachstumsfaktoren. Sie konnten zeigen, dass durch *H.p.* einige dieser Faktoren vermehrt exprimiert werden und zu einer Stimulation der Cyclooxygenase-2 führen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen weiterhin, dass das benutzte *in vitro*-Modell zur Messung der Hydrophobizität bei *H.p.*-Inkubation verwendet werden kann und eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen, die durch *in vitro*-Untersuchungen gewonnen wurden und den zugehörigen *in vivo* Kriterien sowie den *in vivo*-Studien anderer Autoren besteht. So führten z.B. die *CagA*-positiven Stämme auch an den TSMC signifikant häufiger zu einer Vakuolisierung als die *CagA*-negativen Stämme. Khulusi et al. wiesen einen signifikanten Zusammenhang zwischen der *H.p.*-Dichte auf der Biopsie und der Diagnose des Patienten nach (Khulusi 1995), wobei die *H.p.*-Dichte bei Ulcus-Patienten höher als bei Gastritikern war. Dieser Zusammenhang ließ sich auch *in vitro* zeigen: die Stämme von Patienten mit Ulcera wiesen eine signifikant höhere Adhäsionsrate auf als Stämme von Patienten mit Gastritis.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass zwar die Adhäsionsfähigkeit des Stammes in einem signifikanten Zusammenhang mit der Hydrophobizität der Schleimhautoberfläche steht, dass aber die weiteren in dieser Arbeit untersuchten bakteriellen und zellulären Faktoren keinen Einfluss auf die Änderung der Hydrophobizität haben. So bleibt die Frage, wodurch eine Veränderung der hydrophoben Membraneigenschaften bei einer *H.p.*-Infektion verursacht wird, weiterhin offen. Durch die vorliegenden Untersuchungen kann gezeigt werden, dass die Zytotoxizität des Stammes und der veränderte Eicosanoidstoffwechsel der Zellmembran nicht Ursache der Verringerung der Hydrophobizität sind. Weiterhin weisen die Ergebnisse darauf hin, dass für die Eigenschaft der Hydrophobizität der Zellmembran neben den Phospholipiden offensichtlich auch andere Membranbausteine von Bedeutung sind. So könnte in folgenden Studien zur Hydrophobizität der Magenzellmembran z.B. die Rolle von Glykolipiden oder Glykoproteinen als weitere Membranbestandteile untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Die Bedeutung von *Helicobacter pylori* als kausaler Faktor für die Entstehung bestimmter Erkrankungen des oberen Gastrointestinaltraktes ist heute unumstritten. Eine *H.p.*-Infektion ist mit der chronischen Gastritis, gastroduodenalen Ulzerationen sowie dem Auftreten des Magenkarzinoms vergesellschaftet. Die vielfältigen Mechanismen, über die eine Infektion mit diesem Keim zur Schädigung der gastrointestinalen Schleimhaut und letztendlich zum Auftreten obengenannter Erkrankungen führt, waren seit der Wiederentdeckung von *H.p.* 1983 durch Warren und Marshall Untersuchungsschwerpunkt vieler Studien.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen einer *H.p.*-Infektion auf die Schädigung der hydrophoben Grenzschicht als ein Bestandteil der mucogastralen Schutzbarriere. Das Ausmaß der Hydrophobizität der Magenepithelzellen wurde dabei goniometrisch über die Messung des Kontaktwinkels bestimmt. Um isoliert die auftretenden Veränderungen der Hydrophobizität der Schleimhaut bei einer *H.p.*-Infektion betrachten zu können, wurden die Kontaktwinkelmessungen im Gegensatz zu den meisten der bisher vorliegenden Untersuchungen innerhalb eines *in vitro*-Modells vorgenommen. Als Modell der Magenschleimhaut dienten dabei als Monolayer angezüchtete humane Adeno-Karzinomzellen des Magens (TSMC).

