

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

Regulation der „Secretory Leukocyte Protease Inhibitor“-  
Expression in Magenepithelzellen unter dem Einfluss der  
Infektion mit *Helicobacter pylori*

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

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

vorgelegt von Daniel Schindele  
aus München  
Magdeburg 2011

## Dokumentationsblatt

### **Bibliographische Beschreibung:**

Schindele, Daniel

Regulation der „Secretory Leukocyte Protease Inhibitor“-Expression in Magenepithelzellen unter dem Einfluss der Infektion mit *Helicobacter pylori*.

2011 - 90Bl. - 17 Abbildungen

### **Kurzreferat:**

Charakteristisch für die Infektion mit *Helicobacter pylori* sind die meist lebenslange Persistenz des Erregers und eine chronische Entzündung der Magenschleimhaut. Der „Secretory Leukocyte Protease Inhibitor“ (SLPI) ist ein Protein aus der Familie der „Whey Acidic Proteins“ und wird u.a. von Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes und der Atemwege gebildet. Neben der Inhibition verschiedener Serinproteasen, wie Elastase und Chymase, verfügt das Protein noch über weitere, von der proteaseinhibitorischen Domäne unabhängige, Funktionen für die Regulation der Immunantwort sowie eine direkte antimikrobielle Wirkung. Während entzündliche Prozesse im Allgemeinen zu einer verstärkten Expression dieses „Alarm-Proteaseinhibitors“ führen, zeigte sich in *H. pylori*-infizierter Magenschleimhaut eine verringerte Konzentration von SLPI.

Ziel dieser Arbeit war es, den Mechanismus dieser Reduktion näher zu charakterisieren. Hierfür wurde ein etabliertes Zellkulturmodell der *H. pylori*-Infektion eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass dem Verlust an SLPI ein translationaler oder posttranslationaler Prozess zu Grunde liegt. In einem „Screening“ mit insgesamt sechzehn verschiedenen Proteaseinhibitoren ergaben sich letztlich keine Hinweise auf einen proteolytischen Abbau von SLPI. Daneben wurde der Einfluss von Redox-Prozessen auf die SLPI-Konzentration untersucht. Auch hier ließ sich jedoch in Zellkulturexperimenten kein Einfluss von verstärktem oder vermindertem oxidativem Stress auf die *H. pylori*-bedingte Verringerung der SLPI-Expression erkennen.

Die erhobenen Befunde sprechen für einen posttranslationalen, intrazellulären Prozess. Während sowohl ein extrazellulärer proteolytischer Abbau als auch eine oxidative Schädigung des Proteins als unwahrscheinlich anzusehen sind, kann eine Beteiligung von Proteasen an einem intrazellulären Mechanismus der SLPI-Reduktion derzeit noch nicht ausgeschlossen werden.

**Schlüsselwörter:** *H. pylori*, SLPI, Proteasen, oxidativer Stress

# Inhaltsverzeichnis

<b>Dokumentationsblatt</b> .....	<b>I</b>
<b>Kurzreferat</b> .....	<b>I</b>
<b>Schlüsselwörter</b> .....	<b>I</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Helicobacter pylori</i> .....	1
1.1.1 Mikrobiologie, Epidemiologie und Klinik.....	1
1.1.2 Pathophysiologie der <i>H. pylori</i> -Infektion.....	4
1.1.3 <i>H. pylori</i> und Proteasen.....	6
1.2 Serinproteaseinhibitoren.....	8
1.3 „Sekretory Leukozyte Protease Inhibitor“ (SLPI).....	9
1.3.1 Aufbau und Vorkommen.....	9
1.3.2 Funktionen von SLPI.....	10
1.3.3 SLPI im Gastrointestinaltrakt.....	13
1.3.4 Regulation der SLPI-Expression und –Sekretion.....	15
1.4 Aufgabenstellung.....	18
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
2.1 Studiendesign.....	19
2.2 Kultur von AGS-Zellen.....	19
2.3 Kultivierung von <i>H. pylori</i> .....	20
2.4 Infektion von AGS-Zelllinien mit <i>H. pylori</i> .....	20
2.5 Zellversuche unter Zugabe von Cycloheximid (CHX), Proteaseinhibitoren und anderen Substanzen.....	21
2.6 Zellversuche unter Zugabe von L-Buthionin-sulfoximin (BSO) und Carmustin (BCNU).....	22
2.7 Probengewinnung.....	22
2.8 Proteinextraktion aus AGS-Zellkulturen.....	23
2.9 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der Proteine.....	23
2.10 „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) zur Quantifizierung von SLPI.....	23
2.11 RNA-Extraktion aus AGS-Zellkulturen.....	25

2.12	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration.....	25
2.13	Agarosegelelektrophorese für RNA.....	26
2.14	Reverse Transkription der RNA.....	26
2.15	Quantitative „Real-Time“-PCR.....	27
2.16	Agarosegelelektrophorese für cDNA.....	28
2.17	Immunfluoreszenzfärbung.....	29
2.18	Western-Blot für SLPI.....	30
2.19	Versuche mit „Tris[2-carboxyethyl]phosphine hydrochloride“ (TCEP-HCl), H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und rekombinantem humanem SLPI (rhSLPI).....	32
2.20	„Human Neutrophil Elastase“ (HNE) Aktivitätsmessung.....	33
2.21	Statistische Analyse.....	34
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
3.1	Einfluss der <i>H. pylori</i> -Infektion auf die SLPI-Expression im Zellkulturmodell... 35	
3.1.1	SLPI-Verlust in <i>H. pylori</i> -infizierten Zellkulturen bei inhibierter Proteinbiosynthese.....	35
3.1.2	Einfluss von gruppenspezifischen Proteaseinhibitoren auf die <i>H. pylori</i> - induzierte Abnahme der SLPI- Expression im AGS-Zellkulturmodell.....	37
3.1.3	Einfluss der spezifischen Metalloproteaseinhibitoren MMP-Inhibitor-3 und TAPI-2 auf die <i>H. pylori</i> -vermittelte SLPI-Reduktion.....	39
3.1.4	Analyse des Einflusses von EGTA auf die SLPI-Expression in AGS- Zellkulturen.....	40
3.1.5	Immunfluoreszenz-Darstellung der Veränderungen in der SLPI- Expression in AGS-Zellen durch EGTA und <i>H. pylori</i> .....	43
3.1.6	Veränderung der SLPI-Expression in AGS-Zellkulturen durch Inkubation mit zweiwertigen Metallionen und Auswirkungen auf den Effekt einer <i>H. pylori</i> -Infektion.....	45
3.1.7	Versuche zum Nachweis von SLPI mittels Westernblot-Analyse.....	46
3.2	Einfluss des Redoxgleichgewichtes auf rekombinantes humanes SLPI <i>in vitro</i> ... 47	
3.2.1	Rolle des Redoxstatus für den Nachweis von SLPI im ELISA.....	47
3.2.2	Einfluss von TCEP auf die Antiprotease-Aktivität von SLPI.....	50
3.3	Einfluss veränderter Redoxbedingungen im AGS-Zellmodell.....	51
3.3.1	Einfluss von oxidativen und antiinflammatorischen Substanzen auf die SLPI-Expression in AGS-Zellen im Kontext der <i>H. pylori</i> -Infektion.....	51

3.3.2	Einfluss eines veränderten zellulären Glutathionstoffwechsels auf die <i>H. pylori</i> -induzierte SLPI Reduktion.....	52
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>54</b>
4.1	Die <i>H. pylori</i> -Infektion im AGS-Zellmodell.....	55
4.2	Die verminderte Expression von SLPI in <i>H. pylori</i> -infizierten Magenepithelzellen beruht auf einem translationalen oder posttranslationalen Prozess.....	57
4.3	Die Rolle von Proteasen beim posttranslationalen Verlust von SLPI.....	57
4.4	Der verminderte Nachweis von gebundenem SLPI kann die verminderte SLPI-Konzentration in <i>H. pylori</i> -infizierten AGS-Zellen nicht erklären.....	61
4.5	Der Einfluss von oxidativem Stress auf die Expression und den Nachweis von SLPI.....	61
4.5.1	Entstehung und Auswirkungen von oxidativem Stress bei der <i>H. pylori</i> -Infektion.....	61
4.5.2	Veränderter Nachweis von rekombinantem SLPI durch Spaltung von Disulfidbrücken.....	64
4.5.3	Auswirkungen von oxidativem Stress auf den SLPI-Nachweis im Zellkulturmodell.....	65
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>70</b>
7.1	Literaturverzeichnis.....	70
7.2	Verzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen.....	86
7.3	Curriculum vitae.....	88
7.4	Eidesstattliche Erklärung.....	89
7.5	Danksagung.....	90

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar (Mikromol/Liter)
AAT	α-1-Antitrypsin
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
AGS	Zellen
ALLM	Acetyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Methioninal
AMC	7-amino-4-methylcoumarin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCNU	1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosurea
BL	Blank (Leerwert)
BSA	Bovine Serum Albumin
BSO	L-Buthionin-sulfoximin
cagA	cytotoxin-associated gene A
cDNA	complementary Desoxyribonucleic Acid
CHX	Cycloheximid
cm	Centimeter
COPD	Chronic Obstruktive Pulmonary Disease
DESF	Desferrioxamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTU	Dimethylthiourea
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Nukleotide
DTPA	Diethylene Triamine Pentaacetic Acid
dupA	duodenal ulcer promoting gene
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPI	Epithelin

EST	L-trans-epoxysuccinyl-leucylamide (3-methyl)butane-ethyl ester
et al.	et alii/alia: und Andere
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoreszin Isothiocyanat
g	Gramm / Gravitationsbeschleunigung
GERD	Gastro-Esophageal Reflux Disease
Ggt	$\gamma$ -Glutamyltranspeptidase
gp-120	Glykoprotein-120
GSH	Glutathion
GSSG	zwei Glutathion-Moleküle mit Disulfidbrücke
h	Stunde
H. pylori	Helicobacter pylori
HcpA	Helicobacter cystein-rich protein A
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HNE	Human Neutrophil Elastase
Hop	Helicobacter outer membrane protein
HP1069	Helicobacter pylori-Gen für Collagenase
HtrA	Serinprotease von Hp
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
KatA	bakterielle Katalase
kb	kilobasen
kDa	kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonic Acid
MALT	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloprotease
MMPI-3	Matrix-Metalloprotease-Inhibitor-3
MOI	Multiplicity Of Infection
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NAC	N-Acetylcystein

NADPH	Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat
NapA	Neutrophil-activating protein
NE	Neutrophilen Elastase
NFκB	nukleärer Faktor κB
nm	Nanometer
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PAI	Pathogenicity Island
PAR	Protease Activated Receptor
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PEPI	Proepithelin
PFA	Paraformaldehyd
pg	Picogramm
PPI	Protonenpumpeninhibitor
Ras	Rat sarkoma (Familie intrazellulärer Signalproteine)
RER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
rhSLPI	rekombinanter humaner Secretory Leukocyte Protease Inhibitor
RNA	Ribonucleic Acid
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s1/ml	VacA Isoform
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SIE	STAT-Inducible-Element
SLPI	Secretory Leukocyte Elastase Inhibitor
Sod	Superoxid dismutase
SPEM	Spasmolytic Polypeptide-Expressing Metaplasia
SRE	Serum-Responsive-Element
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
T4SS	Typ IV Sekretionssystem
TAE	Puffer
Tapi-2	TNF-α protease inhibitor-2
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Buffered Saline



TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloprotease
TLR	Toll-Like Receptor
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrosis Faktor- $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolet
V	Volt
VacA	Vacuolating cytotoxin A
WAP	Whey Acidic Proteins
WFCD	WAP Four Disulfide Core Domain
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
$\gamma$ -GCS	$\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase

# 1. Einleitung

## 1.1 *Helicobacter pylori*

### 1.1.1 Mikrobiologie, Epidemiologie und Klinik

Bis zur Erstbeschreibung von *H. pylori* durch B. Marshall und J. R. Warren 1983 bei Patienten mit chronischer Gastritis galt der Magen als steril und gegen eine Besiedelung mit Mikroorganismen durch seinen sauren pH-Wert geschützt (Marshall et al. 1984). Heute weiß man nicht nur, dass ca. 50% der Weltbevölkerung mit diesem Mikroorganismus infiziert sind, sondern auch, dass es dabei um einen auf die menschliche Magenschleimhaut spezialisierten Erreger handelt, der unsere Spezies wahrscheinlich schon seit über 58.000 Jahren begleitet. Entsprechend ist eine genetische Variabilität zwischen den sieben regional vorherrschenden Stammtypen nachweisbar die, vergleichbar dem menschlichen Genom, mit steigender Entfernung von Afrika abnimmt (Falush et al. 2003, Linz et al. 2007). Das gramnegative, spiralförmige Bakterium verfügt über zwei bis sechs unipolare Flagellen, welche es in die Lage versetzen, sich innerhalb der gepufferten Mukusschicht der Magenschleimhaut zu bewegen. So kann der Erreger den lebensfeindlichen pH-Werten des Magenlumens entgehen und zur Epitheloberfläche vordringen. Darüber hinaus schützt das Enzym Urease, das durch hydrolytische Harnstoffspaltung Ammoniak und Kohlendioxid freisetzt, den Keim bei kurzfristiger Exposition gegenüber der Magensäure (Bauerfeind et al. 1997, O'Toole et al. 2000). Darüber hinaus produziert *H. pylori* Katalase und Oxidase, sowie weitere spezifische Pathogenitätsfaktoren, auf deren Charakteristika und Funktionen in nachfolgenden Abschnitten der Einleitung näher eingegangen wird.

Die mikrobielle Anzucht gelingt auf bluthaltigen Nährmedien unter mikroaerophilen Bedingungen (85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> und 5% O<sub>2</sub>) bei 37°C. Für die Kultivierung aus Biopsieproben stehen selektive und nicht-selektive Nährböden zur Verfügung (Kusters et al. 2006).

### **Epidemiologie**

Weltweit sind 50% aller Menschen mit *H. pylori* infiziert, allerdings bestehen deutliche Unterschiede in der Prävalenz bezüglich Region, Lebensstandard und Alter der Patienten. So ist die Infektion in den Entwicklungsländern bei ca. 70% der Menschen, und damit deutlich häufiger als in den Industrieländern, zu diagnostizieren. In den meisten Fällen erfolgt die

Infektion im Kindesalter. Eine spontane Ausheilung der Infektion wird nur sehr selten beobachtet (Bruce et al. 2008). Die Inzidenz zeigt eine starke Abhängigkeit vom vorherrschenden Lebensstandard und den hygienischen Bedingungen, so dass eine Verbesserung in diesen Bereichen mit einer verringerten Rate an Neuinfektionen einhergeht. Folglich zeigt sich in den entwickelten Ländern, die in den letzten Jahrzehnten spürbare Verbesserungen der Hygienestandards erfahren haben, eine deutliche Altersabhängigkeit der Prävalenz, mit höheren Werten bei älteren Menschen und niedrigen bei den Jungen (Tkachenko et al. 2007).

### **Krankheitsbilder**

Eine große Bandbreite an Erkrankungen ist mittlerweile mit einer Infektion durch *H. pylori* in Zusammenhang gebracht worden, wobei die Kolonisation der Magenschleimhaut zwar immer eine histologisch nachweisbare Entzündung (Gastritis) bewirkt, in der überwiegenden Zahl der Fälle aber nicht zur Ausbildung klinischer Symptome führt. Die chronisch aktive Gastritis ist jedoch der grundlegende Krankheitsprozess und kann, abhängig von einer multifaktoriellen Wechselwirkung zwischen Wirtsfaktoren (z.B. Genpolymorphismen), Umwelteinflüssen (z.B. Ernährung, Rauchen) und den Virulenzfaktoren des Keims, zu verschiedenen symptomatischen Krankheitsbildern führen (Amieva et al. 2008, Kusters et al. 2006). Der chronische Verlauf der Infektion wird maßgeblich durch die Interaktion zwischen der gastralen Säureproduktion und der lokalen Ausbreitung des Keims bestimmt. Hier gilt, dass eine intakte oder erhöhte Säureproduktion mit einer Antrum-dominanten Lokalisation korreliert, die Bakterien also am besten die Bereiche kolonisieren, die wenige säureproduzierende Parietal-Zellen besitzen. Diese ist die häufigste Form der *H. pylori*-bedingten Gastritis und mit einem erhöhten Risiko für duodenale Ulzera assoziiert. Andererseits ist bei Patienten mit verminderter Säureproduktion, unabhängig von der Ursache, meist eine Korpus-dominante Gastritis zu finden. So konnte gezeigt werden, dass eine Suppression der Säuresekretion durch Protonenpumpeninhibitoren (PPI), bei *H. pylori*-infizierten Patienten mit Gastroösophagealer Refluxerkrankung („Gastroesophageal Reflux Disease“ GERD), zu einer Zunahme der Häufigkeit von Korpus-dominanter Gastritis führt (Kuipers et al. 1997, Moayyedi et al. 2000). Gleichzeitig führt die Infektion mit dem Mikroorganismus selbst zu einer akuten Hypochlorhydrie, welche nach erfolgreicher Eradikationstherapie teilweise reversibel ist (El-Omar et al. 1997). Als Folge einer chronischen Entzündung der Korpuschleimhaut kann es zum Verlust der die Parietalzellen beherbergenden Magendrüsen kommen und damit zur atrophischen Gastritis (Genta 1997).

Diese Form der Gastritis prädisponiert für die Entstehung einer intestinalen Metaplasie (Compare et al. 2010).

Eine *H. pylori* Infektion ist mit einem drei- bis vierfach erhöhten Risiko für die Entstehung von peptischen Ulzera in Magen und Duodenum assoziiert. Bei 75-100% von Patienten mit duodenalen Ulzera bzw. 35-86% von Patienten mit gastralen Ulzera konnte *H. pylori* nachgewiesen werden (Nomura et al. 1994). Entsprechend kann die sinkende Zahl von Krankenhauseinweisungen aufgrund peptischer Ulkuserkrankungen, zumindest zum Teil, der rückläufigen Prävalenz von *H. pylori*-Infektionen zugeschrieben werden (Feinstein et al. 2010).

Ein weiterer Schwerpunkt in der Forschung ist der Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *H. pylori* und der Entstehung gastraler Neoplasien. Trotz eines deutlichen Rückganges in ihrer Prävalenz während der letzten 30 Jahre sind Karzinome des Magens noch immer die zweithäufigste Krebstodesursache weltweit (Polk et al. 2010). Deutschlandweit starben im Jahr 2008 bundesweit 10.510 Personen an einer malignen Erkrankung des Magens (ICD151, [http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/organe/151\\_tab.html](http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/organe/151_tab.html)). Als erstes Bakterium wurde *H. pylori* im Jahre 1994 von der WHO zur Klasse 1 Karzinogen erklärt (IARC Monographs on the Carcinogenic Risks to Humans 1994). Dieser Klassifikation wurde aktuell überprüft und erneut bestätigt (de Martel et al. 2009). Nach Correa spielt die Entstehung einer atrophischen Gastritis, im Rahmen einer Korpus-dominanten Gastritis durch *H. pylori*, eine Schlüsselrolle in der Karzinogenese. Sie mündet über die Zwischenstufen der intestinalen oder pseudopylorischen Metaplasie (SPEM) in eine Schleimhautdysplasie und schließlich in das Adenokarzinom vom intestinalen Typ (Correa et al. 2007, Weis et al. 2009). Der zweite Typ des gastralen Adenokarzinoms, der diffuse Typ, kann auf der Basis einer familiär vorliegenden E-Cadherin Mutation entstehen (Oliveira et al. 2009), ist aber in seiner sporadisch auftretenden Form ebenfalls mit der *H. pylori*-Infektion assoziiert. Im Unterschied zum Magenkarzinom vom intestinalen Typ treten aber keine histologisch nachweisbaren prämaligen Läsionen, wie Atrophie oder intestinale Metaplasie, auf (Polk et al. 2010). Des Weiteren lassen neue Forschungsergebnisse eine Beteiligung von Stammzellen des Knochenmarks an der Magenkarzinogenese vermuten (Saikawa et al. 2010).

Andere, seltenere Erkrankungen im Zusammenhang mit einer *H. pylori*-Infektion, sind MALT-Lymphome des Magens als Sonderform eines extranodalen Non-Hodgkin-Lymphoms (Lehours et al. 2004, Selgrad et al. 2008).

Bei den nicht-gastrointestinalen Manifestationen ist eine Beteiligung der *H. pylori*-Infektion bei der idiopathischen thrombozytopenischen Purpura und der unklaren Anämie anerkannt (Arnold et al. 2009, Malfertheiner et al. 2007).

### 1.1.2 Pathophysiologie der *H. pylori*-Infektion

Einerseits geht zwar die Besiedelung der Mucosa durch *H. pylori* mit einem zwei- bis 20-fach erhöhtem Risiko für Adenokarzinome des Magens einher, andererseits aber entsteht ein solches Malignom nur bei 0,1-0,5% der *H. pylori*-Infizierten (Selgrad et al. 2008). Diesem Phänomen liegt ein komplexes Wechselspiel zwischen Wirtsfaktoren, Umwelteinflüssen und bakteriellen Pathogenitätsfaktoren zu Grunde, das bis zum heutigen Tage noch nicht vollständig verstanden ist. Komplizierend wirkt die Tatsache, dass *H. pylori* im Laufe seiner phylogenetischen Entwicklung zahlreiche genetische Variationen entwickelt hat und unterschiedliche Stämme sich bezüglich des Vorhandenseins, der Expression und der Unterformen der im Folgenden aufgeführten Faktoren unterscheiden.

#### **Bakterielle Pathogenitätsfaktoren:**

Das „Vacuolating Cytotoxin“ A (VacA) wird von ca. 50% der *H. pylori* Stämme sezerniert und trägt, unter anderem über eine Suppression der T-Zell-Reaktion, zur erfolgreichen Kolonisation der Magenschleimhaut bei (Salama et al. 2001). Es sind verschiedene Genotypen bekannt, die sich vor allem in der Signalregion (s) und Mittelregion (m) unterscheiden. Die vor allem in Südost-Asien sehr häufige Isoform s1/m1 ist mit einer erhöhten Rate an peptischen Ulkuserkrankungen und gastralen Malignomen assoziiert. (Kusters et al. 2006, Polk et al. 2010, Yamaoka et al. 1999).

Daneben verfügen 50-70% der *H. pylori*-Stämme über eine Pathogenitätsinsel („pathogenicity island“, PAI) in ihrem Genom, die unter anderem das „cytotoxin-associated gene A“ (cagA) enthält, sowie achtzehn Gene für ein Typ IV Sekretionssystem (T4SS) und eine variable Anzahl weiterer Gene (Kusters et al. 2006, Backert et al. 2008). Das CagA Protein hat stark immunogene Eigenschaften und induziert die Bildung von Antikörpern, so dass der Anti-CagA Status von Patienten als Marker für die Infektion mit einem cagA-positiven (cagA+) Stamm genutzt werden kann (Cover et al. 1995). Das Vorhandensein der cagPAI führt zu einer stärkeren Entzündungsreaktion und ist mit häufigerem Auftreten von gastroduodenalen Ulkuserkrankungen, atrophischer Gastritis und Magenkarzinomen assoziiert (Israel et al. 2010).

Bei direktem Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle können, über das T4SS, bakterielle Proteine in die Wirtszelle eingebracht werden und dort ihre Wirkung entfalten. Das CagA Protein wird durch Enzyme der Zielzelle zum Teil phosphoryliert und führt in Epithelzellen zu Veränderungen von Zellmorphologie, -polarität und -wachstum (Hatakeyama et al. 2009, Polk et al. 2010). Aktuelle Studien haben gezeigt, dass das CagA-Protein verschiedener *H. pylori*-Stämme eine variable Struktur zeigt und sich bezüglich der Anzahl und Lokalisation von Thyrosin-Phosphorylierungsdomänen unterscheiden lässt. Verschiedene Cag-A-Formen wiederum induzieren unterschiedliche Wirtsreaktionen (IL-8 Sekretion, Veränderungen des Zytoskeletts) und stellen eine weitere Stufe der Komplexität in der Interaktion zwischen Bakterium und Wirt dar (Argent et al. 2008, Atherton et al. 2009). Durch die ebenfalls T4SS-abhängige Insertion von Peptidoglykan wird über Signalkaskaden, unter anderem abhängig vom nukleären Faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-8 (IL-8) verstärkt (Viala et al. 2004). Weiterhin wurde in Magenepithelzellen eine CagA-abhängige NF $\kappa$ B-Aktivierung über einen Ras-vermittelten Signalweg beschrieben (Brandt et al. 2005).

Als weitere Einflussfaktoren auf die Interaktion zwischen Erreger und Wirt gelten Oberflächenproteine von *H. pylori* („Helicobacter outer membrane protein“, Hop) (Odenbreit et al. 2009). Deren Bedeutung für die Adhäsion an der Epitheloberfläche und Induktion proinflammatorischer Signalkaskaden gilt als sicher, ist aber aufgrund von Überlagerungen der Effekte untereinander und mit Wirkungen von CagA im einzelnen noch nicht vollständig quantifizierbar (Kusters et al. 2006).

Bezüglich der zumeist *in vitro* beschriebenen Signalwege, die durch *H. pylori* und seine Virulenzfaktoren modifiziert bzw. induziert werden, gibt es viele widersprüchliche Daten, die eine Abschätzung ihrer Rolle *in vivo* erschwert (Backert et al. 2010).

Das Lipopolysaccharid (LPS) der Zellwand von *H. pylori* führt zu einer, im Vergleich zu LPS anderer gram-negativer Bakterien, schwachen Aktivierung der angeborenen Immunabwehr und enthält fukosylierte Oligosaccharide mit großer Ähnlichkeit zu menschlichen Blutgruppenantigenen (Lewis Antigene) (Birkholz et al. 1993). Die Bedeutung der diesem Umstand ursprünglich zugeschriebene immunevasive Wirkung ist in letzter Zeit relativiert worden, und neuere Forschungsergebnisse ergaben Hinweise auf Zusammenhänge zwischen Lewis-Antigen „Mimikry“ und der Fähigkeit des Keimes zur Kolonisation der Magenschleimhaut über die Modulation der Adhäsion und Immunantwort (Moran 2008).

Weitere derzeit intensiv untersuchte Virulenzfaktoren, auf die aber nicht im Detail eingegangen werden kann, sind das „duodenal ulcer promoting gene“ (dupA) (Shiota et al.

2010), sowie die Gamma-Glutamyltranspeptidase (Ggt) (Gong et al. 2010, Schmees et al. 2007).

### **Entzündungsreaktion und Immunantwort:**

Eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der *H. pylori*-Infektion, und den daraus resultierenden Erkrankungen, spielt die durch Besiedelung der Magenschleimhaut ausgelöste Entzündungsreaktion. Durch seine Lokalisation innerhalb der Mukusschicht ist der Erreger vor der humoralen Immunabwehr des Wirtes weitestgehend geschützt und die dominierende Rolle in der Auseinandersetzung mit dem Mikroorganismus obliegt der zellulären Abwehr (Kusters et al. 2006). Die zelluläre adaptive Immunantwort wird durch T-Helferzellen vom Th-1 Typ geprägt und geht mit verstärkter Produktion von Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-8, IL-12, Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) einher. Aktuelle Studien konnten eine funktionelle Rolle der regulatorischen T-Zellen für die Kontrolle der Th-1 gerichteten Antwort gegenüber *H. pylori* zeigen (Kandulski et al. 2010). Die mukosale Entzündungsreaktion ist mit einer Infiltration der Schleimhaut mit neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen assoziiert (Roth et al. 1999, Wong et al. 2009). Wie gezeigt werden konnte, trägt diese Entzündungsreaktion in hohem Maße zur Schädigung der Magenschleimhaut bei (Wong et al. 2009), ohne jedoch eine Elimination des Keimes zu erreichen, so dass ein chronischer entzündlicher Prozess die Folge ist.

Über verschiedene Mechanismen führt *H. pylori* zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) und damit zur Entstehung von oxidativem Stress. Hierzu zählt zum einen die Infiltration der Schleimhaut durch neutrophile Granulozyten, welche über die aktivierte Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat (NADPH)-Oxidase ROS bilden und in die Umgebung freisetzen. Dies wird durch das „Neutrophil-activating protein“ (NapA) von *H. pylori*, welches bei fast allen Stämmen nachweisbar ist und eine starke chemotaktische und aktivierende Wirkung ausübt, weiter verstärkt (Wang et al. 2006a). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Infektion an sich zur Entstehung von ROS innerhalb der Epithelzellen führt und über die Vermittlung von Caspasen zum Zelltod durch Apoptose führen kann (Ding et al. 2007).

### **1.1.3 *H. pylori* und Proteasen**

Während ursprünglich davon ausgegangen wurde, dass *H. pylori* keine signifikante Proteaseaktivität besitzt (Nilius et al. 1996), sind im vergangenen Jahrzehnt verschiedene bakterielle Proteasen entdeckt und charakterisiert worden. Mit HP1069 wurde eine Ca<sup>2+</sup>-

abhängige Kollagenase beschrieben, die vom Bakterium *cagA*-unabhängig sezerniert wird und für die Kolonisation der Magenschleimhaut im Tiermodell essentiell war (Kavermann et al. 2003). Weiterhin sind sezernierte Metalloproteasen mit Ähnlichkeit zu den humanen Matrix-Metalloproteasen (MMP) MMP-1 und MMP-3 sowie dem Inhibitor TIMP-3 beschrieben („Tissue Inhibitor of Metalloprotease-3“), deren Bedeutung für die Pathophysiologie der *H. pylori*-Infektion jedoch noch ungeklärt ist (Gööz et al. 2001). Die ebenfalls sezernierte Serinprotease HtrA ist in der Lage, proteolytisch aktive Komplexe zu bilden und agiert zudem auch als "heat shock protein" (Löwer et al. 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass *H. pylori* in Zellen des Wirtes die Expression verschiedener MMPs und ihrer Inhibitoren beeinflussen kann. Während die Induktion von MMP-7 und MMP-1 vom Vorhandensein der *cagPAI* abhängig ist (Bebb et al. 2003, Krueger et al. 2006), werden MMP-2, MMP-3 und MMP-9 auch unabhängig davon induziert (Pillinger et al. 2007; Kundu et al. 2006). Daneben fanden sich in Biopsien aus der Korpuschleimhaut *H. pylori*-positiver Patienten auch höhere Konzentrationen der TIMP-1, -3 und -4 als bei nicht-infizierten Personen (Bodger et al. 2008). Neuere Studien an "knockout"-Tiermodellen ergaben jedoch Hinweise auf eine verstärkte Karzinogenese in MMP-7-defizienten Mäusen (Ogden et al. 2010), und auch Funktionen von MMP-3 für die Wundheilung in gastroduodenalen Ulzera wurden vermutet (Tomita et al. 2009). Eine abschließende Beurteilung der Funktionen von Metalloproteasen für den Verlauf der *H. pylori*-Infektion ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich.

Erhöht wird die Komplexität dieses pathophysiologischen Aspektes dadurch, dass Proteasen auch über die Beeinflussung von Signalkaskaden in den Entzündungsprozess eingreifen.

Eine wichtige Rolle könnten hier proteaseaktivierte Rezeptoren (PAR) spielen. Dabei handelt es sich um membranständige Rezeptoren, die nach proteolytischer Abspaltung eines N-terminalen Restes intrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen. Es liegen Daten aus *in vitro* und *in vivo* Studien vor, die sowohl eine gesteigerte Expression von PAR-2 als auch eine über den Rezeptor vermittelte Induktion von IL-8 durch *H. pylori*-Infektion zeigen (Kajikawa et al., 2007; Yoshida et al., 2008). PAR-2 wird durch Serinproteasen wie Trypsin aktiviert. Eine Bedeutung der bakteriellen Serinprotease HtrA ist möglich, bisher aber noch nicht untersucht. Ein Einfluss der Infektion auf das Gleichgewicht zwischen Proteaseaktivität und inhibitorischen Proteinen mit Konsequenzen für die Pathogenese, sowohl der Infektion und Entzündung als auch für die Karzinogenese und Metastasierung, muss angenommen werden.



