

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

**Expression der intestinalen Transkriptionsfaktoren
Cdx1 und Cdx2
in der gastralen Mukosa unter Einfluss der
Helicobacter pylori-Infektion und der
gastroösophagealen Refluxerkrankung**

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	Jan Bornschein
geboren in	Baden-Baden
Magdeburg	2007

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Bornschein, Jan:

Expression der intestinalen Transkriptionsfaktoren Cdx1 und Cdx2 in der gastralen Mukosa unter dem Einfluss der *Helicobacter pylori*-Infektion und der gastroösophagealen Refluxerkrankung

2007 - 88 Bl.: 15 Abb., 11 Tab., 2 Anl.

Kurzreferat

Cdx1 und Cdx2 sind epitheliale Transkriptionsfaktoren, die essentiell für die ontogenetische Differenzierung des Gastrointestinaltraktes sind, aber denen auch eine regulatorische Funktion bei der Transdifferenzierung zu intestinaler Metaplasie im oberen Verdauungstrakt zugesprochen wird. Insbesondere im Magen und im distalen Ösophagus gilt diese als prämaligene Läsion im Zusammenhang mit der Entstehung von Adenokarzinomen.

Um sowohl die individuellen als auch die wechselseitigen Einflüsse der wesentlichen Risikofaktoren, der *H.pylori*-Infektion und der gastroösophagealen Refluxerkrankung (GERD), zu evaluieren, wurden Biopsien der gastralen Mukosa (Antrum, Korpus, Kardial) von 96 Patienten, die je nach Vorhandensein einer *H.pylori*-Infektion oder einer GERD in Gruppen eingeteilt worden waren, sowohl histologisch bewertet als auch ihr Gehalt an Cdx1-beziehungswise Cdx2-spezifischer mRNA mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Zur Validierung der so gewonnenen Resultate wurde ein zweites Studienkollektiv mit 66 Patienten retrospektiv zusammengestellt, in welchem die histopathologische Evaluierung der mukosalen Biopsien sowie der immunhistochemische Nachweis des CDX2-Proteins erfolgte. In der Mehrzahl der untersuchten Biopsien konnte sowohl eine Cdx1- als auch eine Cdx2-Genexpression dokumentiert werden, wobei Cdx2 deutlich häufiger nachgewiesen wurde. Eine entzündungsassoziierte Expression von Cdx2 zeigte sich vor allem bei *H.pylori*-positiven Patienten, während dies bei Patienten allein mit GERD nicht der Fall war. Auffallend war eine im Vergleich zur Referenzgruppe erhöhte Expression von Cdx2 im Antrum von Patienten mit GERD, die durch duodenogastralen Reflux bedingt sein könnte.

Generell scheint es sich bei *H.pylori*- und bei Reflux-induzierter intestinaler Metaplasie um unterschiedliche Entitäten mit unterschiedlicher Pathogenese zu handeln, wobei ein kombiniertes Vorkommen beider ätiologischer Faktoren deren pathogenes Potential verstärkt.

Schlüsselwörter

Cdx1, Cdx2, *H.pylori*, GERD, Intestinale Metaplasie, Barrett-Ösophagus

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Definitionen	1
1.2	Entwicklung von Inzidenz und Prävalenz von Adenokarzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes	2
1.3	Die Entstehung von Adenokarzinomen – eine Sequenz?	3
1.4	Risikofaktoren für Adenokarzinome des Magens und des distalen Ösophagus	6
1.4.1	Gastroösophageale Refluxerkrankung (GERD)	6
1.4.2	<i>Helicobacter pylori</i>	8
1.5	Intestinale Metaplasie und Adenokarzinome an der Kardie – GERD, <i>H.pylori</i> oder reine Definitionssache?	10
1.6	CDX1 und CDX2 – Grundstein für intestinale Differenzierung	12
1.6.1	Definition	12
1.6.2	Funktionelle Bedeutung	13
1.7	Pathophysiologische Bedeutung von CDX1 und CDX2	14
1.8	Aufgabenstellung	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Studienkollektiv	16
2.2	Endoskopie	18
2.3	Histologie und Gruppeneinteilung betreffend des Vorhandenseins einer <i>H.pylori</i> -Infektion beziehungsweise einer gastroösophagealen Refluxerkrankung	19
2.4	RNA-analytische Methoden	20
2.4.1	RNA-Extraktion	20
2.4.2	Qualitätsüberprüfung der RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese	21
2.4.3	Photospektrometrische Konzentrationsbestimmung der RNA	22
2.4.4	Umschreiben der mRNA-Fraktion in eine cDNA mittels Reverser Transkriptase-Reaktion	22
2.5	Quantitative RT-PCR	22
2.6	Klonierung der Plasmide für die PCR-Standardkurve	25
2.7	Immunhistochemische Färbungen	26
2.8	Statistische Analyse	27

3 Ergebnisse	28
3.1 Studienkollektiv A	28
3.1.1 Expression von Cdx1 und Cdx2 in der Referenzgruppe <i>H.pylori</i> (-)/GERD(-).....	28
3.1.2 Expressionsvergleich der einzelnen Gruppen.....	28
3.1.3 Allgemeiner Einfluss von <i>H.pylori</i> und GERD auf die Cdx-Expression..	31
3.1.4 Interaktion von <i>H.pylori</i> und GERD im Hinblick auf die Cdx-Expression.....	33
3.1.5 Histologische Evaluation der Gewebeproben.....	35
3.1.5.1 Entzündung.....	35
3.1.5.2 Intestinale Metaplasie.....	36
3.1.6 Zusammenhang zwischen der Genexpression von Cdx1 und Cdx2 und dem histologischen Befund.....	36
3.1.6.1 Assoziation der Cdx1- und Cdx2-Genexpression mit dem Grad der Entzündung.....	37
3.1.6.2 Assoziation der Cdx1- und Cdx2-Genexpression mit dem Grad der intestinalen Metaplasie.....	38
3.1.7 Vergleich von ERD mit NERD.....	40
3.2 Studienkollektiv B	40
3.2.1 Entzündung.....	40
3.2.2 Intestinale Metaplasie.....	41
3.2.3 Immunhistochemischer Nachweis von Cdx2.....	42
4 Diskussion	43
4.1 Allgemeine Bemerkungen.....	43
4.2 Histologische Befunde.....	44
4.2.1 Entzündung.....	44
4.2.2 Intestinale Metaplasie.....	45
4.2.3 Dichte der <i>Helicobacter pylori</i> -Besiedelung bei GERD.....	47
4.3 Expression von Cdx1 und Cdx2.....	47
4.4 Analyse der Genexpression von Cdx1 und Cdx2.....	49
4.4.1 Antrum.....	49
4.4.2 Korpus.....	51
4.4.3 Kardia.....	52

4.5 Genexpression von Cdx1 und Cdx2 bei Patienten mit Barrett-Ösophagus.....	53
4.6 Interaktion von GERD und H.pylori-Infektion im Hinblick auf die Cdx-Expression.....	54
4.7 Cdx-Expression im Zusammenhang mit intestinaler Metaplasie.....	56
4.8 Cdx-Expression im Zusammenhang mit Entzündung.....	57
4.9 Erkenntnisse.....	58
5 Zusammenfassung.....	60
6 Literaturverzeichnis.....	62
Anhang.....	69
Danksagung.....	75
Eidesstattliche Erklärung.....	77
Lebenslauf.....	78
Wissenschaftliche Veröffentlichungen.....	80

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEG	Adenokarzinom des ösophagogastralen Überganges („Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction“)
a.u.	artifizielle Einheiten („arbitrary units“)
BMI	Körpermassen-Index („Body Mass Index“)
bp	Basenpaare
CagA	Cytotoxin-assoziiertes Antigen A
cDNA	komplementäre DNA („complementary DNA“)
cdx1	murines Gen/Transkript des Kaudal-Typ Homeobox Transkriptionsfaktors 1
Cdx1	humanes Gen/Transkript des Kaudal-Typ Homeobox Transkriptionsfaktors 1
CDX1	Kaudal-Typ Homeobox Transkriptionsfaktor-Protein 1
cdx2	murines Gen/Transkript des Kaudal-Typ Homeobox Transkriptionsfaktors 2
Cdx2	humanes Gen/Transkript des Kaudal-Typ Homeobox Transkriptionsfaktors 2
CDX2	Kaudal-Typ Homeobox Transkriptionsfaktors-Protein 2
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure („Desoxy-Ribonucleic Acid“)
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERD	Erosive Refluxerkrankung („Erosive Reflux Disease“)
GERD	Gastroösophageale Refluxerkrankung („Gastroesophageal Reflux Disease“)
<i>H.pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HUT	Harnstoff-Urease-Schnelltest
IHC	Immunhistochemie
IM	Intestinale Metaplasie
LSBE	Langstreckiger Barrett-Ösophagus („Long Segment Barrett’s Esophagus“)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure („messenger Ribonucleic Acid“)
NERD	Nicht-erosive Refluxerkrankung („Non-Erosive Reflux Disease“)
ÖGD	Ösophagogastrroduodenoskopie
ÖGÜ	Ösophagogastraler Übergang
OR	Odds Ratio
RT-PCR	Echtzeit Polymerase Kettenreaktion („Realtime-Polymerase Chain Reaction“)
SSBE	Kurzstreckiger Barrett-Ösophagus („Short Segment Barrett’s Esophagus“)
Tab.	Tabelle

1 Einleitung

1.1 Definitionen

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit pathologischen Veränderungen der Mukosa des Magens inklusive der ösophagogastralen Übergangsregion. Für das Verständnis der Ergebnisse ist eine genaue Definition dieses Bereiches erforderlich.