Die Ergebnisse der Arbeit zeigten, dass eine Infektion mit *H.p.* zu einer signifikanten Abnahme der Hydrophobizität der Zelloberfläche führt. Dabei traten von Stamm zu Stamm deutliche Unterschiede im Ausmaß der Abnahme des Kontaktwinkels hervor. Deshalb war ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit die Frage, ob die Veränderungen der Hydrophobizität in Zusammenhang mit bestimmten bakteriell-determinierten Faktoren stehen oder ob eine durch *H.p.* induzierte Veränderung der Syntheseleistung der Epithelzelle dafür ursächlich ist. Aus diesem Grund wurde als Marker für die Virulenz des *H.p.*-Stammes die Adhäsionsrate mittels Fluoreszenzfärbung und anschließender Auszählung im Mikroskop bestimmt. Weiterhin wurde die Zytotoxizität des Stammes zum einen über eine im Mikroskop sichtbare induzierte Vakuolisierung der TSMC sowie zum anderen über die mittels Elektrophorese und anschließendem Immunoblot nachgewiesene Expression des *CagA*-Gens beurteilt. Dabei zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Adhäsionsrate und der Abnahme der Hydrophobizität der Schleimhaut. Die Zytotoxizität des Stammes hatte jedoch keinen Einfluss auf die Hydrophobizität.

Als Marker für die Syntheseleistung der Zellen wurden die Konzentrationen von LTB_4 sowie PGE_2 im Überstand der TSMC vor und nach Inkubation mit *H.p.* mittels Immunoassay

bestimmt. Es konnte eine statistisch signifikante Stimulation dieser Syntheseparameter durch eine *H.p.*-Infektion nachgewiesen werden. Die unterschiedliche Stimulation der Eicosanoidsynthese stand jedoch in keinem Zusammenhang mit den Veränderungen der Hydrophobizität der Zellmembran.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass eine Infektion mit *H.p.* zu einer statistisch signifikanten Veränderung der Schleimhauthydrophobizität des Magenepithels führt und dass die in dieser Arbeit untersuchten bakteriellen und zellulären Faktoren nicht ursächlich für diese Veränderungen sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen außerdem, dass das verwendete in vitro-Modell gut geeignet ist zur Durchführung von Untersuchungen zur Hydrophobizität der Magenzellmembran.

6 Literaturverzeichnis

Akhtar M., Y. Cheng, R.M. Magno: Promotor methylation regulates *Helicobacter pylori*-stimulated cyclooxygenase-2 expression in gastric epithelial cells. *Cancer Res* 61(6): 2399-2403 (2001)

Asante M., H. Ahmed, P. Patel et al: Gastric mucosal hydrophobicity in duodenal ulceration: Role of *Helicobacter pylori* infection density and mucus lipids. *Gastroenterology* 113:449-454 (1997)

Atherton J.C., Cao P., Peek J.R.: Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 270, 17771-17777 (1995)

Barranco S.C., C.M. Townsend, C. Casertelli et al. : Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 43: 1703-9 (1983)

Bizzozero, G.: Über die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. *Arch. Mikr. Anat.* 42, 82-152 (1893)

Blaser, M.J.: Der Erreger des Magengeschwürs. *Spektrum der Wissenschaft* 4, 68-74 (1996)

Butler B. D., L. M. Lichtenberger, B. A. Hills: Distribution of surfactans in the canine gastrointestinal tract and their ability to lubricate. *Am J Physiol* 244:G645-651 (1983)

Caspary, W.F. et al: Diagnostik und Therapie der *Helicobacter-pylori*-Infektion. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 34: 392-401 (1996)

Cayman Chemical: Prostaglandin E₂ Enzyme Immunoassay Kit Cat#514010 (a)

Cayman Chemical: Leukotriene B₄ Enzyme Immunoassay Kit Cat#520111 (b)

Cover, T.L., Dooley C.P., Blaser M.J.: Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun* 58,603-610 (1990)

Cover, T.L., M.J. Blaser: Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 267, 10570-75 (1992)

Feldmann M., B. Cryer, D. Mallat et al.: Role of *Helicobacter pylori* infection in Gastroduodenal injury and gastric prostaglandin synthesis during long term/low dose aspirin therapy: a prospective placebo-controlled, double-blind randomized trial. *Am J Gastroenterol* 96(6): 1751-57 (2001)