## 1.2 Serinproteaseinhibitoren

Proteaseinhibitoren spielen eine zentrale Rolle in der Homöostase des Organismus, indem sie das Gewebe vor einer überschießenden proteolytischen Aktivität schützen und so eine übermäßig starke Zerstörung von gesundem Gewebes verhindern. Im Rahmen jeglicher Entzündungsreaktion kommt es zu einer verstärkten Freisetzung von verschiedensten Proteasen, welche das Gleichgewicht in Richtung einer verstärkten Gewebeschädigung verschieben können. Ursprung dieser Proteasen sind vor allem Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten, aber auch andere Zellen des Wirtes und viele Erreger sind in der Lage proteolytisch aktive Proteine freizusetzen (Kueppers 1973, Into et al. 2006). Folglich ist in diesen Situationen eine verstärkte Bereitstellung von Proteaseinhibitoren notwendig, um eine überschießende proteolytische Wirkung mit konsekutiver Schädigung auch gesunden Gewebes zu verhindern. Die Störung dieses empfindlichen Gleichgewichtes zwischen der Aktivität von Proteasen und ihren Inhibitoren ist vor allem in der Pathogenese von Lungenerkrankungen in den letzten Jahrzehnten sehr ausgiebig erforscht worden. Bereits in den 60er Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen einem Mangel an  $\alpha_1$ -Antitrypsin (AAT) und dem Auftreten von chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen („Chronic Obstruktive Pulmonary Disease“, COPD) oder Emphysemen festgestellt (Eriksson et al. 1964). Bei AAT handelt es sich um ein Glykoprotein, dass in hohen Konzentrationen im Serum zu finden ist und als akute Phase Protein reagiert. Es bildet enzymatisch inaktive Komplexe mit verschiedenen Serinproteasen, unter anderem mit Trypsin und der von neutrophilen Granulozyten freigesetzten Elastase (Kueppers 1973). Neutrophile Elastase (NE) verfügt über ein hohes elastolytisches Potential, und die Spaltung von Elastin im Bindegewebe der Alveolarsepten wird als wichtiger Faktor in der Pathogenese des Lungenemphysems bei Patienten mit angeborenem AAT-Mangel betrachtet. Auch die Entstehung von Emphysemen und COPD ohne Mangel an AAT kann mit einem Ungleichgewicht zugunsten der NE korreliert werden. Eine gewichtige Rolle spielen hier aber auch andere Proteasen, allen voran die MMPs und Cathepsine, die vor allem aus Makrophagen freigesetzt werden (Abboud et al. 2008). Neben AAT ist auch dem „Secretory Leukozyte Protease Inhibitor“ (SLPI), als Inhibitor von Serinproteasen, eine große Bedeutung für die Pathophysiologie von Lungenerkrankungen beigemessen worden (Gipson et al. 1999). Auf seine Eigenschaften und Funktionen soll im Folgenden eingegangen werden.

## 1.3 „Secretory Leukocyte Protease Inhibitor“ (SLPI)

### 1.3.1 Aufbau und Vorkommen

#### **Aufbau:**

SLPI ist ein Protein mit einer Masse von 11,7kDa und besteht aus 107 Aminosäuren. Sowohl C-terminal als auch N-terminal finden sich Cystein-reiche Domänen mit ca. 35% Sequenzhomologie. Diese Domänen, deren jeweils acht Cystein-Resten zur Ausbildung von jeweils vier Disulfidbrücken führen, begründen die Zugehörigkeit von SLPI zu den „Whey Acidic Proteins“ (WAP) (Thompson et al. 1986). In der Röntgenstrukturanalyse zeigt sich ein Boomerang-förmiges Protein mit zwei strukturell ähnlichen, keilförmigen Domänen, von denen die C-terminale Domäne an das aktive Zentrum von Proteasen wie Chymotrypsin binden kann (Grütter et al. 1988). Wie Curtis et al. zeigen konnten, zeichnet sich SLPI durch einen bemerkenswerten Faltungsmechanismus aus, der auch in Abwesenheit von externen Thiol-Katalysatoren oder reduktiven Agenzien abläuft. Hierbei fungieren die SH-Gruppen der Cystein-Reste Cys18-Cys43 und Cys71-Cys97 der nativen Intermediärprodukte SLPI-6A (6 Disulfidbrücken) und SLPI-7A (7 Disulfidbrücken) als Thiol-Katalysatoren, welche die Isomerisation von Disulfidbrücken der zahlreichen möglichen nicht-nativen Intermediärprodukte erleichtern. Der Bildung dieser letzten beiden Disulfidbrücken, die zur Ausbildung von nativem SLPI führt, liegt eine niedrige Bildungskonstante zugrunde. Diese Kinetik ist einerseits essentiell für eine korrekte Faltung des Proteins, da die Ausbildung der Disulfidbrücken kaum durch Sekundärstrukturen wie Wasserstoffbrückenbindungen gelenkt wird. Andererseits führt die niedrige Bildungskonstante der letzten beiden Disulfidbrücken dazu, dass eben diese relativ anfällig für eine reduktive Spaltung sind. Wegen ihrer Lokalisation in den Enzym-bindenden Domänen führt ein Verlust dieser Disulfidbrücken zu einer deutlichen Abnahme der proteaseinhibitorischen Aktivität des Proteins (Curtis et al. 2006, Gruetter et al. 1988).

#### **Vorkommen:**

Anders als AAT ist SLPI im Serum nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden und wird vor allem auf lokaler Ebene exprimiert. Initial wurde das Vorhandensein von SLPI im Bronchialsekret von Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen beschrieben (Hochstrasser et al. 1972). Mittlerweile konnte für zahlreiche Gewebe und Zellen eine Sekretion von SLPI nachgewiesen werden, darunter Schleimhautepithelien des

Respirationstraktes, des Gastrointestinaltraktes und des Urogenitaltraktes beider Geschlechter (Abe et al. 1991, Nystrom et al. 2001, Si-Tahar et al., 2000, Thompson et al. 2008). Darüber hinaus produzieren Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten selbst SLPI. Auch dendritische Zellen in Lymphknoten können als Reaktion auf Stimulation mit LPS eine SLPI-Synthese aufweisen (Jacobsen et al. 2008, Jin et al. 1997, Samsom et al. 2007). Weitere Organe mit konstitutiver SLPI-Expression sind Haut und Nieren (Ashcroft et al. 2000, Ohlsson et al. 2001), während im Gehirn ein Nachweis von SLPI nur bei vorliegender Entzündung gelang (Wang et al. 2003). In zahlreichen Studien wurde eine Induzierbarkeit der SLPI-Expression durch bakterielle und nicht-bakterielle Infektionen und Entzündungen gezeigt. So war im Rahmen einer experimentell ausgelösten Endophtalmitis durch *Staphylococcus aureus* bei Ratten ein Nachweis von SLPI in Geweben des Auges möglich, während dies bei gesunden Augen nur in der Tränenflüssigkeit gelang (Reviglio et al. 2007). Bei Patienten mit systemischer Entzündungsreaktion ließen sich deutlich erhöhte SLPI-Konzentrationen im Serum feststellen, die mit der Schwere der Infektion positiv korrelierten (Grobmyer et al. 2000). Auch Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis* und *Chlamydia trachomatis* induzieren die Expression von SLPI in Kulturen epithelialer Zellen (Ding et al. 2005, Wheelhouse et al. 2008). Im Tiermodell für die erosive Polyarthrits zeigte sich ebenfalls eine gesteigerte SLPI-Expression (Song et al. 1999). In Zusammenschau haben die dargestellten Ergebnisse zur Charakterisierung von SLPI als „Alarm-Proteaseinhibitor“ geführt, dessen Funktionen im Folgenden besprochen werden sollen.

### 1.3.2 Funktionen von SLPI

#### Wirkungen als Proteaseinhibitor

Wie bereits erwähnt, besitzt SLPI zwei WAP-Domänen, die, trotz ihrer ähnlichen Struktur und Größe, für sehr unterschiedliche physiologische Eigenschaften des Proteins verantwortlich sind. Die C-terminale Domäne ist für die inhibitorische Wirkung auf Serinproteasen verantwortlich. Während die Aminosäuren 67-74 wahrscheinlich als Bindungsstelle für verschiedene Proteasen dienen, ist die inhibitorische Wirkung selbst an den Leucin-Rest an Position 72 gebunden. Eine Oxidation des benachbarten Methionin-Restes (Met73) führt zur Inaktivität gegenüber NE (Taggart et al. 2001). Neben NE, für deren Inhibition es eine entscheidende Rolle spielt, erstreckt sich die Wirkung von SLPI auch auf Cathepsin G, Trypsin, Chymotrypsin, Chymase und Tryptase (Nukiwa et al. 2008). Da die *spli*-Genexpression durch inflammatorische Prozesse induziert wird, war es naheliegend,

zunächst seine Rolle als Gegengewicht zu einer erhöhten Aktivität der von Neutrophilen und Makrophagen freigesetzten Proteasen zu untersuchen. Hier zeigte sich, dass SLPI einen Abbau von Elastin im Bindegewebe der Lunge durch NE verhindern konnte (Bruch et al. 1986). In der Haut konnte mit Hilfe von SLPI-„knockout“-Mäusen ein entscheidender Einfluss des Proteaseinhibitors auf den Ablauf der Wundheilung nachgewiesen werden. Indem es an Proepithelin (PEPI) bindet, schützt SLPI es vor einer Spaltung durch NE. PEPI verhindert die TNF- $\alpha$  vermittelte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, wohingegen sein Spaltprodukt Epithelin (EPI) das Wachstum epithelialer Zellen hemmt und die Freisetzung von proinflammatorischem IL-8 fördert (Zhu et al. 2002). Darüber hinaus gibt es Studien, die eine Bedeutung proteaseinhibitorischer Domäne von SLPI für die Regulation intrazellulärer Signalkaskaden vermuten lassen. Hierauf soll im Abschnitt „Modulation der Immunantwort“ näher eingegangen werden.

### **Antimikrobielle und antiretrovirale Funktionen**

Unabhängig von der proteaseinhibitorischen Aktivität der C-terminalen Domäne konnten Defensin-ähnliche antimikrobielle Funktionen von SLPI festgestellt werden, für welche die N-terminale WAP-Domäne verantwortlich ist. Bereits 1996 berichteten Hiemstra et al. über die Wirkung der ersten Domäne gegen *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* (Hiemstra et al. 1996). Mittlerweile ist eine antimikrobielle Aktivität gegen weitere Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, sowie den Hefepilz *Candida albicans* *in vitro* nachgewiesen worden (Weldon et al. 2007). Zwar ist der genaue Mechanismus noch nicht aufgeklärt, es wird aber angenommen, dass die kationische Ladung der Domäne die Integrität der Zellmembran dieser Keime stört. Darüber hinaus wird davon ausgegangen, dass bakterielle Proteasen *in vivo* als Pathogenitätsfaktoren wirken, womit auch die C-terminale Domäne eine antimikrobielle Wirkung entfalten würde (Sallenave 2010). Weiterhin ist SLPI an der Reaktion des angeborenen Immunsystems auf das Humane Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1) beteiligt. Wie *in vitro* gezeigt werden konnte, induziert das Glykoprotein-120 (gp-120) der Virushülle eine vermehrte Transkription des *sipi*-Gens und resultiert in vermehrter Sekretion von SLPI (Jana et al. 2005). Über einen Mechanismus, der unabhängig von der proteaseinhibitorischen Aktivität ist, verringert SLPI die Infektiosität von HIV-1 gegenüber Makrophagen. Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich die Bindung an, und damit Blockade von, Annexin-II, einem Ko-Faktor für die HIV-Infektion (Ma et al. 2004).

## Modulation der Immunantwort

Die Forschung der letzten Jahre hat neue Erkenntnisse über SLPI, und andere Vertreter der WAP-Familie wie Elafin, vor allem bezüglich ihrer modulatorischen Wirkung auf das angeborene und das adaptive Immunsystem, gebracht. Während einige der Mechanismen, die hierfür eine Rolle spielen, bereits aufgeklärt werden konnten, gelang bei anderen Wirkungen bisher nur eine Beschreibung des Effektes ohne Darstellung der zu Grunde liegenden Prozesse.

So ist SLPI mit seiner antimikrobiellen Funktion nicht nur ein wichtiger aktiver Bestandteil der angeborenen Immunabwehr, es übt auch eine regulierende, limitierende Wirkung auf die infektiös bedingten Entzündungsvorgänge aus. Hierzu zählt die inhibitorische Wirkung auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB. Mulligan et al. konnten im Tiermodell für die Lunge zeigen, dass die Auswirkung von SLPI auf den Entzündungsverlauf bezüglich NFκB-Aktivierung und Rekrutierung neutrophiler Granulozyten vom Aminosäurenrest an Position 72, also im aktiven Zentrum, abhängig ist (Mulligan et al. 2000). Die Arbeitsgruppe um C. Greene konnte 2004 im Zellmodell bestätigen, dass SLPI den Abbau des Inhibitors von NFκB (IκBα und IκBβ), und damit die Aktivierung von NFκB, verhindert. Auf diesem Weg wird in Monozyten die Signalkaskade unterbrochen, über welche TLR („Toll-Like-Receptor“) -2 und -4 nach Kontakt mit bakteriellen LPS oder LTA („Lipoteichoic Acid“) eine NFκB-vermittelte Aktivierung bewirken (Greene et al. 2004). Darüber hinaus wurden direkte, von der proteaseinhibitorischen Wirkung unabhängige, Effekte auf die Wirkung von NFκB beschrieben. In Bronchialzellkulturen führte Östrogen über den Östrogenrezeptor-β zu einer gesteigerten SLPI-Expression. Die gleichzeitige Reduktion der NFκB Aktivität und IL-8-Sekretion stellte sich im „knockdown“-Modell SLPI-abhängig dar (Chotirmall et al. 2010). Die Arbeitsgruppe um Taggart konnte *in vitro* zeigen, dass SLPI in Monozyten aufgenommen wird und dort in den Zellkern gelangen kann. Über eine selektive Bindung an NFκB-bindende DNA-Abschnitte verhindert es dessen Anlagerung, unter anderem auch in der Promotorregion von IL-8 und TNF-α. Dies ist wahrscheinlich ein Mechanismus für die Inhibition von NFκB-abhängigen Aktivierungsvorgängen in Monozyten (Taggart et al. 2005). Daten aus Versuchen mit SLPI-defizienten-Mäusen unterstreichen die Bedeutung von SLPI für die Regulation der Entzündungsreaktion. Die intraperitoneale Applikation von LPS führte bei diesen Tieren zur Entwicklung eines septischen Schocks mit deutlich höherer Letalität als bei Wildtyp-Tieren (Nakamura et al. 2003).

SLPI beeinflusst auch den Ablauf der adaptiven Immunantwort. Ebenfalls im „knockout“-Mausmodell zeigte sich, dass SLPI die Reaktion von dendritischen Zellen der

Nasenschleimhaut auf die Exposition mit LPS verringert, auch hier im Kontext mit einer verminderten NF $\kappa$ B Aktivität. Dendritische Zellen in zervikalen Lymphknoten exprimierten SLPI nach Kontakt der Schleimhaut mit LPS. SLPI-defiziente Zellen dagegen produzierten vermehrt proinflammatorische Zytokine wie IL-12p70 und IL-6. In dem dadurch verursachten Zytokinmilieu kann es zu einer fehlregulierten T-Zell-Antwort auf harmlose Antigene kommen, mit der Folge einer überschießenden Immunreaktion (Samsom et al. 2007). Der Klassenwechsel von Immunglobulinen aus B-Zellen der Rachenmandel wird von benachbarten Schleimhautzellen beeinflusst, über einen Prozess der vermutlich TLR-abhängig abläuft und durch SLPI gehemmt werden kann (Xu et al. 2007). Neuere *in vitro* Studien ergaben weiterhin Hinweise auf eine Beeinflussung der Reifung dendritischer Zellen durch NE (Maffia et al. 2007, Roghanian et al. 2006), was eine Regulation der adaptiven Immunabwehr auch über die proteaseinhibitorische Komponente von SLPI möglich erscheinen lässt.

Zusammenfassend übt SLPI seine antiinflammatorische Wirkung auf verschiedenen Stufen aus: Verminderte Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Makrophagen, dadurch verringerte Freisetzung von Proteasen und ROS und gleichzeitig direkte Inhibition wichtiger Proteasen. Weiterhin verhindert SLPI eine NF $\kappa$ B-vermittelte Aktivierung von Immunzellen und bewirkt so eine geringere Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen. Außerdem zeigt es eine modulierende Wirkung auf die adaptive Immunantwort. Aus diesem Grund ist SLPI ein interessantes Protein in der Erforschung und Therapie inflammatorischer Prozesse, vor allem dann, wenn die Immunantwort einen signifikanten Beitrag zur Gewebeschädigung leistet.

### **1.3.3 SLPI im Gastrointestinaltrakt**

SLPI wird sowohl im oberen als auch im unteren Gastrointestinaltrakt konstitutiv exprimiert und leistet dort einen Beitrag zur Funktion der angeborenen Immunabwehr (si-Tahar et al. 2000, Williams et al. 2006). So wird SLPI durch verschiedene oral aufgenommene Erreger, unter anderem HIV-1, in Epithelzellen der Mundschleimhaut induziert (Jana et al. 2005). Studien der eigenen Arbeitsgruppe konnten im Ösophagus und Magen ebenfalls SLPI nachweisen. Immunhistochemische Versuche konnten zeigen, dass vor allem das Oberflächenepithel für die Sekretion des Proteaseinhibitors verantwortlich ist, während Immunzellen in der Submukosa nur gering dazu beitragen (Wex et al. 2004a, Krieg 2009, unveröffentlichte Daten). Eine Gastroösophageale Refluxerkrankung vom erosiven oder

nicht-erosiven Typ im Ösophagus führten zu keinen signifikanten Änderungen der SLPI-Expression in der Schleimhaut von Cardia oder Ösophagus (Wex et al. 2009). Ebenso wenig führen eine durch chemische Noxen, wie nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR), oder durch Autoantikörper bedingte Gastritis, zu signifikanten Veränderungen der SLPI-Expression (Hritz et al. 2006, Wex et al. 2006b).

Ein anderes Bild ergab sich dagegen bei der Antrum-dominanten Gastritis durch *H. pylori*. Diese ging bei asymptomatischen Patienten mit einer verringerten Expression von SLPI einher. Bemerkenswert war dies zum einen, weil SLPI in den meisten Fällen durch bakterielle Infektionen vermehrt exprimiert wird, und zum anderen, weil der Grad der Entzündung eine inverse Korrelation mit den gemessenen SLPI Konzentrationen aufwies (Wex et al. 2004a).

Der Verlust an SLPI korrelierte mit einer 30-fach erhöhten Elastaseaktivität in den antralen Biopsien (Wex et al. 2006a). Weitere Studien zeigten auch bei symptomatischen Patienten (gastroduodenale Ulkuserkrankung, Magenkarzinom, Dyspeptische Erkrankungen) eine deutliche Assoziation zwischen verminderten SLPI-Konzentrationen und *H. pylori* Infektion. Dagegen bestand kein nachweisbarer Zusammenhang zur symptomatischen Erkrankung und nach erfolgreicher Eradikationstherapie normalisierten sich die SLPI-Werte im Antrum (Hritz et al. 2006, Wex et al. 2006b).

Auch im mittleren und unteren Gastrointestinaltrakt scheint SLPI eine Rolle für die angeborene Immunabwehr und die Kontrolle inflammatorischer Prozesse zu spielen. So gehört das *slpi*-Gen zu der Gruppe von Genen, deren Transkription im Dünndarm bei einer akuten Infektion mit *Vibrio cholerae* gesteigert ist (Flach et al. 2007). Untersuchungen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ergaben eine deutlich gesteigerte SLPI-Expression bei Colitis ulcerosa, nicht aber bei Morbus Crohn, ein Befund der mit der Morphologie und Tiefe der Entzündung in Zusammenhang gebracht wurde (Schmid et al. 2007).

Noch unklar ist allerdings die Rolle von SLPI bei Entstehung, Invasion, Wachstum und Metastasierung von gastrointestinalen Tumoren. Cheng et al. berichteten über eine gesteigerte SLPI-Expression in Biopsien aus Magenkarzinomen und einen Zusammenhang zwischen dieser Überexpression und fortgeschrittenem Tumorwachstum, sowohl lokal als auch systemisch. In Zellkulturen fanden sie eine gesteigerte Invasivität in SLPI-überexprimierenden Zelllinien (Cheng et al. 2008). Auch in anderen malignen Tumoren wurde eine vermehrte SLPI-Expression beschrieben, unter anderem in der Lunge (Nukiwa et al. 2008), und bei gynäkologischen Malignomen (Devoogdt et al. 2004).

Andererseits liegen Daten vor die nahe legen, dass die SLPI-Expression in Lungenkarzinomzellen negativ mit ihrer Fähigkeit zur Lebermetastasierung korreliert (Wang et al. 2006b). Auch für das Ovarialkarzinom liegen widersprüchliche Daten zur Rolle von SLPI für Zellproliferation und -apoptose vor (Nakamura et al. 2008, Simpkins et al. 2008).

### 1.3.4 Regulation der SLPI-Expression und -Sekretion

#### **Genort und Regulation der Expression:**

Das *slpi*-Gen besteht aus vier Exons und drei Introns und hat eine Länge von 2,65kb (Stetler et al. 1986). Zusammen mit anderen Vertretern der Proteinfamilie mit „WAP Four Disulfide Core Domain“ (WFCD) ist das *slpi*-Gen auf Chromosom 20q12-13 lokalisiert (Nukiwa et al. 2008). Die Promotorregion enthält Abschnitte, die eine Regulation über aktiviertes Protein-1 (AP-1), „Serum-Responsive-Element“ (SRE) und „STAT-Inducible-Element“ (SIE) vermuten lassen (Velarde et al. 2005).

*In vitro* Studien haben verschiedene Mechanismen gezeigt, die an der Regulation der SLPI-Expression beteiligt sind. Als wichtige proinflammatorische Zytokine führen TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zu einer verstärkten Expression von SLPI (Devoogdt et al. 2006, Si-Tahar et al. 2000). NE wird von SLPI nicht nur inhibiert, sondern hat auch einen fördernden Effekt auf die Transkription des *slpi*-Gens (Wetering et al. 2000a). Bakteriellies LPS und LTA führen zu einer verstärkten SLPI-Expression in Makrophagen. Dies ist zum Teil durch einen über IL-6 und IL-10 vermittelten Effekt auf die Transkription des *slpi*-Gens erklärbar. Zusätzlich spielt noch ein schnell ablaufender Prozess eine Rolle in der Induktion des *slpi*-Gens, der vermutlich auf eine durch LPS ausgelöste Signalkaskade zurückzuführen ist (Jin et al. 1998). Eine mögliche Erklärung hierfür bietet ein von Ding et al. beschriebener Signalweg über den TLR-2, wobei die Vermittler der Signalkaskade in diesem Fall noch nicht identifiziert werden konnten (Ding et al. 2005). Makrophagen die mit apoptotischen Zellen interagieren, exprimieren ebenfalls vermehrt SLPI, allerdings ist auch hier der genaue Mechanismus der Regulation noch nicht aufgeklärt (Odaka et al. 2003). Eine supprimierende Wirkung auf die *slpi*-Genexpression wurde für IFN- $\gamma$  und den „Transforming Growth Factor- $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ) gezeigt (Jaumann et al. 2000, Jin et al. 1997, Luo et al. 2008, Odaka et al. 2003).



## Posttranslationale Regulation und Abbau

Neben einer Regulation der Genexpression sind auch posttranslationale Prozesse beschrieben, die einen Einfluss auf die Konzentration und Funktion von SLPI ausüben.

Während NE, wie dargestellt, eine vermehrte Produktion von *slpi*-mRNA induziert, haben verschiedene Forschergruppen eine verminderte Konzentration des sezernierten Proteins im Sputum oder Vaginalsekret von Patienten mit akuten Entzündungen gemessen (Draper et al. 2000, Hill et al. 2000). Auch *in vitro* wurden im Überstand von mit NE behandelten Zellen verringerte SLPI-Konzentrationen gemessen. Der Verlust von Protein im Überstand ging allerdings mit einem vermehrten Nachweis von Zell-gebundenem SLPI einher. Somit erschien eine verminderte Sekretion als Ursache wahrscheinlicher als eine verminderte Synthese oder ein vermehrter Abbau des Proteins (Wetering et al. 2000b). Diese Befunde könnten durch eine Bindung des Protease-Inhibitor-Komplexes an Zellmembranen erklärt werden. Zellkulturexperimente von Sullivan konnten dies bestätigen und darüber hinaus zeigen, dass Komplexe von SLPI mit NE oder auch Cathepsin G eine starke positive Ladung an der Oberfläche tragen. Somit könnte eine Bindung an negativ geladene Strukturen, wie Zellmembranen oder auch anorganische Oberflächen, auch ohne Vermittlung durch spezifische Rezeptoren zustande kommen (Sullivan et al. 2008). Aufgrund seiner durch acht Disulfidbrücken stabilisierten Tertiärstruktur ist davon auszugehen, dass SLPI gegen proteolytische Aktivität gut geschützt ist. Einige Studien konnten jedoch Umstände aufzeigen, unter denen es zur Spaltung des Proteins durch verschiedene Proteasen kam.

Weldon et al. konnten eine Spaltung von SLPI im N-terminalen Bereich in Situationen zeigen, in denen NE im Überschuss vorhanden war. Dadurch wurde die proteaseinhibitorische C-terminale Domäne jedoch nicht beeinträchtigt. Wenn SLPI und NE in äquimolaren Mengen vorlagen, konnte keine Proteolyse festgestellt werden (Weldon et al. 2009) Während natives SLPI gegen einen Abbau durch NE geschützt zu sein scheint, kann der Proteaseinhibitor in einer oxidierten Form in vermutlich zwei Fragmente gespalten werden, wovon das schwerere eine molekulare Masse von ca. 8kDa aufweist. Dies konnte *in vitro* gezeigt werden und passt zu *in vivo* Befunden, die verminderte SLPI-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von Patienten mit Lungenemphysem nachweisen konnten (Vogelmeier et al. 1991). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Cysteinproteasen Cathepsin B, L und S, die unter anderem von Makrophagen exprimiert werden, SLPI *in vitro* in drei Fragmente aufspalteten, von denen das größte eine Masse von 7,353kDa aufwies. Dies spricht für eine Spaltung zwischen den Resten 67 und 68. Eine weitere Schnittstelle lag zwischen Position 74 und 75. Die proteolytische Spaltung in so unmittelbarer Nähe des proteaseinhibitorisch aktiven Zentrums

korrelierte mit einem Verlust dieser Funktion. Auch in der BAL von Emphysem-Patienten ließ sich ein 7,5kDa großes SLPI-Spaltprodukt nachweisen, und die Spaltung von SLPI durch BAL-Flüssigkeit war durch Inhibition von Cathepsin L reduzierbar (Taggart et al. 2001). Für eine weitere Protease aus Makrophagen, die MMP-12, konnte eine proteolytische Aktivität gegen SLPI nachgewiesen werden (Ramadas et al. 2009). Auch einige bakterielle Proteasen sind in der Lage SLPI zu spalten. Hierfür liegen *in vitro* Befunde vor für Gingipaine (Arginin spezifische Cysteinproteasen) von *Porphyromonas gingivalis*, Cysteinproteasen von *Trichomonas vaginalis* und Proteasen von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* (Draper et al. 1998, Into et al. 2006, Sponer et al. 1991). In Zusammenschau finden sich also drei möglich Erklärungen für Zustände chronischer Entzündung, die nicht mit erhöhten Konzentrationen von SLPI einhergehen, sondern zum Teil mit verminderten: 1. Eine Bindung von SLPI-Elastase-Komplexen an zelluläre Strukturen. 2. Abbau durch Proteasen des Wirtes oder bakteriellen Ursprungs. 3. Vermehrte Ausschüttung von Zytokinen mit inhibitorischem Effekt auf die SLPI-Expression oder -Sekretion, wie zum Beispiel IFN- $\gamma$ .

## 1.4 Aufgabenstellung:

In der Expression des „Alarm-Proteaseinhibitors“ SLPI unterscheidet sich die *H. pylori* Infektion des Magen-Antrums von zahlreichen anderen bakteriellen und viralen Infektionen. Die verminderte Konzentration von SLPI auf Proteinebene trotz unbeeinträchtigter Mengen an *slpi*-Transkript führte zu der Arbeitshypothese, dass ein posttranslationaler Prozess die wesentliche Ursache der verminderten SLPI-Expression sein müsste. Von der Arbeitsgruppe um Wex war bereits ein Zellmodell mit Magenkarzinomzellen etabliert worden, in dem es gelungen war, die verminderte SLPI-Expression auf der Proteinebene bei gleichzeitig erhöhter *slpi*-mRNA-Synthese zu reproduzieren (Wex. et al. 2006a). Mit Hilfe dieses Zellmodells sollte nun der diesem Phänomen zugrunde liegende Mechanismus charakterisiert werden. Hierfür waren folgende Schritte vorgesehen:

1. Sicherung der Arbeitshypothese: Bestimmung des Einflusses der *H. pylori*-Infektion auf die SLPI-Konzentration bei blockierter Proteinbiosynthese, um einen Effekt durch veränderte Translation der mRNA auszuschließen
  
2. Charakterisierung posttranslationaler Prozesse, die eine Bedeutung für die SLPI-Expression haben
  - Identifizierung von Proteasen, die an der Reduktion des SLPI beteiligt sind
  - Untersuchungen zum Einfluss des oxidativen Stresses auf die SLPI-Konzentration im Zellmodell
  - Studien zur Beeinflussung der Tertiärstruktur des Proteins und ihre Rolle für die Nachweisbarkeit des SLPI im ELISA und Protease-Aktivitätsassay

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich *in vitro*-Versuche durchgeführt. Kulturen von AGS-Zellen wurden mit *H. pylori* infiziert, als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellkulturen. Zusätzlich wurden die Zellen, sowohl infizierte wie auch nicht infizierte, mit verschiedenen Substanzen inkubiert. Durch dieses Vorgehen wurde es möglich, den Einfluss dieser Substanzen auf den Effekt der *H. pylori*-Infektion bezüglich der von uns beobachteten Parameter zu beurteilen. Die Analysen erfolgten an Proteinlysaten und zum Teil am Zellkulturüberstand. In anderen Experimenten wurde rekombinantes humanes SLPI (rhSLPI) eingesetzt.

### 2.2 Kultur von AGS-Zellen

Zellen der Linie AGS (CRL-1739) entstammen einem Adenokarzinom des Magens. Die Kultivierung erfolgte in RPMI-Medium in 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (Nunclon<sup>TM</sup>, Nunc, Roskilde, Dänemark) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank (Hereaus, Hanau, Deutschland). Die Ablösung der Zellen erfolgte bei konfluent gewachsenen Kulturen mit Trypsin 1:10 in PBS für 10min im Brutschrank. Unter der Sterilbank (Hereaus Lamin air, Hereaus, Hanau, Deutschland) wurden die Zellen in ein Greiner-Röhrchen überführt, in dem bereits 10ml Medium vorgelegt waren. Nach Zentrifugation (5min, 200xg) (Rotixa/RP, Hettich AG Bäch, Schweiz) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 20ml Medium resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit der Neubauer Zählkammer (Brand, Wertheim, Deutschland) unter dem Mikroskop (Axioskop Pol, Zeiss AG, Jena, Deutschland) bei zehnfacher Vergrößerung. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in der Zählkammer ausgewertet, indem die Zellen in den vier Eckquadranten gezählt wurden.

Anschließend wurde ein jeweils 380.000 Zellen enthaltendes Volumen der Zellsuspension in sechs-„Well“-Platten (Nunclon<sup>TM</sup>Surface, Nunc, Roskilde, Dänemark) ausgesät und auf insgesamt 3ml mit Nährmedium aufgefüllt. Die weitere Inkubation erfolgte dann für 48h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, bevor die Infektion mit *H. pylori* und andere, im Folgenden beschriebene, Versuche durchgeführt wurden.

*Material: AGS-Zellen (CRL-1739) (ATCC, Manassas, USA), RPMI 1640 ohne L-Glutamin mit 10% FCS, +1% Penicillin, +1% Gentamycin; Trypsin, Dulbecco's 1x PBS (Phosphate Buffered Saline) (alle Reagenzien von PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)*

### **2.3 Kultivierung von *H. pylori***

*H. pylori* (No. 43504,) wurde auf 37°C vorgewärmte Blutagarplatten (Biomerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) für drei Tage in Anaerobiertöpfen (Merck, Darmstadt, Deutschland) unter mikroaerophilen Bedingungen (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>) bei 37°C im Brutschrank (Thermo, Hereaus, Hanau, Deutschland) inkubiert. Nach Überimpfen auf neue Platten wurden die Bakterien nach einer weiteren Bebrütungszeit von 24-48h für Zellkulturexperimente eingesetzt.

*Material: H. pylori Stamm No. 43504 (ATCC, Manassas, USA)  
Blutagarplatten (Biomerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)*

### **2.4 Infektion von AGS-Zelllinien mit *H. pylori***

Nach 24-48h Inkubation wurden *H. pylori*-Kulturen unter der Sterilbank mit einer sterilen Impföse gewonnen und in 10ml Nährmedium (RPMI-Medium mit 10% FCS, ohne Antibiotika-Zusatz) resuspendiert. Die Bestimmung der Bakteriendichte erfolgte durch Absorptionsmessung eines aliquoten Teils der Suspension bei einer Wellenlänge von 550nm (Cary 50 BIO<sup>TM</sup> (Varian, Darmstadt, Deutschland)) nach der Formel

$$1\text{OD (Optische Dichte)} = 100 \times 10^6 \text{ Bakterien/ml}$$

Vor der Infektion wurde das Medium der Zelllinien gewechselt. Das alte Medium wurde verworfen, die „Wells“ mit antibiotikafreiem Medium gespült und 2ml frisches, antibiotikafreies-RPMI-Medium zugesetzt. Die Infektion erfolgte mit 38 x 10<sup>6</sup> Bakterien/„Well“, entsprechend einer „Multiplicity Of Infection“ (MOI) von ca. 50. Abschließend wurde mit RPMI-Medium auf 3ml aufgefüllt.

Die Inkubation der infizierten Zellkulturen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für Zeiträume von 4h bis 48h.