In der Regel geht das mehrschichtige Plattenepithel des Ösophagus an einer scharfen Grenzlinie, die als Linea dentata oder Z-Linie bezeichnet wird, in ein einschichtiges Zylinderepithel über, das den Magen auskleidet (**Abb. 1**).[1]

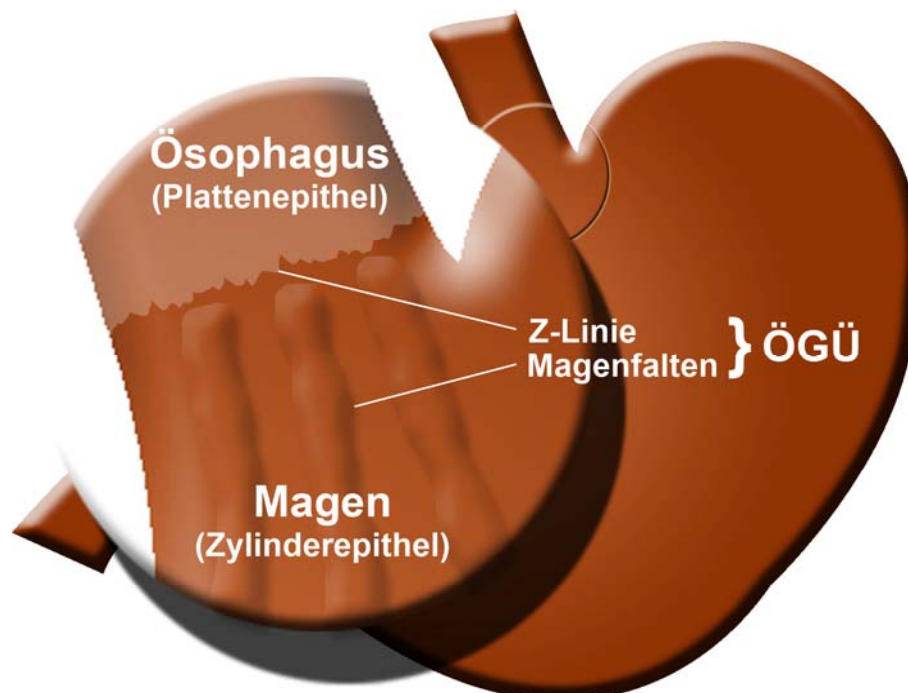


Abbildung 1: Schematische Darstellung der ösophagogastralen Übergangsregion (ÖGÜ)

Der Ösophagogastrale Übergang (ÖGÜ) beschreibt die Region, in der der tubuläre Ösophagus in die Magenblase übergeht. Die proximale Grenze des Magens wird hierbei durch die Magenfalten beschrieben. Das mehrschichtige Plattenepithel des Ösophagus geht in einer scharfen Linie (Linea dentata; „Z-Linie“) in das einschichtige Zylinderepithel des Magens über.

Der Ösophagogastrale Übergang (ÖGÜ) ist definiert als die Region, in der der tubuläre Ösophagus in die Magenblase übergeht, wobei der Beginn des Magens durch das proximale Ende der Magenfalten definiert ist.[2, 3] Der proximalste Abschnitt des Magens wird traditionell als Kardia bezeichnet und kann anatomisch (der Anteil des Magens, der direkt an

den ÖGÜ anschließt) und histologisch (Kardia-Mukosa zeigt ein einschichtiges Zylinderepithel, das allein aus Mukuszellen besteht und keine Becher- oder Parietalzellen aufweist) definiert werden.[4]

Maligne Neoplasien des oberen Verdauungstraktes sind überwiegend Adenokarzinome des Magens oder des distalen Ösophagus und Plattenepithelkarzinome der Speiseröhre. Adenokarzinome des Magens werden nach Lauren in drei Entitäten unterteilt.[5] Karzinome vom intestinalen Typ wachsen polypös expansiv, sind gut begrenzt und histologisch gut differenziert, während die deutlich aggressiveren Karzinome vom diffusen Typ ein infiltratives Wachstum zeigen, schlecht abzugrenzen sind und Zellen mit einem geringen Differenzierungsgrad repräsentieren.[5] Darüber hinaus existiert noch eine Mischform beider Varianten.

Nach Vereinbarung der International Gastric Cancer Association (IGCA) und der International Society for Diseases of the Esophagus (ISDE) werden alle Adenokarzinome die 5cm ober- oder unterhalb der „anatomischen Kardia“ liegen als Adenokarzinome des ÖGÜ definiert (AEG: „Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction“).[6] Sie schließen damit einen größeren Bereich als den eigentlichen ÖGÜ selbst ein und können weiterhin in drei Subtypen unterteilt werden: a) AK des distalen Ösophagus (AEG I; Barrett-Karzinome, siehe unten), die den ÖGÜ von proximal infiltrieren; b) „echte“ Kardia-Karzinome (AEG II); c) subkardiale AK, die den ÖGÜ von distal infiltrieren (AEG III).[6, 7]

1.2 Entwicklung von Inzidenz und Prävalenz von Adenokarzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes

In der westlichen Welt ist es in den letzten 4 Jahrzehnten zu wesentlichen Veränderungen der Inzidenz und Prävalenz von Karzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes gekommen. Insbesondere in der kaukasischen männlichen Bevölkerung stieg die Inzidenz von Adenokarzinomen am ÖGÜ.[8-10] Dies galt sowohl für Adenokarzinome der Kardia als auch für die des distalen Ösophagus, wobei der beschriebene Trend bei letzteren deutlich ausgeprägter ist.[8-11]

So dokumentierten Devesa *et al.* eine mehr als 3,5-fache Zunahme der Inzidenz distal ösophagealer Adenokarzinome von 1974 bis 1996, während der Anstieg bei Adenokarzinomen der Kardia (1,6-fach) im gleichen Zeitraum deutlich geringer ausfiel.[12]

Plattenepithelkarzinome des Ösophagus zeigten dagegen eine rückläufige Tendenz.[8, 9, 12] Im Magen wurde eine Verschiebung der Verteilung von den ebenfalls in ihrer Häufigkeit rückläufigen distalen Adenokarzinome zu proximalen Entitäten hin verzeichnet.[11] So traten von 1992 bis 1994 Adenokarzinome an der Kardia bei der weißen männlichen Bevölkerung in annähernd gleicher Häufigkeit auf wie alle anderen Tumoren des Magens zusammen.[12]

1.3 Die Entstehung des Adenokarzinoms – eine Sequenz?

Ob in der Entwicklung von Adenokarzinomen des Magens und des ÖGÜ eine der Entwicklung kolorektaler Karzinome analoge „Adenom-Karzinom Sequenz“ existiert, ist seit Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Bislang konnte jedoch keine entsprechende Abfolge sequentieller genetischer Alterationen sowie derer morphologischer Korrelate nachgewiesen werden.

Correa *et al.* untersuchten gezielt eine Population in Kolumbien, bei der eine hohe Inzidenz für das distale Magenkarzinom vorlag. Die Ergebnisse deuteten auf eine sequentielle Abfolge molekularer Ereignisse, welche zur Entwicklung von Drüsenhals-Hyperplasie, gastraler Atrophie, intestinaler Metaplasie und letztlich Dysplasie bis hin zum Karzinom führten.[13] Der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von intestinaler Metaplasie als präneoplastischer Läsion und der Entstehung eines Adenokarzinoms konnte auch von anderen bestätigt werden, wobei Welin *et al.* diesen Prozess ausschließlich auf Karzinome vom intestinalen Typ nach Lauren bezogen.[14]

Die Rolle der intestinalen Metaplasie als präkanzerogene Veränderung in der Entwicklung von Adenokarzinomen konnte eindrucksvoll in der Pathogenese des distal ösophagealen Adenokarzinoms nachgewiesen werden. Die betreffende Läsion wird als Barrett-Metaplasie oder Barrett-Ösophagus bezeichnet und beschreibt metaplastische Schleimhaut im distalen Ösophagus, wobei das ursprüngliche Plattenepithel zumindest teilweise durch Zylinderepithel ersetzt wird.[15] Als wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung eines Barrett-Ösophagus gilt ein langjähriger abnormer gastroösophagealer Reflux.[16, 17] Allerdings gibt es auch Fälle, bei denen ein Barrett-Ösophagus ohne vorhergehende Refluxsymptomatik nachgewiesen wurde.

Die Diagnose eines Barrett-Ösophagus kann nur gestellt werden, wenn sowohl der endoskopische als auch der histologische Befund darauf hinweisen.[2, 15] Das endoskopische

Bild ist geprägt von Zungen oder Inseln metaplastischer Schleimhaut, die die reguläre Z-Linie überschreiten (**Abb. 2**).[2, 18]



Abbildung 2: Endoskopisches Bild eines Barrett-Ösophagus

Links: „natives“ endoskopisches Bild eines Barrett-Ösophagus mit zungenförmigen Ausläufern des metaplastischen Epithels, die sich deutlich bis in den Bereich des eigentlichen ösophagealen Plattenepithels erstrecken, welches blasser imponiert. Im Hintergrund ist der Mageneingang zu sehen mit einer noch angedeuteten Magenfalte auf 6 Uhr. Rechts: Darstellung des gleichen Befundes von Zylinderepithelmetaplasie im distalen Ösophagus in der „Narrow-Band Imaging“-Technik.