- Figura N.**, A. Guglielmetti, A. Rossolini et al.: Cytotoxin production by *Campylobacter pyloristrains* isolated from patients with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only. *J. Clin. Microbiol.* 27: 225-226 (1989)
- Forman, D. and the Eurogast Study Group:** An international association between *Helicobacter pylori*-infection and gastric cancer. *Lancet* 341, 1359-62 (1993)
- Freedberg, A.S.**, L.E. Barron. The presence of spirochetes in human gastric mucosa. *Am. J. Dis.* 7, 443-45 (1940)
- Fukuda T.**, S. Kimura, T. Arakawa : Possible role of leukotrienes in gastritis associated with *Campylobacter pylori*. *J Clin Gastroenterol* 12 Suppl 1:S131-4 (1990)
- Go M.F.**, G.M. Lew, L.M. Lichtenberger : Gastric mucosal hydrophobicity and *Helicobacter pylori* : response to antimicrobial therapy. *Am J Gastroenterol* 88: 1362-65 (1993)
- Goggin P. M.**, T. C. Northfield, R. T. Spychal: Factors affecting gastric mucosal hydrophobicity in man. *Scand. J Gastroenterol* , 26 (Suppl 181), 65-73 (1991)
- Goggin P. M.**, J. M. Marrero, R. T. Spychal, P. A. Jackson, C. M. Corbishley, T. C. Northfield: Surface hydrophobicity of gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection - effect of clearance and eradication. *Gastroenterology* 103: 1486-90 (1992)
- Goodwin, C.S.**, J.A. Armstrong, T. Chilvers, M. Peters et al.: Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. System. Bact.* 39, 397-405 (1989)
- Gyires K.**: Some of the factors, that may mediate or modify the gastrointestinal mucosal damage induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Agents Actions* 41(1-2): 73-79 (1994)
- Hackelsberger A.**, U. Platzer, M. Nilius et al.: Age and *Helicobacter pylori* decrease gastric mucosal surface hydrophobicity independently. *Gut* 43(4): 465-469 (1998)
- Harry L.T.**, Mobley PhD.: Defining *Helicobacter pylori* as a Pathogen : Strain heterogenicity and virulence. *Am J Med* 100,2S-11S (1996)
- Hessey, S.J.**, J. Spencer, J.I. Wyatt et al. : Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Gut* 31, 134-138 (1990)
- Hills B. A.**, B. D. Butler, L. M. Lichtenberger : Gastric mucosal barrier: hydrophobic lining to the lumen of the stomach. *Am J Physiol* 244:G561-68 (1983)
- Hills B. A.**: A mucosal barrier of gastric surfactant identified in the human stomach. *Aust. NZJ Med* 4: 441-444 (1992)

- Hudson N.**, M. Balsitis, F. Filipowicz et al. :Effect of *Helicobacter pylori* colonization on gastric mucosal eicosanoid synthesis in patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs. Gut 34:748-51 (1993)
- InStat.** GraphPad InStat™ Copyright © 1990-1994 GraphPad Software, V2. 05a
- Kasirga E.**, I. Coker, S. Aydogdu : Increased gastric juice leukotriene B4, C4 and E4 concentration in children with *Helicobacter pylori* colonization. Turk J Pediatr 41(3): 335-9 (1999)
- Kay, Y.C.**, L.M. Lichtenberger. Localization of phospholipid-rich zones in rat gastric mucosa. Possible origin of a protective hydrophobic luminal lining. J. Histochem. Cytochem. 35, 1285-98 (1987)
- Kim H.**, J.W.Lim, K.H. Kim: *Helicobacter pylori* induced expression of IL-8 and cyclooxygenase 2 in AGS gastric epithelial cells: mediation by nuclear factor kappaB. Scand J Gastroenterol 36(7): 706.716 (2001)
- Kimura S.**, T. Fukuda, T. Arakawa: Leukotriene levels of *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa. Nippon Rinsho 51(12): 3159-62 (1993)
- Kreinitz, W.:** Über das Auftreten von Spirochäten verschiedener Formen im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi. Deutsch. Med. Wochenschr.32, 872-882 (1906)
- Khulusi S.**, M.A. Mendall, P. Patel: *Helicobacter pylori* infection density and gastric inflammation in duodenal ulcer and non-ulcer subjects. Gut 37: 319-324 (1995)
- Lichtenberger, L.M.**, L.A. Graziani, E.J.Dial et al.: Role of surface-active phospholipids in gastric cytoprotection. Science 219, 1327-29 (1983)
- Lichtenberger, L. M.**, J. J. Romero, Y. C. Kao, E. J. Dial: Gastric protective activity of mixtures of saturated polar and neutral lipids in rats. Gastroenterology 99: 311-26 (1990)
- Lichtenberger L.M.**, T.N. Ahmed, J.C. Barreto et al.: Use of fluorescent hydrophobic dyes in establishing the presence of lipids in gastric mucus gel layer. J Clin Gastroenterol 14 (suppl): S82-S87 (1992)
- Lichtenberger L.M.**, J.J. Romero: Effect of ammonium ion on the hydrophobic and barrier properties of the gastric mucus gel layer: implications of the role of ammonium in *H.pylori*-induced gastritis. J. Gastroenterol Hepatol 9:S13-S19 (1994)
- Lichtenberger L.M.**, E.J. Dial, A. Ottlecz et al: Attenuation of hydrophobic phospholipid barrier is an early event in *Helicobacter felis*-induced gastritis in mice. Dig Dis Sci 44:108-115 (1999)