*Material: RPMI 1640 ohne L-Glutamin mit 10% FCS (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)*

## 2.5 Zellversuche unter Zugabe von Cycloheximid (CHX), Proteaseinhibitoren und anderen Substanzen

Für den Einsatz von Cycloheximid, den Proteaseinhibitoren, Salzen zweiwertiger Metallionen sowie Resveratrol und NFκB-Inhibitor wurden diese zunächst in flüssige Lösungen gebracht. Die hierfür jeweils eingesetzten Lösungsmittel sind in Klammern mit aufgeführt. Einem Teil der Zellkulturen wurde zusätzlich zu den jeweils getesteten Substanzen *H. pylori* zugegeben, weshalb die Vorbereitung der in sechs-„Well“-Platten über 48h inkubierten Zellen wie im Abschnitt 2.4 durchgeführt wurde. Die Infektion erfolgte immer fünfzehn Minuten nach Zugabe der jeweiligen Substanz.

Sofern in einer Versuchsreihe Substanzen nicht in Aqua dest gelöst werden konnten, wurden als Kontrollen Zellkulturen, denen nur eine entsprechende Menge des jeweiligen Lösungsmittels zugesetzt war, mitgeführt. Die Werte dieser Kontrollen sind im Abschnitt Ergebnisse nicht aufgeführt, da sie sich nicht von den AGS-Kontrollen unterschieden. Die weitere Inkubation der so behandelten Zellen geschah im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> über Zeiträume zwischen 2h und 42h. Die jeweiligen Zeiten sind im Abschnitt Ergebnisse aufgeführt.

*Material: Cycloheximid (DMSO), (Calbiochem<sup>®</sup>, Merck Biosciences Ltd, Darmstadt, Deutschland)*

*Antipain (DMSO), Bestatin (Methanol), Chymostatin (20mg/ml in DMSO), Leupeptin (Aqua dest), Pepstatin (Methanol), Phosphoramidon (Aqua dest), Pefabloc (in Aqua dest), EDTA (Aqua dest bei pH 8-9), Aprotinin (Aqua dest), ALLM (in DMSO), Collagenaseinhibitor I (Ethanol), AEBSF (Aqua dest), Bestatin (DMSO), EGTA (DMSO), EST (Ethanol), Pepstatin (DMSO), MMPI-3 (DMSO), Tapi-2 (Aqua dest), alle Proteaseinhibitoren von Calbiochem<sup>®</sup> (Merck Biosciences Ltd, Darmstadt, Deutschland)*

*Resveratrol (DMSO) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland), NFκB-Activation-Inhibitor: 6-Amino-4-(4-phenoxyphenylethylamino)quinazoline (DMSO) (Calbiochem<sup>®</sup>)*

*ZnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, (alle: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland, Stammlösungen 200mM)*

*Methanol, DMSO (Dimethylsulfoxid), Aqua dest, Ethanol*

## 2.6 Zellversuche unter Zugabe von L-Buthionin-sulfoximin (BSO) und Carmustin (BCNU)

AGS-Zellen wurden, wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, in sechs-„Well“-Platten ausgesät und für 48h inkubiert. Vor der Zugabe von BSO bzw. BCNU wurden die Zellen gewaschen und das antibiotikahaltige RPMI-Medium durch antibiotikafreies RPMI-Medium ersetzt. Beide Substanzen wurden den Zellen zugesetzt und durch sorgfältiges Resuspendieren verteilt. Zur Kontrolle wurde auch eine Gruppe von Zellkulturen mit dem jeweiligen Lösungsmittel versetzt. Nach 24h Inkubation der so behandelten Zellkulturen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, erfolgte die Infektion eines Teiles der Zellkulturen mit *H. pylori*. Die Probengewinnung erfolgte dann nach weiteren 24h Inkubation.

*Material: Carmustin (1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosurea, BCNU) (in Ethanol) und L-Buthionin-sulfoximin (BSO) (in Aqua dest) (beide: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), Ethanol*

## 2.7 Probengewinnung

Nach der Inkubationsphase wurden 800µl Zellkulturüberstand in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Überstände wurden zentrifugiert (Biofuge fresco, Hereaus, Hanau, Deutschland) (10min, 4°C, 10.000xg) und anschließend 500µl Überstand in ein neues Eppendorfgefäß übertragen und bei -80°C eingefroren.

Zur Gewinnung der Zellen wurde zunächst der restliche Überstand verworfen und die adhären Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 500µl Western-Aufschluss-Puffer mit Proteaseinhibitorzusatz überschichtet, der wie folgt zusammengesetzt war:

5ml Tris 62,5mM

5ml Glycerol 10%

0,25ml Tween 0,5%

0,25ml Triton x100

0,25g SDS

39,5ml Aqua dest

1 Tablette cOplete in 300µl N,N-Dimethylformamid

Nach mehrmaligem Resuspendieren mit der Pipette wurden die abgelösten Zellen in ein Eppendorf-Gefäß übertragen und auf Eis gekühlt oder bei -80°C gelagert.

*Material: Western-Lysis-Puffer: Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), Tween, Glycerol 10% , Triton x100, SDS (alle: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), cOmplete Proteaseinhibitor-Tabletten (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), N,N Dimethylformamid (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland), 1xPBS (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)*

## **2.8 Proteinextraktion aus AGS-Zellkulturen**

Die AGS-Zellpellets wurden entweder direkt verarbeitet oder, wenn vorher eingefroren, auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (UP 200H, Dr. Hielscher GmbH, Teltow, Deutschland) über 10s zertrümmert und anschließend 10min mit 8.000xg bei 4°C zentrifugiert (Rotixa/RP, Hettich AG, Bäch, Schweiz). Abschließend wurden 400µl des Überstandes in ein neues Eppendorf-Gefäß übertragen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

## **2.9 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der Proteine**

Der Gehalt an Protein in den so gewonnenen Zelllysaten wurden mit dem Spektrophotometer Cary 50 BIO™ (Varian, Darmstadt, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 595nm bestimmt. Hierfür wurden in einer Polystyrol-Küvette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) 10µl Zelllysate mit 990µl Aqua dest verdünnt. Als Standardkurve diente eine BSA-Verdünnungsreihe mit 5-25µg/ml in Aqua dest, als Leerwert Aqua dest. Vor dem Messen wurde 1ml Farbreagenz (Advanced Protein Assay Reagent, 5-fach konzentrierte Lösung 1:5 in Aqua dest verdünnt) zugegeben und sorgfältig durch Resuspendieren vermischt. Die quantitative Bestimmung des Proteingehaltes im Zelllysate erfolgte durch Vergleich der optischen Dichten der Probe mit denen der BSA-Standardreihe.

*Material: BSA (Bovine Serum Albumin, 100x purified BSA, New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland), 5x Advanced Protein Assay Reagent (Cytoskeleton Inc., Denver, USA), Aqua dest*

## **2.10 „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) zur Quantifizierung von SLPI**

Der „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) basiert als immunologisches Nachweisverfahren auf der spezifischen Bindung einer Substanz durch Antikörper.



Ein primärer Antikörper („coating“-Antikörper) ist am Boden von „Wells“ der Polystyrol-Platte gebunden und fixiert dort das zu bestimmende Substrat. Im von uns eingesetzten ELISA-Kit, Quantikine Human (R&D Systems, Minneapolis, USA), handelt es sich dabei um einen monoklonalen Antikörper aus der Maus. In einem weiteren Arbeitsschritt wird die am Boden der „Wells“ gebundene Substanz durch einen zweiten Antikörper an einem anderen Epitop gebunden. Hier ist im ELISA-Kit von R&D-Systems ein polyklonaler „goat“-Antikörper gegen SLPI enthalten. Dieser sekundäre Antikörper ist mit einem Enzym versehen, das nach Zugabe eines Substrates eine enzymatische Farbreaktion katalysiert.

Die Messung von SLPI wurde von uns gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Wenn die zu erwartende SLPI-Konzentration in einer Probe oberhalb des Messbereichs lag, erfolgte eine 1:5 oder 1:10 Verdünnung mit RD5T „Calibrator Diluent“. Anschließend wurden 100µl der Proben in die 96-Loch-Platte, in der 100µl RD1Q „Assay Diluent“ vorgelegt waren, pipettiert. Die Bindung an den primären Antikörper erfolgte während einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken. Durch Abpipettieren der Überstände und dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatten mit Waschpuffer wurden alle nicht an den primären Antikörper gebundenen Bestandteile der Proben entfernt. Anschließend erfolgte eine weitere, zweistündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper, wiederum bei Raumtemperatur. Nach erneutem Entfernen des Überstandes und dreimaligem Waschen der Mikrotiterplatten wurde das Substrat der enzymatischen Farbreaktion zugesetzt und für 20min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der photometrischen Bestimmung der Absorption bei 450nm (Sunrise<sup>®</sup> Tecan, Männedorf, Schweiz) wurde die Farbreaktion durch 50µl „Stop Solution“ beendet.

Die Menge des entstandenen Chromogens ist proportional der Menge an gebundenem, Enzym-gekoppeltem sekundären Antikörper und somit direkt von der Menge an SLPI-Antigen in der Probe abhängig. Durch Vergleich der Farbintensität mit einer definierten Standardreihe, mit im Kit enthaltenem rekombinantem humanem SLPI (rhSLPI) aus *Escherichia coli*, kann die Menge an SLPI in der Probe quantitativ bestimmt werden. Um die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Proben zu gewährleisten, wurden alle im Zellysat ermittelten SLPI-Konzentrationen auf 50µg eingesetztes Gesamtprotein bezogen.

*Material: Quantikine Human SLPI-ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA)*

### 2.11 RNA-Extraktion aus AGS-Zellkulturen

Für die Präparation von RNA aus AGS-Zellkulturen wurde der RNeasy Mini Kit<sup>TM</sup> (Qiagen, Hilden, Deutschland) genutzt. Hierbei können bis zu 100µg RNA über die Bindung an eine „silica-gel“-Membran aus dem Probematerial extrahiert werden, während die anderen Zellbestandteile mit dem Durchfluss verworfen werden. Durch eine Selektivität für RNA-Moleküle > 200Basen wird fast ausschließlich mRNA gewonnen. Die Gewinnung und weitere Verarbeitung der Proben erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Cells, I. Spin Protocol, Qiagen). Für die Lyse wurden 500µl RLT-Puffer mit 10% Mercaptoethanol (1µl/10µl RLT-Puffer) zu den Zellen gegeben. Anschließend wurde fünf bis sieben Mal mit einer RNase-freien Pipettenspitze resuspendiert und die resultierende Suspension in ein Eppendorf-Gefäß übertragen. Eine weitere Homogenisierung erfolgte durch gründliches „Vortexen“ der Proben. Um eine Verunreinigung auch durch geringe DNA-Mengen auszuschließen, erfolgte ein DNase-Verdau auf der Säule wie im Hersteller-Protokoll empfohlen. Die Elution der gebundenen RNA erfolgte mit 2x50µl RNase-freiem Wasser. Jeweils 5µl des Eluats wurden für die RNA-Messung bzw. Gelelektrophorese verwendet. Die restliche RNA wurde bei -80°C gelagert.

*Material: RNeasy Mini Kit<sup>TM</sup> (Qiagen, Hilden, Deutschland), 14,3M β-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland), 70% Ethanol*

### 2.12 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration in den Proben wurde UV-spektrometrisch (GeneQuant<sup>TM</sup>, GE, München, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Nach Einstellung des Nullwertes mit RNase-freiem Wasser wurden die Proben 1:2 mit RNase-freiem Wasser verdünnt gemessen. Eine optische Dichteeinheit (OD) entspricht dabei 40µg RNA/ml, so dass sich die RNA-Konzentration in µg/ml in den Proben nach der Formel

$$x = OD_{260nm} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

berechnen ließ. Der Reinheitsgrad der Proben konnte durch den Quotienten  $OD_{260nm} / OD_{280nm}$  bestimmt werden, wobei Werte >1,8 und <2,2 für eine gute Qualität der RNA sprechen.

### 2.13 Agaroseelektrophorese für RNA

Um die Integrität der extrahierten RNA zu prüfen, wurde eine Elektrophorese in 1%-igem Agarosegel durchgeführt. 1g Agarose wurde in 100ml 1xTBE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt bis die Agarosepartikel vollständig aufgelöst waren. Der abgekühlten Lösung wurden 10µl Ethidiumbromid zugesetzt, bevor sie blasenfrei in den Gelschlitten gegossen wurde. Das erstarrte Gel wurde mit 1xTBE-Puffer überschichtet und 3µl RNA, gemischt mit 1µl TBE-Puffer, in die Taschen pipettiert. Unter konstanter Spannung von 85V wurden die Proben über 60min aufgetrennt und abschließend unter UV-Licht fotografiert.

*Material: Agarose (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 1xTBE-Puffer (0,09M TRIS/HCL, 0,09M Borsäure, 2mM EDTA, pH 8,0), 1% Ethidiumbromid ((10mg/ml) Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)*

### 2.14 Reverse Transkription der RNA

Für die weiteren Untersuchungen wurde die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Das Enzym AMV Reverse Transkriptase (AMV RT) fungiert als RNA-abhängige DNA-Polymerase und wurde für diesen Zweck genutzt. Für den Start der Transkription wird ein kurzes Oligonukleotid („Primer“) benötigt. Die eingesetzten „Random“ Primer binden unselektiv und zufällig an eine beliebige RNA-Sequenz, so dass unterschiedlich lange cDNA-Einzelstränge entstehen. Eventuell noch in den Proben vorhandene RNasen wurden durch Zugabe eines Inhibitors inaktiviert.

Anhand der Ergebnisse der photometrischen RNA-Konzentrationsmessung wurde das Volumen der Probe eingesetzt, das 500ng RNA enthielt, und mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12,7µl aufgefüllt. Schließlich wurden der Probe 7,3µl von einem „Mastermix“ zugegeben, dessen Zusammensetzung im Folgenden aufgeführt ist:

- 4µl AMV-RT 5xReaktionspuffer
- 1µl AMV-Reverse Transkriptase
- 0,8µl dNTP-Mix (je 10mM)
- 1µl „Random“-Primer (0,04 A260U/µl)
- 0,5µl Recombinant-Rnasin® Ribonuclease Inhibitor (40U/µl)

Die Ansätze wurden für 45min bei 42°C im Thermoblock (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) unter Schütteln inkubiert. Die Inaktivierung der reversen

Transkriptase erfolgte bei 95°C für 10min. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf 4°C gekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

*Material: AMV-Reverse Transkriptase (Promega, Mannheim, Deutschland), AMV-RT 5xReaction Buffer (Promega), Recombinant-Rnasin<sup>®</sup>Ribonuclease Inhibitor 40U/μl (Promega), peqGold dNTP-Set 10mM je Nukleotid (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland), Random Primer p(dN)6-0,04 A260 U/μl (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland),*

## 2.15 Quantitative „Real-Time“-PCR

Für die quantitative Bestimmung der cDNA-Konzentration in den Proben wurde eine „Real-Time“-PCR-Analyse mit einem iCycler iQ<sup>®</sup> (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) durchgeführt. Diese Methode ermöglicht die Quantifizierung von DNA über Fluoreszenzmessung während der DNA-Synthese. Wir verwendeten den Kit QuantiTect<sup>®</sup>SYBR<sup>®</sup>Green PCR (Qiagen, Hilden, Deutschland), und damit einen Fluoreszenzfarbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Durch die Bindung an doppelsträngige DNA kann der Farbstoff SYBR<sup>®</sup>Green durch Licht der Wellenlänge 494nm zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Spezifität der „Real-Time“-PCR wird bei dieser Methode durch den Einsatz spezifischer Primer erreicht. Somit werden nur die gewünschten cDNA-Abschnitte amplifiziert und die Fluoreszenzintensität ist proportional der Menge an Amplifikationsprodukt in der jeweiligen Probe. Durch Fluoreszenzmessung lässt sich dann, im Vergleich mit einem mitgeführten Plasmid-Standard, die Menge an spezifischer mRNA in einer Probe berechnen.

Zusätzlich zum slpi-Transkript wurde die β-actin-mRNA als konstitutiv exprimiertes „housekeeping-gene“ bestimmt. Die Expression dieses Gens unterliegt kaum Regulationsmechanismen und wird daher als Marker für die generelle Transkriptionsrate in den Proben eingesetzt. Folgende Primer wurden von uns genutzt (in Klammern: Größe des Amplifikationsproduktes):

slpi (203bp)

forward: 5' CAG ATG GAT GGC CAG TGC AAG C 3'

reverse: 5' GCT GTG TGC CAA GCC TTT CCC 3'

$\beta$ -actin (400bp)

forward: 5' CAT GCC ATC CTG CGT CTG GAC C 3'

reverse: 5' ACA TGG TGG TGC CGC CAG ACA G 3'

Der PCR-Ansatz wurde folgendermaßen zusammengestellt:

15 $\mu$ l 2xQuanti-Tect SYBR-Green Master Mix<sup>®</sup>

0,2 $\mu$ l Primer forward (50 $\mu$ M)

0,2 $\mu$ l Primer reverse (50 $\mu$ M)

3 $\mu$ l cDNA

11,6 $\mu$ l RNase-freies Wasser

Alle weiteren Arbeitsschritte wurden entsprechend des Hersteller-Protokolls für den iCycler iQ<sup>®</sup> durchgeführt. Durch Erhitzen auf 95°C für 15min wurde die „HotStarTaq“ Polymerase aktiviert. Anschließend wurden 40 Zyklen nach folgendem Schema durchlaufen: Denaturierung der DNA (15s, 94°C), anschließend Annealing der spezifischen Primer an komplementäre cDNA-Sequenzen (30s, *slpi* bei 58°,  $\beta$ -actin bei 60°C) als Startpunkt für die Elongation des komplementären DNA-Strangs durch die Taq Polymerase (30s, 72°C). In die dadurch entstehenden Doppelstränge interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff, so dass jeweils am Ende dieser Phase des Zyklus auch die Fluoreszenzintensität gemessen wird.

Abschließend wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese auf ihre Spezifität kontrolliert (Abschnitt 2.16)

*Material: QuantiTect<sup>®</sup>SYBR<sup>®</sup>Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), slpi Primer (BioTeZ, Berlin, Deutschland),  $\beta$ -actin Primer (Operon Biotechnologies GmbH, Köln, Deutschland)*

## 2.16 Agarosegelelektrophorese für cDNA

Zur Kontrolle der Spezifität der „Real Time“-PCR wurde die amplifizierte cDNA elektrophoretisch aufgetrennt. 1,8g Agarose wurden in 100ml 1xTAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle erhitzt. Das resultierende 1,8%-ige Agarosegel wurde blasenfrei in einen Gelschlitten gegossen und nach dem Aushärten für 10min in ein Färbebad mit Ethidiumbromid verbracht. In der Elektrophoresekammer wurde das Gel mit 1xTAE-Laufpuffer überschichtet und 5 $\mu$ l PCR-Produkt, gemischt mit 3 $\mu$ l Auftragspuffer, in die Geltaschen gegeben. Ein DNA-Längenstandard wurde mitgeführt um die spezifische

Basenpaarlänge der cDNA-Fragmente nachzuweisen. Die Auftrennung erfolgte bei 80V für 2h. Die DNA-Banden wurden mit einem Transilluminator (Herolab, Biometra, Göttingen, Deutschland) sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

*Material: Agarose (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 1% Ethidiumbromid (10mg/ml), DNA-Molekulargewichtsmarker: 100bp DNA-Leiter (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 1xTAE-Puffer: 20ml 50xTAE-Puffer auf 1l Aqua dest (50xTAE-Puffer: 2,0M Tris, 100ml 0,5M Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8,0), 57,1ml 100%ige Essigsäure, mit Aqua dest auf 1l aufgefüllt), DNA-Auftragspuffer (30% Glycerol, 0,25% Bromphenolblau, 1xTAE-Puffer)*

## 2.17 Immunfluoreszenzfärbung

AGS-Zellen wurden in RPMI-Medium (+ 10% FCS) in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen/ml auf Deckgläschen ausgesät und für 24h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zugabe von EGTA und Infektion mit *H. pylori* (MOI=50) erfolgte wie in Kapitel 2.4 beschrieben. Zur Kontrolle dienende Zellkulturen wurden nicht mit *H. pylori* infiziert bzw. nicht mit EGTA versetzt. Nach Inkubation für weitere 24h wurde das Medium entfernt, die Zellen dreimal mit 1xPBS gewaschen und anschließend mit PFA 3,7% und 0,025% Glutaraldehyd in 1xPBS (pH 7,4) für 10min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde erneut mit 1xPBS (pH 7,4) je dreimal 5min gewaschen. Um die Zellmembranen durchlässig für die Antikörper zu machen, wurden die Zellen mit 0,2% TritonX-100 in 1xPBS (pH 7,4) „permeabilisiert“. Wieder wurde dreimal mit 1xPBS (pH 7,4) für 5min gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurden die Zellen für 30min bei Raumtemperatur mit Albumin Fraktion V inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1xPBS (pH 7,4) wurde polyklonales SLPI-Antiserum („rabbit“, 1:400 in PBS) zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde erneut zweimal mit 1xPBS (pH 7,4) gewaschen und mit Albumin Fraktion V blockiert. Mit dem sekundären Antikörper („goat“ anti-rabbit FITC 307F IgG, 1:1000 in PBS) wurde für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde zweimal mit 1xPBS gewaschen und mit PFA 3,7% und 0,05% Glutaraldehyd in 1xPBS für 10min bei Raumtemperatur ein zweites Mal fixiert. Abschließend wurde mit 1xPBS gewaschen (3x5min 1xPBS pH 7,4; ein Mal mit 1xPBS pH 8,9) und die Zellen mit Vectashield<sup>™</sup> Fluoreszenz-Erhaltungspuffer eingebettet.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte bei 100-facher Vergrößerung (LEICA DMRE7, Wetzlar, Deutschland) und wurde mit einer CCD-Kamera (Spot RT, Diagnostik Instruments, Bourroughs, USA) dokumentiert.

*Material: polyklonales SLPI-Antiserum (rabbit)(eigenes Labor, Wex et al. 2006a), anti-rabbit FITC (Fluoreszin Isothiocyanat)307F Antikörper (Chemicon/Millipore, Billerica, USA), 1xPBS, pH 7,4, 1xPBS, pH 8,9 (beide: PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), 0,2% TritonX100 in 1xPBS (pH 7,4), Albumin Fraktion V (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), Fluoreszenz-Erhaltungspuffer: 2,45ml Vectashield™ (Vector Laboratories, Burlingame, USA) + 2,45ml Glycerol (Merck, Darmstadt, Deutschland) + 100µl Dabcco (125mg) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland), PFA (Paraformaldehyd) (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz), Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich)*

## 2.18 Western-Blot für SLPI

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben erfolgt bei dieser Methode der spezifische Nachweis eines Proteins über eine Bindung durch Antikörper. Hierfür müssen die Proteine vom Sammelgel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden, auf der dann schließlich die Antigen-Antikörper-Reaktion stattfindet. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgt entsprechend ihrer molekularen Masse, unabhängig von ihrer Konformation und Ladung, die durch SDS („Sodium Dodecyl Sulphate“) aufgehoben werden. Die Übertragung der Proteine auf die Membran folgt einem elektrischen Gradienten. Die spezifischen primären Antikörper werden schließlich über eine, an sekundäre Antikörper gebundene, enzymatische Farbreaktion sichtbar gemacht.

Die Trennung erfolgte in 20% igem Acrylamidgel, das aus folgenden Komponenten hergestellt wurde:

- 3,4ml Acrylamid 30%
- 1,3ml Tris 1,5M, pH 8,8
- 50µl SDS 10%
- 50µl APS 10%
- 10µl TEMED
- 1ml Aqua dest

Nachgeschaltet war ein Sammelgel mit folgender Zusammensetzung:

- 0,5ml Acrylamid 30%
- 0,38ml 1,0M Tris, pH 6,8
- 30µl SDS 10%
- 30µl APS 10%
- 5µl TEMED
- 2,1ml Aqua dest

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt und bei 96°C für 5min im Thermomixer (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Es wurden 15µl pro Tasche eingesetzt (10µl Probe + 5µl Probenpuffer). Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden 5µl eines Protein-Standards mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei 80V über ca. 2h in der Elektrophoresekammer (Biostep, Jahnsdorf, Deutschland) in Laufpuffer.

Anschließend erfolgte der eigentliche „Blot“, der elektrophoretische Transfer der aufgetrennten Proben auf eine Nitrozellulosemembran (PDVF Transfer Membrane, ThermoFischer Scientific, Rockford, USA). Hierfür wurde das Trenngel auf die Nitrozellulosemembran gelegt und zusammen mit Filterpapier (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und Schwämmchen zur Polsterung in eine Blotting-Kassette gepackt. In einer mit Westernpuffer gefüllten, eisgekühlten Kammer (Biostep, Jahnsdorf, Deutschland), wurde der Transfer bei 100V über 1h durchgeführt.

Zur Blockade unspezifischer Antigene auf der Membran wurde diese für 1h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit 5%-iger Albumin Fraktion V inkubiert. Anschließend wurde der anti-SLPI-Antikörper („goat“-IgG, R&D Systems, Minneapolis, USA) aufgetragen (1:1000 in Glycin) und unter leichtem Schütteln für 24h bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem Auftragen des sekundären Antikörpers gegen „goat“-IgG („rabbit“-IgG, Jackson ImmunoResearch) wurde die Membran dreimal für 10min mit TBST 0,1% gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:10.000 in Glycin) erfolgte für 1h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Nach erneutem Waschen mit TBST 1% (4x15min, RT, 10rpm) wurde die Membran durch Zugabe von 500µl des Substrates (Super Signal® West Dura, Extended Duration Substrate, ThermoFisher Scientific, Rockford, USA), für die an den sekundären Antikörper gebundene Peroxidase, gefärbt. In der Dunkelkammer wurde ein Film (Kodak BioMax, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) für 10sek belichtet.



*Material: primärer Antikörper: human SLPI specific goat IgG (R&D Systems, Minneapolis, USA), sekundärer Antikörper: Peroxidase-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Rabbit Anti-Goat IgG (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, England), rhSLPI (R&D Systems), Acrylamid 30% (BIO RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland.), Albumin Fraktion V, mindestens 98% proteasefrei, Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), TEMED (Tetramethylethyldiamin), APS (Ammoniumpersulfat), TBS (Tris-buffered Saline), Tween, Glycin (alle: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 1xPBS (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland), Protein-Standard (Fermentas SM 1811, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), Laufpuffer: Tris-Glycin 10x (100ml/l), SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) 10% (10ml/l), Aqua dest (890ml/l), Westernpuffer: Tris-Glycin 10x (100ml/l), Methanol (100ml/l), Aqua dest (800ml/l)*

### **2.19 Versuche mit „Tris[2-carboxyethyl]phosphine hydrochloride“ (TCEP-HCl), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und rekombinantem humanem SLPI (rhSLPI)**

Kristallines TCEP-HCl wurde in Aqua dest gelöst. Die resultierende 1M Stammlösung wurde für die Versuche in 96-„Well“-Platten (Nunc Surface<sup>®</sup>, Nunc, Roskilde, Dänemark) mit RD5T-Puffer aus dem SLPI-ELISA Kit verdünnt. Das rhSLPI stammte ebenfalls aus dem SLPI-ELISA Kit und war in RD5T-Puffer entsprechend der Herstellerangaben zur Vorbereitung der SLPI-Standardreihe gelöst. Die resultierenden Endkonzentrationen sind im Abschnitt Ergebnisse aufgeführt. Die Inkubation erfolgte über die angegebenen Zeiträume bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln.

Für die in *Abbildung 14* dargestellten Versuche wurde rhSLPI zu den TCEP-Verdünnungen pipettiert. Die Proben wurden in vier Gruppen, jeweils als Doppelbestimmung, unterteilt. Die erste Gruppe wurde nach 2h Inkubation von rhSLPI mit TCEP in Eppendorf-Gefäße verbracht und bei -80°C bis zur weiteren Analyse eingefroren. Zwei der drei verbliebenen Gruppen wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5mM bzw. 15mM Endkonzentration) versetzt, während der verbliebenen Gruppe eine entsprechende Menge RD5T-Puffer als Kontrolle zugegeben wurde. Nach weiteren 6h Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln wurden auch diese Proben bis zur weiteren Analyse eingefroren. Die Messung des SLPI-Gehaltes erfolgte mittels ELISA gemäß dem Protokoll des Herstellers

*Material: Tris[2-carboxyethyl]phosphine hydrochloride (TCEP-HCl) (ThermoFisher Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, USA), rhSLPI, RD5T-Puffer (beide aus Quantikine® Human SLPI-ELISA, R&D-Systems, Minneapolis, USA), Aqua dest*

## **2.20 „Human Neutrophil Elastase“ (HNE)-Aktivitätsmessung**

Der Einfluss von TCEP auf die Fähigkeit von rhSLPI die Aktivität der Elastase zu inhibieren, wurde mit Hilfe eines standardisierten HNE-Aktivitäts-Assays untersucht. Bei diesem Verfahren wird HNE durch monoklonale Antikörper am Boden der 96-„Well“-Platten gebunden, so dass im nächsten Schritt, nach Inkubation bei Raumtemperatur, alle anderen Bestandteile der Proben durch viermaliges Waschen entfernt werden können. Die Aktivität der Elastase wird über die proteolytische Freisetzung von 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) aus einer Verbindung mit dem Oligopeptid MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val bestimmt. Diese Freisetzung erfolgt quantitativ in Abhängigkeit von der enzymatischen Aktivität der gebundenen Elastase. Die Menge an freiem AMC wurde fluoreszenzphotometrisch durch Vergleich mit einem definierten AMC-Standard bestimmt. Alle Reagenzien wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers vorbereitet, wobei als HNE-Standard 1ng/ml eingesetzt wurde. Mit Ausnahme der für den Nullwert und den AMC-Standard benötigten „Wells“ wurden sowohl für den HNE-Standard als auch für die Proben 100µl der 1ng/ml enthaltenden Standard-Lösung eingesetzt. Nach 1h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die „Wells“ gewaschen und 50µl rhSLPI-Lösung, die zum Teil mit TCEP versetzt worden war, sowie 50µl 1X Substrat zugegeben. Hierfür waren sowohl rhSLPI als auch die TCEP-HCl-Lösung (1M) mit Elastase-Assay-Puffer verdünnt und dann über 2h bei Raumtemperatur inkubiert worden, analog zum in Abschnitt 2.19 beschriebenen Vorgehen. Als Kontrolle für die Elastase-Aktivität diente der HNE-Standard, dem Assay-Puffer ohne rhSLPI oder TCEP zugegeben wurde. Die Inkubation mit MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val AMC erfolgte, bei luftdicht verschlossener Assay-Platte, über 24h bei 37°C im Brutschrank (Hereaus, Hanau, Deutschland). Die Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzphotometer (GENios<sup>Tm</sup>, Tecan, Männedorf, Schweiz) gemäß dem Protokoll des Herstellers unter Kalibrierung gegen den AMC-Standard.

*Material: InnoZyme™ Human Neutrophil Elastase Immunocapture Activity Assay Kit (Calbiochem®, Merck, Darmstadt, Germany), rhSLPI ( aus Quantikine® Human SLPI-ELISA, R&D-Systems, Minneapolis, USA), TCEP-HCl (ThermoFisher Scientific, Rockford, USA)*

## 2.21 Statistische Analyse

Bis auf erste Vorversuche zur Wirkung von TCEP auf rhSLPI, den SLPI-ELISA und den HNE-Assay, wurden alle im Folgenden dargestellten Experimente als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Sofern die erste Versuchsreihe eindeutige Ergebnisse ergab und diese eine weitere Untersuchung des Sachverhaltes nicht sinnvoll erschienen ließ, wurde auf eine Wiederholung eines identischen Versuchsaufbaus verzichtet. Dies war der Fall bei den Untersuchungen zur Wirkung variierender Metallionenkonzentrationen auf die SLPI-Expression im Zellmodell.

Alle anderen Experimente wurden in zwei bis vier unabhängigen Versuchsansätzen jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt.