Die proximale Ausdehnung der metaplastischen Läsionen wird vom definierten ÖGÜ (proximales Ende der Magenfalten) aus gemessen.[2] Es wird dabei „Short Segment Barrett’s Esophagus“ (SSBE, <3cm) von „Long Segment Barrett’s Esophagus“ (LSBE, > 3cm) unterschieden, die mit unterschiedlichem Karzinomrisiko assoziiert sind. So zeigt sich eine positive Korrelation zwischen der Länge des metaplastischen Schleimhautabschnittes und dem Risiko, eine hochgradige Dysplasie oder ein Adenokarzinom zu entwickeln.[2, 18-20]

Histologisch wurde die Barrett-Metaplasie kürzlich in der GERD-Konsensusklassifikation von Montreal neu definiert.[15] Eine Läsion des distalen Ösophagus beziehungsweise proximal des ÖGÜ wird als „Barrett-Ösophagus“ bezeichnet, sofern sich histologisch ein metaplastisches Zylinderepithel zeigt, unabhängig davon, ob dieses vom intestinalen Typ ist oder nicht.[15] In der vorliegenden Studie wurde allerdings die traditionelle Definition zugrunde gelegt, die das Vorhandensein von Becherzellen im Sinne einer spezialisierten intestinalen Metaplasie voraussetzt (**Abb. 3**).[21]

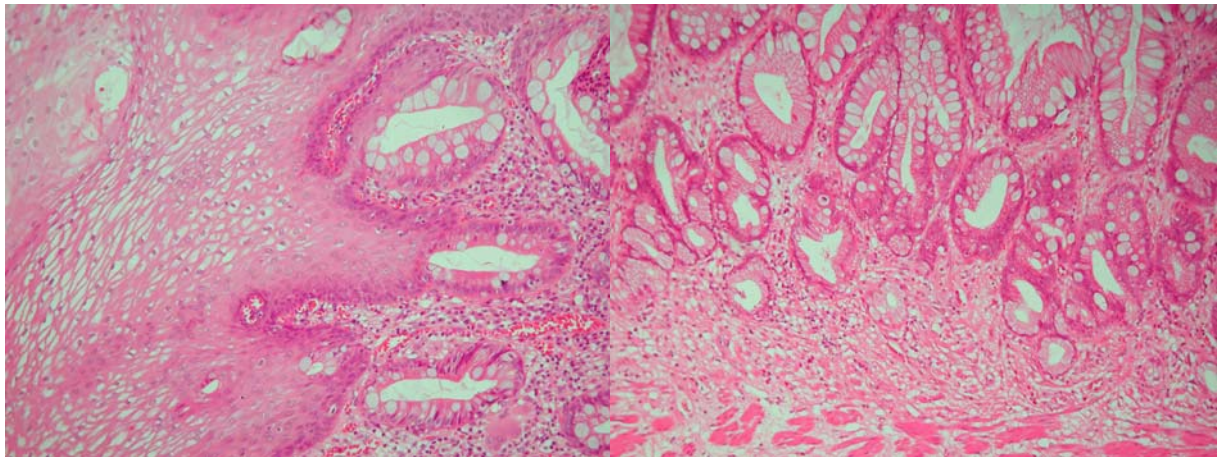


Abbildung 3: Histologisches Bild eines Barrett-Ösophagus

Dargestellt sind die Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Schnitte von Gewebeproben aus dem distalen Ösophagus zweier Patienten mit Barrett-Ösophagus (zehnfache Vergrößerung). Es ist deutlich zu erkennen wie das ösophageale Plattenepithel von transdifferenziertem Epithel im Sinne einer spezialisierten intestinalen Metaplasie unterminiert wird (links), beziehungsweise bereits ersetzt wurde (rechts).

Eine Metaanalyse von Shaheen *et al.* zeigte, dass in den Jahren 1966 bis 1998 das Risiko bei vorliegendem BÖ ein AK zu entwickeln bei etwa 0,5% (0-3%) pro Patientenjahr lag.[22]

Hirota *et al.* konnten bei der Auswertung von Biopsien von über 800 Patienten des Walter Reed Army Medical Center in Washington D.C. bei 13,2% einen Barrett-Ösophagus nachweisen. Bei allen diesen Patienten konnte histologisch eine spezialisierte intestinale Metaplasie nachgewiesen werden. Hierbei wurde im Einzelnen zwischen einem LSBE, einem SSBE sowie spezialisierte intestinaler Metaplasie am ÖGÜ bei regulärer Z-Linie ohne zungenförmige Ausläufer unterschieden. Es zeigte sich ein deutlich geringeres Vorkommen von LSBE (1,6%) als SSBE (6,0%) oder spezialisierte intestinaler Metaplasie am ÖGÜ direkt (5,6%).[23] Der Anteil der Proben mit dysplastischem oder bereits neoplastischem Epithel war für LSBE mit 31% deutlich höher als für SSBE und spezialisierte intestinale Metaplasie ohne zungenförmige Ausläufer direkt am ÖGÜ (10%, bzw. 6%).[23]

Auch Sharma *et al.* berichteten von unterschiedlichem Karzinomrisiko bei unterschiedlicher Ausdehnung der intestinalen Metaplasie. Die Drei-Jahres Dysplasierate lag bei Patienten mit SSBE bei 31%, dagegen bei Patienten mit intestinaler Metaplasie an der Kardia nur bei 4,2%. [24]

Im Gegensatz zu den klar belegten Zusammenhängen von intestinaler Metaplasie und dem Risiko für ein Adenokarzinom im distalen Ösophagus, ist die Bedeutung von intestinaler Metaplasie als präkanzeröse Läsion an der Kardia derzeit noch nicht endgültig einzuschätzen. So fanden beispielsweise Ruol *et al.* eine intestinale Metaplasie in 69% aller Biopsien, die angrenzend zu Adenokarzinomen der Kardia entnommen wurden.[25] Ein

deutlicheres Ergebnis zeigte sich allerdings bei Proben, die angrenzend zu Barrett-Karzinomen entnommen wurden. Hier konnte in 96% der Fälle eine intestinale Metaplasie nachgewiesen werden.[25]

1.4 Risikofaktoren für Adenokarzinome des Magens und des distalen Ösophagus

Männliches Geschlecht, kaukasische Abstammung und höheres Alter gelten als allgemein anerkannte Risikofaktoren für Adenokarzinome des proximalen Gastrointestinaltraktes, während Tabakkonsum, übermäßigem Alkoholgenuss sowie erhöhtem Body Mass Index (BMI) unterschiedliche pathogenetische Relevanz für die einzelnen Entitäten beigemessen wird.[23-26] Obgleich grundsätzlich Übereinstimmung dahin gehend besteht, dass die gastroösophageale Refluxerkrankung (Gastroesophageal Reflux Disease = GERD) und die *Helicobacter pylori* (*H.pylori*-) Infektion an der Entstehung metaplastischer Veränderungen maßgeblich beteiligt sind, bleibt ihre Bedeutung, insbesondere für die histomorphologischen Veränderungen im Bereich des ÖGÜ unklar.

1.4.1 Gastroösophageale Refluxerkrankung (GERD)

Nach dem evidenzbasierten Konsens von Montreal ist die GERD definiert als „ein Zustand, der entsteht, wenn der Rückfluss von Mageninhalt beeinträchtigende Symptome und/oder Komplikationen verursacht“.[15] Saurer Mageninhalt und/oder duodenales Sekret sind die entscheidenden schädigenden Agenzien.[27-30] Die Prävalenz der Refluxerkrankung liegt in Westeuropa und Nordamerika bei 10-20%, in Asien bei weniger als 5%.[31]

Klassische Symptome sind retrosternales Brennen und Regurgitationen. Es können aber auch Dysphagie, epigastrische Schmerzen oder extraösophageale Symptome wie Husten, asthmatische Beschwerden, Heiserkeit oder Laryngitis auftreten.[15]

Die GERD ist bezüglich der klinischen Ausprägung keine einheitliche Entität, sondern wird auf der Basis des endoskopischen und histologischen Befundes in drei klinische Manifestationen unterteilt, die neben der Diagnosestellung auch von therapeutischer Relevanz sind.