- Lingwood, C.A.**, A. Pellizai, H. Law et al.: Gastric glycerolipid as a receptor for *Campylobacter pylori*. Lancet 2, 238-241 (1989)
- Mai, U.E.**, G.I. Perez-Perez, L.M.Wahl et al.: Soluble surface proteins from *H. pylori* activate monocytes/macrophages by lipopolysaccharid-independent mechanism. J. Clin. Invest. 87, 894-900 (1991)
- Mai, U. E.**, G.I. Perez-Perez, J.B.Allen et al. : Surface proteins from *Helicobacter pylori* exhibit chemotactic activity for human leucocytes and are present in gastric mucosa. J. Ecp. Med. 175, 517-25 (1992)
- Malfërtheiner, P.** , M. Nilius: Pathogenese der *Helicobacter-pylori*-Infektion. In *Helicobacter Pylori: Von der Grundlage zur Therapie*. Hrsg. P. Malfërtheiner, Thieme (1994)
- Mauch, F.**, G. Bode, H. Ditschuneit, P. Malfërtheiner: Ultrastructural characterization of a phospholipid-rich zone in the human gastric epithelium. Gastroenterology 105, 1698-1704 (1993)
- Menge, J. L.**, C. Capo, A. M. Benoliel, C. Foa, P. Bongrand: Nonspecific surface properties; Contact angle of water on dried cell monolayers. Immunol Commun . 13:211-227 (1984)
- Mertz-NielsenA.**, J. Hillingsø, H. Frøkiær et al: Gastric bicarbonate secretion and release of prostaglandin E2 are increased in duodenal ulcer patients but not in *Helicobacter pylori*-positive healthy subjects. Scan J Gastroenterol 31(1): 38-43 (1996)
- Muotiala, A.**, M. Helander, L. Pyhala et al. :Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. Infect. Immun. 60, 1714-16 (1992)
- Neumann, A. W.**, D. R. Absolom, D. W. Francis et al.: Measurement of surface tension of blood cells and protein. Ann NY Academy Science. 416:276-298 (1983)
- Nilius, M.**, P. Malfërtheiner: Contact angle measurement. In: *Helicobacter pylori*-techniques for clinical diagnosis and basic research. Eds. A. Lee, F. Megrand , 236-298 (1996)
- Nilius, M.**, G. Bode, A. Stanescu, P. Malfërtheiner: Interaction between *H.pylori* and three different surface mucus cells. Europ. J. clin. Invest. (1994) in press
- Nilius, M., G. Bode, M. Buchler et al.: Adhesion of *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli* to human and bovine surface mucus cells in vitro. Eur J Clin Invest 24(7): 454-9 (1994)
- Nomura A.**, G. N. Stemmermann, P.-H. Chyou et al.: *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. New England Journal of Medicine 325, 1132-36 (1991)