Eine statistische Auswertung erfolgte mit dem zweiseitigen t-Test für unabhängige Stichproben, allerdings nur wenn mindestens vier unabhängige Messwerte vorlagen. In allen Versuchsreihen ergab sich eine eindeutige Reduktion der SLPI-Expression in *H. pylori*-infizierten Zellkulturen, die jeweils als Kontrolle mitgeführt wurden. Dieser aus den Vorstudien bekannte Effekt wurde daher nicht in den einzelnen Versuchsansätzen statistisch betrachtet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Einfluss der *H. pylori*-Infektion auf die SLPI-Expression im Zellkulturmodell

##### 3.1.1 SLPI-Verlust in *H. pylori*-infizierten AGS-Zellkulturen bei inhibierter Proteinbiosynthese

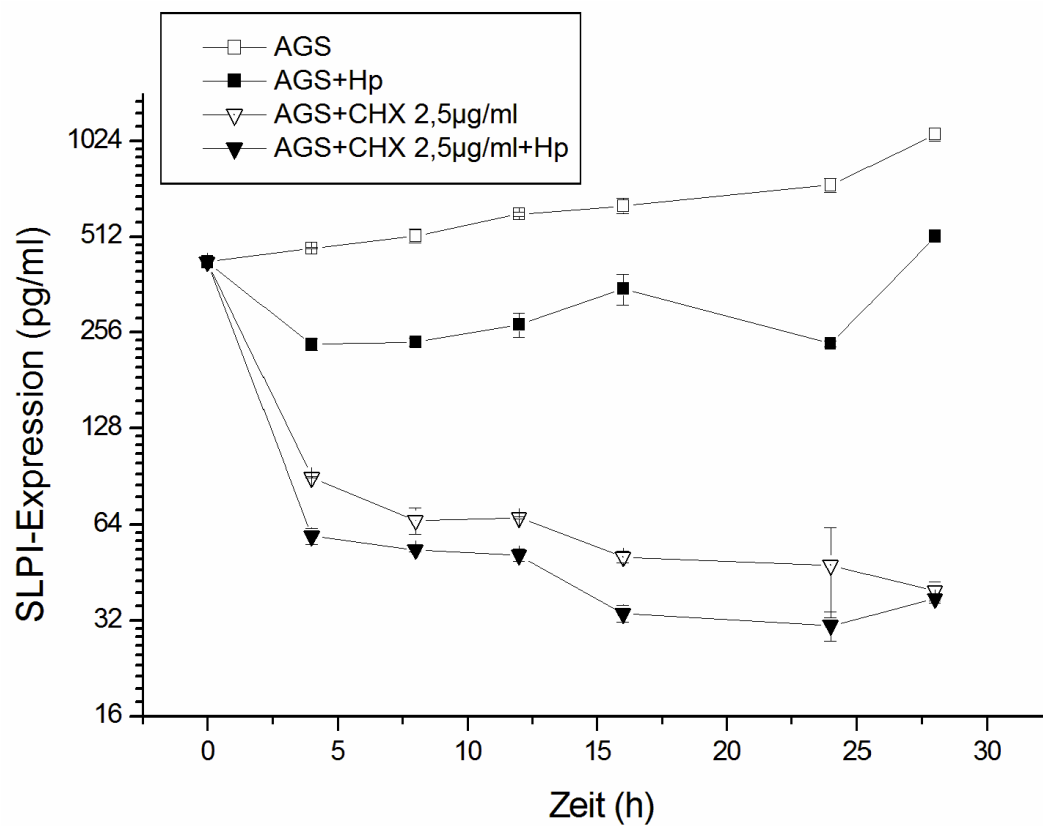
Um den Einfluss der *H. pylori*-Infektion auf die Expression von SLPI im verwendeten Zellmodell eingehender zu untersuchen, wurde die Konzentration von SLPI in Gegenwart des Proteinbiosyntheseinhibitors Cycloheximid (CHX) untersucht. CHX ist eine heterocyclische Verbindung, die durch Enzyminhibition eine Verlängerung der Peptidkette am Ribosom eukaryontischer Zellen verhindert. Durch Inkubation von AGS-Zellen mit CHX konnte die Translation und damit die *de novo*-Synthese von SLPI konzentrationsabhängig vermindert werden. So wurden Rückschlüsse auf posttranslationale Veränderungen der SLPI-Konzentration möglich, da *H. pylori*-induzierte Veränderungen der *de novo*-Synthese ausgeschlossen wurden.

Für den dargestellten Versuch wurden AGS-Zellen zwischen vier und 28 Stunden in Gegenwart von CHX und/oder *H. pylori* inkubiert und die Zellkulturüberstände und Zellysate für nachfolgende Analysen gewonnen. Wie in *Abbildung 1* ersichtlich, ergaben sich folgende Befunde: Für die als Kontrolle unbehandelten AGS-Zellen zeigte sich eine konstante Zunahme der SLPI-Konzentration. Im Zellpellet betrug die durch Infektion mit *H. pylori*-induzierte Abnahme der SLPI-Konzentration gegenüber den Kontrollen durchschnittlich 53,7% ( $\pm 7,9\%$ ) und war bereits nach vier Stunden fast vollständig ausgeprägt. Der Verlust an SLPI im Vergleich mit den nicht infizierten Zellen blieb im weiteren zeitlichen Verlauf relativ konstant.

Wurde die Proteinbiosynthese durch die Inkubation der AGS-Zellen mit CHX inhibiert, ergaben sich die folgenden Befunde: Die messbare Konzentration von SLPI im Zellpellet war bereits nach vier Stunden um 80,9% reduziert und fiel in den darauf folgenden Stunden nur noch langsam ab, bis zu einer maximalen Reduktion von 96,3% gegenüber den Kontrollen. Die Infektion der mit CHX-behandelten Zellen mit *H. pylori* resultierte in einem noch stärkeren Rückgang von SLPI im Zellysate. Die SLPI-Konzentration lag in diesen Proben durchschnittlich 91,5% ( $\pm 3,73\%$ ) unter den Kontrollen und 24,7% ( $\pm 12,3\%$ ) unter den ausschließlich mit CHX-behandelten Proben. Zu beachten gilt hier, dass sich in Gegenwart

von CHX die *H. pylori*-bedingten Veränderungen auf einem deutlich niedrigeren Expressionsniveau abspielten.

Durch diesen Versuchsaufbau konnten drei verschiedene Aspekte demonstriert werden: Erstens war die verminderte Expression von SLPI in *H. pylori*-infizierten Zellen bereits nach vier Stunden in nahezu voller Ausprägung nachweisbar. Zweitens blieb das Niveau der SLPI-Expression in den infizierten Zellkulturen dauerhaft und stabil unter dem Niveau der nicht infizierten Zellkulturen. Drittens blieben die beiden vorgenannten Aspekte auch dann nachweisbar, wenn die Proteinbiosynthese der AGS-Zellen inhibiert wurde.

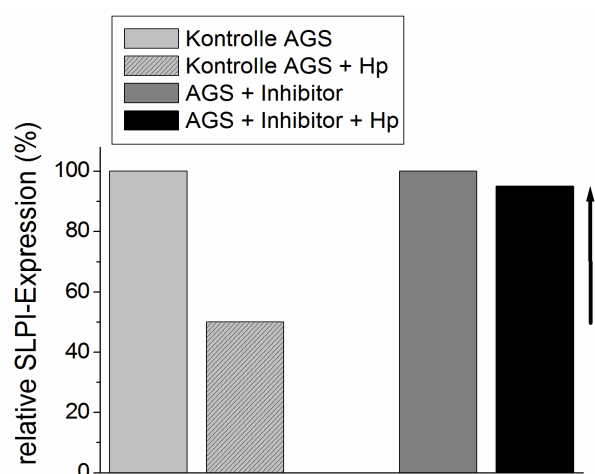


**Abbildung 1: SLPI-Expression bei Inkubation mit Cycloheximid.** Die SLPI-Konzentrationen im Zelllysate sind im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die unterschiedlichen Versuchsansätze sind als Rechtecke bzw. Dreiecke illustriert. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte, die dazugehörigen Standardabweichungen sind durch Balken gekennzeichnet. Die absolute SLPI-Konzentration in pg/ml, bezogen auf 50µg eingesetztes Gesamtprotein, ist auf der Y-Achse logarithmisch aufgetragen. Die Infektion mit *H. pylori* führte in den nicht mit CHX behandelten Zellen zu einer durchschnittlichen Reduktion der SLPI-Expression um 53,7% ( $\pm 7,9\%$ ), in den mit CHX behandelten Zellen um 24,7% ( $\pm 12,3\%$ ).

### 3.1.2 Einfluss von gruppenspezifischen Proteaseinhibitoren auf die *H. pylori*-induzierte Abnahme der SLPI- Expression im AGS-Zellkulturmodell

Basierend auf der Annahme eines posttranslationalen Mechanismus, sollte ein möglicher proteolytischer Abbau des SLPI überprüft werden. Im von uns gewählten Versuchsaufbau wurden AGS-Zellkulturen mit verschiedenen Proteaseinhibitoren versetzt und zu einem Teil mit *H. pylori* infiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Bestimmung der SLPI-Konzentrationen im Zelllysat mittels ELISA. Ziel dieser Experimente war es, Proteaseinhibitoren zu identifizieren, welche den durch die *H. pylori*-Infektion verursachten Verlust von SLPI verhinderten. So sollten Rückschlüsse auf beteiligte Proteasen möglich werden.

Abbildung 2 soll die von uns, für einen in dieser Weise wirkenden Proteaseinhibitor, erwarteten Ergebnisse schematisch illustrieren. Um eventuelle zytotoxische Einflüsse der Proteaseinhibitoren oder der Lösungsmittel auf die Zellkulturen identifizieren zu können, wurden die Zellkulturen auch in Abwesenheit von *H. pylori* sowohl mit den ausgewählten Substanzen als auch mit den verwendeten Lösungsmitteln inkubiert.

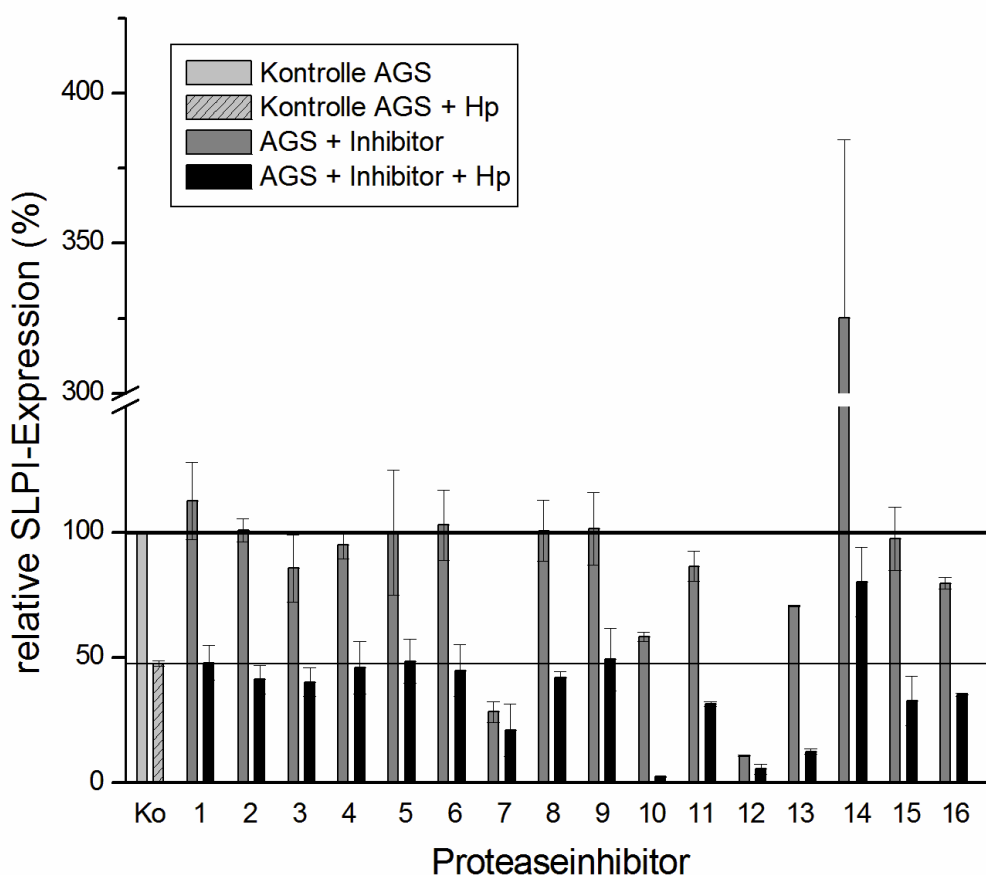


**Abbildung 2: Schematische Darstellung der erwarteten Ergebnisse.** Wird eine an der *H. pylori*-vermittelten Verminderung der SLPI-Expression (linker Teil der Abbildung) beteiligte Protease durch den eingesetzten Proteaseinhibitor in ihrer Aktivität gehemmt, sollte der Einfluss einer *H. pylori* Infektion auf die SLPI-Expression signifikant vermindert werden (rechter Teil der Abbildung). Der Pfeil verdeutlicht den Effekt eines wirksamen Proteaseinhibitors.

Zunächst wurde ein „Screening“ durchgeführt, in dem in sechzehn Ansätzen insgesamt vierzehn verschiedene Protease-inhibitoren eingesetzt wurden. Die SLPI-Gehalte wurden ausschließlich im Zelllysat bestimmt, da der von uns untersuchte Effekt in den vorangegangenen Untersuchungen sowohl im Zellpellet als auch im Überstand nachweisbar war. In *Liste 1* sind die verwendeten Proteaseinhibitoren angegeben. Ausgewählt wurden Inhibitoren, deren Wirkung gruppenspezifisch und weniger auf einzelne Proteasen beschränkt ist. Weitere Auswahlkriterien waren hohe Zellpermeabilität und geringe Zytotoxizität. *Abbildung 3* zeigt die resultierenden SLPI-Konzentrationen nach 24 Stunden Inkubation.

**Liste 1:** Aufgeführt sind die im Screening verwendeten Proteaseinhibitoren mit den entsprechenden Endkonzentrationen (in Klammern) sowie die jeweils inhibierten Gruppen von Proteasen

- |  |  |
|--|--|
| 1. <b>Antipain</b> (29,6µM)            | Ca <sup>2+</sup> -abhängige Endopeptidasen, Trypsin-ähnliche Serinproteasen und Papain-ähnliche Cathepsine |
| 2. <b>Bestatin</b> (3,2µM)             | Aminopeptidasen ("broad spectrum")   |
| 3. <b>Chymostatin</b> (33,3µM)         | Chymotrypsin-ähnliche Serinproteasen, Cysteinproteasen   |
| 4. <b>Leupeptin</b> (2µM)              | Trypsin-ähnliche Serinproteasen, Cysteinproteasen  |
| 5. <b>Pepstatin A</b> (1,4µM)          | Aspartatproteasen (Cathepsin D, Renin, Pepsin)   |
| 6. <b>Phosphoramidon</b> (34µM)        | Thermolysin, Endothelin-abbauende Proteasen, einige Metalloproteasen                                       |
| 7. <b>Pefabloc</b> (400µM)             | Serinproteasen ("broad spectrum")  |
| 8. <b>EDTA</b> (0,5mM)                 | Metalloproteasen ("broad spectrum")  |
| 9. <b>Aprotinin</b> (1,5µM)            | Serinproteasen ("broad spectrum")  |
| 10. <b>ALLM</b> (1µM)                  | Calpaine, verschiedene Papain-ähnliche Cathepsine  |
| 11. <b>Collagenaseinhibitor</b> (45µM) | Collagenasen ("broad spectrum")  |
| 12. <b>AEBSF</b> (1,67mM)              | Serinproteasen ("broad spectrum")  |
| 13. <b>Bestatin</b> (121µM)            | Aminopeptidasen  |
| 14. <b>EGTA</b> (1mM)                  | Metalloproteasen ("broad spectrum")  |
| 15. <b>EST</b> (11,3µM)                | Calpaine   |
| 16. <b>Pepstatin A</b> (14,3µM)        | Aspartatproteasen  |



**Abbildung 3: Relative SLPI-Konzentrationen im Lysat von AGS-Zellen in Gegenwart verschiedener Proteaseinhibitoren.** Zur leichteren Orientierung sind die SLPI-Niveaus der Kontrollen, AGS ohne *H. pylori* bzw. AGS mit *H. pylori*, durch horizontale Linien markiert. Die Säulen repräsentieren jeweils die Mittelwerte zweier unabhängiger Messungen, die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken repräsentiert. Die Proteaseinhibitoren sind durch Nummern repräsentiert und in *Liste 1* detailliert aufgeführt. Für die Kontrollen ergab sich eine *H. pylori*-bedingte Reduktion der SLPI-Expression auf 47,7% ( $\pm 1,2\%$ ). Absolute Werte der Kontrollen bezogen auf 50µg Gesamtprotein: 997pg/ml ( $\pm 91$ ).

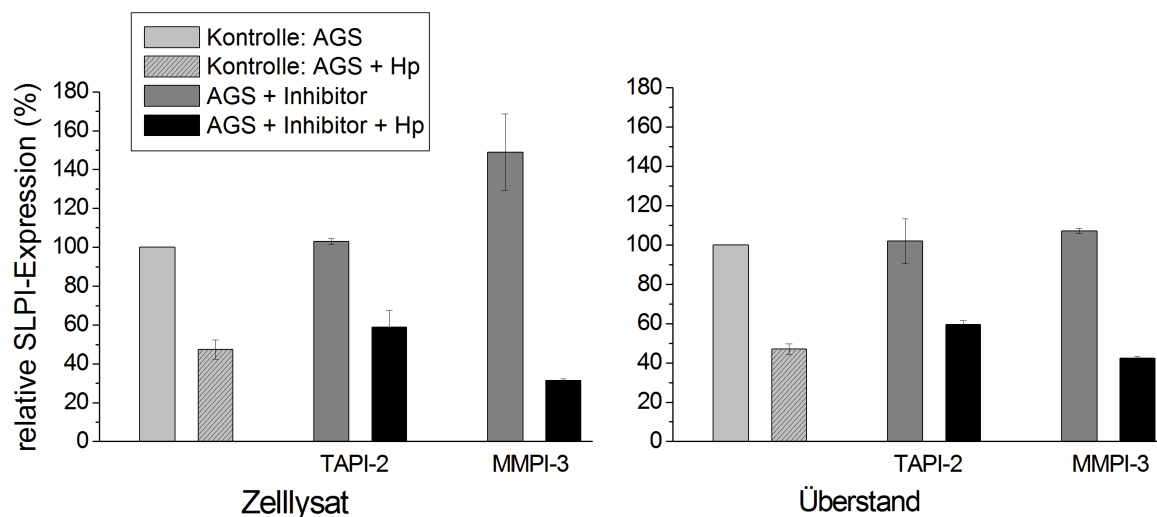
Die Lösungsmittel Methanol, Ethanol und DMSO zeigten keinen Einfluss auf die SLPI-Expression (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich mit den Kontrollen ließ sich für den größten Teil der Proteaseinhibitoren kein Effekt auf die SLPI-Expression nachweisen. Auffällig sind die Effekte von Pefabloc (Nr. 7) und AEBSF (Nr. 12), bei denen sich bereits in alleiniger Gegenwart des Inhibitors eine deutliche Reduktion der SLPI-Gehalte zeigte. Dies ist am wahrscheinlichsten auf eine zytotoxische Wirkung der eingesetzten Proteaseinhibitoren zurückzuführen. In den Ansätzen mit EGTA (Nr. 14) erreichte die SLPI-Expression trotz Infektion mit *H. pylori* nahezu das Ausgangsniveau der nicht infizierten AGS-Kontrollen, weshalb im Weiteren die Wirkung von EGTA im Zellkulturmodell eingehender untersucht wurde.

Die antiproteolytische Wirkung des EGTA richtet sich unspezifisch gegen Metalloproteasen und basiert auf der Bildung von Chelatkomplexen. Hierdurch werden die zwei- bzw. dreiwertigen Metallionen aus dem aktiven Zentrum von Proteasen kompetitiv gebunden und deren proteolytische Aktivität somit gehemmt.

### **3.1.3 Einfluss der spezifischen Metalloproteaseinhibitoren MMP-Inhibitor-3 und TAPI-2 auf die *H. pylori*-vermittelte SLPI-Reduktion**

Aufgrund des ausgeprägten Effektes den der unspezifische Metalloproteaseinhibitor EGTA auf die SLPI-Expression zeigte, wurden ,zusätzlich zum initialen Screening, noch zwei spezifische Metalloproteaseinhibitoren getestet: Matrix-Metalloprotease-Inhibitor-3 (MMP-Inhibitor-3) und TNF- $\alpha$ -Proteaseinhibitor-2 (TAPI-2). Wie in *Abbildung 4* gezeigt, konnte weder die Anwesenheit des MMP-Inhibitors-3 (110 $\mu$ M) noch von TAPI (96 $\mu$ M) den *H. pylori*-assoziierten Verlust von SLPI beeinflussen. Wie in den Kontrollen führte, auch in Anwesenheit der Proteaseinhibitoren, die Infektion mit *H. pylori* zu einer signifikanten Abnahme der im ELISA gemessenen SLPI-Konzentration sowohl im Zelllysat als auch im Überstand um 42-79%.

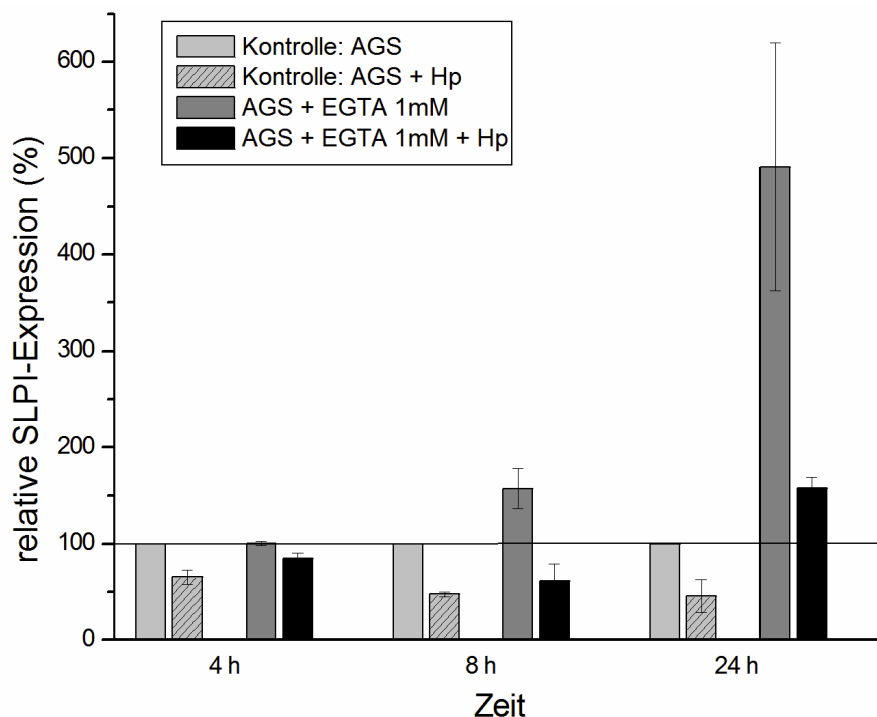




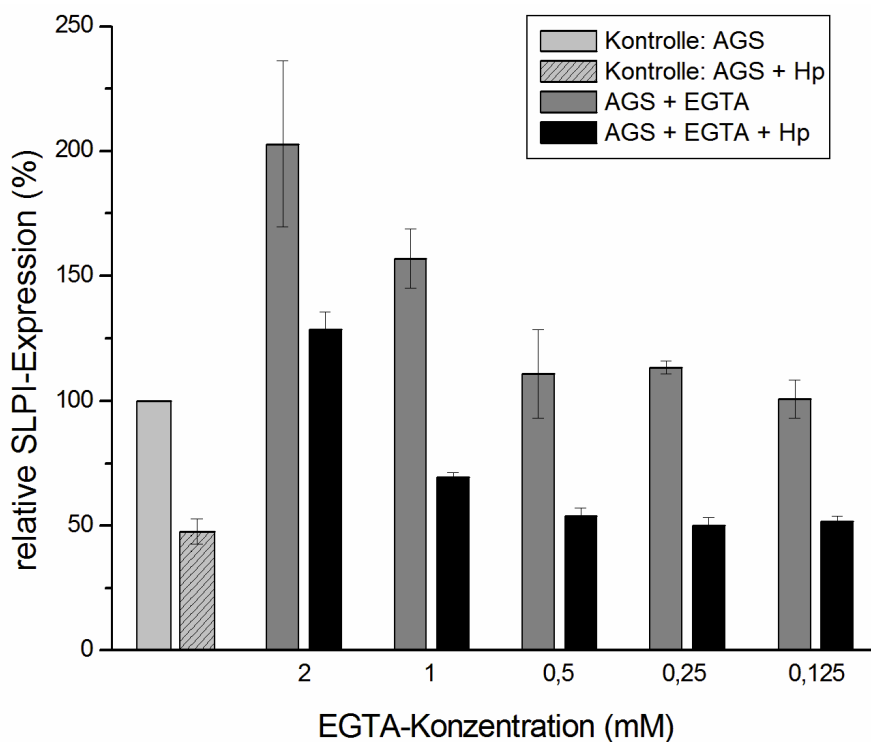
**Abbildung 4:** Wirkung von TAPI-2 und MMP-Inhibitor-3 auf die SLPI-Konzentration in Zellysate und Überstand. Die Balken repräsentieren die SLPI-Expression relativ zur Kontrolle (native AGS-Zellkultur), die gleich 100% gesetzt wurde. Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken repräsentiert. Es zeigt sich in allen drei Gruppen eine signifikante Reduktion der SLPI-Expression um 42–79%, sowohl im Zellysate als auch im Überstand. Im Vergleich der Zellkulturen mit Proteaseinhibitor gegen die Kontrollen ließ sich keine Verminderung der *H. pylori*-induzierten Reduktion der SLPI-Expression nachweisen. Absolute Ausgangswerte der Kontrollen waren 1139pg/ml ( $\pm 49$ ) für die Zellysate (bezogen auf 50 $\mu$ g Gesamtprotein) bzw. 1553pg/ml ( $\pm 53$ ) in den Überständen.

### 3.1.4 Analyse des Einflusses von EGTA auf die SLPI-Expression in AGS Zellkulturen

Aufgrund der überwältigenden Anzahl aller bekannten humanen und bakteriellen Metalloproteasen erschien es uns nicht sinnvoll, weiter mit einzelnen spezifisch wirkenden Metalloproteaseinhibitoren zu arbeiten. Stattdessen wurden, in einem von mehreren Ansätzen zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung von Metalloproteasen, die Effekte von EGTA auf die SLPI-Expression eingehender analysiert. Zunächst wurden die Veränderungen der SLPI-Expression im Zeitverlauf betrachtet. In *Abbildung 5* sind die Ergebnisse exemplarisch für die auch im „Screening“ verwendete EGTA-Konzentration (1mM) dargestellt. Die gesteigerte Expression von SLPI bei Inkubation der AGS-Zellen in Anwesenheit von EGTA 1mM wurde bereits nach acht Stunden sehr deutlich und war nach 24 Stunden auf ein Vielfaches des Ausgangsniveaus erhöht. Bei Infektion der so behandelten Zellen blieb die SLPI Expression zwar nach 24 Stunden über dem Niveau der nicht infizierten Kontrollen, die Verminderung der SLPI-Konzentration durch *H. pylori* im Vergleich mit den nicht infizierten Zellkulturen blieb jedoch über alle drei untersuchten Zeitintervalle bestehen.



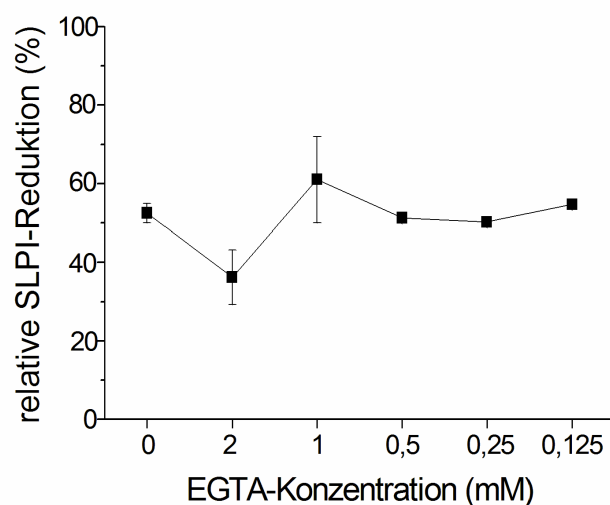
**Abbildung 5: Einfluss von EGTA 1mM auf die SLPI Expression im Lysat von AGS-Zellkulturen im Zeitverlauf.** Die Balken repräsentieren die SLPI-Expression nach vier, acht und 24 Stunden relativ zur Kontrolle (native AGS-Zellkultur), die gleich 100% gesetzt wurde. Standardabweichungen werden durch die Fehlerbalken abgebildet. Absolute Ausgangswerte der Kontrollen, bezogen auf 50 $\mu$ g Gesamtprotein, waren 383,0pg/ml ( $\pm$ 1) für 4h, 469,5pg/ml ( $\pm$ 26,16) für 8h und 659,0pg/ml ( $\pm$ 58) für 24h.



**Abbildung 6: Konzentrationsabhängiger Effekt von EGTA auf die SLPI-Expression in AGS-Zellen nach acht Stunden.** Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung der relativen SLPI-Konzentrationen im Lysat von AGS Zellen, acht Stunden nach Zugabe von EGTA in absteigender Konzentration und Infektion mit *H. pylori*. Absoluter Ausgangswert der Kontrollen, bezogen auf 50 $\mu$ g Gesamtprotein, war 468,5pg/ml Protein ( $\pm$ 26).

Des Weiteren konnte eine klare Abhängigkeit der SLPI-Expression von der EGTA-Konzentration zu allen drei Messzeitpunkten dokumentiert werden. In *Abbildung 6* ist dieser Sachverhalt exemplarisch für die Inkubationsdauer von acht Stunden dargestellt.

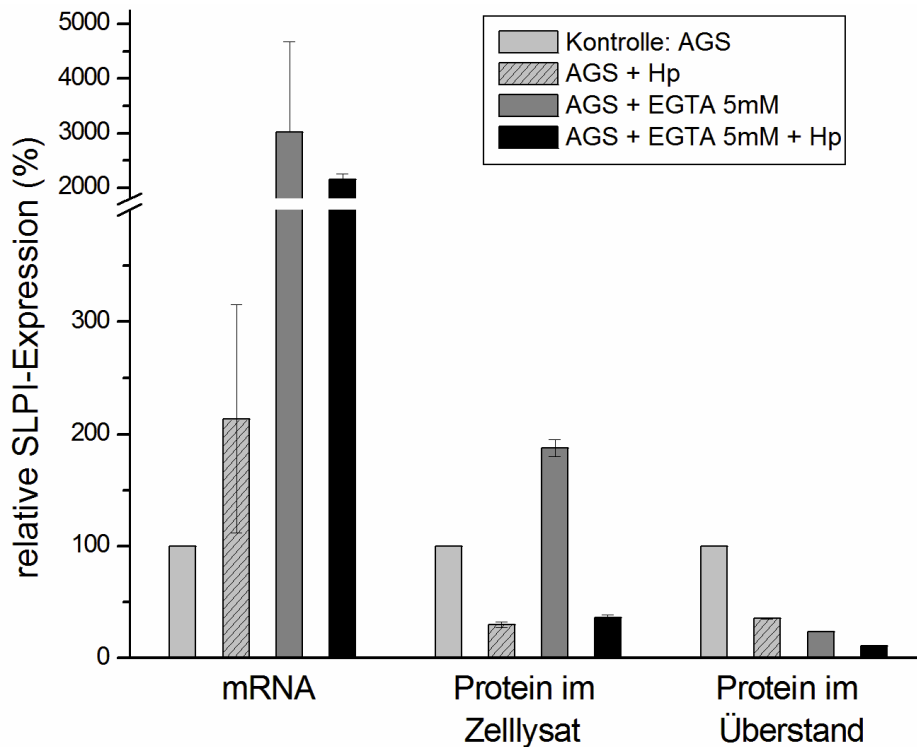
Wie *Abbildungen 5 und 6* vermuten lassen, wurde durch Inkubation mit EGTA zwar eine gesteigerte SLPI-Expression erreicht, eine signifikante Verminderung des *H. pylori*-induzierten SLPI-Verlustes gelang aber nicht. Dies wird in *Abbildung 7* noch einmal verdeutlicht.



**Abbildung 7: Reduktion der SLPI-Expression in AGS-Zellkulturen durch *H. pylori*-Infektion in Abhängigkeit der Inkubation mit verschiedenen EGTA-Konzentrationen.** Die Y-Achse zeigt die prozentuale Reduktion der SLPI Expression in *H. pylori*-infizierten Zellen gegenüber den nicht infizierten Zellkulturen. Es lässt sich keine Abhängigkeit von der eingesetzten EGTA-Konzentration erkennen. Die Daten beziehen sich auf die bereits in *Abbildung 6* dargestellten SLPI-Konzentrationen im AGS-Zelllysat 8h nach Infektion bzw. Inkubation.

Als Ursache des zeit- und konzentrationsabhängig erhöhten Expressionsniveaus für SLPI in Gegenwart von EGTA wurde ein transkriptioneller Regulationsmechanismus vermutet. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde der Einfluss des Chelatkomplexbildners auf die Expression des *sipi*-Gens eingehender untersucht.

Die Bestimmung der SLPI-Expression auf Transkriptionsniveau erfolgte durch quantitative „real time“ RT-PCR Analyse der *sipi*-mRNA Gehalte. Hierbei zeigte sich einerseits eine Verdopplung der *sipi*-Transkriptmenge durch die *H. pylori*-Infektion, die der bekannten Reduktion der SLPI-Gehalte auf der Proteinebene „entgegensteht“. Andererseits ließ sich bei Inkubation mit EGTA eine erhebliche Steigerung der *sipi*-Transkriptgehalte um mehr als 2 Zehnerpotenzen nachweisen. Diese korrelierte mit erhöhten SLPI-Proteingehalten im Zelllysat, wohingegen die sezernierte Menge an SLPI abnahm. Diese in der *Abbildung 8* illustrierten Ergebnisse waren für alle eingesetzten EGTA-Konzentrationen (siehe *Abbildungen 6 und 7*) nachweisbar, wurden aber aus Gründen der Übersichtlichkeit nur für die höchste Konzentration (5mM) detailliert dargestellt.