Nicht-erosive Refluxerkrankung (NERD; „Non-Erosive Reflux Disease“)

Bei der nicht-erosiven Refluxerkrankung (NERD) zeigen sich endoskopisch keine mukosalen Läsionen und histologisch ist keine beziehungsweise nur eine schwache Entzündung der Ösophagusschleimhaut nachweisbar. Der Hauptanteil der Patienten mit GERD gehört zu dieser Gruppe (ca. 60%). Eine Korrelation der Symptome mit den Refluxepisoden (gemessen durch 24h-pH-Metrie im Ösophagus) ist nur bei einem Teil der Patienten nachweisbar. So zeigt ein großer Anteil (bis zu 50 %) der NERD-Patienten trotz ausgeprägter Symptomatik normale Ergebnisse in der pH-Metrie.[32, 33]

NERD-Patienten können weiter unterteilt werden in a) solche mit abnormer Säureexposition des Ösophagus, b) solche mit normalen Säurewerten im Vergleich zu gesunden Kontrollen jedoch mit einer Korrelation von Refluxepisoden mit dem Auftreten von Symptomen und c) solchen mit typischen Symptomen einer Refluxerkrankung, die jedoch nicht oder nur in geringem Maße mit Refluxepisoden korrelieren.[33]

Patienten mit NERD scheinen eine höhere Sensibilität gegenüber gastroösophagealem Refluxat zu besitzen als Patienten, die an anderen Varianten der GERD leiden. Bei der Bestimmung des Schwellenwertes für die Schmerzauslösung mittels Ballondilatation wiesen Patienten mit NERD die niedrigsten Schwellenwerte aller GERD-Patienten auf.[32]

Erosive Refluxerkrankung (ERD; „Erosive Reflux Disease“)

Die zweite Manifestationsform der GERD ist die erosive Refluxerkrankung (ERD), bei der endoskopisch sichtbare Läsionen im distalen Ösophagus und am ÖGÜ gefunden werden, die in der Regel von einer Ösophagitis unterschiedlichen Schweregrades begleitet werden.[15]

Anders als bei Patienten mit NERD (50-66%) können bei ERD in 75-90% der Fälle abnorme Refluxepisoden messtechnisch nachgewiesen werden, welche jedoch nur in 5% bei Patienten mit Ösophagitis symptomatisch wahrgenommen werden.[32, 33]

Barrett-Ösophagus

Auf die dritte Manifestationsform der Refluxerkrankung, den Barrett-Ösophagus wurde bereits in Abschnitt 1.3 näher eingegangen. Generell kann festgestellt werden, dass der Barrett-Ösophagus in seiner pathophysiologischen Ausprägung eher Parallelen zur ERD zeigt. Er stellt jedoch eine unabhängige Entität dar. Die traditionelle Sichtweise, dass sich ein Barrett-Ösophagus immer aus einer bestehenden ERD heraus entwickelt besitzt keine Gültigkeit mehr.[15, 33]

Risikofaktoren

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Risikofaktoren für die Entwicklung einer GERD beschrieben, wobei unterschiedliche Definitionen und Studienansätze die Vergleichbarkeit der einzelnen Studien erschweren.

So zeigten Labenz *et al.*, dass männliches Geschlecht, kaukasische Abstammung, Adipositas und regelmäßiger Tabak- oder Alkoholkonsum wesentliche Risikofaktoren für die Manifestation einer GERD darstellen.[34] Allerdings wurden in dieser Studie nur Patienten mit ERD evaluiert. Im Gegensatz dazu fanden Lagergren *et al.*, die nicht zwischen den einzelnen Entitäten differenzierten, keinen wesentlichen Zusammenhang von Alter, Geschlecht, BMI, Tabak- oder Alkoholkonsum mit Refluxerkrankung.[26]

In der letztgenannten Studie wurde darüber hinaus das Risikoprofil der GERD im Hinblick auf die Entwicklung eines Adenokarzinom untersucht. Dabei wurden allerdings ausschließlich die Zusammenhänge mit dem Schweregrad und der Ausprägung der Symptome evaluiert, welchen eine größere Bedeutung als dem histologischen Befund beigemessen wurde. So wurde bei Patienten mit entsprechend ausgeprägten Symptomen (retrosternales Brennen und Regurgitationen) ein fast achtfach (mehr als zweifach) erhöhtes Risiko für ein Adenokarzinom im distalen Ösophagus (an der Kardia) festgestellt. Dagegen wiesen nur 62% der untersuchten Patienten mit ösophagealem Adenokarzinom einen Barrett-Ösophagus auf.[26]

Ungeachtet etwaiger Diskrepanzen in der Auswertung einzelner Studien, kann festgehalten werden, dass der gastroösophageale Reflux einen Risikofaktor für die Entstehung von intestinaler Metaplasie, beziehungsweise eines Adenokarzinoms im distalen Ösophagus und in geringerer Ausprägung auch am ÖGÜ und an der Kardia darstellt.

1.4.2 *Helicobacter pylori*

Der gramnegative, mikroaerophile Keim *H.pylori* wurde 1984 von Marshall und Warren charakterisiert und seine Präsenz erstmals in Zusammenhang mit Gastritiden und Ulzera des Magens und des Duodenums gesetzt.[35]

H.pylori ist eines der wenigen Bakterien, das von der WHO als Karzinogen eingestuft wird.[36, 37]

Die Bedeutung von *H.pylori* als Risikofaktor für Adenokarzinome des Magens wurde in einer Metaanalyse von Huang *et al.* bestätigt, in der Ergebnisse von 19 Studien ausgewertet

wurden.[38] Insgesamt wurden fast 2500 Magenkarzinompatienten und annähernd 4000 Kontrollen eingeschlossen. Die odds ratio (OR) für die Entwicklung eines Adenokarzinoms des Magens lag bei *H.pylori*-positiven Patienten bei 1,92.[38]

Dieser Zusammenhang zeigte sich auch in der Studie von Uemura und Kollegen. In einem Kollektiv von mehr als 1500 Patienten, die wegen Magenulzera, hyperplastischen Polypen des Magens oder dyspeptischen Beschwerden gastroskopiert wurden, zeigten sich Magenkarzinome ausschließlich bei *H.pylori*-positiven Patienten.[39] Die 10-Jahresinzidenz lag bei 5%. Alle Patienten, bei denen eine *H.pylori*-Besiedelung vorlag, zeigten entzündliche Veränderungen der gastralen Mukosa unterschiedlicher Lokalisation (56% Antrumgastritis, 27% Pangastritis, 17% Korpusgastritis), und bei 37% der *H.pylori*-positiven Patienten fand sich intestinale Metaplasie. Das Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms war bei Vorhandensein von intestinaler Metaplasie erhöht.[39]

Im Gegensatz dazu wiesen in einer anderen Studie nur 52,4% aller Patienten mit einem frühen Magenkarzinom eine *H.pylori*-Infektion auf.[40] Darüber hinaus konnte in dieser Studie eine Assoziation der *H.pylori*-Infektion mit der Progression pathologischer Prozesse in der Magenmukosa dokumentiert werden. So korrelierte der Anteil *H.pylori*-infizierter Patienten mit steigendem Schweregrad der mukosalen Schädigung (superfizielle Gastritis < erosive Gastritis < ausgeprägte Schleimhauterosionen < Ulzera).[40] Eine ähnliche Relation ergab sich zwischen dem Anteil mit nachgewiesener intestinaler Metaplasie mit dem Schweregrad der Schleimhautschädigung (superfizielle Gastritis < erosive Gastritis < ausgeprägte Erosionen < Ulzera < frühes Magenkarzinom).[40]

Genta *et al.* untersuchten gezielt die Kardialregion *H.pylori*-positiver Patienten und zeigten eine bakterielle Besiedelung dieser Region bei 95% des Studienkollektivs.[41] Die vorliegende Entzündung der Kardialregion war in der Ausprägung vergleichbar mit der des Antrums, aber deutlich stärker als die des Magenkorpus.[41]

Das Risiko ein Adenokarzinom an der Kardialregion zu entwickeln war bei *H.pylori*-positiven Personen allerdings nicht wesentlich erhöht (OR 1,23). Dies stand im Gegensatz zu einem deutlich erhöhten Risiko an allen anderen Lokalisationen des Magens (OR 3,08).[38]

1.5 Intestinale Metaplasie und Adenokarzinome an der Kardia – GERD, *H.pylori* oder reine Definitionssache?

Es wird zunehmend kontrovers diskutiert, welche Mechanismen zu einer intestinalen Metaplasie am ÖGÜ führen und welchen Risikofaktoren eine entscheidende Bedeutung zukommt.

Öberg *et al.* fanden bei 73,7% ihrer Patienten typische Kardiaschleimhaut am ÖGÜ, von denen wiederum 96% eine Entzündung (Karditis) zeigten.[42] Beides war assoziiert mit einer erhöhten Säurebelastung des Ösophagus, dem Vorliegen einer Hiatushernie, erosiver Ösophagitis oder Störungen in der Funktion des unteren Ösophagussphinkters. Es ergab sich keinerlei Bezug zu einer *H.pylori*-Infektion, auch nicht bei Patienten mit Kardiaschleimhaut, in welcher eine intestinale Metaplasie nachgewiesen wurde (11,7%). Öberg postulierte, dass Kardiaschleimhaut ein refluxbedingtes metaplastisches Epithel darstelle.[42] Castro *et al.* konnten sowohl keine Assoziation von *H.pylori* zu intestinaler Metaplasie an der Kardia, als auch keinen Bezug von Reflux-Symptomen zu mukosalen Läsionen an der Kardia oder im distalen Ösophagus zeigen.[43]

Andere Arbeitsgruppen wiesen jedoch einen Zusammenhang zwischen einer *H.pylori*-Infektion und sowohl dem Auftreten einer Entzündung als auch dem Vorkommen einer intestinalen Metaplasie in der Kardiaschleimhaut nach. Darüber hinaus zeigte sich für beides eine inverse Korrelation mit dem Schweregrad der Manifestation einer GERD.[44, 45]

Neben möglichen Erklärungen, nach denen entzündliches oder metaplastisches Geschehen an der Kardia vorwiegend einem der beiden Faktoren zuzuordnen sei, gewann die Hypothese an Bedeutung, es könnte sich um zwei unterschiedliche Entitäten handeln. Beispielsweise untersuchten Hackelsberger *et al.* Patienten mit Barrett-Ösophagus und fanden den erwarteten Zusammenhang mit erosiver Ösophagitis und männlichem Geschlecht. Dagegen war in einer zweiten Gruppe von Probanden, welche in der Endoskopie einen unauffälligen ÖGÜ zeigten, das Vorliegen einer intestinalen Metaplasie an der Kardia entweder mit einer *H.pylori*-Infektion assoziiert und/oder mit dem Vorkommen weiterer metaplastischer Foci an anderen Lokalisationen des Magens.[46]