- Oderda G. M.** Dalessandro`, P. Mariani: Prostaglandin E₂ in gastric mucosa of children with *H. pylori* gastritis: relation to thickness of mucus gel layer. J Clin Pathol 46(9): 836-9 (1993)
- Ottlecz A.**, J. J. Romero, S. L. Hazell, D. Y. Graham, L. M. Lichtenberger: Phospholipase activity of *Helicobacter pylori* and its inhibition by bismuth salts - biochemical and biophysical studies. Dig Dis Sci 38 : 2071-80 (1993)
- Pomorski T.**, T.F. Meyer, M. Naumann: *Helicobacter pylori*-induced prostaglandin E(2) synthesis involves activation of cytosolic phospholipase A(2) in epithelial cells. J Biol Chem 276(1): 804-10 (2001)
- Preiß H.:** Einfluss von *Helicobacter pylori* auf die Hydrophobizität von Magen- und Duodenalschleimhaut und humane Magenepithelzellen. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades Dr. med., Magdeburg 1999
- Prelik G.**, G. Abedin, E.F. Stange: Endogene Prostaglandinsynthese und Gastritis: Fehlende Korrelation zu endoskopischen Befunden, *Helicobacter*-Kolonisierung und leukozytärer Infiltration der Mucosa. Z Gastroenterol 30: 130-133 (1992)
- Pretolani,S.**, F.Bonviccini, G.Gabarrini. Epidemiology. In: *Helicobacter pylori*. An atlas. Malfertheiner, P., P. Michetti, A.Price (Eds.), Science press 1996
- Price A.B.:** The Sydney system : histological division. J Gastroenterol Hepatol 6:209-222 (1991)
- Ringner, M.**, M. Paulsson, T. Wadström: Vitronectin binding by *Helicobacter pylori*. FMES Microb. Immun. 105, 219-24 (1992)
- Romano M.**, V. Ricci, A. Memoli: *Helicobacter pylori* up-regulates cyclooxygenase-2 mRNA expression and prostaglandin E2 synthesis in MKN 28 gastric mucosal cells in vitro. J Biol Chem 273(44): 28560-3 (1998)
- Sierra E.M.**, L.M. Lichtenberger: Effect of ethanol and cytoprotective agents on the surface hydrophobicity of rat gastric mucosa in vivo. Gastroenterology 90: 1633 (1986)
- Slomiany, B.L.**, A. Slomiany: Magenschleimproduktion und Magenschleimhautprotektion. In:Domschke, W., S.J.Konturek: Der Magen: Physiologie – Pathophysiologie – Klinik. Springer 1993
- Smith J.I.**, B. Drumm, A.W. Neumann: In vitro surface properties of newly recognized gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Infect Immun 58: 3056-60 (1990)
- Steinbeck, M.J.**, J.A. Roth: Neutrophil activation by recombinant cytokines. Rev. Infect. Dis. 11, 549-568 (1989)

- Spychal R. T.,** J. M. Marrero, S. H. Saverymuttu, T. C. Northfield: Measurement of the surface hydrophobicity of human gastrointestinal mucosa. *Gastroenterology* 97: 104-111 (1989)
- Spychal R. T.,** P. M. Goggin, J. M. Marrero et al. : Surface hydrophobicity of gastric mucosa in peptic ulcer disease. Relationship to gastritis and *Campylobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 98: 1250-54 (1990a)
- Spychal R. T.,** R. S. Savalgi, J. M. Marrero, S. H. Saverymuttu, J. S. Kirkham, T. C. Northfield: Thermodynamic effects of bile acid in the stomach. *Gastroenterology* 99: 305-310 (1990b)
- Tummuru M.K.R.,** S.Sharma, M.Blaser: *J Mol Microbiol* 18, 867-76 (1995)
- Trust, T.J.,** P.Doig, L. Emödy et al. : High affinity binding of the basement membrane proteins Collagen Type IV and Laminin to the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 59, 4398-4404 (1991)
- Valkonen, K.H.,** M.Ringner, A. Ljungh, T. Wadström : High affinity binding of laminin by *Helicobacter pylori*: Evidence for a lectin-like interaction. *FEMS Immun. Med. Microb.* 7, 29-38 (1993)
- van Oss C. J.,** C. F. Gillman, A. W. Neumann. : Phagocytic Engulfment and Cell Adhesiveness as Cellular Surface Phenomina. New York: Dekker 1975
- von Oss C. J.,** D. R. Absolom, A. W. Neumann, W. Zingg. : Determination of the surface tension of proteins. 1. Surface tension of native serum proteins in aqueous media. : *Biochim Biophys Acta*; 670: 64 (1981)
- van Loosdrecht M C.,** J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa, A. J. Zehnder.: The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl Environ Microbiol.* 53:1893-1897 (1987)
- Wadström, T. J.** I. Guruge, S. Wei et al. : *Helicobacter pylori* haemagglutinins – possible gut mucosa adhesins. In: *Helicobacter pylori*, Gastritis and Duodenal Ulcer, P. Malfertheiner, H. Ditschuneit eds. Springer, Heidelberg 1990 (96-103)
- Wadström, T.,** S. Hirno: Bacterial pathogenesis. In: *Helicobacter pylori*. An atlas. Malfertheiner, P., P. Michetti, A.Price (Eds.), Science press 1996
- Wakabayashi H.,** T. Orihara, A. Nakaya et al. :Effect of *Helicobacter pylori* infection on gastric mucosal phospholipid contents and their fatty acid composition. *J Gastroenterol Hepatol* 13(6):566-71 (1998)
- Warren, J.,** B. Marshall: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1 1273-75 (1983)