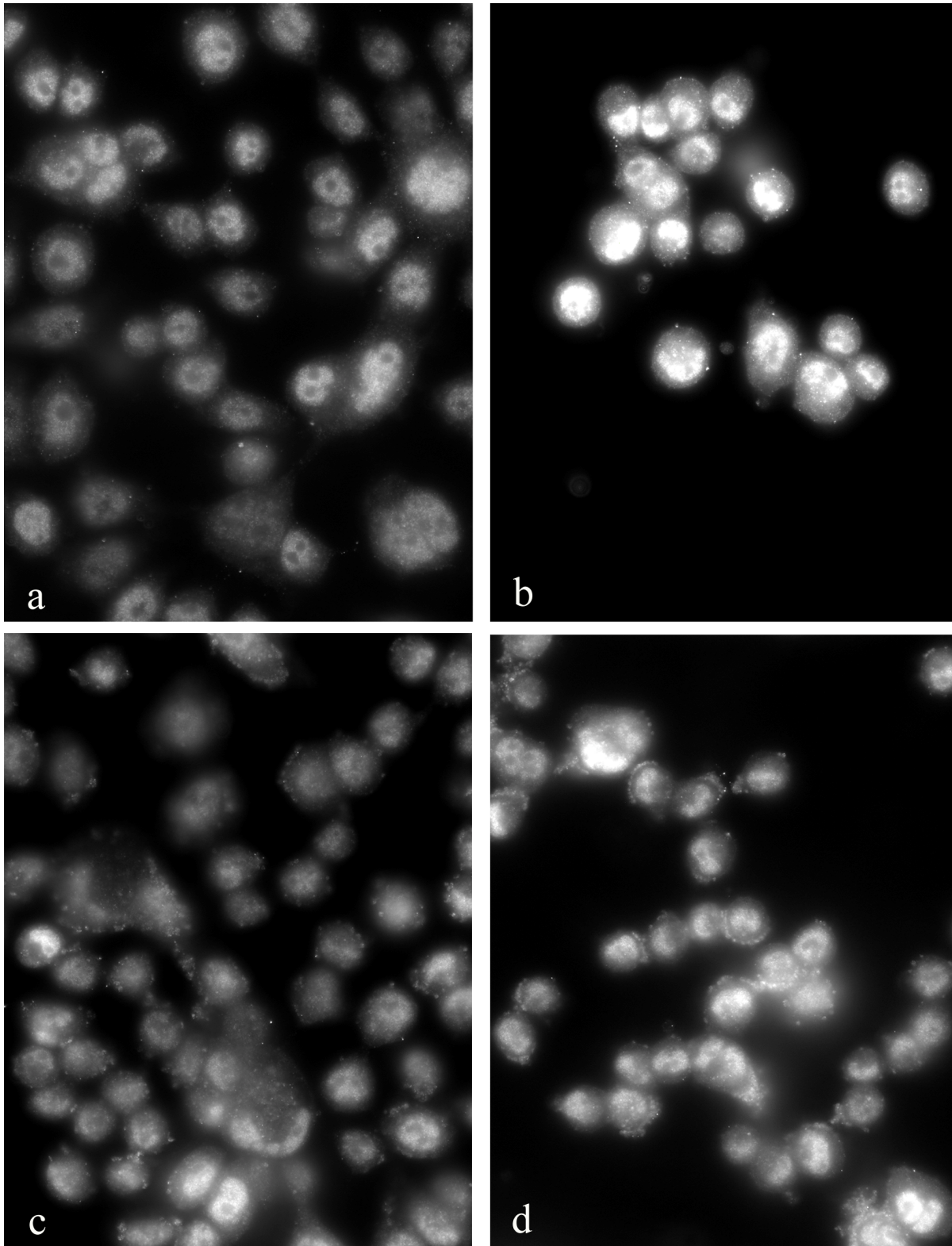


**Abbildung 8: Relative SLPI-Expression in Abhängigkeit von EGTA und *H. pylori*.** Darstellung getrennt für die drei untersuchten Ebenen: *spl*i-mRNA, Protein im Zelllysate und Protein im Zellkulturüberstand. Die Ergebnisse sind relativ (%), bezogen auf das jeweilige Kontrollniveau in nativen AGS-Zellkulturen, dargestellt. 24 Stunden nach Infektion bzw. Zugabe von EGTA zeigt sich eine erhöhte *spl*i-Transkriptgehalte bei der *H. pylori*-Infektion und bei Inkubation mit EGTA. Auf Proteinebene zeigt sich eine reduzierte SLPI-Expression bei *H. pylori*-Infektion sowohl im Zelllysate als auch im Überstand. Zusätzlich wird eine verminderte Nachweisbarkeit von SLPI im Überstand der mit EGTA behandelten Zellkulturen deutlich. Absolute Werte der Kontrollen: *spl*i-mRNA  $3,66 \cdot 10^{-5}$  „arbitrary units“, Zelllysate (bei  $50 \mu\text{g}$  eingesetztem Gesamtprotein)  $519,6 \text{ pg/ml}$  ( $\pm 3$ ), Überstände  $636,1 \text{ pg/ml}$  ( $\pm 20$ ).

### 3.1.5 Immunfluoreszenz-Darstellung der Veränderungen in der SLPI-Expression in AGS-Zellen durch EGTA und *H. pylori*

Zur Verdeutlichung der beschriebenen Veränderungen der SLPI-Expression in Gegenwart von EGTA und *H. pylori* wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hier ließ sich die durch EGTA gesteigerte Expression von SLPI in den AGS-Zellen in Form einer Anhebung der Signalintensität erkennen. Die vor allem perinukleäre Lokalisation von SLPI in EGTA-behandelten Zellen ist am ehesten auf eine gesteigerte Produktion im Rauen Endoplasmatischen Retikulum (RER) zurückzuführen. Es zeigte sich ein feingranuläres Fluoreszenzmuster.

Die etwas verminderte Signalintensität in den mit *H. pylori* infizierten Zellen entspricht vermutlich der im ELISA quantifizierbaren SLPI-Reduktion. Im Vergleich mit den nicht infizierten Zellen wirkt das granuläre Fluoreszenzmuster etwas gröber und verstärkt zellmembran-nah.



**Abbildung 9: SLPI-Immunfluoreszenz in AGS-Zellen:** Repräsentative Aufnahmen aus zwei unabhängig voneinander angefertigten Zellkulturen. Primärer Antikörper: polyklonaler anti-SLPI-Kaninchenantikörper, sekundärer Ziege anti-Kaninchen FITC.

9a) AGS-Kontrollen

9b) AGS-Zellen mit EGTA

9c) AGS-Zellen mit *H. pylori* infiziert

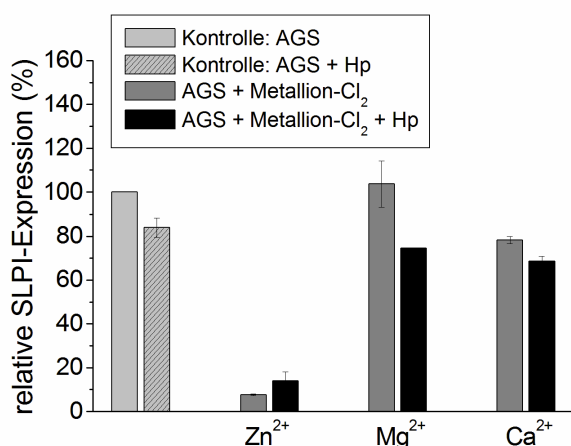
9d) AGS-Zellen mit EGTA und *H. pylori*

Zu erkennen ist eine gesteigerte Signalintensität in EGTA-behandelten Zellen. Angedeutet lässt sich eine größere, granuläre SLPI-Lokalisation in *H. pylori*-infizierten Zellen erkennen. Negativ-Kontrollen ohne primären Antikörper zeigten kein Signal (nicht gezeigt).

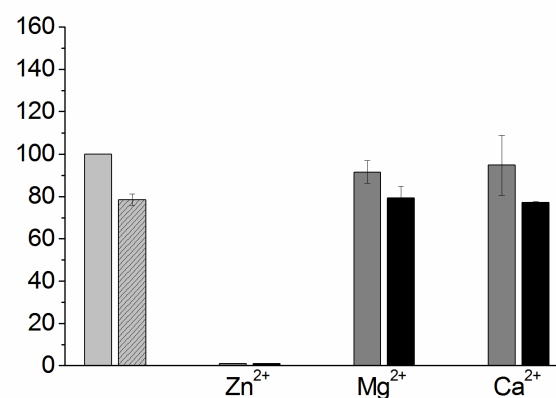
### 3.1.6 Veränderung der SLPI-Expression in AGS-Zellkulturen durch Inkubation mit zweiwertigen Metallionen und Auswirkungen auf den Effekt einer *H. pylori*-Infektion

In einem weiteren Ansatz zur Evaluierung der Rolle von Metalloproteasen für den Verlust von SLPI in *H. pylori*-infizierten Zellen, wurde der Einfluss veränderter Konzentrationen verschiedener biologisch relevanter Metallionen untersucht. Weder für  $\text{MgCl}_2$  (5mM) noch für  $\text{CaCl}_2$  (5mM) ließen sich entscheidende Veränderungen der SLPI-Expression feststellen (Abbildung 10), auch eine veränderte Wirkung der *H. pylori*-Infektion auf die SLPI-Konzentrationen im Zelllysate oder Überstand war nicht erkennbar. Die Inkubation mit  $\text{ZnCl}_2$  (5mM) hatte offensichtlich zytotoxische Effekte. Weitere Versuche mit geringeren  $\text{ZnCl}_2$ -Konzentrationen wurden durchgeführt, um eine mögliche Beteiligung von  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen am Mechanismus der *H. pylori*-induzierten SLPI-Reduktion abzuklären, da  $\text{Zn}^{2+}$  eine zentrale Rolle für die Funktion von MMPs besitzt.

10a) Zelllysate



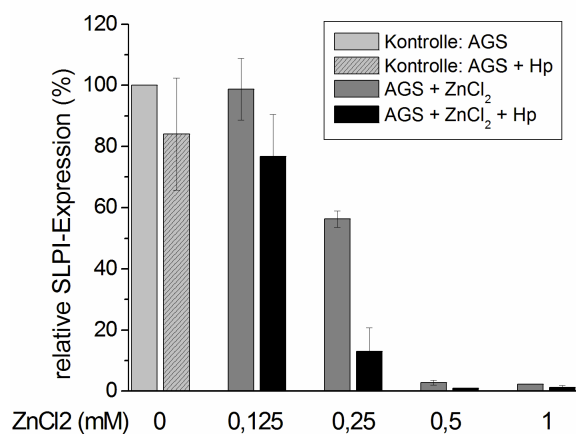
10b) Überstände



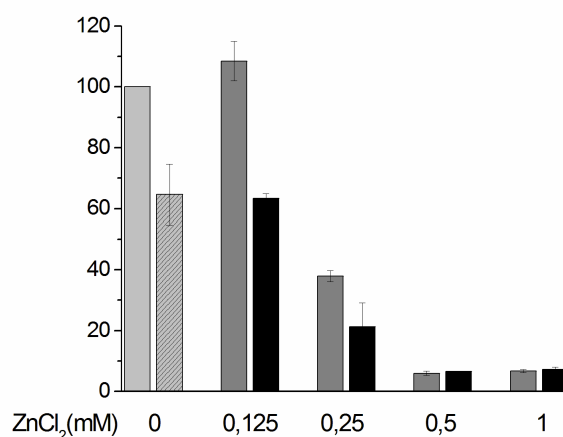
**Abbildung 10:** Einfluss verschiedener Metallionen (5mM) auf die Expression von SLPI und Veränderungen durch Infektion mit *H. pylori* in AGS-Zellkulturen. SLPI-Konzentration im Zelllysate (Abbildung 10a) und im Überstand (Abbildung 10b) wurden mittels ELISA bestimmt. Alle Metallionen wurden in 5mM Lösung eingesetzt. Die Balken repräsentieren die SLPI-Expression relativ zur Kontrolle (native AGS-Zellkultur) die gleich 100% gesetzt wurde, die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken repräsentiert. Im Überstand der mit  $\text{ZnCl}_2$  inkubierten Zellkulturen lag die SLPI-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze. Absolute Werte der Kontrollen: 1164,8pg/ml ( $\pm 188$ ) im Zelllysate, (bezogen auf 50 $\mu$ g Gesamtprotein), 3018,6pg/ml ( $\pm 41$ ) im Überstand.

Wie *Abbildung 11* zeigt ließ sich hier eine konzentrationsabhängige Verringerung der SLPI-Expression nachweisen, welche am ehesten auf einen zytotoxischen Effekt zurückzuführen ist. Ein Einfluss auf die *H. pylori*-assoziierte Reduktion der SLPI-Expression ließ sich dagegen nicht erkennen.

11a) Zellysate



11b) Überstände

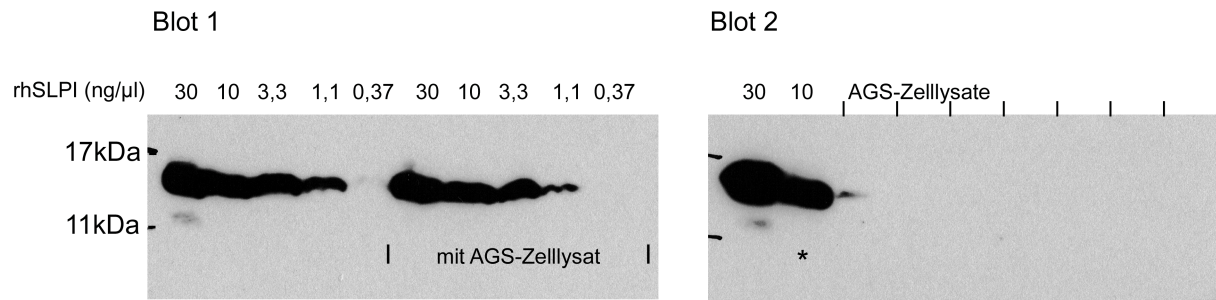


**Abbildung 11: Einfluss von ZnCl<sub>2</sub> auf die SLPI-Expression von *H. pylori*-infizierten AGS-Zellkulturen.** Die Balken repräsentieren die SLPI-Expression relativ zu den nativen AGS-Kontrollen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Die Ergebnisse wurden für die Zellysate (Abbildung 11a) und Zellkulturüberstände (Abbildung 11b) gesondert dargestellt. Absolute Werte der Kontrollen: 2231,7pg/ml ( $\pm 17$ ) für Zellysate (bezogen auf 50 $\mu$ g Gesamtprotein) und 5444,0pg/ml ( $\pm 127$ ) für Überstände.

### 3.1.7 Versuche zum Nachweis von SLPI mittels Westernblot-Analyse

Ogleich die bisherigen Ergebnisse eine Regulation der *H. pylori*-induzierten SLPI-Gehaltes in den AGS-Zellen durch posttranslationale bzw. translationale Mechanismen nahelegten, war eine Identifizierung des Prozesses mit den angewandten Methoden nicht gelungen. Daher strebten wir die Etablierung eines SLPI-spezifischen Westernblots an, um mögliche Spaltprodukte als Ergebnis eines posttranslationalen proteolytischen Abbaus nachzuweisen. Hierbei gelang uns, wie in *Abbildung 12* dargestellt, der Nachweis von rekombinantem humanem SLPI (rhSLPI). Allerdings lagen die von uns ermittelten Nachweisgrenzen ca. 100-fach über den höchsten in den Zellkulturen erreichten SLPI-Konzentrationen. Aus diesem Grund war ein Nachweis von SLPI bzw. von SLPI-Spaltprodukten, geschweige denn der semiquantitative Nachweis einer SLPI-Reduktion durch *H. pylori* mit dieser Methode nicht durchführbar.





**Abbildung 12: Nachweis von SLPI im Westernblot:** Angegeben sind die Endkonzentrationen von rhSLPI (ng/μl), wobei insgesamt immer 10μl Probe und 5μl Probenpuffer pro Gel-Tasche eingesetzt wurden. Ein Teil der rhSLPI-Verdünnungen für Blot 1 wurden mit dem Lysat von AGS-Zellen 1:1 gemischt, um den Schwellenwert der Nachweisbarkeit in einem Protein-Gemisch festzustellen. In Blot 2 wurden als Positivkontrollen 30ng/μl rhSLPI sowie 10ng/μl rhSLPI gemischt mit 5μl Zellysate (\*) eingesetzt. Das AGS-Zellysate mit der höchsten SLPI-Konzentration enthielt 0,012ng SLPI/μl bei 1,95μg/μl Gesamtprotein. Davon wurden maximal 10μl eingesetzt, entsprechend 0,12ng SLPI und 19,5μg Protein. Dies lag deutlich unterhalb der von uns erreichten Nachweisgrenze (>3,7ng). Das Signal beim ersten der AGS-Zellysate in Blot 2 ist daher als Verunreinigung aus der benachbarten Positivkontrolle zu werden.

### 3.2 Einfluss des Redoxgleichgewichtes auf rekombinantes humanes SLPI *in vitro*

Die Infektion mit *H. pylori* setzt sowohl *in vivo* als auch in Zellkulturen ROS und RNS frei (siehe Einleitung). Ein veränderter Redoxstatus oder eine Schädigung des Proteins durch diese Radikale waren weitere mögliche Ursachen für die verringerten SLPI-Gehalte nach *H. pylori*-Infektion. bzw. die verminderte funktionelle Aktivität des SLPI. Um diese Möglichkeit zu überprüfen wurden verschiedene Versuche, sowohl mit rhSLPI, als auch im AGS-Zellmodell durchgeführt.

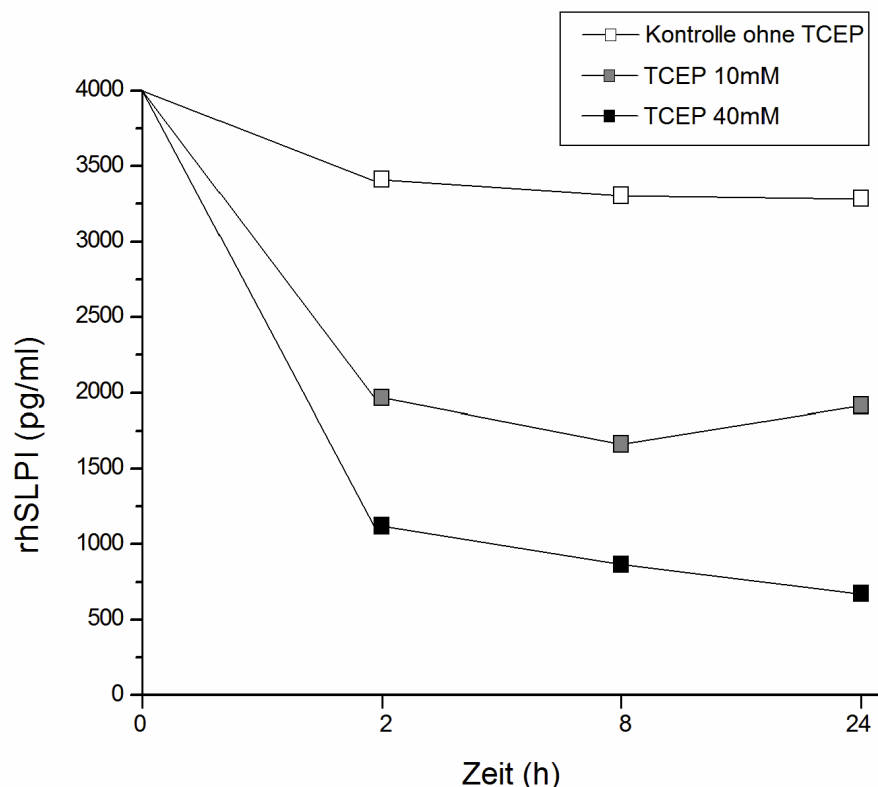
#### 3.2.1 Rolle des Redoxstatus für den Nachweis von SLPI im ELISA

Die Tertiärstruktur des SLPI ist durch acht Disulfidbindungen zwischen korrespondierenden SH-Gruppen dominiert. Aus diesem Grund war es naheliegend, zunächst die Bedeutung dieser Bindungen für den von uns genutzten ELISA zu untersuchen. Als reduzierendes Agens wählten wir Tris(2-carboxyethyl)phosphat (TCEP), welches ähnlich wie Dithiothreitol (DTT) sehr effektiv Disulfidbrücken reduziert (Burns et al. 1991).

Hierzu wurde rekombinantes humanes SLPI (rhSLPI) aus dem ELISA-Kit von R&D Systems in zwei definierten Konzentrationen (4000pg/ml und 1000pg/ml) mit TCEP für zwei beziehungsweise 24 Stunden inkubiert und anschließend die rhSLPI-Konzentration in den Proben mittels SLPI-ELISA ermittelt. Wie in *Abbildung 13* für die höhere rhSLPI-Konzentration dargestellt, verringerte sich die gemessene Konzentration durch Inkubation mit



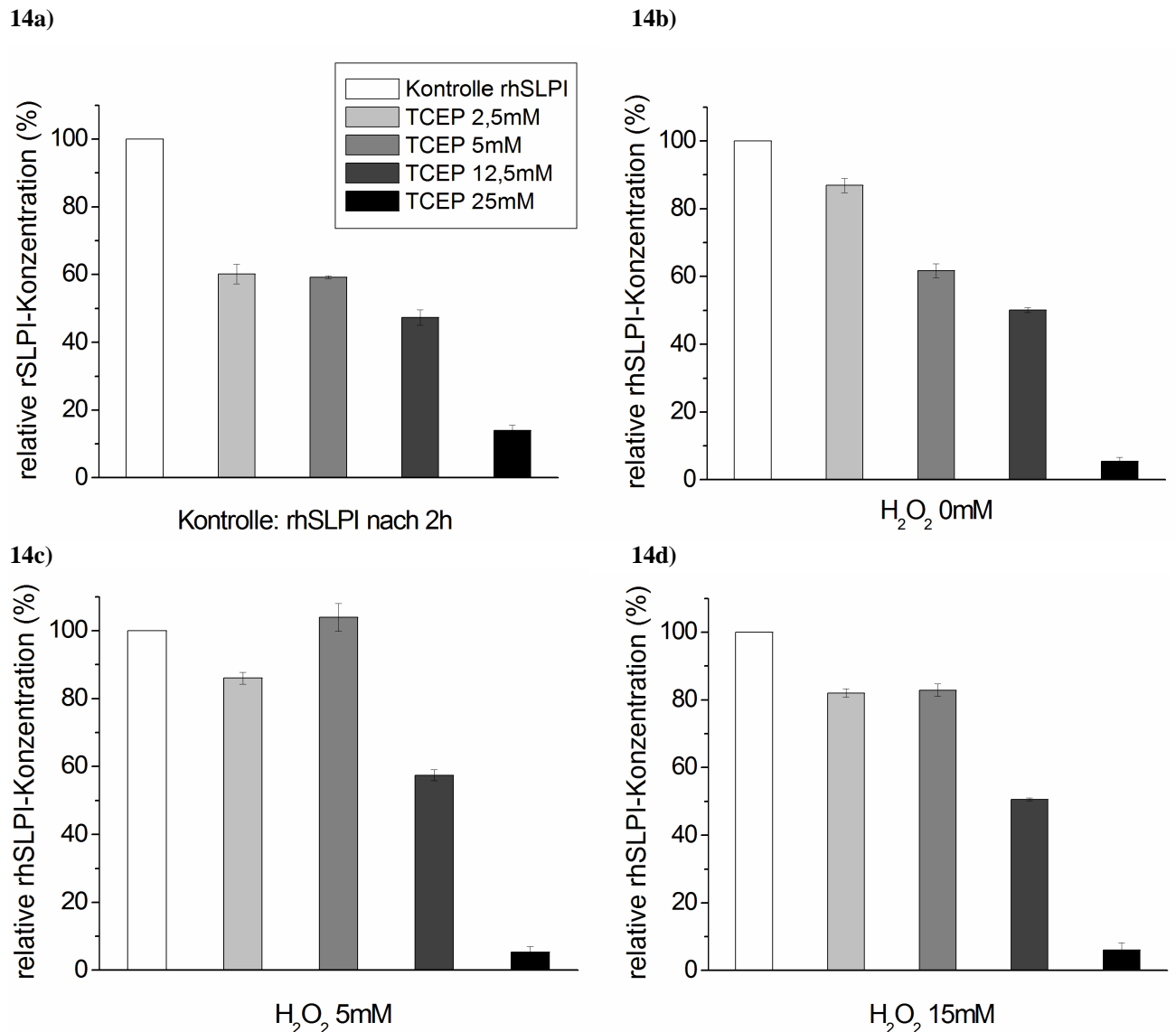
TCEP 40mM um 73,1 % ( $\pm 5,83$ ) gegenüber den Kontrollansätzen, denen nur der ELISA-Puffer zugesetzt wurde. Durch Inkubation mit 10mM TCEP ergab sich eine Reduktion der gemessenen SLPI-Konzentrationen gegenüber den jeweiligen Kontrollen um 43,7 % ( $\pm 5,66$ ). Die hier angedeutete Konzentrationsabhängigkeit bestätigte sich in den folgenden Untersuchungen. Der beschriebene Effekt war nach zwei Stunden Inkubationszeit bereits voll ausgeprägt, weshalb für die nachfolgenden Versuche ebenfalls kurze Inkubationszeiten gewählt wurden.



**Abbildung 13: Einfluss von TCEP auf den Nachweis von rhSLPI.** Dargestellt sind die mittels ELISA gemessenen rhSLPI-Konzentrationen nach 2, 8 und 24 Stunden Inkubation mit TCEP. Den Kontrollen wurde Puffer aus dem ELISA-Kit zugegeben. Aufgrund der Ähnlichkeit der Ergebnisse für beide SLPI-Konzentrationen sind nur die Ergebnisse für SLPI 4000 pg/ml gezeigt. Die Versuche wurden mit zwei TCEP-Konzentrationen (10 mM und 40 mM) durchgeführt.

In weiteren Vorversuchen zeigte sich, dass die TCEP-Wirkung auf den Nachweis von rhSLPI-Konzentration durch  $H_2O_2$  antagonisiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Um diesen Umstand näher zu untersuchen, wurden weitere Experimente durchgeführt. Hierbei wurde der Versuchsaufbau so gewählt, dass eine direkte Wechselwirkung zwischen TCEP und  $H_2O_2$  unwahrscheinlich gemacht werden konnte. Zunächst wurde rhSLPI mit verschiedenen TCEP-Konzentrationen zwischen 2,5mM und 50mM für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde eine Aliquot der Probe eingefroren. Jeweils zwei weitere Aliquots wurden mit je 5mM bzw. 15mM  $H_2O_2$  versetzt und für weitere sechs Stunden inkubiert. Einem weiteren Aliquot wurde als Kontrolle wurde ELISA-Puffer zugegeben. Die in *Abbildung 14* dargestellten

Ergebnisse zeigen einen deutlichen Einfluss von TCEP auf die Quantifizierung von SLPI mittels ELISA. Wurde den Proben im Anschluss  $H_2O_2$  zugesetzt, ließ sich der Effekt von TCEP teilweise antagonisieren bzw. abschwächen. Dies gelang besonders bei der Kombination niedriger TCEP-Konzentrationen und  $H_2O_2$  Konzentrationen von 5mM.



**Abbildung 14:** rhSLPI-Konzentration nach zwei Stunden Inkubation mit TCEP und Auswirkung einer anschließenden Inkubation mit  $H_2O_2$ . Die Balken repräsentieren die Mittelwerte, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Alle Werte in % bezogen auf die Kontrollen die ohne TCEP inkubiert wurden..

In allen Versuchen wurden 1000pg/ml SLPI eingesetzt.

**Abbildung 14a:** Einfluss einer zweistündigen Inkubation mit TCEP auf den Nachweis von SLPI. Es zeigt sich eine konzentrationsabhängige Reduktion um 40–86 % bei einem absoluten Kontrollniveau von 780,0pg/ml ( $\pm 5$ ).

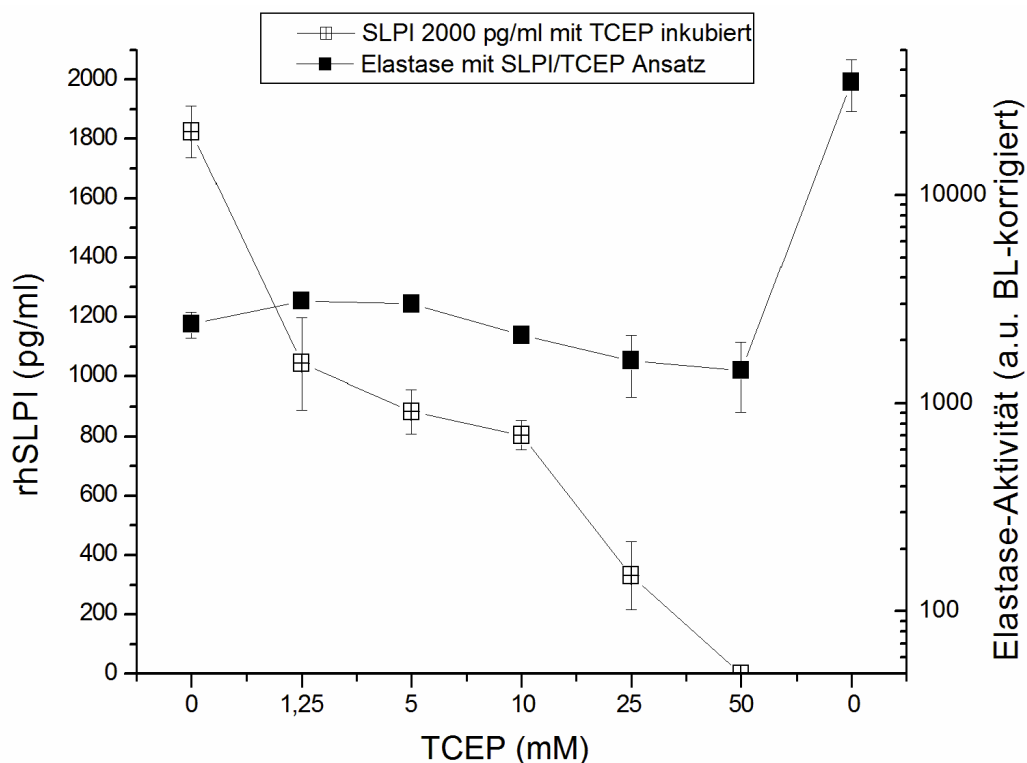
**Abbildung 14b:** Nach TCEP-Inkubation und der anschließenden Zugabe von ELISA-Puffer für 6h ergab sich eine ebenfalls konzentrationsabhängige Reduktion des Nachweises um 13–95% bei einem absoluten Kontrollniveau von 720,4pg/ml ( $\pm 16$ ).

**Abbildung 14c:** Dagegen zeigt sich nach TCEP-Inkubation und anschließender Inkubation mit 5mM  $H_2O_2$  für 6h eine Reduktion der rhSLPI-Konzentration um bis zu 95% mit einem deutlich höheren rhSLPI-Nachweis im Bereich der kleineren TCEP-Konzentrationen. Absoluter Wert der Kontrollen war 629,6pg/ml ( $\pm 19$ ).

**Abbildung 14d:** Nach TCEP-Inkubation und anschließender Inkubation mit 15mM  $H_2O_2$  für 6h ergab sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der rhSLPI-Konzentration von bis zu 94%. Auch hier zeichnet sich eine Antagonisierbarkeit des Effektes von TCEP bis 5mM ab. Mittelwert der Kontrolle war 565,0 pg/ml ( $\pm 7$ ).

### 3.2.2 Einfluss von TCEP auf die Antiprotease-Aktivität von SLPI

Um festzustellen, ob die beschriebene verminderte Nachweisbarkeit von rhSLPI im ELISA mit einer veränderten proteaseinhibitorischen Aktivität des Proteins einhergeht, bestimmten wir, parallel zur quantitativen rhSLPI-Messung im ELISA, die SLPI-Wirkung auf die Neutrophile Elastase (NE). *Abbildung 15* illustriert die bereits beschriebene TCEP-abhängige Verringerung des nachweisbaren rhSLPI (offene Quadrate). Die parallel ermittelten HNE-Aktivitäten (schwarze Quadrate) zeigen eine konstante Inhibition der Proteaseaktivität auf Werte zwischen 4,1% und 8,8% im Vergleich zur Kontrolle ohne rhSLPI (rechts, „0“). Während bei intaktem rhSLPI ein reziprokes Verhältnis zwischen rhSLPI-Konzentration und Elastase-Aktivität zu erwarten wäre, zeigte sich in diesem Versuchsaufbau kein Anstieg der Elastase-Aktivität bei sinkender rhSLPI-Konzentration in den mit TCEP behandelten Proben. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Abnahme der im ELISA bestimmten rhSLPI-Gehalte nicht mit einem Verlust von funktionalem Proteaseinhibitor gleichzusetzen ist.