Ähnliche Ergebnisse erhielt auch eine finnische Gruppe, bei denen intestinale Metaplasie in der Kardiaschleimhaut deutlich in Relation zu präexistenter Entzündung gesehen wurde. Bei diesen Patienten mit Gastritis war eine *H.pylori*-Infektion der einzige Risikofaktor für eine Karditis, während bei unauffälliger Magenschleimhaut ausschließlich endoskopisch erosive Ösophagitis im Rahmen einer Refluxerkrankung in Bezug zu setzen war.[47] Im Folgenden

wies die gleiche Arbeitsgruppe nach, dass beide Varianten der Entzündung in der Region des ÖGÜ sich zudem im histologischen Typ einer eventuell vorhandenen epithelialen Metaplasie unterscheiden. Die *H.pylori*-assoziierte Variante der intestinalen Metaplasie konnte eher dem kompletten Typ zugeordnet werden (Typ I: resorbierendes Zylinderepithel mit neutralen Muzinen), während die ERD-assoziierte Form eher vom inkompletten Typ war (Typ II, bzw. Typ III: teilweise sekretorisches Epithel mit sauren Sialomuzinen bzw. Sulphomuzinen). Die spezialisierte intestinale Metaplasie im Sinne einer Barrett-Metaplasie wird vorwiegend als Typ III klassifiziert.[47, 48]

Auch Adenokarzinome am ÖGÜ sind unterschiedlich mit den Risikofaktoren assoziiert. So zeigt sich für das distale Ösophaguskarzinom (siehe Abschnitt 1.1) eher ein Zusammenhang mit der Refluxerkrankung unabhängig von der klinischen Manifestation, während sich beim subkardialen Adenokarzinom eher ein Zusammenhang mit einer *H.pylori*-Infektion zeigt.[7]

Wie ist aber trotz relativ klarer konzeptueller Ansätze und Ergebnisse die zum Teil grundlegende widersprüchliche Datenlage in der Literatur zu werten? Vieles deutet darauf hin, dass dies auf fehlende Präzision und Kongruenz im Studiendesign zurückzuführen ist. Erst in den letzten Jahren wurde insbesondere die ösophagogastrale Übergangsregion genau definiert.

Bereits 1996 wies Spechler auf Schwierigkeiten bei der genauen endoskopischen Definition des ÖGÜ und der richtigen Lokalisation für die Biopsieentnahme hin.[49] Er schlug vor, Proben nicht mehr anatomisch nach der Entnahmelokalisation, sondern vielmehr histologisch einzuteilen [Zylinderepithel (CLE = „Columnar Lined Epithelium“) mit spezialisierter intestinaler Metaplasie, Zylinderepithel ohne spezialisierte intestinale Metaplasie, spezialisierte intestinale Metaplasie am ÖGÜ]. Chandrossa vertiefte diesen Gedanken noch.[50] Er stellte fest, dass am ÖGÜ im Wesentlichen drei Arten von Epithel unterschieden werden müssten: a) Kardiale Mukosa (Zylinderepithel bestehend nur aus Schleim produzierenden Zellen), b) Oxynto-kardiale Mukosa (Schleim produzierende Zellen mit Parietalzellen und zusätzlichen Drüsen) und c) intestinale Metaplasie entweder vom Barrett-Typ (Becherzellen in Kardial-Mukosa) oder vom gastralen Typ (Becherzellen in pylorischem Epithel oder oxyntischem, wie es im Fundus vorkommt).[50] Des Weiteren postulierte er, dass Kardiaschleimhaut als solche nicht natürlich sei, sondern erworben und in der Regel im Rahmen eines metaplastischen Prozesses refluxbedingt aus dem Plattenepithel des distalen Ösophagus entstünde.[50] Dementsprechend korreliere die Ausdehnung des Zylinderepithels auch mit der Ausprägung des Refluxes. Entzündung und intestinale Metaplasie in der Region,

die als anatomische Kardia bezeichnet wird, entstünden häufig im oxyntischen Fundusepithel und seien in der Regel Auswirkung einer *Helicobacter*-bedingten multifokalen Gastritis. Nur durch einen Konsens betreffend die exakten Definitionen der Strukturen am ÖGÜ (vor allem auch histologisch) ließen sich zukünftige Studienergebnisse wirklich vergleichbar gestalten.[50]

Entgegen den Ergebnissen von Chandrosoma, Öberg und anderen, zeigten Autopsiestudien an Kindern, Neugeborenen, Säuglingen und auch an fetalem Gewebe, dass Kardiaschleimhaut sehr wahrscheinlich keine metaplastisch erworbene sondern vielmehr eine natürliche epitheliale Struktur am ÖGÜ darstellt, da sie bei jeweils 100% der untersuchten Proben nachgewiesen werden konnte.[51-54]

Auch wenn die Frage, ob Kardia-Mukosa von Geburt an vorhanden ist oder erst durch pathologische Prozesse entsteht, bislang nicht eindeutig geklärt ist, so weist die Datenlage betreffend des ÖGÜ darauf hin, dass zwei unterschiedliche Entitäten intestinaler Metaplasie mit unterschiedlichem Risikopotential für die Entwicklung eines Adenokarzinoms existieren.

1.6 CDX1 und CDX2 – Grundstein für intestinale Differenzierung

(Schreibweisen: CDX: Protein; cdx: murines Gen/murine mRNA; Cdx: humanes Gen/humane mRNA)

1.6.1 Definition

CDX1 und CDX2 sind Transkriptionsfaktoren, die entscheidend an der Regulation der epithelialen Differenzierung des Dünndarms und Kolonrektaltraktes beteiligt sind. Beide Proteine gehören zur Gruppe der „Homeobox-Proteine“, die in allen Vertebraten existieren und an eine konservierte DNA-Bindungsregion in den Promotorregionen differenzierungsspezifischer Gene binden.[55-57]

Das humane Cdx1-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 5 (5q31), besitzt 3 Exons und 2 Introns und kodiert für ein Protein, das aus 265 Aminosäuren besteht (siehe Anhang 1). Physiologisch wird es beim Menschen nur im Dün- und Dickdarm exprimiert.[57] Das Cdx2-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 13 (13q12) lokalisiert. Homologien zu Cdx1 existieren insbesondere im Bereich der sogenannten Homeodomäne, welche die Bindung an die DNA in den Promoterregionen vermittelt. Das Cdx2-Transkript besitzt ebenfalls drei Exons und kodiert für ein aus 311 Aminosäuren bestehendes Protein.[58]

Die physiologische Relevanz beider Homeobox-Gene wurde im Wesentlichen an der Maus untersucht, deren orthologen Gene (*cdx1* und *cdx2*) eine mehr als achtzigprozentige Übereinstimmung mit den humanen Gensequenzen aufweisen.[57]

1.6.2 Funktionelle Bedeutung

Suh und Traber wiesen nach, dass sich durch die konstitutionelle Expression von CDX2 in undifferenzierten IEC-6-Zellen ein Zellverband entwickeln kann, der Merkmale intestinalen resorptiven Epithels aufweist: Zylinderepithel auf einer Basallamina, verbunden durch „tight junctions“ und Desmosomen, mit Zellen, welche Mikrovilli mit entsprechender Glykokalyx, sowie eine Induktion der Sucrase-Isomaltase-Expression zeigten.[59] Ähnliche Ergebnisse konnten auch für die konstitutive Expression von CDX1 dokumentiert werden. Auch hier entstand ein Zylinderepithel mit komplexen interzellularen Verbindungen und Mikrovilli. Die für Enterozyten typische Expression von Villin wurde induziert.[60]

In vivo wurde die Rolle der Homeoboxfaktoren zunächst an der Maus untersucht. Hier zeigte sich eine funktionelle Bedeutung von CDX1 und CDX2 auch in der axialen Entwicklung, das heißt in der anterior-posterioren Differenzierung des Maus-Embryos. *Cdx1*-defiziente Tiere zeigen Störungen in der Entwicklung der Somiten, die zu Wirbeldefekten und Fusionen von Spinalganglien führen. Heterozygote *cdx2*-Mäuse litten unter Fehlentwicklungen vor allem im posterioren Bereich.[61, 62]

Generell wird CDX2 früher exprimiert als CDX1 (Tag 9,5 vs. Tag 12,5 post coitum). Zum Zeitpunkt der Geburt ist CDX2 im gesamten Epithel vom Duodenum bis zum proximalen Kolon nachweisbar, mit einer maximalen Expression im distalen Jejunum und im Ileum. Innerhalb der mukosalen Strukturen zeigt sich das höchste Vorkommen von CDX2 im Villus. CDX1 zeigt eine geringere Präsenz in proximalen Abschnitten des Darmes, kann dafür aber im Dickdarm konstant bis hin zum Rektum nachgewiesen werden. Die maximale Expression findet sich jedoch ebenfalls im Bereich des distalen Dünndarms. CDX1 wird vorwiegend in den Krypten gefunden, was auf eine funktionelle Rolle des Proteins für die Regulation der Proliferation hindeutet, während für CDX2 eine funktionelle Bedeutung in der Differenzierung der Enterozyten postuliert wird. Beide Faktoren werden nicht von enteroendokrinen Zellen und nur spärlich von Panethzellen exprimiert. In der Regel können sie im gesunden Magen und Ösophagus nicht nachgewiesen werden.[63, 64]

Ein topographisch vergleichbares Expressionsmuster mit nur geringen Abweichungen konnten auch in humanen Resektaten der entsprechenden Abschnitte des Gastrointestinaltraktes nachgewiesen werden.[65, 66]