Wotherspoon, A. C. et al.: Regression of Primary Low-grade B-cell gastric lymphoma of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue after Eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet 347, 575-77 (1993)

Xu J.K., C.S. Goodwin, M. Cooper, et al.: Intracellular vacuolization caused by the urease of *Helicobacter pylori*. J. Inf. Dis. 161, 1302-04 (1990)

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. P. Malfertheiner danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Magdeburg durchführen zu können. Durch seine Motivation und Interesse am Fortgang der Experimente ist die Durchführung dieser Arbeit möglich geworden.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Manfred Nilius. Seine konstruktive Unterstützung während meiner Experimente und seine Anregungen in unseren wissenschaftlichen Diskussionen halfen mir, aufgetretene Probleme zu lösen. Ohne seine unermüdliche Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Des weiteren bedanke ich mich bei der MTA Frau U. Stolz, die mich bei der Durchführung der Experimente unterstützt hat.

8 Erklärung

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

Einfluss von *Helicobacter pylori* auf die Hydrophobizität von TSMC-Zellen

in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Magdeburg

mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. Peter Malfertheiner und Dr. Manfred Nilius ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

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

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

Magdeburg, den 25. April 2003

9 Lebenslauf

Name	Claudia Wenke, geb. Schulze
Geburtsdatum	19. 07. 72
Geburtsort	Magdeburg
1979-1983	Grundschule Magdeburg
1983-1991	Gymnasium Magdeburg
1991-1993	Studium der Biologie in Göttingen
1993-2001	Studium der Humanmedizin an der Universität in Magdeburg
seit 01.01.02	Arzt im Praktikum in der Klinik für Innere Medizin des Städtischen Klinikums Magdeburg

10 Anhang

10.1 Untersuchungsdaten

Nummer	in vivo-Daten		in vitro-Daten								
	Endoskopischer Befund	Histologische H.p.-Dichtegrade	Adhäsionsrate	Relative Kontaktwinkelabnahme		Vakuolisierung	CagA	Relative LTB ₄ -Konzentration		Relative PGE ₂ -Konzentration	
				12 h	24 h			12 h	24 h	12 h	24 h
1	Gastritis		4,63	8,42%	8,76%			123,00%	88,60%	117,80%	122,40%
2	Gastritis		1,18	6,85%	10,36%	Ja	Positiv				
3	Gastritis	2	2,06	9,02%	12,68%	Ja	Positiv	68,67%			
4	Gastritis	4	4,28	8,89%	8,32%	Ja	Positiv				109,50%
5	Gastritis	5	4,87	9,91%	18,86%	Ja	Positiv				
6	Gastritis	4	12,79	7,78%	15,78%	Nein	Positiv				
7	Gastritis	4	5,22	19,48%	15,81%			87,57%	126,66%	132,89%	100,89%
8	Gastritis	4	7,54	8,70%	14,32%	Ja	Positiv	87,90%	113,30%	94,40%	103,30%
9	Gastritis	0	1,36	8,68%	9,29%			66,12%	115,10%		106,50%
10	Gastritis	2	1,72	9,70%	13,04%	Nein	Positiv	92,80%	174,71%	92,80%	91,78%
11	Gastritis	3	2,77	1,68%	4,94%	Nein	Negativ	133,10%	112,90%		
12	Gastritis	4	2,82	6,37%	12,94%	Nein	Negativ	65,30%	86,80%	88,30%	86,90%
13	Gastritis	3	1,78	-0,60%	5,63%	Ja	Positiv	110,90%	98,60%		107,82%
14	Gastritis	2	1,72	17,27%	19,30%	Ja	Positiv	99,26%	144,90%	130,66%	104,38%
15	Gastritis		2,7	6,02%	2,00%	Nein					
16	Gastritis		2,7	7,20%	4,30%	Nein					
17	Ulcus	2	7,57	5,29%	10,83%	Nein	Negativ				
18	Ulcus	3	13,16	8,31%	8,18%	Ja	Positiv	117,80%	93,00%	111,50%	105,10%
19	Ulcus		0,78	5,28%	13,24%	Ja	Positiv				109,48%
20	Ulcus	1	3,69	6,61%	11,83%	Ja	Positiv	64,30%			
21	Ulcus		6,56	9,29%	12,31%	Ja	Positiv				
22	Ulcus		2,73	9,06%	13,99%	Ja	Positiv	127,05%	126,48%	127,60%	118,60%
23	Ulcus		4,32	12,41%	10,87%	Ja	Positiv	97,07%	127,96%	97,10%	102,10%
24	Ulcus		6,87	10,60%	12,70%	Ja					
25	Ulcus		6,87	6,50%	14,40%	Ja					