**Abbildung 15:** Einfluss von TCEP auf den Nachweis und die Antiprotease-Aktivität des SLPI. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte aus vier unabhängigen Messungen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. 2000pg/ml rhSLPI wurden mit den angegebenen TCEP-Konzentrationen für zwei Stunden inkubiert und die SLPI-Gehalte per ELISA (offene Quadrate) und die antiproteolytische Aktivität über einen NE-Aktivitätsassay (schwarze Quadrate) bestimmt. Die Werte ganz links „0“ entsprechen der SLPI-Konzentration und der korrespondierenden Elastase-Aktivität in Ansätzen ohne TCEP. Der Wert ganz rechts „0“ entspricht der Elastase-Aktivitätskontrolle ohne rhSLPI oder TCEP im Ansatz. Für TCEP=50mM lag rhSLPI im ELISA unterhalb der Nachweisgrenze. Angabe der Elastaseaktivität in „arbitrary units“ (a.u.), für den Leerwert („blank“, BL) korrigiert.

Um die Auswirkungen von TCEP auf unsere Nachweismethoden abschätzen zu können, inkubierten wir, in einem orientierenden Versuch, beide Assays vor dem Messen einer definierten Standardreihe über zwei Stunden mit dem TCEP. Hierbei zeigte sich eine um ca. 50% verminderte Nachweisfähigkeit für SLPI im ELISA. Auch im Elastase-Assay deutete sich ein verminderter Aktivitätsnachweis an, der auf einer konzentrationsabhängig verminderten NE-Bindungsfähigkeit des Anti-NE-Antikörpers beruhen könnte (Daten nicht gezeigt).

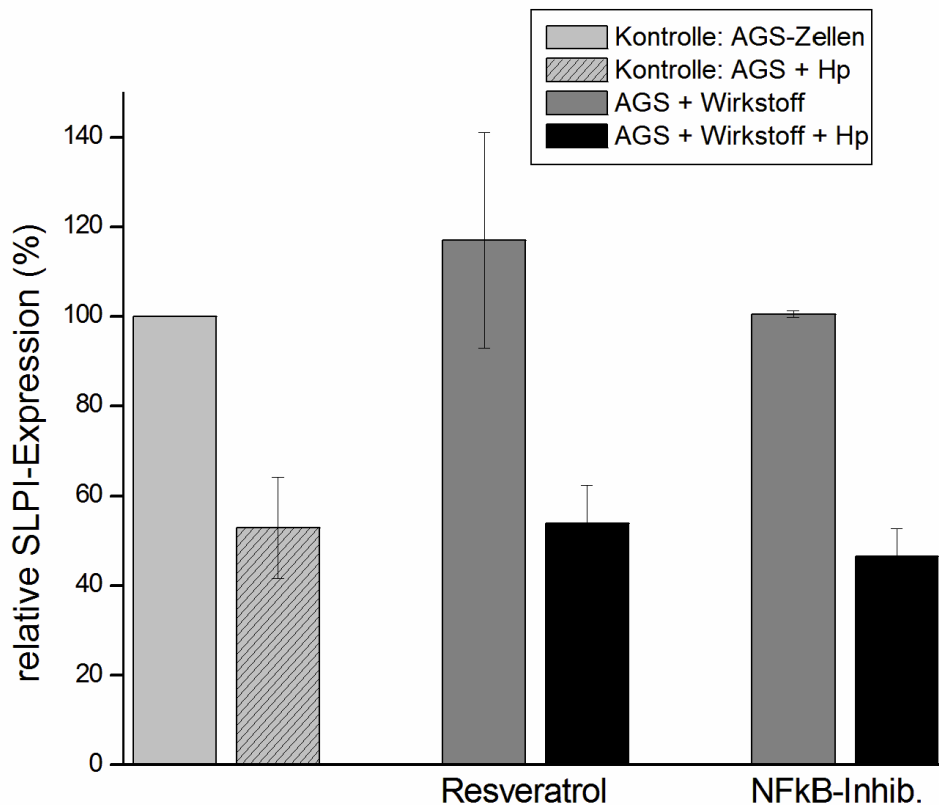
### **3.3 Einfluss veränderter Redoxbedingungen im AGS-Zellmodell**

Die anhand des rhSLPI beobachteten Einflüsse veränderter Redoxbedingungen auf die quantitative SLPI-Bestimmung gaben interessante Denkanstöße, ließen sich aber naturgemäß nicht ohne weiteres auf das Zellmodell übertragen. Aus diesen Überlegungen heraus wurden experimentelle Ansätze entwickelt, um im Zellkulturmodell einen möglichen Einfluss von veränderten Redoxverhältnisse auf die SLPI-Expression, bzw. die im ELISA messbare Konzentration, zu untersuchen.

#### **3.3.1 Einfluss von antioxidativen und antiinflammatorischen Substanzen auf die SLPI-Expression in AGS-Zellen im Kontext der *H. pylori*-Infektion**

In einem Versuchsansatz wurden Zellkulturen mit Substanzen inkubiert, welche den *H. pylori*-bedingten oxidativen Stress reduzieren, bzw. intrazelluläre Signalketten unterbinden, die an der Vermittlung seiner Wirkung auf die Zellen beteiligt sind. Aufgrund seiner, in der Literatur ausführlich beschriebenen und in der nachfolgenden Diskussion erörterte, direkte und indirekt antioxidativen Wirkung wurde Resveratrol ausgewählt. Dabei handelt es sich um ein Polyphenol, das unter anderem in roten Weinbeeren vorkommt. Daneben kam auch der NFκB-Inhibitor zum Einsatz, um die Wirkung proinflammatorischer Zytokine zu unterbinden und so die intrazelluläre Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies zu reduzieren.

Allerdings ließ sich durch keine der beiden Substanzen die Reduktion der SLPI-Expression in *H. pylori*-infizierten Zellkulturen verhindern oder verändern, wie in *Abbildung 16* dargestellt.



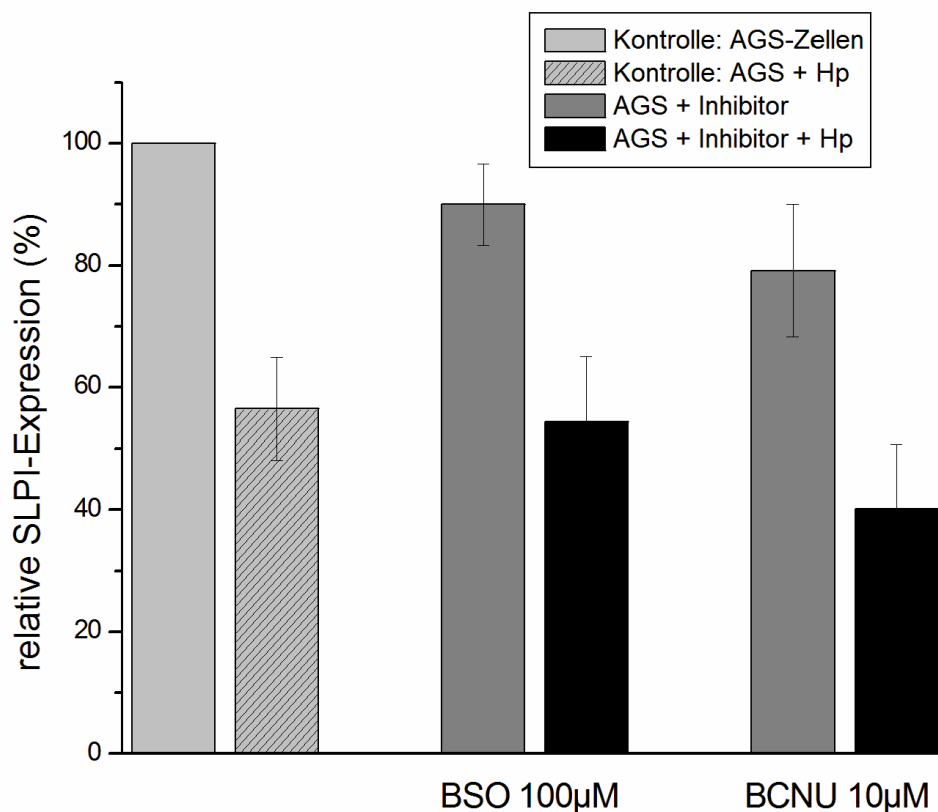
**Abbildung 16: Wirkung von Resveratrol und NFκB-Inhibitor auf die *H. pylori*-assoziierte Reduktion der SLPI-Expression.** Die Balken repräsentieren die SLPI-Expression im Lysat von AGS-Zellen relativ zu den nativen AGS-Kontrollen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Die Infektion mit *H. pylori* erfolgte in Anwesenheit von Resveratrol 5μM bzw. NFκB-Inhibitor 0,5μM über 24h Stunden. Die Infektion führte zu vergleichbaren Reduktionen der SLPI-Expression in den verschiedenen behandelten Zellen zwischen 55-57%. Es ließen sich keine relevanten Unterschiede bezüglich der durch *H. pylori* verursachten SLPI-Konzentrationsänderung erkennen. Absolute Werte der Kontrollen: 1134,4pg/ml (±133) bei 50μg eingesetztem Gesamtprotein.

### 3.3.2 Einfluss eines veränderten zellulären Glutathionstoffwechsels auf die *H. pylori*-induzierte SLPI Reduktion

Als weiteren Ansatzpunkt zur Veränderung der zellulären Redoxverhältnisse wählten wir den intrazellulären Umsatz von Glutathion (GSH). Mit seiner Funktion als Elektronenakzeptor unter Ausbildung von intermolekularen Disulfidbindungen (GSSG) leistet GSH einen großen Beitrag zur Neutralisation schädlicher Sauerstoffradikale. Sollte der Verringerung der SLPI-Expression ein redoxabhängiger Prozess zu Grunde liegen, müsste ein Wegfall intrazellulärer Reduktionsäquivalente zu Veränderungen der SLPI-Expression in unserem Zellmodell führen. Zum Einsatz kamen zwei Substanzen, die an verschiedenen Stellen in den GSH-Stoffwechsel eingreifen und dadurch die Menge an zur Verfügung stehenden Reduktionsäquivalenten verringern.

L-Buthionin Sulfoximin (BSO) inhibiert selektiv die  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase ( $\gamma$ -GCS), ein Schlüsselenzym der GSH-Synthese. Durch 1,3-Bis(2 Chlorethyl)-1-Nitrosourea (BCNU oder Carmustin) wird die Glutathion-Reduktase inhibiert und somit die Konversion von GSSG zu GSH vermindert, wodurch der Zelle weniger Reduktionsäquivalente zur Verfügung stehen und der intrazelluläre oxidative Stress ansteigt (Harlan et al. 1984, Takahashi et al. 2003).

Nachdem in Vorversuchen die Versuchskonzentrationen hinsichtlich der Zytotoxizität überprüft worden waren (Daten nicht gezeigt), prüften wir den Einfluss von BSO und BCNU auf die SLPI-Expression in *H. pylori*-infizierten Zellkulturen. Wie in *Abbildung 17* dargestellt, ergab sich in allen drei Gruppen die bekannte signifikante Reduktion der SLPI-Expression. Die Verwendung der beiden Substanzen (BSO, BCNU) hatte auf diese Reduktion keinen Einfluss.



**Abbildung 17: Einfluss des intrazellulären GSH-Stoffwechsels auf die SLPI-Expression von AGS-Zellen.**

Die Balken repräsentieren die mittlere SLPI-Expression im Lysat von AGS-Zellen relativ zu den unbehandelten AGS-Kontrollen, die Fehlerbalken bilden die Standardabweichungen ab. Die Behandlung der Zellen mit BSO und BCNU ergab keine Unterschiede bezüglich des Effektes der *H. pylori*-Infektion. Absolute Werte der Kontrollen bezogen auf 50µg eingesetztes Gesamtprotein: 1902,0pg/ml ( $\pm$ 111). Die Kontrollen mit Ethanol als Lösungsmittel zeigten ebenfalls keinen Einfluss (Daten nicht gezeigt).

## 4. Diskussion

Weltweit sind ca. 50% aller Menschen mit *H. pylori* infiziert. Seit der Erstbeschreibung des Bakteriums wurden zahlreiche Erkenntnisse über die Infektion und ihre mögliche Folgen gewonnen, zu denen neben gastroduodenalen Ulkuserkrankungen auch die Entwicklung maligner Neoplasien zählt. Dennoch sind die komplexen Interaktionen zwischen dem Erreger und dem Wirtsorganismus noch längst nicht gänzlich aufgeklärt. Von größtem Interesse sind hierbei vor allem die Fragen nach dem warum und wie? Warum führt die Infektion an sich nur bei einer Minderheit der Betroffenen zur Ausbildung klinischer Symptome? Und wie gelingt dem Bakterium die dauerhafte Kolonisation der Magenschleimhaut, obwohl es dort eine persistierende Immunreaktion in Form einer chronischen Entzündung auslöst?

Erstmals 2004 publizierte die Arbeitsgruppe Wex et al. Daten die zeigten, dass eine Infektion mit *H. pylori* zu einer reduzierten Expression von SLPI in der Schleimhaut des Antrums führt (Wex et al. 2004a). Darauf aufbauende Studien konnten diese Beobachtung auch in größeren Patientenkollektiven bestätigen (Hritz et al. 2006, Wex et al. 2006b) und im Zellkulturmodell reproduzieren (Wex et al. 2006a).

Bemerkenswert war dies nicht nur weil SLPI in der Regel im Rahmen von entzündlichen Prozessen auf lokaler Ebene verstärkt exprimiert, und deshalb auch als „Alarmproteaseinhibitor“ bezeichnet, wird. In dieser Funktion schützt der Proteaseinhibitor auch das betroffene Gewebe vor einer überschießenden Aktivität proteolytischer Enzyme. Wie andere Mitglieder der Proteinfamilie mit „Whey Acidic Protein“ (WAP) -Domäne, beispielsweise Elafin, übt auch SLPI einen regulatorischen Einfluss auf das angeborene und adaptive Immunsystem aus. Darüber hinaus wirkt SLPI auch unabhängig von seiner proteaseinhibitorischen Komponente antimikrobiell (Weldon et al. 2007).

Die pathophysiologische Bedeutung dieses SLPI-Verlustes durch die *H. pylori*-Infektion ist bisher nur zum Teil verstanden. Ziel meiner Dissertationsarbeit war es, den Mechanismus der zur reduzierten SLPI-Expression im infizierten Epithel führt, zu charakterisieren. Um diese zellbiologischen bzw. biochemischen Vorgänge zu analysieren, entschlossen wir uns dazu, das bereits etabliertes Modell der *H. pylori*-Infektion in AGS-Zellen zu nutzen.

#### 4.1 Die *H. pylori*-Infektion im AGS-Zellmodell

Bei der Zelllinie AGS (CRL-1739) handelt es sich um isolierte Zellen eines epithelialen Adenokarzinoms des Magens, die für vielfältige *in vitro* Studien zum Magenkarzinom wie z.B. die *H. pylori*-Infektion verwendet werden (Ding et al. 2007, Yan et al. 2009b). In unserem Labor waren bereits in vorangegangenen Zellkulturversuchen mehrere verschiedene Zelllinien parallel auf die Änderung der SLPI-Expression durch die Infektion mit *H. pylori* hin untersucht worden. Hierbei hatten AGS- und MKN-28- (JCRB-0253) Zellen eine gleichermaßen signifikante Reduktion der SLPI-Proteinmenge, trotz erhöhter *spli*-mRNA-Gehalte, gezeigt (Wex et al. 2006a). Deshalb wurde für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente nur noch die AGS-Zelllinie genutzt.

Der Einsatz eines Zellmodells bot für die Beantwortung der gegebenen Fragestellung mehrere Vorteile. Erstens war nur in diesem experimentellen Ansatz die Zugabe spezifischer Substanzen wie des Translationsinhibitors Cycloheximid (CHX) oder diverser Proteaseinhibitoren möglich, um so deren Auswirkungen auf den *H. pylori*-induzierten Verlust von SLPI-Protein abzuschätzen. Zweitens ermöglichte die Kultur adhärenter Zellen in flüssigem Medium eine gute Trennung des Überstandes, mit den darin enthaltenen sezernierten Proteinen, von den zellulären Bestandteilen. Drittens erlaubte dieses vereinfachte Modell der Infektion des Magenepithels eine Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Epithelzellen und Erreger ohne Einflüsse durch endokrin aktive Zellen, neurohumorale Faktoren oder Zellen des Immunsystems. Letzteres war von besonderer Bedeutung, da Entzündungszellen, vor allem neutrophile Granulozyten, sowohl SLPI selbst produzieren und sezernieren (Jacobsen et al. 2008), als auch über die Freisetzung von NE die SLPI-Expression und -Sekretion der Magenepithelzellen beeinflussen (Sullivan et al. 2008, van Wetering et al. 2000a). Sowohl immunhistochemische Daten der eigenen Arbeitsgruppe als auch andere Untersuchungen an neutrophilen Granulozyten ergaben, dass diese Zellen nur geringe Mengen SLPI freisetzen. (Jacobsen et al. 2008, Wex et al. 2004a). Deshalb war es sinnvoll, den von uns beobachteten Einfluss von *H. pylori* auf die SLPI-Expression zunächst nur an Magenepithelzellen, den wichtigsten Produzenten des Proteaseinhibitors in der Magenschleimhaut, zu untersuchen.

Auch Wechselwirkungen zwischen SLPI und Neutrophilen-Elastase (NE) konnten im *in vitro*-Modell als unwahrscheinlich angenommen werden, da *H. pylori* in Magenepithelzellen zu keiner veränderten Expression der NE führt (Resnick et al. 2006). Untersuchungen der



eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass AGS-Zellen nur eine relativ geringe Genexpression der NE und der dazugehörigen Elastaseaktivität aufweisen (Wex, unveröffentlichte Daten).

Neben den beschriebenen Vorteilen mussten durch den Einsatz eines *in vitro*-Modells natürlich auch Nachteile in Kauf genommen werden. Die Vereinfachung des komplexen Systems aus verschiedensten Zellarten und ihren gegenseitigen Interaktionen ermöglichte es uns einerseits zwar, einen Teilaspekt der *H. pylori*-Infektion eingehender zu untersuchen, machte die Studien aber selbstverständlich auch anfälliger für das Auftreten von experimentell bedingten Artefakten. Zytokine aus Entzündungszellen, deren vielschichtige Wechselwirkungen mit der SLPI-Expression in der Einleitung beschrieben wurden, fehlten in diesem Versuchsaufbau. Zwar sezernieren auch Epitelzellen verschiedene proinflammatorische Mediatoren als Reaktion auf eine Kolonisation durch *H. pylori* (Brandt et al. 2005), jedoch muss man Unterschiede bezüglich des Zytokinmilieus zwischen der Situation *in vivo* und *in vitro* annehmen. Ein weiterer bedeutender Unterschied zum Ablauf der Infektion und Kolonisation der Magenschleimhaut besteht bezüglich des untersuchten Zeitraumes. Während *in vivo* fast immer eine chronische Gastritis vorliegt, bei der sich bereits ein gewisses „Gleichgewicht“ zwischen Bakterium und Wirt eingestellt hat, entspricht der Versuchsaufbau *in vitro* eher einer akuten Infektion, mit Untersuchungszeiträumen zwischen zwei und 48 Stunden.

Folglich kann nicht mit absoluter Sicherheit davon ausgegangen werden, dass der verminderten Expression von SLPI durch die *H. pylori*-Infektion *in vitro* dieselben Mechanismen zu Grunde liegen wie im natürlichen Milieu des Magenantrums. Insgesamt zeigten die Ergebnisse unserer *in vitro*-Versuche jedoch eine gute Korrelation mit den aus Biopsien erhobenen Daten. Wie normale Magenepithelzellen auch, zeigen AGS-Zellen eine konstitutive SLPI-Expression, die mit der Menge an *slpi*-Transkript korreliert (Wex et al. 2004a). Diese Kopplung von *slpi*-mRNA-Gehalt und nachweisbarem SLPI-Protein wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch die *H. pylori*-Infektion aufgehoben, dahingehend dass bei gleichbleibender Transkriptmenge eine Verringerung des SLPI-Proteingehaltes auftrat. In der Zellkultur zeigte sich sogar eine gesteigerte *slpi*-mRNA Konzentration in den infizierten Zellen (Wex et al. 2006a).

Aufgrund der geschilderten Ergebnisse war das AGS-Zellkulturmodell aus unserer Sicht gut geeignet, den Einfluss einer Infektion mit *H. pylori* auf die SLPI-Expression in Magenepithelzellen eingehender zu untersuchen.

#### **4.2 Die verminderte Expression von SLPI in *H. pylori*-infizierten Mageneithelzellen beruht auf einem translationalen oder posttranslationalen Prozess**

Wie bereits dargestellt, ging der *H. pylori*-assoziierte Verlust von SLPI-Protein mit einer stabilen oder erhöhten Menge an *slpi*-mRNA einher. Dies sprach für einen Mechanismus der reduzierten SLPI-Expression auf Ebene der Proteinbiosynthese und gegen einen Effekt der prätranslational bedingt ist.

Um diese These zu sichern, blockierten wir in unserem Zellmodell die Proteinsynthese durch CHX. Diese Substanz aus der Gruppe der Glutarimid-Antibiotika inhibiert die Translation der mRNA am Ribosom (Obrig et al. 1971). Unter diesen Bedingungen kann weder in den infizierten noch in den nichtinfizierten AGS-Zellen eine Neusynthese von SLPI stattfinden. Wie erwartet, beobachteten wir einen raschen Abfall der SLPI-Konzentration, der in den infizierten Zellkulturen stabil und deutlich unter dem Niveau der nicht-infizierten Kulturen lag. Da der *H. pylori*-assoziierte Effekt bei blockierter Translation in gleicher Weise auftrat wie bei intakter Proteinbiosynthese, sahen wir unsere Arbeitshypothese von einem SLPI-Verlust auf translationaler oder posttranslationaler Ebene bestätigt. Eine spezifische Beeinflussung auf Ebene der Translation am Ribosom erschien uns hierbei allerdings weniger wahrscheinlich als eine Veränderung am fertig synthetisierten Polypeptid.

Hierfür kamen nun verschiedene Mechanismen in Betracht, die, zumindest theoretisch, über eine posttranslationale Proteinmodifikation zu einer veränderten oder aufgehobenen Nachweisbarkeit führen könnten. Dazu gehörte die Möglichkeit, dass die Verringerung des SLPI-Gehaltes durch die Komplexbildung mit Proteasen wie der NE verursacht wird und diese Komplexe nicht mehr durch den ELISA nachgewiesen werden können. Weitere Erklärungsmöglichkeiten, die mit der *H. pylori*-assoziierten verringerten SLPI-Gehalte zu erklären, wären eine inkorrekte Faltung, oxidative oder reduktive Prozesse mit Schädigung des Proteins oder ein proteolytischer Abbau. Zunächst soll auf letzteren Punkt eingegangen werden.

#### **4.3 Die Rolle von Proteasen beim posttranslationalen Verlust von SLPI**

In der Literatur finden sich verschiedene Berichte über humane und auch bakterielle Proteasen unterschiedlicher Klassen, die in der Lage sind, SLPI zu spalten (siehe auch Abschnitt 1.3.4 der Einleitung). Um erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Proteasen an der von uns untersuchten Verminderung von SLPI zu erhalten, führten wir ein

„Screening“ mit vierzehn verschiedenen Proteaseinhibitoren durch. So wurden, neben Proteasen, für die bereits eine Spaltung von SLPI beschrieben war, auch andere Proteasenklassen getestet. In unserem Versuchsaufbau und mit den eingesetzten Konzentrationen der Proteaseinhibitoren ließ sich jedoch der Einfluss von *H. pylori* auf die SLPI-Expression nicht aufheben. Einzig die Ko-Inkubation der *H. pylori*-infizierten AGS-Zellen mit EGTA, einem Chelatbildner mit Metalloprotease-inhibitorischer Aktivität mit breitem Spektrum, ergab eine deutlich stabilere SLPI-Expression auch in Anwesenheit des Bakteriums.

Eine weiterführende Untersuchung der Wirkung von EGTA zeigte jedoch, dass dies vor allem auf einer konzentrationsabhängigen Induktion der *slpi*-Transkription und Proteinbiosynthese zu beruhen schien. Der relative Verlust von SLPI in infizierten Zellkulturen gegenüber *H. pylori*-freien blieb auch bei steigenden EGTA-Konzentrationen und konsekutiv vermehrter SLPI-Expression mit höherem absolutem Verlust an nachweisbarem Protein relativ stabil. Es fiel auf, dass EGTA zwar die Expression von SLPI insgesamt induzierte, die Konzentration des sezernierten SLPI im Überstand aber deutlich verminderte. Dies beruhte möglicherweise auf einer verminderten Sekretion des Proteaseinhibitors in Anwesenheit von EGTA.

Parallel zur Untersuchung der Wirkung von EGTA auf die SLPI-Expression wurden weitere Versuche zur Evaluierung einer eventuellen Beteiligung von Metalloproteasen durchgeführt. Die Gründe für dieses Vorgehen sind im Folgenden aufgeführt. Zum einen sezerniert *H. pylori* selbst mehrere Proteine mit proteolytischer Aktivität, darunter solche mit starker Ähnlichkeit zu den Matrix-Metalloproteasen MMP-1- und MMP-3 (Gööz et al. 2001) sowie eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kollagenase (Kavermann et al. 2003). Zum anderen liegen Befunde aus AGS-Zellkulturen vor, die eine Induktion von  $\text{Zn}^{2+}$ -abhängigen MMPs durch *H. pylori* zeigen (Gööz et al. 2001, Pillinger et al. 2007). Die fehlende Wirkung der Chelatkomplexbildner EDTA und EGTA sowie des Metalloproteaseninhibitors Phosphoramidon allein ließ den Ausschluss einer Beteiligung von Metalloproteasen am SLPI-Verlust nicht zu. Angesichts der zahlreichen in Frage kommenden Metalloproteasen war eine breit angelegte Testung spezifischer Inhibitoren, wie mit MMP-Inhibitor-3 und Tapi-2 geschehen, im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Die Aktivität von Metalloproteasen ist an das Vorhandensein der Metallionen in ihrem aktiven Zentrum gebunden (Klein et al. 2010), weshalb getestet wurde, ob erhöhte Konzentrationen ausgewählter Metallionen einen Einfluss auf den SLPI-Abbau zeigen würden. Dieser Ansatz stellte in gewisser Weise den Gegenpol zu den Versuchen mit dem

Chelator EGTA dar. Auch hier ergaben sich letztendlich keine Hinweise auf eine Beteiligung von Metalloproteasen.

Abschließend konnten keine Befunde erhoben werden, die unsere Arbeitshypothese vom gesteigerten Abbau des SLPI durch *H. pylori*-eigene oder in den Epithelzellen-induzierte Proteasen bestätigten. Daraus lässt sich allerdings nicht folgern, dass eine Beteiligung von Proteasen an der veränderten SLPI-Konzentration in infizierten Magenepithelzellen endgültig ausgeschlossen werden kann. Begründet liegt dies zum einen in der Vielzahl der in Frage kommenden Proteasen verschiedener Klassen. Dadurch ist ein absolut sicherer Ausschluss anhand des von uns durchgeführten Screenings nicht möglich. Zum anderen muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass durch die Bedingungen innerhalb der Zellen die Wirkung der Inhibitoren gegen ihre Ziel-Proteasen beeinträchtigt wird.

Sowohl vorbeschriebene Befunde als auch unsere eigenen Daten lassen den Schluss zu, dass dem von uns untersuchten Phänomen ein intrazellulärer Mechanismus zu Grunde liegt. Beleg hierfür ist vor allem der gleichermaßen im Zellysate und im Zellkulturüberstand nachweisbare Reduktion von SLPI (Wex et al. 2006a), der durch einen extrazellulären Abbau des Proteins nicht zu erklären ist. Dass auch EGTA, das neben der Induktion von SLPI auch seine Sekretion vermindert, nicht vor dem Verlust bei *H. pylori*-Infektion schützen kann, wurde als weiterer Hinweis auf einen intrazellulären Prozess gewertet.

Wie bereits erwähnt, wurde in der Literatur von verschiedenen Autoren ein proteolytischer Abbau von SLPI beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir jedoch keine Hinweise auf eine Beteiligung von Proteasen an der Regulation der SLPI-Expression finden. Deshalb scheint es an dieser Stelle sinnvoll, einige der Arbeiten näher zu besprechen.

Auch die Arbeitsgruppe um Weldon berichtete über eine Spaltung von SLPI durch NE. Hierbei ist aber zu beachten, dass in diesen Untersuchungen NE im Überschuss vorlag. Weiterhin erfolgte die Proteolyse lediglich im N-terminalen Bereich und hatte keinen Einfluss auf die proteaseinhibitorische Aktivität von SLPI gegenüber Cathepsin G (Weldon et al. 2009). Somit stehen diese Befunde im Widerspruch zu der Feststellung, wonach eine verminderte SLPI-Konzentration im Epithel des Magens mit einer deutlich erhöhten Elastaseaktivität einhergeht (Wex et al. 2006a).

Bereits 1991 beschrieben Vogelmeier et al. eine Spaltung von rekombinantem SLPI (rSLPI) durch NE *in vitro*, allerdings nur in Anwesenheit von Oxidantien. Während weder Oxidantien noch NE allein eine Spaltung bewirkten, ergab sich durch die Kombination beider Faktoren ein Spaltprodukt von acht kDa Größe (Vogelmeier et al. 1991). Diese Befunde scheinen

jedoch nicht auf die Situation im Epithel des Magenantrums oder der Magenepithelzellkultur übertragbar zu sein.

Diese Problematik betrifft auch *in vitro*-Befunde zur Spaltbarkeit von SLPI durch MMP-12 (Ramadas et al. 2009) und Chymase (Belkowski et al. 2008). Taggart et al. beschreiben ein Spaltung von SLPI durch Cathepsine, wobei vor allem Cathepsin L eine hohe proteolytische Aktivität aufwies. In dieser Arbeit wurde auch demonstriert, dass erhöhte Cathepsin-Konzentrationen in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit von Emphysepatienten zum proteolytischen Abbau von SLPI führen. Allerdings bezogen sich auch diese Experimente auf den Abbau von rSLPI *in vitro* (Taggart et al. 2001). Ein solches Vorgehen ermöglicht jedoch lediglich Aussagen zum Abbau von extrazellulär vorliegendem Proteaseinhibitor und kann somit nicht den von uns festgestellten Verlust von intrazellulärem SLPI erklären. Immunfluoreszenz-Befunde in der Dissertation von Krieg zeigten darüber hinaus keine Kolokalisation von SLPI enthaltenden Granula und Lysosomen, den Hauptwirkorten der Cathepsine (Krieg, 2009, unveröffentlichte Daten). Diese Untersuchungen zu intrazellulären Mechanismen des SLPI-Abbaus geben einen Denkanstoß, um über eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen und den Befunden anderer Arbeitsgruppen bezüglich der proteolytischen Spaltung von SLPI zu spekulieren.

Nur wenige Publikationen beschäftigen sich mit der subzellulären Lokalisation von SLPI. Jacobsen et al. konnten in Granulozyten eine Lokalisation in sekundären Granula zeigen (Jacobsen et al. 2008) und damit ältere Ergebnisse widerlegen, nach denen SLPI in diesen Zellen vor allem zytosolisch vorliegt (Sallenave et al. 1997). Eine Literaturrecherche (PubMed) erbrachte keine Studien zur subzellulären Lokalisation in Magenepithelzellen. Eigene Ergebnisse und noch unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe aus Immunfluoreszenzfärbungen stützen jedoch die Annahme, dass SLPI als sekretorisches Protein in intrazellulären Vesikeln enthalten ist. Das Vorliegen eines 25-Aminosäuren langen Signalpeptides, wie es auch bei anderen sekretorischen Proteinen gefunden wurde unterstützt diese These (Jacobsen et al. 2008). Wahrscheinlich führt auch in Magenepithelzellen eine Verschmelzung dieser Vesikel mit der Zellmembran zur Freisetzung des Inhaltes. Ausgehend von dieser subzellulären Lokalisation in sekretorischen Granula erscheint ein proteolytischer Abbau von SLPI innerhalb dieses Kompartimentes denkbar. Obgleich bei der Auswahl der im Screening eingesetzten Inhibitoren auf Zellpermeabilität geachtet wurde, könnten die tatsächlichen Konzentrationen innerhalb dieser subzellulären Strukturen unterhalb der für eine effektive Wirkung notwendigen liegen. Wie bereits dargestellt wurde, induziert das Bakterium die Expression verschiedenster Proteine in den betroffenen Epithelzellen. Hierzu

gehören neben SLPI auch Proteasen, die ebenfalls sezerniert werden (siehe Abschnitt 1.1.3 der Einleitung). Eine Ko-Lokalisation von SLPI und SLPI-spaltenden Proteasen, deren Expression durch *H. pylori* induziert wird, in sekretorischen Granula könnte damit die Reduktion von SLPI sowohl im Zelllysate als auch im Überstand erklären.

Somit ist eine extrazelluläre Spaltung von SLPI durch Proteasen in Zusammenschau aller bisherigen Erkenntnisse auszuschließen. Eine Beteiligung von Proteasen an einem intrazellulären Mechanismus der SLPI-Reduktion dagegen ist, bis zu dessen definitiver Aufklärung, als weiterhin möglich anzusehen, auch wenn wir hierfür keine Beweise erbringen konnten.