1.7 Pathophysiologische Bedeutung von CDX1 und CDX2

Die Folgen einer pathologischen cdx-Expression im Magen und am ÖGÜ wurden zunächst an transgenen Mäusen untersucht. Bei Mäusen mit konstitutiver cdx1-Expression war 120 Tage nach Geburt die komplette gastrale Mukosa durch eine intestinale Metaplasie ersetzt. Es fanden sich Enterozyten, Becherzellen, enteroendokrine Zellen sowie auch Paneth'sche Körnerzellen.[67] Darüber hinaus zeigte sich eine verstärkte Präsenz der intestinalen Markerproteine Sucrase-Isomaltase, Villin, Muzin 2 und des Trefoilfaktorpeptids 3.[67] Im Magen von cdx2-transgenen Mäusen kam es zur Entwicklung einer intestinalen Metaplasie vom Typ III und zwar vor allem im distalen Abschnitt des Organs. Im weiteren Verlauf konnte eine Progression dieser Läsionen zu Magenkarzinomen vom intestinalen Typ dokumentiert werden.[68, 69]

Auch in humanen Gewebeproben konnte eine Expression von sowohl Cdx1 als auch Cdx2 in Bereichen einer intestinalen Metaplasie nachgewiesen werden. Dies galt sowohl für metaplastische Magenmukosa als auch in Bereichen mit spezialisierter intestinaler Metaplasie von Patienten mit Barrett-Ösophagus.[66, 70]

Ein deutlich erhöhter Transkriptgehalt, sowohl von Cdx1 als auch von Cdx2 wurde unter anderem auch in Adenokarzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes gefunden.[66, 71-74] Allerdings war bei diesen teilweise schon entdifferenzierten Geweben die Expression geringer als in entsprechenden Biopsien mit intestinaler Metaplasie.[75, 76] In der Mehrzahl der Studien konnte gezeigt werden, dass sich eine verstärkte Cdx-Expression vor allem bei höher differenzierten Karzinomen vom intestinalen Typ nachweisen ließ.[72-74, 76]

Auch bei anderen intestinal differenzierten Tumoren des Gastrointestinaltraktes, des hepatobiliären System oder des Pankreas, sowie deren Metastasen, liegt in der Regel eine erhöhte Expression von Cdx2 vor, so dass dieser Transkriptionsfaktor zunehmend als Marker für intestinal differenzierte Neoplasien betrachtet und dementsprechend in der histologischen Routinediagnostik eingesetzt wird.[77-81]

Entgegen der pathophysiologischen Bedeutung von Cdx2 im oberen Gastrointestinaltrakt, wurde in vitro sowie im Tierexperiment ein Tumor-suppressiver Effekt bei der Entwicklung

kolorektaler Adenokarzinome nachgewiesen.[82-84] In wie weit Cdx1 bei der Pathogenese kolorektaler Neoplasien eine Rolle spielt, ist noch nicht eindeutig geklärt.[85-87]

1.8 Aufgabenstellung

Die steigende Inzidenz von Adenokarzinomen insbesondere in der Region des ÖGÜ sowie die das Fehlen geeigneter Biomarker für die frühe Diagnostik dieser Tumoren erfordern genauere Untersuchungen der Mechanismen, die für die Pathogenese dieser Tumorentität verantwortlich sind.[18]

Die vorliegende Dissertation hatte zum Ziel, folgende Arbeitshypothese zu bestätigen:

Die durch eine H.pylori-Infektion oder einen abnormen Reflux bedingte Transdifferenzierung der gastralen Mukosa in eine intestinale Metaplasie ist mit einer erhöhten Expression von Cdx1 und Cdx2 assoziiert.

Dies ist nach meinem derzeitigen Wissenstand die erste Studie, die den Einfluss von abnormen gastroösophagealen Reflux und einer *H.pylori*-Infektion auf entzündliche und metaplastische Prozesse im Magen und am ÖGÜ untersucht und diesen mit der Expression der Transkriptionsfaktoren Cdx1 und Cdx2 vergleicht, die als Schlüsselgene für die Entstehung und Erhaltung intestinal differenzierter Epithelien gelten.

Hierzu wurden etwa 100 Patienten bezüglich des Vorhandenseins einer *H.pylori*-Infektion oder einer GERD in Subgruppen unterteilt und endoskopisch gewonnene Schleimhautbiopsien histologisch gemäß der Sydney-Klassifikation charakterisiert und mittels RT-PCR der Transkriptgehalt von Cdx1 und Cdx2 ermittelt. Die Daten wurden miteinander korreliert, um den jeweiligen Einfluss der Infektion beziehungsweise des Refluxes auf die Cdx-Expression und die Genese der mukosalen Metaplasie zu beurteilen. Zur Validierung der Ergebnisse erfolgte die histologische Charakterisierung und immunhistochemische Färbung von CDX2 von Biopsien eines zweiten Patientenkollektivs.

Ziel war es, Informationen zu gewinnen, die zur Entwicklung geeigneter Früherkennungs- oder Therapiemaßnahmen beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Studienkollektiv

Die Studie ist Bestandteil des Partnerprojektes 12 im Rahmen der BMBF Förderinitiative NBL3 und erhielt am 24.10.2001 ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

Es wurden Patienten berücksichtigt, die im Zeitraum von Mai 2000 bis Juni 2002 (Patientenkollektiv A) und von April 2005 bis November 2006 (Patientenkollektiv B) eine Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg erhalten hatten. Die Untersuchung wurde bei verschiedener Indikation durchgeführt, in der Regel jedoch wegen typischer Symptome von Erkrankungen des oberen Gastrointestinaltraktes. Dies waren vor allem dyspeptische Beschwerden oder solche, die im Rahmen einer GERD auftreten: Retrosternale und/oder epigastrische Schmerzen, Regurgitation, Säurerückfluss, Schluckbeschwerden und unangemessenes Völlegefühl.

Nach schriftlicher Einwilligung wurden 96 Patienten mit einem mittleren Alter von 53,16 Jahren in die Studie eingeschlossen (Kollektiv A), von denen 52 männlich (54,64%) und 44 weiblich (45,36%) waren. Als Ausschlusskriterien galten das Vorliegen einer Autoimmun-Gastritis, eine vorangegangene *H.pylori*-Eradikation oder Anzeichen für jegliche Art von maligner Neoplasie sowie anamnestisch bekannte Malignome.

Sämtliche Patienten wurden klinisch und histologisch insbesondere im Hinblick auf den Status einer potentiellen *H.pylori*-Infektion oder einer GERD evaluiert. Dabei ist zu beachten, dass GERD-positive Patienten ohne einen Barrett-Ösophagus in die Gruppen, welche GERD(+) gekennzeichnet sind, eingeteilt wurden. Patienten mit Refluxerkrankung und nachgewiesenem Barrett-Ösophagus bilden eine eigenständige Gruppe, die allerdings nicht bezüglich des *H.pylori*-Status weiter stratifiziert wurde. Dementsprechend wurde das Kollektiv in folgende Gruppen eingeteilt (**Abb. 4**):

H.pylori(-)/GERD(-) (n=22),

H.pylori(+)/GERD(-) (n=11),

H.pylori(-)/GERD(+) (n=17),

H.pylori(+)/GERD(+) (n=19),

Barrett (n=27).

Von den 27 Patienten mit Barrett-Ösophagus (Gruppe „Barrett“) zeigten 8 (29,6%) einen positiven Harnstoff-Urease-Schnelltest (HUT) als Zeichen einer *H.pylori*-Infektion.

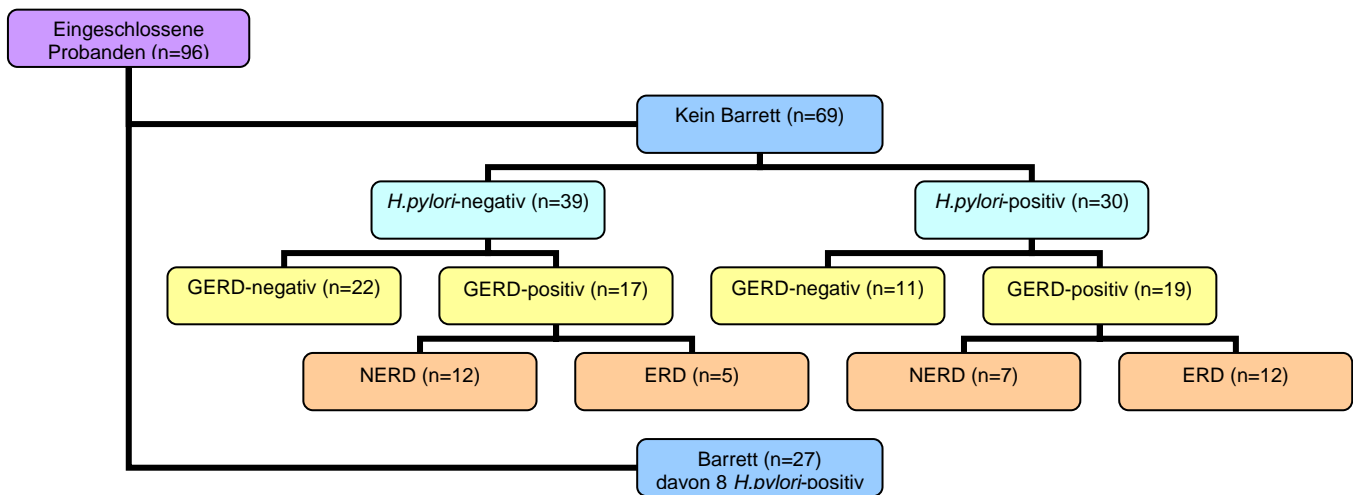


Abbildung 4: Aufteilung des Studienkollektivs A.