10.2 Gram-Färbung

1. Ausstreichen der mit einer Öse von der Kultur aufgenommenen Bakterien in einem NaCl-Tropfen, der auf einen Objektträger aufgebracht wurde
2. Lufttrocknen und Hitzefixierung
3. Einwirken von Gentianaviolett-Lösung über 3 min
4. Einwirken von Lugolscher-Lösung über 2 min
5. Abspülen mit Alkohol
6. Abspülen mit destilliertem H₂O
7. Einwirken von Fuchsinrot über 20 sec
8. Abspülen mit destilliertem H₂O
9. Trocknen des fertigen Präparates

10.3 Testung des *H.p.*-Stammes auf Katalase-, Oxidase- und Urease-Aktivität

Katalase-Nachweis

Benetzung eines Abstriches von der Bakterienkultur mit 3%iger wässriger Wasserstoffperoxidlösung, Aktivität der Katalase zeigt sich in sofortiger Bläschenbildung

Prinzip: Katalase beschleunigt die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff

Oxidase-Nachweis

Ausstreichen eines Teils der Kultur auf einem Oxidase – Stäbchen der Firma Merck, Aktivität der Cytochromoxidase zeigt sich in Blaufärbung des Teststreifens

Urease-Nachweis

Benetzung eines Teils der Kultur mit der Nachweisreagenz, Aktivität der Urease zeigt sich im Farbumschlag der Lösung von gelb nach dunkelrot

Nachweisreagenz: wässrige Lösung mit 1,5% Harnstoff, 0,02% Kresolrot sowie 0,1% Titriplex

Prinzip: Spaltung des Harnstoffs in Ammoniak und Kohlendioxid, Verschiebung des pH – Wertes der Lösung durch Indikator angezeigt

10.4 Wasch- und Färbelösungen für die Fluoreszenzfärbung

Acridinorange – Lösung:

10 mg Acridinorange auf 200 ml Cacodylatpuffer lösen und in eine lichtundurchlässige Flasche filtrieren

Cacodylatpuffer – Lösung:

0,1 M Natrium-Cacodylat sowie 0,1 M Succrose im Verhältnis 9:1 steril mischen

Fixierlösung

25%iges Glutaraldehyd mit Cacodylatpuffer-Lösung in Verhältnis 1:12

10.5 Immunoblot – Lösungen

Probenpufferlösung:

0,0625 M Tris-HCl mit pH=6,8

2 % SDS (Natriumdodecylsulfat)

10 % Glycerol

5 % β -Mercaptoethanol

0,001 % Brom-Phenolblau

Diskontinuierliches Puffersystem:

Anodenlösung I

0,3 M Tris und 20% Methanol

Anodenlösung II

25 mM Tris und 20% Methanol

Kathodenlösung

40 mM 6-Aminohexansäure, 0,01% SDS und 20% Methanol

PBS-Tween:

0,17 M NaCl, 0,024 M Na_2HPO_4 , 0,0015 M NaH_2PO_4 , 0,05% Tween

Substratinkubationslösung:

60 mg 3'3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid und 15 μl H_2O_2 auf 100 ml PBS