#### **4.4 Der verminderte Nachweis von gebundenem SLPI kann die verminderte SLPI-Konzentration in *H. pylori*-infizierten AGS-Zellen nicht erklären**

Neben einem proteolytischen Abbau und einer durch Proteasen beeinflussten Expression von SLPI in *H. pylori*-infiziertem Magenepithel kamen noch weitere Mechanismen als Ursache der reduzierten Nachweisbarkeit des Proteaseinhibitors in Frage. So konnten beispielsweise van Wetering et al. zeigen, dass niedrige Konzentrationen von SLPI in bronchoalveolärer Lavage durch eine Bindung des SLPI-NE-Komplexes an zelluläre Bestandteile bedingt waren (Wetering et al. 2000a). Wahrscheinlich ist dies Folge einer positiven Ladung an der Oberfläche dieses Komplexes (Sullivan et al. 2008). Ein solcher Effekt wäre jedoch nicht in der Lage die reduzierte SLPI-Konzentration in Gewebeproben und Zelllysaten gleichermaßen zu erklären, die Ausgangspunkt für unsere Überlegungen waren (Wex et al. 2004a, 2006a). Auch eine reduzierte Nachweisbarkeit des Proteaseinhibitors durch Bindung an sein Substrat NE bietet hierfür keine Erklärung, da der von uns genutzte „Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay“ (ELISA) auch NE-gebundenes SLPI quantifizieren kann (Informationen des Herstellers unter <http://www.rndsystems.com/pdf/dpi00.pdf>).

#### **4.5 Der Einfluss von oxidativem Stress auf die Expression und den Nachweis von SLPI**

##### **4.5.1 Entstehung und Auswirkungen von oxidativem Stress bei der *H. pylori*-Infektion**

Eine denkbare Möglichkeit war dagegen die Veränderung oder Zerstörung von SLPI-Protein durch Redoxvorgänge. Eine *H. pylori*-Infektion erzeugt oxidativen Stress *in vivo* und *in vitro*,

so dass wir dessen Einfluss auf die Expression und den Nachweis von SLPI ebenfalls überprüfen.

Durch die Kolonisation der Magenschleimhaut mit *H. pylori* kommt es zu einer akuten Gastritis, die im weiteren Verlauf in eine chronische Entzündung übergeht. Charakteristisch ist hierfür die Infiltration der Mukosa und Submukosa durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten (Wong et al. 2009). Letztere werden sowohl indirekt, über durch *H. pylori*-induzierte proinflammatorische Zytokine wie IL-8 (Zaidi et al. 2009), als auch direkt durch das NapA von *H. pylori* „angelockt“ (Wang et al. 2006a). Die eingewanderten Neutrophilen setzen nach ihrer Aktivierung nicht nur Proteasen wie NE und Proteinase-3 frei, sondern auch verschiedene „Reactive Oxygen Species“ (ROS). Dieser als „oxidative burst“ bezeichnete Vorgang hängt entscheidend von der Aktivierung der NADPH-Oxidase ab, einem membranständigen Komplex, der unter NADPH-Verbrauch zwei Elektronen auf ein Sauerstoff Atom überträgt und so zwei Superoxid-Anionen ( $O^{\bullet-}$ ) entstehen lässt. Diese sind wiederum Ausgangspunkt für die Bildung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und hypochlorischer Säure (Seger 2010). Die physiologische Funktion dieses Systems besteht darin, phagozytierte oder auch extrazelluläre Erreger abzutöten. Die Bedeutung des „oxidative burst“ für die erfolgreiche Abwehr pathogener Keime lässt sich an Erkrankungen erkennen, die auf einem Defekt der NADPH-Oxidase beruhen und mit schwersten, granulomatös verlaufenden Infektionen einhergehen (Seger 2010). Wenn  $H_2O_2$  mit Chlor ( $Cl_2$ ) und Ammoniak ( $NH_4^+$ ) reagiert, entsteht außerdem sehr lipophiles Chloramin ( $NH_3Cl$ ) als wichtigster Vertreter der "Reactive Nitrogen Species" (RNS). All diese hoch reaktiven Metabolite führen wiederum zu einer oxidativen Schädigung der DNA in den Wirtszellen (Olivares et al. 2005). Als Folge kommt es zum Teil über Signalwege wie Cytochrom-C-Induktion und die Aktivierung von Caspasen zur Apoptose. Andererseits kann die Schädigung der DNA auch zu Mutationen führen und so letzten Endes zur malignen Transformation der Mukosa beitragen (Correa 2006). Darüber hinaus tragen die Wirkungen von oxidativem Stress erheblich zur Schädigung von Lipidmembranen sowie intra- und extrazellulären Proteinen bei (Biswas et al. 2009).

Humane Zellen verfügen über verschiedene Mechanismen um die schädigende Wirkung von ROS zu vermindern. Auf diese soll noch einmal kurz hingewiesen werden. GSH ist ein Tripeptid, dessen Cysteinrest mit anderen GSH-Molekülen Disulfidbrücken ausbilden kann ( $\Rightarrow$  GSSG). Aufgrund seiner hohen Konzentration innerhalb der Zelle (10-15mM) und seines niedrigen Redoxpotentials ( $E'_0 = -240mV$ ) kommt GSH eine wichtige Rolle als Antioxidans und Redox-Puffer zu. Der limitierende Schritt in der Synthese des Tripeptides stellt die

Adenosin-Triphosphat (ATP)-abhängige Synthese von  $\gamma$ -Glutamylcystein dar (Marí et al. 2009). Für die Regeneration von oxidiertem GSSG zu GSH, das dann wieder als Antioxidans zur Verfügung steht, spielt die Glutathion-Reduktase, mit NADPH als Koenzym, eine entscheidende Rolle (Biswas et al. 2009).

Die vor allem zytosolisch vorliegende Superoxid-Dismutase-1 (Sod-1) wandelt hochreaktives, instabiles  $O^{\bullet-}$  unter Verbrauch von Wasser in  $H_2O_2$  um (Leitch et al. 2009). Das Häm-Enzym Katalase liegt vor allem in intrazellulären Peroxisomen vor und wandelt mit hoher „turnover“-Rate  $H_2O_2$  in Wasser und Sauerstoff um (Szasz et al. 2007).

Auch *H. pylori* exprimiert zahlreiche Proteine die seine Resistenz gegenüber ROS erhöhen. Viele von ihnen sind obligat für eine erfolgreiche Kolonisation der Magenschleimhaut. Dazu zählen die bakterielle Superoxiddismutase (SodB) und drei unterschiedliche Peroxiredoxine, die ebenfalls  $H_2O_2$  unschädlich machen. Die bakterielle Katalase (KatA) und die durch mdaB-Gen kodierte NADPH-Quinon-Reduktase sind von Bedeutung für die langfristige Kolonisation des Wirtes (Israel et al. 2010). Das bereits erwähnte NapA übt eine doppelte Funktion aus, indes es einerseits die neutrophile Infiltration und Aktivierung fördert und gleichzeitig die bakterielle DNA vor ROS schützt (Wang et al. 2006a). Darüber hinaus konnten im Proteom von *H. pylori* ein sezerniertes Thioredoxin identifiziert werden, das höchstwahrscheinlich an der Reparatur von oxidativen Schäden beteiligt ist, indem es oxidierte Disulfide reduziert (Kim et al. 2002).

Im Kontext von entzündlichen Lungenerkrankungen führten verschiedene Arbeitsgruppen Studien zur Wirkung von oxidativem Stress auf SLPI durch und kamen dabei zu widersprüchlichen Ergebnissen. Initiale Ergebnisse deuteten auf eine oxidative Inaktivierung der proteaseinhibitorischen Funktion durch oxidativen Stress hin, wobei eine proteolytische Spaltung von SLPI nicht berichtet wurde (Kramps et al. 1988). Vogelmeier et al. dagegen kamen zu dem Schluss, dass oxidiertes SLPI durch NE gespalten werden könne, während intaktes SLPI gegenüber der Wirkung von NE sehr stabil schien (Vogelmeier et al. 1991). Weitere *in vitro*-Versuche konnten die Reduktion der Anti-NE Aktivität von SLPI durch oxidativen Stress und aktivierte Makrophagen bestätigen (Vogelmeier et al. 1997). Die Oxidation eines Methionin-Restes im aktiven Zentrum (Met 73) scheint dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Gleichgewichtskonstante ( $K_i$ ) gegenüber NE zu haben, wobei eine nicht zu vernachlässigende inhibitorische Restaktivität berichtet wurde (Boudier et al. 1994). Zusammengenommen sprechen alle Ergebnisse für eine Beeinflussung der proteaseinhibitorischen Funktion von SLPI durch oxidative Vorgänge. Der derzeitige



Erkenntnisstand ermöglicht jedoch keine Aussagen über die Auswirkungen von oxidativem Stress auf die Expression oder Nachweisbarkeit von SLPI im Verlauf einer *H. pylori*-Infektion.

#### **4.5.2 Veränderter Nachweis von rekombinantem humanem SLPI durch Spaltung von Disulfidbrücken**

Um den Effekt einer Konformationsänderung auf die Nachweisbarkeit und Funktionalität des Proteaseinhibitors einschätzen zu können, wurden zunächst *in vitro* Versuche mit rekombinantem humanem SLPI (rhSLPI) durchgeführt. Die Tertiärstruktur des Proteins wird entscheidend durch die Disulfidbrücken der WAP-Domänen geprägt, und auch die Aktivität gegen Serinproteasen hängt vom Vorhandensein dieser intramolekularen kovalenten Verbindungen ab (Curtis et al. 2006). Physiologisch liegt SLPI in einem oxidiertem Zustand vor, in dem alle acht Disulfidbrücken ausgebildet sind (Curtis et al. 2006), weshalb wir zunächst die Auswirkungen einer Abweichung von diesem Zustand untersuchten. Die Behandlung von rekombinantem humanem SLPI (rhSLPI) mit dem spezifisch Disulfidbrücken reduzierenden Agens „Tris(2-Carboxyethyl) phosphine Hydrochloride“ (TCEP-HCl) (Burns et al. 1991) führte zu einer deutlichen, konzentrationsabhängigen Abnahme der Nachweisbarkeit des Proteins im ELISA. Die teilweise Reversibilität dieses Befundes durch oxidierendes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ließe sich durch eine Wiederausbildung der originären Tertiärstruktur nach Aufhebung der reduzierenden TCEP-Wirkung erklären. Wir stellten außerdem fest, dass eine verminderte Nachweisbarkeit von rhSLPI in unserer Antikörper-abhängigen Nachweismethode nicht mit einer veränderten Elastase-inhibierenden Aktivität korrelierte. Auf Grundlage dieser experimentellen Befunde ließe sich ein Mechanismus der *H. pylori*-induzierten Verminderung von SLPI im Magenepithel vermuten, der nicht auf einem tatsächlichen Verlust des intakten Proteins beruht. Stattdessen könnte von einem verminderten Nachweis ausgegangen werden, der auf einer Veränderung der Proteinstruktur basiert und nicht unbedingt mit einem Funktionsverlust einhergeht. Denkbar wäre eine strukturelle Veränderung eines für den immunologischen Nachweis entscheidenden Epitopes.

Diese Überlegungen bleiben zum jetzigen Zeitpunkt jedoch eher spekulativ, zumal sie in der Praxis einigen berechtigten Einwänden unterliegen. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss insbesondere beachtet werden, dass auch die Struktur von Antikörpern entscheidend durch das Vorhandensein mehrerer Disulfidbrücken bestimmt wird (Yan et al. 2009a). Da sowohl der SLPI-ELISA als auch der von uns eingesetzte Elastase-Aktivitäts-Assay von der

Funktion spezifischer Antikörper abhängen, muss eine Beeinflussung der Messverfahren durch Beeinträchtigung der Antikörperbindung in Betracht gezogen werden. Orientierende Untersuchungen zu diesem Teilaspekt (nicht gezeigte Daten) sprechen für eine verminderte Nachweisrate des rhSLPI, wenn die ELISA-Platte mit TCEP vorbehandelt wurde. Auch ein Aktivitätsnachweis im Elastase-Assay gelang nach Inkubation der Elastase-bindenden Antikörper mit TCEP nur noch unvollständig.

Insgesamt konnten die Versuche mit rhSLPI zeigen, dass eine Spaltung der Disulfidbrücken zu einem verminderten Nachweis von SLPI in dem von uns genutzten Nachweisverfahren (ELISA) führen kann. Ein Einfluss methodischer Störfaktoren ist jedoch anzunehmen, wodurch eine exakte Quantifizierung dieses Effektes und seines Einflusses auf den SLPI-Nachweis in Magenepithelzellen nicht möglich war.

#### **4.5.3 Auswirkungen von oxidativem Stress auf den SLPI-Nachweis im Zellkulturmodell**

Um die Auswirkung von oxidativem Stress auf die Expression bzw. den Nachweis von SLPI im Magenepithel zu untersuchen, nutzten wir erneut das AGS-Zellmodell. Naturgemäß fehlten in diesem experimentellen Ansatz die neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, die *in vivo* zur Entstehung von oxidativem Stress beitragen. Wie jedoch gezeigt werden konnte, induziert *H. pylori* oxidativen Stress auch in Magenepithelzellkulturen (Bagchi et al. 2002, Ding et al. 2007). Hier konnte ein unmittelbarer, innerhalb der ersten 30 Minuten auftretender Effekt von einem längerfristigen, nach 24 Stunden nachweisbaren Effekt unterschieden werden. Es ließ sich eine Abhängigkeit der Stärke dieses schnellen ROS-Anstieges vom Vorhandensein der cagPAI erkennen (Ding et al. 2007). Die intrazelluläre Akkumulation von ROS war durch die Zugabe verschiedener Antioxidantien wie N-Acetylcystein (NAC), GSH, der Radikalfänger Dimethylthiourea (DMTU) und die Eisenchelatoren Desferrioxamin (DEF) und Diethylen Triamin Pentazetische Säure (DTPA) reduzierbar (Ding et al. 2007). Auch ein zytokinvermittelter Anstieg intrazellulärer ROS war nach 24 Stunden nachweisbar und beruhte auf den Wirkungen von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , und IL-1 $\beta$  (Ding et al. 2007).

Auf Grundlage dieser Feststellungen untersuchten wir die Wirkung von *H. pylori*-induziertem oxidativem Stress auf die SLPI-Konzentration in unserem Zellkulturmodell. Hierfür setzten wir Resveratrol, dessen direkte antioxidative Wirkung in *H. pylori*-infizierten Zellkulturen Zaidi et al. zeigen konnten (Zaidi et al. 2009), und NF $\kappa$ B-Inhibitor ein. Dieser greift in die

zytokinvermittelten Vorgänge innerhalb der Zellen ein und beeinflusst so auf indirektem Wege die Entstehung und Wirkung von oxidativem Stress innerhalb der betroffenen Epithelzellen. Jedoch führte keine dieser beiden Substanzen zu einem geringeren Verlust von SLPI in *H. pylori*-infizierten Zellkulturen. In einem entgegengesetzt konzipierten Versuchsaufbau wurde dieser SLPI-Verlust auch durch Ko-Inkubation mit Hemmstoffen des GSH-Stoffwechsels nicht verstärkt. Die Kombination der bereits vorhandenen Erkenntnisse mit unseren Ergebnissen spricht in der Zusammenschau also gegen infektionsinduzierten oxidativen Stress als Ursache des *H. pylori*-vermittelten Verlustes an SLPI.

## **5. Zusammenfassung:**

Wie diese Arbeit zeigen konnte, beruht die verminderte Expression von SLPI im Zellmodell der *H. pylori*-Infektion der Magenschleimhaut nicht auf einer verringerten Menge an mRNA, sondern auf einem wahrscheinlich posttranslationalen Mechanismus. Obwohl dieser nicht eindeutig identifiziert werden konnte, gelang es dennoch einige wichtige Abgrenzungen zu treffen. Die Einwirkung von oxidativem Stress auf das SLPI-Molekül als Ursache für eine verminderte Nachweisbarkeit des Proteins über immunologische Nachweisverfahren erschien zwar denkbar, konnte aber experimentell im Zellkulturmodell nicht bestätigt werden. Auch für eine Beteiligung von Proteasen am Abbau von SLPI ergaben sich keine weiteren Hinweise. Während unsere Ergebnisse in Kombination mit der zur Verfügung stehenden Literatur einen extrazellulären proteolytischen Verdau (mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit) ausschließen, kann eine Beteiligung von Proteasen an einer intrazellulären Degradation von SLPI nicht sicher verneint werden.

## 6. Ausblick

Die Infektion mit *H. pylori* führt in nahezu allen Fällen zu einer chronischen Entzündung der Magenschleimhaut. Diese ist durch eine Infiltration der Mukosa durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen sowie eine komplexe zelluläre Immunreaktion charakterisiert, für deren Ausprägung regulatorische T-Zellen eine wesentliche Bedeutung besitzen (Kandulski et al. 2010). Verschiedene Faktoren ermöglichen dem Bakterium das Überleben in dieser „feindlichen Umgebung“ und tragen so zur Persistenz der Gastritis bei, die die Grundlage für klinische Befunde wie die Ulkuserkrankung oder das Magenkarzinom bildet. Zu diesen Faktoren zählt das VacA, das unter anderem die Antigenpräsentation und Proliferation von T-Zellen hemmt (Israel et al. 2010). Das Vorhandensein einer funktionellen cagPAI ist mit einer schwereren Immunreaktion und einer höheren Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung klinischer Symptome assoziiert (Israel et al. 2010). Das Genprodukt CagA führt in den Wirtszellen zu zahlreichen Veränderungen der Genexpression, Differenzierung und Morphologie (Murata-Kamyia et al. 2007) sowie zu Störungen der apikalen „tight junctions“ (Polk et al. 2010). Aktuelle Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung der bakteriellen Serinprotease HtrA an der Zerstörung epithelialer Interzellularverbindungen hin. Durch die Proteolyse der extrazellulären Domäne von E-Cadherin gelingt dem Keim die Kolonisation des interzellulären Kompartiments (Hoy et al. 2010).

Für die Verminderung der epithelialen SLPI-Produktion lassen sich verschiedene Konsequenzen für die Pathogenese der *H. pylori*-Gastritis ableiten. Die proteaseinhibitorische Funktion der C-terminalen Domäne bildet ein Gegengewicht zum gewebeschädigenden Effekt extrazellulärer Serinproteasen. Die Antrum-dominante Gastritis geht mit einem deutlichen Übergewicht der Elastase-Aktivität einher (Wex et al. 2006a) und ist mit der Entstehung duodenaler Ulzera assoziiert (Kusters et al. 2006). Eine Inhibition der bakteriellen Protease HtrA durch SLPI ist ebenfalls denkbar, so dass ein Verlust von SLPI die Zerstörung interzellulärer Verbindungen wahrscheinlich befördert. Die N-terminale Domäne von SLPI weist Defensin-ähnliche antibakterielle Aktivität gegen verschiedene gram-negative Keime auf (Hiemstra et al. 1996, Weldon et al. 2007). Eine Aktivität gegen *H. pylori* ist, wenngleich bisher noch nicht untersucht, anzunehmen, was der Reduktion dieses Proteins einen weiteren Aspekt für die Pathogenese der erfolgreichen Kolonisation eine zusätzliche Bedeutung zukommen lassen würde. Darüber hinaus legen die pleiotropen Effekte von SLPI auf die Regulation der angeborenen und erworbenen Immunabwehr den Schluss nahe, dass die

Wirkung von *H. pylori* auf diesen Faktor eine Rolle in der Modulation der Immunreaktion durch den Keim spielt.

Trotz intensiver Forschung seit der Erstbeschreibung von *H. pylori* im Jahr 1983 sind noch immer nicht alle pathophysiologischen Aspekte der Infektion und der daraus entstehenden Erkrankungen verstanden. Besonderes Augenmerk gilt dabei der Frage, warum eine Infektion zwar in fast allen Fällen zu einer chronischen Gastritis führt, aber nur bei 15-20% der Infizierten klinische Symptome verursacht (Kusters et al. 2006).

Um den Einfluss der verminderten SLPI-Expression auf den Ablauf der Entzündung und ihre Folgen, insbesondere die Entstehung maligner Neoplasien beurteilen zu können, werden auch in der Zukunft noch weitere Anstrengungen nötig sein. Grundlage hierfür wird ein Verständnis des dem Verlust zu Grunde liegenden Mechanismus sein, um dann im „knockout-“ oder „knockdown-Modell“ weitere Erkenntnisse über die Bedeutung dieses Phänomens zu erlangen. So konnte eine Unabhängigkeit des von uns untersuchten Effektes vom Vorhandensein der *cagPAI* mit dem TypIV-Sekretionssystem gezeigt werden (Krieg 2009, unveröffentlichte Daten). Aktuelle Untersuchungen ergaben eine Auslösbarkeit sowohl durch den Überstand von *H. pylori*-Kulturen als auch durch lysierte Bakterien und solche, deren Proteinbiosynthese durch Chloramphenicol inhibiert war. Ein direkter Kontakt der Bakterien zu den Zellen war ebenfalls nicht notwendig (Wex et al., unveröffentlichte Daten). Es ist also davon auszugehen, dass ein löslicher Faktor für die verminderte SLPI-Expression von Bedeutung ist. Eine Aufhebbarkeit des Effektes durch Erhitzen des bakteriellen Überstandes auf über 60-70°C und den Verdau mit einer Proteinase weist auf das Vorliegen eines Proteins als induzierender Faktor hin (Wex et al., unveröffentlichte Daten).

Alle bisher gesammelten Daten zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass ein von *H. pylori* sezerniertes Protein in den Mageneithelzellen einen posttranslationalen Prozess auslöst, der letztendlich zum Verlust von funktionellem SLPI führt.

Untersuchungen des „Sekretoms“, d.h. der Gesamtheit der sezernierten Proteine, von *H. pylori* werden erschwert durch die Neigung des Bakteriums zur Autolyse. Dadurch können auch intrazelluläre und membrangebundene Proteine in den Überstand gelangen und eine Sekretion „vortäuschen“. Verschiedene Studien haben sich mit diesem Problem befasst und konnten für verschiedene Proteine eine Sekretion wahrscheinlich machen, obgleich der Sekretionsmechanismus nicht immer zu bestimmen war (Backert et al. 2005, Bumann et al. 2002, Kim et al. 2002). Unter den sezernierten Proteinen befinden sich bereits gut charakterisierte, spezifische Pathogenitätsfaktoren wie das *VacA*. Andere Proteine wie *HtrA*, „*Helicobacter cystein-rich protein A*“ (*HcpA*) und die  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase (*Ggt*) sind

erst in den letzten Jahren zunehmend in das Interesse der Forschung gerückt (Dumrese et al. 2009, Gong et al. 2010, Hoy et al. 2010). Die Funktion wieder anderer Proteine konnte bisher nur über Homologien mit bereits untersuchten Proteinen abgeschätzt oder anhand von Aufbau und Struktur vermutet werden. Über Aufbau und Funktion eines letzten, wenn auch kleinen Anteils des Sekretoms liegen bisher noch gar keine Erkenntnisse vor.

Ob es sich bei dem von Wex et al. postulierten Protein um ein bisher noch nicht charakterisiertes, oder um eine noch nicht erkannte Funktion eines bereits bekannten Proteins handelt, kann derzeit noch nicht gesagt werden. Weitere Arbeiten werden also noch notwendig sein, um diesen Aspekt der Pathophysiologie der *H. pylori*-Infektion detailliert verstehen zu können.

## 7. Anhang

### 7.1 Literaturverzeichnis

1. Abboud R, Vimalanathan S. "Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema." *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2008; 12 (4): 361–367.
2. Abe T, Kobayashi N, Yoshimura K, Trapnell BC, Kim H, Hubbard RC, Brewer MT, Thompson RC, Crystal RG. "Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells." *The Journal of Clinical Investigation* 1991; 87 (6): 2207-2215.
3. Amieva MR, El-Omar EM. "Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection." *Gastroenterology* 2008; 134 (1): 306-323.
4. Argent RH, Hale JL, El-Omar EM, Atherton JC. "Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion." *Journal of medical microbiology* 2008; 57 (Pt 9): 1062-1067.
5. Arnold DM, Bernotas A, Nazi I, Stasi R, Kuwana M, Liu Y, Kelton JG, Crowther MA. "Platelet count response to *H. pylori* treatment in patients with immune thrombocytopenic purpura with and without *H. pylori* infection: a systematic review." *Haematologica* 2009; 94 (6): 850-856.
6. Ashcroft, G S, K Lei, W Jin, G Longenecker, A B Kulkarni, T Greenwell-Wild, H Hale-Donze, G McGrady, X Y Song, and S M Wahl. "Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing." *Nature Medicine* 2000; 6 (10): 1147-1153.
7. Atherton JC, Blaser MJ. "Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications." *The Journal of Clinical Investigation*. 2009 ; 119 (9): 2475-2487.
8. Backert S, Kwok T, Schmid M, Selbach M, Moese S, Peek RM, König W, Meyer TF, Jungblut PR. "Subproteomes of soluble and structure-bound *Helicobacter pylori* proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry." *Proteomics* 2005a; 5 (5): 1331-1345.
9. Backert S, Naumann M. "What a disorder: proinflammatory signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*." *Trends in Microbiology* 2010; 18 (11): 479-486.

10. Backert S, Selbach M. "Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis." *Cellular Microbiology* 2008; 10 (8): 1573-1581.
11. Bagchi D, McGinn TR, Ye X, Bagchi M, Krohn RL, Chatterjee A, Stohs SJ. "Helicobacter pylori-induced oxidative stress and DNA damage in a primary culture of human gastric mucosal cells." *Digestive diseases and sciences* 2002; 47 (6): 1405-1412.
12. Bauerfeind P, Garner R, Dunn BE, Mobley HL. "Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH." *Gut* 1997; 40 (1): 25-30.
13. Bebb JR, Letley DP, Thomas RJ, Aviles F, Collins HM, Watson SA, Hand NM, Zaitoun A, Atherton JC. "Helicobacter pylori upregulates matrilysin (MMP-7) in epithelial cells in vivo and in vitro in a Cag dependent manner." *Gut* 2003; 52 (10): 1408-1413.
14. Belkowski SM, Masucci J, Mahan A, Kervinen J, Olson M, Garavilla L de, D'Andrea MR. "Cleaved SLPI, a novel biomarker of chymase activity." *Biological chemistry* 2008; 389 (9): 1219-1224.
15. Birkholz S, Knipp U, Nietzki C, Adamek RJ, Opferkuch W. "Immunological activity of lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* on human peripheral mononuclear blood cells in comparison to lipopolysaccharides of other intestinal bacteria." *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1993; 6 (4): 317-324.
16. Biswas SK, Rahman I. "Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione." *Molecular aspects of medicine* 2009; 30 (1-2): 60-76.
17. Bodger K, Ahmed S, Pazmany L, Pritchard DM, Micheal A, Khan AL, Dimaline R, Dockray GJ, Varro A. "Altered gastric corpus expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in human and murine *Helicobacter* infection." *Journal of Clinical Pathology* 2008; 61 (1): 72-78.
18. Boudier C, Bieth JG. "Oxidized mucus proteinase inhibitor: a fairly potent neutrophil elastase inhibitor." *The Biochemical journal* 1994; 303: 61-68.
19. Brandt S, Kwok T, Hartig R, König W, Backert S. "NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102 (26): 9300-9305.
20. Bruce MG, Maaroos HI. "Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection." *Helicobacter* 2008; 13 Suppl 1: 1-6.
21. Bruch M, Bieth JG. "Influence of elastin on the inhibition of leucocyte elastase by alpha 1-proteinase inhibitor and bronchial inhibitor. Potent inhibition of elastin-bound elastase by bronchial inhibitor." *The Biochemical Journal* 1986; 238 (1): 269-273.



22. Bumann D, Aksu S, Wendland M, Janek K, Zimny-Arndt U, Sabarth N, Meyer TF, Jungblut PR. "Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*." *Infection and immunity* 2002; 70 (7): 3396-3403.
23. Cheng W-L, Wang C-S, Huang Y-H, et al. "Overexpression of a secretory leukocyte protease inhibitor in human gastric cancer." *International journal of cancer* 2008; 123 (8): 1787-1796.
24. Chotirmall SH, Greene CM, Oglesby IK, Thomas W, O'Neill SJ, Harvey BJ, McElvaney NG. "17Beta-estradiol inhibits IL-8 in cystic fibrosis by up-regulating secretory leucoprotease inhibitor." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2010; 182 (1): 62-72.
25. Compare D, Rocco A, Nardone G. "Risk factors in gastric cancer." *European review for medical and pharmacological sciences* 2010; 14 (4): 302-308.
26. Correa P, Houghton J. "Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*." *Gastroenterology* 2007; 133 (2): 659-672.
27. Correa P. "Does *Helicobacter pylori* cause gastric cancer via oxidative stress?" *Biological chemistry* 2006 Apr ; 387 (4): 361-364.
28. Cover, T L, Y Glupczynski, A P Lage, A Burette, M K Tummuru, G I Perez-Perez, and M J Blaser. "Serologic detection of infection with *cagA+* *Helicobacter pylori* strains." *Journal of clinical microbiology* 1995; 33 (6): 1496-1500.
29. Curtis CJL, Chang JY. "Pathway of Oxidative Folding of Secretory Leucocyte Protease Inhibitor: An 8-Disulfide Protein Exhibits a Unique Mechanism of Folding." *Biochemistry* 2006; 45 (19): 6231-6240.
30. Devoogdt N, Revets H, Ghassabeh GH, De Baetselier P. "Secretory leukocyte protease inhibitor in cancer development." *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004; 1028: 380-389.
31. Devoogdt N, Revets H, Kindt A, Liu YQ, De Baetselier P, Ghassabeh GH. "The tumor-promoting effect of TNF-alpha involves the induction of secretory leukocyte protease inhibitor." *Journal of Immunology* 2006; 177 (11):8046-8052
32. Ding A, Yu H, Yang J, Shi S, Ehrt S. "Induction of macrophage-derived SLPI by *Mycobacterium tuberculosis* depends on TLR2 but not MyD88." *Immunology* 2005; 116 (3): 381-389.

33. Ding S-Z, Minohara Y, Fan XJ, Wang J, Reyes VE, Patel J, Dirden-Kramer B, Boldogh I, Ernst PB, Crowe SE. "Helicobacter pylori infection induces oxidative stress and programmed cell death in human gastric epithelial cells." *Infection and Immunity* 2007; 75 (8): 4030-4039.
34. Draper D, Donohoe W, Mortimer L, Heine RP. "Cysteine proteases of *Trichomonas vaginalis* degrade secretory leukocyte protease inhibitor." *The Journal of Infectious Diseases* 1998; 178 (3): 815-819.
35. Draper DL, Landers DV, Krohn MA, Hillier SL, Wiesenfeld HC, Heine RP. "Levels of vaginal secretory leukocyte protease inhibitor are decreased in women with lower reproductive tract infections." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2000; 183 (5): 1243-1248
36. Dumrese C, Slomianka L, Ziegler U, Choi SS, Kalia A, Fulurija A, Lu W, Berg DE, Benghezal M, Marshall B, Mittl PRE. "The secreted *Helicobacter* cysteine-rich protein A causes adherence of human monocytes and differentiation into a macrophage-like phenotype." *FEBS letters* 2009; 583 (10):1637-43.
37. El-Omar EM, Oien K, El-Nujumi A, Gillen D, Wirz A, Dahill S, Williams C, Ardill JE, McColl KE. "Helicobacter pylori infection and chronic gastric acid hyposecretion." *Gastroenterology* 1997; 113 (1): 15-24.
38. Eriksson S. "Pulmonary Emphysema and alpha1-Antitrypsin Deficiency." *Acta medica Scandinavica* 1964; 175: 197-205.
39. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Mégraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang X, Achtman M, Suerbaum S. "Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations." *Science* 2003; 299 (5612): 1582-1585.
40. Feinstein LB, Holman RC, Christensen KLY, Steiner CA Swerdlow DL. "Trends in Hospitalizations for Peptic Ulcer Disease, United States, 1998–2005." *Emerging Infectious Diseases* 2010; 16 (9): 1410-1418
41. Flach C-F, Qadri F, Bhuiyan TR, et al. "Broad up-regulation of innate defense factors during acute cholera." *Infection and immunity* 2007; 75 (5): 2343-2350.
42. Fox, JG, Wang TC. "Inflammation, atrophy, and gastric cancer." *Journal of Clinical Investigation* 2007; 117 (1): 60–69.
43. Genta RM. "Helicobacter pylori, inflammation, mucosal damage, and apoptosis: pathogenesis and definition of gastric atrophy." *Gastroenterology* 1997; 113 (6 Suppl.): S51-55.