Aus statistischen Gründen wurde in den weiteren Analysen eine Unterteilung der Patienten mit Refluxerkrankung bezüglich der endoskopischen Manifestation (NERD, ERD) nicht vorgenommen.

Die Gruppen wurden nicht im Hinblick auf weitere Faktoren wie Alter und Geschlecht aufeinander abgeglichen. **Tabelle 1** zeigt die alters- und geschlechtsspezifische Verteilung der einzelnen Gruppen.

Tabelle 1: Mittleres Alter in Jahren [a] und geschlechtsspezifische Verteilung der einzelnen Gruppen des Studienkollektivs A.

Gruppe	Mittleres Alter [a]	Weiblich	Männlich
<i>H.pylori</i> (-)/GERD(-)	44,85	16	6
<i>H.pylori</i> (+)/GERD(-)	52,61	5	6
<i>H.pylori</i> (-)/GERD(+)	55,80	9	8
<i>H.pylori</i> (+)/GERD(+)	53,67	12	7
Barrett	57,74	2	25

Da nach Analyse der Cdx-Genexpression und der histologischen Bewertung der Proben des Kollektivs A nicht mehr ausreichend Material für immunhistochemische Färbungen zur Verfügung stand, wurden für die exemplarischen Färbungen Biopsien zusätzlicher Patienten (Studienkollektiv B) verwendet. Diese wurden retrospektiv zusammengestellt aus Material, das im Rahmen anderer Studien archiviert worden war. Es galten hierbei allerdings dieselben Ein- und Ausschlusskriterien wie für das Kollektiv A.

Das Patientenkollektiv B beinhaltete 66 Patienten mit einem mittleren Alter von 50,27 Jahren, von denen 26 (39,4%) weiblichen und 40 (60,6%) männlichen Geschlechts waren. Bei 31 Patienten konnte eine *H.pylori*-Infektion nachgewiesen werden. Unabhängig vom *H.pylori*-Status litten 30 Patienten an einer GERD, bei weiteren fünf wurde ein Barrett-Ösophagus nachgewiesen. Zehn Patienten, bei denen keine klinischen oder endoskopischen Hinweise für eine GERD vorlagen, und bei denen auch keine *H.pylori*-Infektion nachgewiesen werden konnte, wurden als Referenzgruppe angesehen.

Da keine detaillierte statistische Auswertung vorgesehen war, sondern exemplarische Färbungen durchgeführt werden sollten, mit dem Ziel, die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse des Kollektivs A zu unterstützen, erfolgte lediglich die Einteilung nach dem Vorkommen einer *H.pylori*-Infektion oder einer GERD. Überschneidungen der einzelnen Gruppen waren möglich.

2.2 Endoskopie

Die endoskopischen Untersuchungen wurden mit einem Standardendoskop vom Typ GIF Q 145 der Firma Olympus Optical Europe (Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Patienten, die an Symptomen einer Refluxerkrankung litten, wurden gebeten, die eventuelle Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren (PPI) mindestens zwei Wochen vor der Prozedur zu unterbrechen.

Im Rahmen der ÖGD wurden von jedem Patienten mindestens neun Biopsien der gastralen Mukosa entnommen, jeweils drei aus dem Antrum, dem Korpus und der Kardial-Region. Die Antrum-Proben wurden 3-5 cm proximal des Pylorus von der großen und kleinen Kurvatur, die des Korpus an der Mitte der großen Kurvatur und die der Kardial am proximalen Ende der Magenfalten entnommen.

Bei beiden Patientenkollektiven wurde je eine Biopsie für die konventionelle pathohistologische Evaluierung verwendet, bei Kollektiv A eine weitere für die quantitative RT-PCR-Analyse, bei Kollektiv B eine weitere für immunhistochemische Färbungen.

2.3 Histologie und Gruppeneinteilung betreffend des Vorhandenseins einer *H.pylori*-Infektion beziehungsweise einer gastroösophagealen Refluxerkrankung

Die Schleimhautproben wurden im Institut für Pathologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg unter Nutzung etablierter Standardmethoden aufgearbeitet und die Färbungen von zwei unabhängigen Gutachtern beurteilt. Jeweils ein Schnitt wurde mit Haematoxylin/Eosin gefärbt, ein weiterer mit Warthin-Starry-Silberfärbung zur Markierung potentiell vorhandener *H.pylori*.

Das Ausmaß der mukosalen Entzündung, der intestinalen Metaplasie und der bakteriellen Kolonisierung wurden gemäß der Sydney-Klassifikation semiquantitativ bewertet.[88]

Die *H.pylori*-Besiedelung des Magens wurde während der Endoskopie mittels Urease-Schnelltest (HUT[®], Astra-Zeneca, Wedel, Germany), wie von Malfertheiner *et al.* beschrieben, analysiert.[89]

Patienten, bei denen es weder in der Histologie noch im Urease-Schnelltest einen Anhalt für die Infektion durch *H.pylori* gab, wurden der Gruppe „*H.pylori*(-)“ zugeteilt. Patienten in der Gruppe „*H.pylori*(+)“ zeigten in mindestens einer der beiden Nachweise ein positives Ergebnis.

Die Zuteilung zur Gruppe „GERD(+)“ erfolgte für Patienten, die entweder typische Symptome einer Refluxerkrankung (Sodbrennen, retrosternale Schmerzen, Regurgitation von Speisen, „saures“ Aufstoßen) und/oder entsprechende Schädigung der Schleimhaut im distalen Ösophagus beziehungsweise am ÖGÜ und/oder ein pathologisches Ergebnis der 24h-pH-Metrie aufwiesen.

2.4 RNA-analytische Methoden

2.4.1 RNA-Extraktion

Aus den Biopsien, die für die RT-PCR-Analysen vorgesehen waren, wurde die Gesamt-RNA der Zellen unter Nutzung eines in unserem Labor etablierten Zwei-Schritt-Protokolls extrahiert.[90]

Initial wurden die entnommenen Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nach Zusatz von 500µl Trizol[®] bei -80 °C in 1,7ml RNase-freien Eppendorf Tubes (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gelagert. Zur RNA-Extraktion wurden die Proben mit Hilfe autoklavierter DSTROY-S-Plastikrührstäbe (BIOzym Diagnostik GmbH, Oldendorf, Deutschland) mechanisch mittels manuellen Drehbewegungen homogenisiert. Dies erfolgte in mehreren Zyklen unter mehrmaligem Wiedereinfrieren, bis keine festen Partikel mehr sichtbar waren. Nach Zugabe von 200µl Chloroform wurde das Homogenat für 10 Minuten bei 4°C mit 12 000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer RNase-freien Pipette in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und anschließend für 10 Minuten auf Eis inkubiert, bevor die erneute Zentrifugation für 10 Minuten bei 12 000x g erfolgte. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Pellett in 100µl RNase-freiem DEPC-Wasser resuspendiert.

Der so extrahierten RNA wurden 350µl RLT-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol hinzugefügt und gemischt, bevor 250µl Ethanol zugesetzt und erneut gemischt wurde. Anschließend wurde das Gemisch auf eine RNeasy[®]-Säule mit Silica-Gelmembran pipettiert (RNeasy[®]-Minikit, Qiagen, Hilden, Deutschland), welche auf einen mit einer Vakuumpumpe verbundenen QIAvac24[®]-Adapter gesteckt war. Durch Anlegen eines Vakuums wurde das Gemisch durch die Silica-Membran gesaugt, wobei die Phosphatgruppen der RNA über Salzbrückenbindungen an den Silanolgruppen der Silica-Membran banden. Die Zugabe des Ethanols erhöhte die Bindungsspezifität für die RNA.

Die so gebundene RNA wurde durch Zugabe von 250µl RW1-Puffer gereinigt, welcher ebenfalls mittels Vakuum durch die Membran gesaugt wurde. Um Verunreinigungen mit genomischer DNA auszuschließen wurde die Membran mit einem Gemisch aus 35µl RDD-Puffer und 5µl DNase versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut mit 250µl RW1-Puffer und zweimal mit 500µl RPE-Puffer gespült, bevor eine „Trocknung“ die Zentrifugation für 2 Minuten bei 12 000x g erfolgte.

Nach Überführung der Säule auf ein neues RNase-freies Eppendorf-Tube wurde die an die Membran gebundene RNA mit zweimal 35µl RNase-freiem Wasser eluiert, wobei jeweils erneut für 2 Minuten bei 12 000x g zentrifugiert wurde. Von dem gewonnenen Eluat wurden je 5µl für die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung und die Überprüfung der RNA-Integrität mittels Agarose-Gelelektrophorese entnommen, der Rest bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.2 Qualitätsprüfung der RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Qualität der gewonnenen RNA wurde per Agarosegelelektrophorese in 1%igem Agarosegel überprüft, wobei die Präsenz der ribosomalen 28S- und 18S-RNA-Banden maßgebend waren.

1g Agarose (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurde in 100ml 1xTBE-Puffer gelöst, in der Mikrowelle bei 600W erhitzt und anschließend in einen 12cm breiten Gelträger gegossen. Nach dem Erkalten wurde das Gel in eine mit 1xTBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt und die Taschen mit je 5µl Probengemisch und 3µl Ladepuffer beschickt. Die Elektrophorese erfolgte für eine Stunde bei 85V. Anschließend wurde das Gel für 10 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (300ml 1xTBE-Puffer mit 50µl 1%igem Ethidiumbromid) inkubiert, bevor erneut die Elektrophorese für 10 Minuten bei 85V erfolgte.