44. Gipson TS, Bless NM, Shanley TP, Crouch LD, Bleavins MR, Younkin EM, Sarma V, Gibbs DF, Tefera W, McConnell PC, Mueller WT, Johnson KJ, Ward P a. "Regulatory effects of endogenous protease inhibitors in acute lung inflammatory injury." *Journal of immunology* 1999; 162 (6): 3653-3662.
45. Gong M, Ling SSM, Lui SY, Yeoh KG, Ho B. "Helicobacter pylori gamma-glutamyl transpeptidase is a pathogenic factor in the development of peptic ulcer disease." *Gastroenterology* 2010; 139 (2): 564-573.
46. Gööz, M, P Gööz, and a J Smolka. "Epithelial and bacterial metalloproteinases and their inhibitors in H. pylori infection of human gastric cells." *American journal of physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 2001; 281 (3): 823-832.
47. Greene, C.M., N.G. McElvaney, S.J. O'Neill, and C.C. Taggart. "Secretory leucoprotease inhibitor impairs Toll-like receptor 2-and 4-mediated responses in monocytic cells." *Infection and Immunity* 2004; 72 (6): 3684.
48. Grobmyer SR, Barie PS, Nathan CF, Fuortes M, Lin E, Lowry SF, Wright CD, Weyant MJ, Hydo L, Reeves F, Shiloh MU, Ding A. "Secretory leukocyte protease inhibitor, an inhibitor of neutrophil activation, is elevated in serum in human sepsis and experimental endotoxemia.." *Critical Care Medicine* 2000; 28 (5) 1276-1282.
49. Grütter MG, Fendrich G, Huber R, Bode W. "The 2.5 Å X-ray crystal structure of the acid-stable proteinase inhibitor from human mucous secretions analysed in its complex with bovine alpha-chymotrypsin." *The EMBO Journal* 1988; 7 (2): 345-351.
50. Harlan JM, Levine JD, Callahan KS, Schwartz BR, Harker LA. "Glutathione redox cycle protects cultured endothelial cells against lysis by extracellularly generated hydrogen peroxide." *The Journal of clinical investigation* 1984; 73 (3): 706-713.
51. Hatakeyama M. "Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis." *Journal of gastroenterology* 2009; 44 (4): 239-248.
52. Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzl-Wieland R, Steffens GJ, Dijkman JH. "Antibacterial activity of antileukoprotease." *Infection and Immunity* 1996; 64 (11): 4520-5424.
53. Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, Bayley DL, Stockley RA. "Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis." *The American Journal of Medicine* 2000; 109 (4): 288-295.
54. Hochstrasser K, Reichert R, Schwarz S, Werle E. "Isolation and characterisation of a protease inhibitor from human bronchial secretion." *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 1972; 353 (2): 221-226.

55. Hoy B, Löwer M, Weydig C, Carra G, Tegtmeyer N, Geppert T, Schröder P, Sewald N, Backert S, Schneider G, Wessler S. "Helicobacter pylori HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion." *EMBO reports* 2010; 11 (10): 798-804.
56. Hritz I, Kuester D, Vieth M, Herszenyi L, Stolte M, Roessner A, Tulassay Z, Wex T, Malfertheiner P. "Secretory leukocyte protease inhibitor expression in various types of gastritis: a specific role of Helicobacter pylori infection." *European journal of gastroenterology & hepatology* 2006; 18 (3): 277-282.
57. <http://rndsystems.com/pdf/dpi00.pdf>
58. [http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/organe/151\\_tab.html](http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/organe/151_tab.html)
59. IARC Monographs on the Carcinogenic Risks to Humans. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1994;61:1–241.
60. Into T, Inomata M, Kanno Y, Matsuyama T, Machigashira M, Izumi Y, Imamura T, Nakashima M, Noguchi T, Matsushita K. "Arginine-specific gingipains from Porphyromonas gingivalis deprive protective functions of secretory leukocyte protease inhibitor in periodontal tissue." *Clinical and Experimental Immunology* 2006; 145 (3): 545-554.
61. Israel DA, Peek R. "Surreptitious manipulation of the human host by Helicobacter pylori." *Gut Microbes* 2010; 1 (2): 119–127.
62. Jacobsen LC, Sørensen OE, Cowland JB, Borregaard N, Theilgaard-Mönch K. "The secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and the secondary granule protein lactoferrin are synthesized in myelocytes, colocalize in subcellular fractions of neutrophils, and are coreleased by activated neutrophils." *Journal of leukocyte biology* 2008; 83 (5): 1155-1164.
63. Jana NK, Gray LR, Shugars DC. "Human immunodeficiency virus type 1 stimulates the expression and production of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in oral epithelial cells: a role for SLPI in innate mucosal immunity." *Journal of Virology* 2005; 79 (10): 6432.
64. Jaumann F, Elssner A, Mazur G, Dobmann S, Vogelmeier C. "Transforming growth factor-beta1 is a potent inhibitor of secretory leukoprotease inhibitor expression in a bronchial epithelial cell line. Munich Lung Transplant Group." *European Respiratory Journal* 2000; 15 (6): 1052-1057.

65. Jin FY, Nathan CF, Radzioch D, Ding A. "Lipopolysaccharide-related stimuli induce expression of the secretory leukocyte protease inhibitor, a macrophage-derived lipopolysaccharide inhibitor." *Infection and Immunity* 1998; 66 (6): 2447-2452.
66. Jin FY, Nathan CF, Radzioch D, Ding A. "Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide." *Cell* 1997; 88 (3): 417-426.
67. Kajikawa H, Yoshida N, Katada K, Hirayama F, Handa O, Kokura S, Naito Y, Yoshikawa T. "Helicobacter pylori activates gastric epithelial cells to produce interleukin-8 via protease-activated receptor 2." *Digestion* 2007; 76 (3-4): 248-255.
68. Kandulski A, Malfertheiner P, Wex T. "Role of regulatory T-cells in H. pylori-induced gastritis and gastric cancer." *Anticancer research* 2010; 30 (4): 1093-1103.
69. Kavermann H, Burns BP, Angermuller K, Odenbreit S, Fischer W, Melchers K, Haas R. "Identification and characterization of Helicobacter pylori genes essential for gastric colonization." *The Journal of Experimental Medicine* 2003; 197 (7): 813-822.
70. Kim N, Weeks DL, Shin JM, Scott DR, Young MK, Sachs G. "Proteins released by Helicobacter pylori in vitro." *Journal of Bacteriology* 2002; 184 (22): 6155-6162.
71. Klein T, Bischoff R. "Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases." *Amino acids* 2010; Epub ahead of print
72. Kramps JA, Twisk C van, Klasen EC, Dijkman JH. „Interactions among stimulated human polymorphonuclear leucocytes, released elastase and bronchial antileucoprotease." *Clinical science* 1988; 75 (1): 53-62.
73. Krieg, A. „Ex vivo und in vitro Untersuchungen zur SLPI-Expression in Abhängigkeit bakterieller Pathogenitätsfaktoren bei einer H. pylori-Infektion.“ Dissertation 2009.
74. Krueger S, Hundertmark T, Kalinski T, Peitz U, Wex T, Malfertheiner P, Naumann M, Roessner A. "Helicobacter pylori encoding the pathogenicity island activates matrix metalloproteinase 1 in gastric epithelial cells via JNK and ERK." *The Journal of biological chemistry* 2006; 281 (5): 2868-2875.
75. Kueppers F.  $\alpha_1$ -Antitrypsin. *American Journal of Human Genetics*. 1973;25:677-686.
76. Kuipers EJ. "Helicobacter pylori and the risk and management of associated diseases: gastritis, ulcer disease, atrophic gastritis and gastric cancer." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 1997; 11 Suppl 1: 71-88.

77. Kundu P, Mukhopadhyay AK, Patra R, Banerjee A, Berg DE, Swarnakar S. "Cag pathogenicity island-independent up-regulation of matrix metalloproteinases-9 and -2 secretion and expression in mice by *Helicobacter pylori* infection." *The Journal of Biological Chemistry* 2006; 281 (45): 34651-34662.
78. Kusters JG, Vliet AHM van, Kuipers EJ. "Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection." *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19 (3): 449-490.
79. Lehours P, Dupouy S, Bergey B, Ruskoné-Foumestroux A, Delchier JC, Rad R, Richy F, Tankovic J, Zerbib F, Mégraud F, Ménard A. "Identification of a genetic marker of *Helicobacter pylori* strains involved in gastric extranodal marginal zone B cell lymphoma of the MALT-type." *Gut* 2004; 53 (7): 931-937.
80. Leitch JM, Yick PJ, Culotta VC. "The right to choose: multiple pathways for activating copper,zinc superoxide dismutase." *The Journal of biological chemistry* 2009; 284 (37): 24679-2483.
81. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, Van Der Merwe SW, others. "An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*." *Nature* 2007; 445 (7130): 915–918.
82. Löwer M, Weydig C, Metzler D, Reuter A, Starzinski-Powitz A, Wessler S, Schneider G. "Prediction of extracellular proteases of the human pathogen *Helicobacter pylori* reveals proteolytic activity of the Hp1018/19 protein HtrA." *PloS one* 2008; 3 (10): e3510.
83. Luo B-L, Niu R-C, Feng J-T, Hu C-P, Xie X-Y, Ma L-J. "Downregulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor in chronic obstructive lung disease: the role of TGF-beta/Smads signaling pathways." *Archives of Medical Research* 2008; 39 (4): 388-396.
84. Ma G, Greenwell-Wild T, Lei K, Jin W, Swisher J, Hardegen N, Wild CT, Wahl SM. "Secretory leukocyte protease inhibitor binds to annexin II, a cofactor for macrophage HIV-1 infection." *The Journal of Experimental Medicine* 2004; 200 (10): 1337-1346.
85. Maffia PC, Zittermann SE, Scimone ML, Tateosian N, Amiano N, Guerrieri D, Lutzky V, Rosso D, Romeo HE, Garcia VE, Issekutz AC, Chuluyan HE. "Neutrophil elastase converts human immature dendritic cells into transforming growth factor-beta1-secreting cells and reduces allostimulatory ability." *The American Journal of Pathology* 2007; 171 (3): 928-937.
86. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. "Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report." *Gut* 2007; 56 (6): 772-781.

87. Marí M, Morales A, Colell A, Garcia-Ruiz C, Fernández-Checa JC. “Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant.” *Antioxidants & Redox Signaling* 2009 ; 11 (11): 2685–2700.
88. Marshall BJ, Warren JR. “Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration.” *Lancet* 1984; 1 (8390): 1311-1315.
89. Martel C de, Franceschi S. “Infections and cancer: established associations and new hypotheses.” *Critical reviews in oncology/hematology* 2009; 70 (3): 183-194.
90. Moayyedi P, Wason C, Peacock R, Walan A, Bardhan K, Axon AT, Dixon MF. “Changing patterns of *Helicobacter pylori* gastritis in long-standing acid suppression.” *Helicobacter* 2000; 5 (4): 206-214.
91. Moran AP. “Relevance of fucosylation and Lewis antigen expression in the bacterial gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori*.” *Carbohydrate Research* 2008; 343 (12): 1952-1965.
92. Mulligan MS, Lentsch a B, Huber-Lang M, Guo RF, Sarma V, Wright CD, Ulich TR, Ward P. “Anti-inflammatory effects of mutant forms of secretory leukocyte protease inhibitor.” *The American Journal of Pathology* 2000; 156 (3): 1033-1039.
93. Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, Yamahashi Y, Saito Y, Higashi H, Aburatani H, Akiyama T, Peek RM, Azuma T, Hatakeyama M. “*Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells.” *Oncogene* 2007; 26 (32): 4617-4626.
94. Nakamura a, Mori Y, Hagiwara K, Suzuki T, Sakakibara T, Kikuchi T, Igarashi T, Ebina M, Abe T, Miyazaki J, Takai T, Nukiwa T. “Increased Susceptibility to LPS-induced Endotoxin Shock in Secretory Leukoprotease Inhibitor (SLPI)-deficient Mice.” *Journal of Experimental Medicine* 2003; 197 (5): 669-674.
95. Nakamura K, Takamoto N, Hongo A, Kodama J, Abrzua F, Nasu Y, Kumon H, Hiramatsu Y. “Secretory leukoprotease inhibitor inhibits cell growth through apoptotic pathway on ovarian cancer.” *Oncology reports* 2008; 19 (5): 1085-1091.
96. Nilius M, Pugliese M, Malfertheiner P. “*Helicobacter pylori* and proteolytic activity.” *European Journal of Clinical Investigation* 1996; 26 (12): 1103-1106.
97. NomuraA, Stemmermann G. “*Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration.” *Annals of internal Medicine* 1994; 120 (12): 977-981
98. Nukiwa T, Suzuki T, Fukuhara T, Kikuchi T. “Secretory leukocyte peptidase inhibitor and lung cancer.” *Cancer Science* 2008; 99 (5): 849-855.

99. Nyström M, Westin UP, Linder C, Ohlsson K. "Secretory leukocyte protease inhibitor in punch biopsies from human colonic mucosa." *Mediators of Inflammation* 2001; 10 (5): 269-272.
100. O'Toole PW, Lane MC, Porwollik S. "Helicobacter pylori motility." *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 2000; 2 (10): 1207-1214.
101. Obrig TG, Culp WJ, McKeehan WL, Hardesty B. "The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes." *The Journal of biological chemistry* 1971; 246 (1): 174-181.
102. Odaka C, Mizuochi T, Yang J, Ding A. "Murine macrophages produce secretory leukocyte protease inhibitor during clearance of apoptotic cells: implications for resolution of the inflammatory response." *The Journal of Immunology* 2003; 171 (3): 1507-1514.
103. Odenbreit S, Swoboda K, Barwig I, Ruhl S, Borén T, Koletzko S, Haas R. "Outer membrane protein expression profile in Helicobacter pylori clinical isolates." *Infection and Immunity* 2009; 77 (9): 3782-3790.
104. Ogden SR, Noto JM, Allen SS, Patel DA, Romero-Gallo J, Washington MK, Fingleton B, Israel DA, Lewis ND, Wilson KT, Chaturvedi R, Zhao Z, Shyr Y, Peek RM. "Matrix metalloproteinase-7 and premalignant host responses in Helicobacter pylori-infected mice." *Cancer research* 2010; 70 (1): 30-35.
105. Ohlsson S, Ljungkrantz I, Ohlsson K, Segelmark M, Wieslander J. "Novel distribution of the secretory leukocyte proteinase inhibitor in kidney." *Mediators of Inflammation* 2001; 10 (6): 347-350.
106. Oliveira C, Seruca R, Carneiro F. "Hereditary gastric cancer." *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* 2009; 23 (2): 147-157.
107. Pillinger MH, Marjanovic N, Kim S-Y, Lee Y-C, Scher JU, Roper J, Abeles AM, Izmirlly PI, Axelrod M, Pillinger MY, Tolani S, Dinsell V, Abramson SB, Blaser MJ. "Helicobacter pylori stimulates gastric epithelial cell MMP-1 secretion via CagA-dependent and -independent ERK activation.." *The Journal of Biological Chemistry* 2007; 282 (26): 18722-18731.
108. Polk DB, Peek RM. "Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond." *Nature Reviews Cancer* 2010; 10 (6): 403-414.
109. Ramadas R a, Wu L, LeVine AM. "Surfactant protein A enhances production of secretory leukoprotease inhibitor and protects it from cleavage by matrix metalloproteinases." *Journal of Immunology* 2009; 182 (3): 1560-1567.



110. Resnick MB, Sabo E, Meitner P a, Kim SS, Cho Y, Kim HK, Tavares R, Moss SF. “Global analysis of the human gastric epithelial transcriptome altered by *Helicobacter pylori* eradication in vivo.” *Gut*. 2006;55(12):1717-1724.
111. Reviglio VE, Sambuelli RH, Olmedo A, Falco M, Echenique J, O’Brien TP, Kuo IC. “Secretory leukocyte protease inhibitor is an inducible antimicrobial peptide expressed in *Staphylococcus aureus* endophthalmitis.” *Mediators of Inflammation* 2007: Article ID 93857.
112. Roghanian A, Drost EM, MacNee W, Howie SEM, Sallenave J-M. “Inflammatory lung secretions inhibit dendritic cell maturation and function via neutrophil elastase.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2006; 174 (11): 1189-1198.
113. Roth K a, Kapadia SB, Martin SM, Lorenz RG. “Cellular immune responses are essential for the development of *Helicobacter felis*-associated gastric pathology.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163, no. 3 (August 1999): 1490-7.
114. Saikawa Y, Fukuda K, Takahashi T, Nakamura R, Takeuchi H, Kitagawa Y. “Gastric carcinogenesis and the cancer stem cell hypothesis.” *Gastric Cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association* 2010; 13 (1): 11-24.
115. Salama NR, Otto G, Tompkins L, Falkow S. “Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection.” *Infection and Immunity* 2001; 69 (2): 730-736.
116. Sallenave J-M, Si Tahar M, Cox G, Chignard M, Gauldie J. “Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils.” *Journal of leukocyte biology* 1997; 61 (6): 695-702.
117. Sallenave J-M. “Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity.” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2010; 42 (6 ): 635-643.
118. Samsom JN, Marel APJ van der, Berkel L a van, Helvoort JMLM van, Simons-Oosterhuis Y, Jansen W, Greuter M, Nelissen RLH, Meeuwisse CML, Nieuwenhuis EES, Mebius RE, Kraal G. “Secretory leukoprotease inhibitor in mucosal lymph node dendritic cells regulates the threshold for mucosal tolerance.” *Journal of Immunology* 2007; 179 (10): 6588-6595.
119. Schmees C, Prinz C, Treptau T, Rad R, Hengst L, Voland P, Bauer S, Brenner L, Schmid RM, Gerhard M. “Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase.” *Gastroenterology* 2007; 132 (5): 1820-1833.

120. Schmid M, Fellermann K, Fritz P, Wiedow O, Stange EF, Wehkamp J. "Attenuated induction of epithelial and leukocyte serine antiproteases elafin and secretory leukocyte protease inhibitor in Crohn's disease." *Journal of Leukocyte Biology* 2007; 81 (4): 907-915.
121. Seger R a. "Chronic granulomatous disease: recent advances in pathophysiology and treatment." *The Netherlands journal of medicine* 2010; 68 (11): 334-340.
122. Selgrad M, Malfertheiner P, Fini L, Goel A, Boland CR, Ricciardiello L. "The role of viral and bacterial pathogens in gastrointestinal cancer.." *Journal of Cellular Physiology* 2008; 216 (2): 378-388.
123. Shiota S, Matsunari O, Watada M, Hanada K, Yamaoka Y. "Systematic review and meta-analysis: the relationship between the Helicobacter pylori dupA gene and clinical outcomes." *Gut Pathogens* 2010; 2:13.
124. Simpkins FA, Devoogdt NM, Rasool N, Tchabo NE, Alejandro EU, Kamrava MMRN, Kohn EC. "The alarm anti-protease, secretory leukocyte protease inhibitor, is a proliferation and survival factor for ovarian cancer cells." *Carcinogenesis* 2008; 29 (3): 466-472.
125. Si-Tahar M, Merlin D, Sitaraman S, Madara JL. "Constitutive and regulated secretion of secretory leukocyte proteinase inhibitor by human intestinal epithelial cells." *Gastroenterology* 2000; 118 (6): 1061-1071.
126. Song X, Zeng L, Jin W, Thompson J, Mizel DE, Lei K-jian, Billingham R, Poole AR, Wahl SM. "Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis." *The Journal of Experimental Medicine* 1999; 190 (4): 535.
127. Sponer M, Nick HP, Schnebli HP. "Different susceptibility of elastase inhibitors to inactivation by proteinases from Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa." *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 1991; 372 (11): 963-970.
128. Stetler, G, M T Brewer, and R C Thompson. "Isolation and sequence of a human gene encoding a potent inhibitor of leukocyte proteases." *Nucleic Acids Research* 1986; 14 (20): 7883-7896.
129. Sullivan AL, Dafforn T, Hiemstra PS, Stockley R a. "Neutrophil elastase reduces secretion of secretory leukoproteinase inhibitor (SLPI) by lung epithelial cells: role of charge of the proteinase-inhibitor complex." *Respiratory Research* 2008; 9: 60.

130. Szasz T, Thakali K, Fink GD, Watts SW. "A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease." *Experimental biology and medicine* 2007; 232 (1): 27-37.
131. Taggart CC, Cryan S-A, Weldon S, Gibbons A, Greene CM, Kelly E, Low TB, O'Neill SJ, McElvaney NG. "Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF-kappaB binding sites in monocytes and inhibits p65 binding." *The Journal of Experimental Medicine* 2005; 202 (12): 1659-1668.
132. Taggart CC, Lowe GJ, Greene CM, Mulgrew a T, O'Neill SJ, Levine RL, McElvaney NG. "Cathepsin B, L, and S cleave and inactivate secretory leucoprotease inhibitor." *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276 (36): 33345-33352.
133. Takahashi K, Tatsunami R, Oba T, Tampo Y. "Buthionine sulfoximine promotes methylglyoxal-induced apoptotic cell death and oxidative stress in endothelial cells." *Biological & pharmaceutical bulletin* 2010; 33 (4): 556-560.
134. Thompson M, Lapointe J, Yoon-La Choi DEO, Higgins JP, Brooks JD, Pollack JR. Id "Identification of candidate prostate cancer genes through comparative expression-profiling of seminal vesicle." *The Prostate* 2008; 68 (11): 1248-1256.
135. Thompson RC, Ohlsson K. "Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986; 83 (18): 6692-6696.
136. Tkachenko MA, Zhannat NZ, Erman LV, Blashenkova EL, Isachenko SV, Isachenko OB, Graham DY, Malaty HM. "Dramatic changes in the prevalence of Helicobacter pylori infection during childhood: a 10-year follow-up study in Russia." *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2007; 45 (4): 428-432
137. Tomita M, Ando T, Minami M, Watanabe O, Ishiguro K, Hasegawa M, Miyake N, Kondo S, Kato T, Miyahara R, Ohmiya N, Niwa Y, Goto H. "Potential role for matrix metalloproteinase-3 in gastric ulcer healing." *Digestion* 2009; 79 (1) :23-29.
138. Velarde MC, Parisek SI, Eason RR, Simmen FA, Simmen RCM. "The secretory leukocyte protease inhibitor gene is a target of epidermal growth factor receptor action in endometrial epithelial cells." *The Journal of Endocrinology* 2005; 184 (1): 141-151.
139. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Mémet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL. "Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island.." *Nature Immunology* 2004; 5 (11): 1166-1174.

140. Vogelmeier C, Bierdermann T, Maier K, Mazur G, Behr J, Krombach F, Buhl R. "Comparative loss of activity of recombinant secretory inhibitor caused leukoprotease inhibitor and  $\alpha_1$ -protease inhibitor by different forms of oxidative stress." *European Respiratory Journal* 1997; 10 (9): 2114-2119.
141. Vogelmeier C, Hubbard RC, Fells G a, Schnebli HP, Thompson RC, Fritz H, Crystal RG. "Anti-neutrophil elastase defense of the normal human respiratory epithelial surface provided by the secretory leukoprotease inhibitor." *The Journal of clinical investigation* 1991; 87 (2): 482-488.
142. Vries, AC de, Kuipers EJ. "Epidemiology of premalignant gastric lesions: implications for the development of screening and surveillance strategies." *Helicobacter* 2007; 12 Suppl 2: 22-31.
143. Wang G, Hong Y, Olczak A, Maier SE, Maier RJ. "Dual Roles of Helicobacter pylori NapA in inducing and combating oxidative stress." *Infection and Immunity* 2006a; 74 (12): 6839-6846.
144. Wang N, Thuraisingam T, Fallavollita L, Ding A, Radzioch D, Brodt P. "The secretory leukocyte protease inhibitor is a type 1 insulin-like growth factor receptor-regulated protein that protects against liver metastasis by attenuating the host proinflammatory response." *Cancer research* 2006b; 66 (6): 3062-3070.
145. Wang X, Li X, Xu L, Zhan Y, Yaish-Ohad S, Erhardt J a, Barone FC, Feuerstein GZ. "Up-regulation of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in the brain after ischemic stroke: adenoviral expression of SLPI protects brain from ischemic injury." *Molecular Pharmacology* 2003; 64 (4): 833-840.
146. Weis VG, Goldenring JR. "Current understanding of SPEM and its standing in the preneoplastic process." *Gastric Cancer* 2009; 12 (4): 189-197.
147. Weldon S, McNally P, McElvaney NG, Elborn JS, McAuley DF, Wartelle J, Belaouaj A, Levine RL, Taggart CC. "Decreased levels of secretory leucoprotease inhibitor in the Pseudomonas-infected cystic fibrosis lung are due to neutrophil elastase degradation." *Journal of immunology* 2009; 183 (12): 8148-8156.
148. Weldon S, Taggart CC. "Innate host defense functions of secretory leucoprotease inhibitor." *Experimental Lung Research* 2007; 33 (10): 485-491.

149. Wetering S van, Der Linden AC van, Sterkenburg MA van, Rabe KF, Schalkwijk J, Hiemstra PS. "Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) production by human bronchial epithelial cells: increase of cell-associated SLPI by neutrophil elastase." *Journal of Investigative Medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research* 2000a; 48 (5): 359-366.
150. Wetering S van, Linden a C van der, Sterkenburg M a van, Boer WI de, Kuijpers a L, Schalkwijk J, Hiemstra PS. "Regulation of SLPI and elafin release from bronchial epithelial cells by neutrophil defensins." *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 2000b; 278 (1): L51-58.
151. Wex T, Mönkemüller K, Kuester D, Weise S, Kropf S, Fry LC, Stahr A, Völkel S, Roessner A, Malfertheiner P. "Gastroesophageal reflux disease does not lead to changes in the secretory leukocyte protease inhibitor expression in esophageal mucosa." *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2009; 21 (2): 150-158.
152. Wex T, Sokic-Milutinovic A, Todorovic V, Bjelovic M, Milosavljevic T, Pesko P, Malfertheiner P. "Down-regulation of secretory leukocyte protease inhibitor expression in gastric mucosa is a general phenomenon in Helicobacter pylori-related gastroduodenal diseases." *Digestive diseases* 2004b; 22 (4): 390-395.
153. Wex T, Treiber G, Nilius M, Vieth M, Roessner A, Malfertheiner P. "Helicobacter pylori-mediated gastritis induces local downregulation of secretory leukocyte protease inhibitor in the antrum." *Infection and immunity* 2004a; 72 (4): 2383-2385.
154. Wex T, Treiber G, Venerito M, Leodolter A, Peitz U, Kuester D, Hritz I, Krueger S, Roessner A, Malfertheiner P. "Helicobacter pylori-induced downregulation of the secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in gastric epithelial cell lines and its functional relevance for H. pylori-mediated diseases." *Biological chemistry* 2006a; 387 (7): 893-901.
155. Wex T, Ye S, Treiber G, Vieth M, Roessner A, Malfertheiner P. "Helicobacter pylori infection, but not low-dose aspirin, results in a local reduction of the secretory leukocyte protease inhibitor in gastroduodenal mucosa." *Helicobacter* 2006b; 11 (1): 31-38.
156. Wheelhouse N, Wattedegera S, Fleming D, Fitch P, Kelly R, Entrican G. "Chlamydia trachomatis and Chlamydia abortus induce the expression of secretory leukocyte protease inhibitor in cells of the human female reproductive tract." *Microbiology and Immunology* 2008; 52 (9): 465-468.
157. Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave J-M. "SLPI and elafin: one glove, many fingers." *Clinical science* 2006; 110 (1): 21-35.

158. Wong BLW, Zhu S-L, Huang XR, Ma J, Xia HHX, Bucala R, Wong BCY, Lan HY. "Essential role for macrophage migration inhibitory factor in gastritis induced by *Helicobacter pylori*." *The American Journal of Pathology* 2009; 174 (4): 1319-1328.
159. Xu W, He B, Chiu A, Chadburn A, Shan M, Buldys M, Ding A, Knowles DM, Santini PA, Cerutti A. "Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI." *Nature Immunology* 2007; 8 (3): 294-303.
160. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima KEI, Graham DY. "Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA, and vac A Status and Clinical Outcome : Studies in Four Different Countries." *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37 (7): 2274-2279.
161. Yan B, Yates Z, Balland A, Kleemann GR. "Human IgG1 hinge fragmentation as the result of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated radical cleavage." *The Journal of biological chemistry* 2009a; 284 (51): 35390-35402.
162. Yan F, Cao H, Chaturvedi R, Krishna U, Hobbs SS, Dempsey PJ, Peek RM, Cover TL, Washington MK, Wilson KT, Polk DB. "Epidermal growth factor receptor activation protects gastric epithelial cells from *Helicobacter pylori*-induced apoptosis." *Gastroenterology* 2009b; 136 (4): 1297-1307,
163. Yoshida N, Yoshikawa T. "Basic and translational research on proteinase-activated receptors: implication of proteinase/proteinase-activated receptor in gastrointestinal inflammation." *Journal of Pharmacological Sciences* 2008; 108 (4): 415-421.
164. Zaidi SFH, Ahmed K, Yamamoto T, Kondo T, Usmanghani K, Kadowaki M, Sugiyama T. "Effect of resveratrol on *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 secretion, reactive oxygen species generation and morphological changes in human gastric epithelial cells." *Biological & pharmaceutical bulletin* 2009; 32 (11): 1931-1935.
165. Zhu J, Nathan C, Jin W, Sim D, Ashcroft GS, Wahl SM, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wright CD, Ding A. "Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair." *Cell* 2002; 111 (6): 867-878.

**Verzeichnis der Wissenschaftlichen Veröffentlichungen:**

Schindele D, Wex T, Malfertheiner P „Regulation der mukosalen SLPI-Konzentration bei *H. pylori*-Infektion.“ 18. Kongress der Mitteldeutschen Gesellschaft für Gastroenterologie: Bad Soden/Taunus, Deutschland, 07.05.-09.05.2009

-Poster-

Wex T, Schindele D, Schönberg C, Malfertheiner P „*H. pylori*-Infection Changes Proepithelin Levels Independent of the Expression of Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) in AGS cells and gastric mucosa.” *European Helicobacter Study Group, XXIII International Workshop*. Rotterdam, Niederlande, 16.09-10.09.2010, *Helicobacter* 15 (4): 348-349

-Poster-

Wex T, Schindele D, Schönberg C, Malfertheiner P „*H. pylori*-Infection Changes Proepithelin Levels in AGS Cells Independent of the Expression of Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI).” *Digestive Disease Week. AGA*, New Orleans, USA, 30.04.-05.05.2010.

*Gastroenterology* 138 (5): 248.

-Poster-

Wex T, Schindele D, Krieg A, Peitz U, Naumann M, Malfertheiner P „*Helicobacter pylori* reguliert SLPI in Magenkarzinomzellen unabhängig von der Existenz der bakteriellen Pathogenitätsinsel (PAI).“ 64. Jahrestagung der DGVS, 29.09.-04.10.2009, Hamburg, Deutschland. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 47:867.

-Poster-

Wex T, Schindele D, Krieg A, Peitz U, Naumann M, Malfertheiner P „The *Helicobacter pylori*- induced reduction of secretory leukocyte protease inhibitor protein levels is regulated by posttranslational mechanisms in a CagA-independent manner.” *European Helicobacter Study Group, XXII International Workshop*. Porto, Portugal, 17.09-10.09.2009, *Helicobacter* 14 (4): 354.

-Poster-

Wex T, Kuester D, Schönberg C, Schindele D, Treiber G, Malfertheiner P „Mucosal Progranulin expression is induced by *H. pylori*, but independent of Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) expression.” *BMC Gastroenterology* 2011, 11:63,  
<http://www.biomedcentral.com/1471-230X/11/63>



**Curriculum vitae**Persönliche Angaben:

Name: Daniel Wolfgang Schindele  
 Geburtsdatum: 02.11.1983  
 Geburtsort: München  
 Familienstand: ledig

Ausbildung und Zivildienst:

09/1989 – 08/1994: Grundschule Betzigau  
 08/2000 – 06/2001: Green City High School, Green City, Missouri, USA  
 09/1994 – 06/2003: Allgäu Gymnasium Kempten, Abitur mit Gesamtnote 1,3  
  
 09/2003 – 06/2004: Zivildienst in der Klinik für Kinder und Jugendpsychiatrie Josefinum in Kempten  
  
 10/2004 – 10/2010: Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg  
 09/2006: 1. Staatsexamen  
 10/2010 2. Staatsexamen

Berufliche Laufbahn:

seit 02/2011: Assistenzarzt in Weiterbildung, Klinik für Urologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

**Eidesstattliche Erklärung:**

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

**Regulation der „Secretory Leukocyte Protease Inhibitor“-Expression in Magenepithelzellen unter dem Einfluss der Infektion mit *Helicobacter pylori***

in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie  
mit Unterstützung durch PD Dr. Thomas Wex

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

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

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht.

Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Daniel Schindele

**Danksagung:**

Mein Dank geht allen voran an PD Dr. rer. nat. Thomas Wex, der mich während meiner gesamten Tätigkeit in seiner Forschungsgruppe nach allen Kräften unterstützt hat. Seine stetige Erreichbarkeit, Flexibilität und zügige Korrekturen waren für mich alles Andere als selbstverständlich.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. med. Peter Malfertheiner für die Möglichkeit in seiner Klinik zu promovieren. An seiner Klinik habe ich ausgezeichnete Arbeitsbedingungen vorgefunden und von einem inspirierenden, hochaktiven Forschungsbetrieb profitieren dürfen.

Herzlichst bedanken für ihre tatkräftige Unterstützung und das freundliche Arbeitsklima möchte ich mich bei Frau Ursula Stolz, Frau Marion Holley, Frau Nadine Schüler, Frau Simone Philipsen und Frau Wiebke Schirrmeister. Herzlichen Dank auch dafür, dass Sie auch stets geduldig für Fragen zur Verfügung standen.

Selbstverständlich danke ich meinen Eltern, Michael und Maria Schindele, die mir diese Ausbildung erst ermöglicht und mich auch noch während der Fertigstellung dieser Arbeit weiter unterstützt haben.

„Last but not least“ danke ich Frau Anne Ballaschk für ihre kontinuierliche Unterstützung wie auch für ihre fachlichen Anregungen