Die aufgetrennten RNA-Banden wurden mittels eines UV-Transilluminators (Herolab, Biometra, Göttingen, Deutschland) sichtbar gemacht, wobei das interkalierende Ethidiumbromid durch seine Fluoreszenz die Nukleinsäuren markiert (**Abb. 5**).

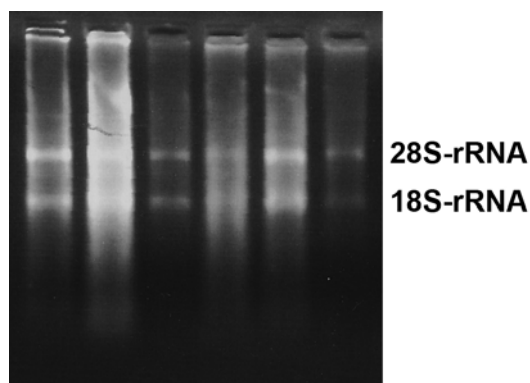


Abbildung 5: Agarosegel nach Elektrophorese der extrahierten RNA

Deutlich sichtbare Banden der 28S- und 18S-rRNA willkürlich ausgewählter Proben in 1%igem Agarosegel nach Elektrophorese für eine Stunde bei 85V und anschließende Färbung mit Ethidiumbromid.

2.4.3 Photospektrometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Der RNA-Gehalt der Proben wurde photospektrometrisch mit dem GENESYS™ Spektrometer 10UV (ThermoSpectronic, Waltham, MA, USA) gemessen. Das zuvor aliquotierte RNA-Eluat (5µl) wurde mit 5µl RNase-freiem DEPC-Wasser verdünnt, gemischt und 5µl des Gemischs nach Nullabgleich des Photometers mit Aqua dest. in eine Quarzküvette überführt. Anschließend wurde die Absorption bei 260nm gemessen.

Über den Extinktionskoeffizienten konnte der RNA-Gehalt der Probe berechnet werden, wobei davon ausgegangen wurde, dass eine OD₂₆₀-Einheit einer RNA-Konzentration von 40µg/ml entspricht. Das Absorptionsverhältnis von 260 zu 280nm gab Aufschluss über Proteinverunreinigungen der Proben. Der Quotient sollte im Bereich von 1,8 bis 2,2 liegen. Im Mittel wurden je Probe etwa 4,5µg RNA isoliert.

2.4.4 Umschreiben der mRNA-Fraktion in eine cDNA mittels Reverser Transkriptase-Reaktion

Je Probe wurden 500ng Gesamt-RNA in H₂O auf 25,4µl standardisiert und in ein zuvor mit UV-Licht bestrahltes Eppendorf-Gefäß (1,7ml) pipettiert. Für die cDNA-Synthese wurde ein Standard-Protokoll für AMV-RT (Promega, Mannheim, Deutschland) angewendet. Es wurden jeweils 14,6µl eines Reaktionsgemisches für die Reverse Transkriptase-Reaktion hinzugefügt, bestehend aus 8µl 5xPromega-Puffer AMV-RT, 2µl AMV (10U/µl), 1,6µl dNTP (je 25nM), 2µl „random Primer“ und 1µl RNase-Inhibitor. Dieser Ansatz wurde für 45 Minuten bei 42°C und anschließend für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Abschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert, bevor es bei -20°C gelagert wurde.

Insgesamt wurden von allen zu untersuchenden Proben jeweils 500ng RNA in eine cDNA in einem Endvolumen von 40µl umgeschrieben.

2.5 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR wurde mit einem iCycler der Firma BioRad (München, Deutschland) durchgeführt. Es wurde ein Reaktionsgemisch verwendet, das aus 15µl

HotStarTaq™ Master Mix, 12,8µl DEPC-Wasser, 1,2µl der synthetisierten cDNA, 0,3µl SYBR-Green-I (Molecular Probes, Eugene, USA) und je 0,2µl (50µM) der spezifischen Primer für entweder Cdx1, Cdx2 oder β-Aktin bestand.

Nach einer 15minütigen initialen Denaturierungsphase bei 95°C, folgten insgesamt 40 Zyklen mit je 30 Sekunden zur Denaturierung bei 94°C, zum Binden der Primer bei 60°C und für die Elongation bei 72°C. Am Ende jeder Elongationsphase wurde die Intensität des Fluoreszenzsignals erfasst, das vom SYBR-Green-I-Molekül ausging, welches spezifisch mit der Doppelstrang-DNA interkalierte.

Die so erhaltenen Resultate wurden verwendet, um den ursprünglichen mRNA-Gehalt der Proben zu berechnen. Dazu wurde jeweils der Zeitpunkt bestimmt an dem der lineare Anstieg der PCR-Reaktion begann und dieser dann ins Verhältnis zu einer entsprechenden Standardkurve gesetzt. Diese wurde erstellt mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von Plasmid-DNA, die die jeweiligen spezifischen PCR-Fragmente enthielt (**Abb. 6**). Es ergaben sich PCR-Fragmente von 224 bp für Cdx1, 150 bp für Cdx2 und 400 bp für β-Aktin. Die Standardkurven von β-Aktin und Cdx2 zeigten einen Korrelationskoeffizient von >0,96.

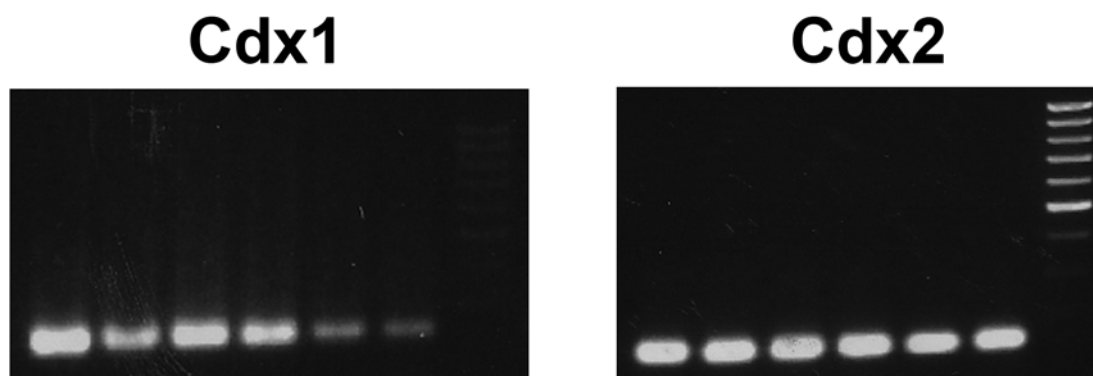


Abbildung 6: Standardverdünnungsreihen von Cdx1 und Cdx2 zur Quantifizierung des PCR-Produktes
Dargestellt sind die Agarosegele nach Elektrophorese der PCR-Produkte der Verdünnungsreihen der mittels Plasmidklonierung gewonnenen Standards für Cdx1 (links) und Cdx2 (rechts). In der obersten Bande stellt sich ein Marker (je 100 Basenpaare) dar, darunter die Standardverdünnungsreihe in ansteigender Konzentration. Es wurde 1,8%iges Agarosegel verwendet.

Der so errechnete Gehalt an Cdx-mRNA wurde abschließend auf den ebenfalls bestimmten Gehalt an β-Aktin normalisiert. Dies ist ein so genanntes „housekeeping“-Gen, welches in allen Zellen exprimiert wird und dessen Expression relativ unbeeinflusst durch exogene Faktoren erfolgt. Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR-Analyse ergaben sich also letztendlich aus dem Verhältnis des Cdx- gegen den β-Aktin-Gehalt der jeweiligen Proben.

In **Tabelle 2** sind die verwendeten Primer der jeweiligen Gene angegeben.

Tabelle 2: Für die RT-PCR verwendete Primerpaare für β -Aktin, Cdx1 und Cdx2

Gen	„Primer upstream“	„Primer downstream“
β -Aktin	5'-cat-gcc-atc-ctg-cgt-ctg-gac-c-3'	5'-aca-tgg-tgg-tgc-cgc-cag-aca-g-3'
Cdx1	5'-agc-ggt-aag-act-cgg-acc-aag-g-3'	5'-ggc-tgt-tgc-tgc-tgc-tgt-ttc-3'
Cdx2	5'-gtt-tca-gaa-ccg-cag-agc-aaa-g-3'	5'-ctc-aag-ggc-tct-ggg-aca-ctt-c-3'

Aufgrund der Vorgaben durch das RT-PCR-Protokoll und der Basenfolge des Cdx2-Gens, war es uns nicht möglich, einen Primer zu konfigurieren, der zumindest in Anteilen ein Intron des Gens mit einschloss. Um daher die Ausgangsproben auf DNA-Kontamination hin zu prüfen, wurden Stichproben erneut mittels RT-PCR untersucht, allerdings ohne vorangehende Reverse Transkriptase Reaktion. Bei allen Stichproben fiel das Ergebnis der PCR negativ aus. Im Falle eines positiven DNA-Nachweises hätten Verunreinigungen vorgelegen.

Generell wurden zur internen Kontrolle der RT-PCR Reaktion sämtliche PCR-Produkte per Gelelektrophorese auf das Vorhandensein von dem erwünschten DNA-Fragment entsprechenden Banden untersucht (**Abb. 7**).

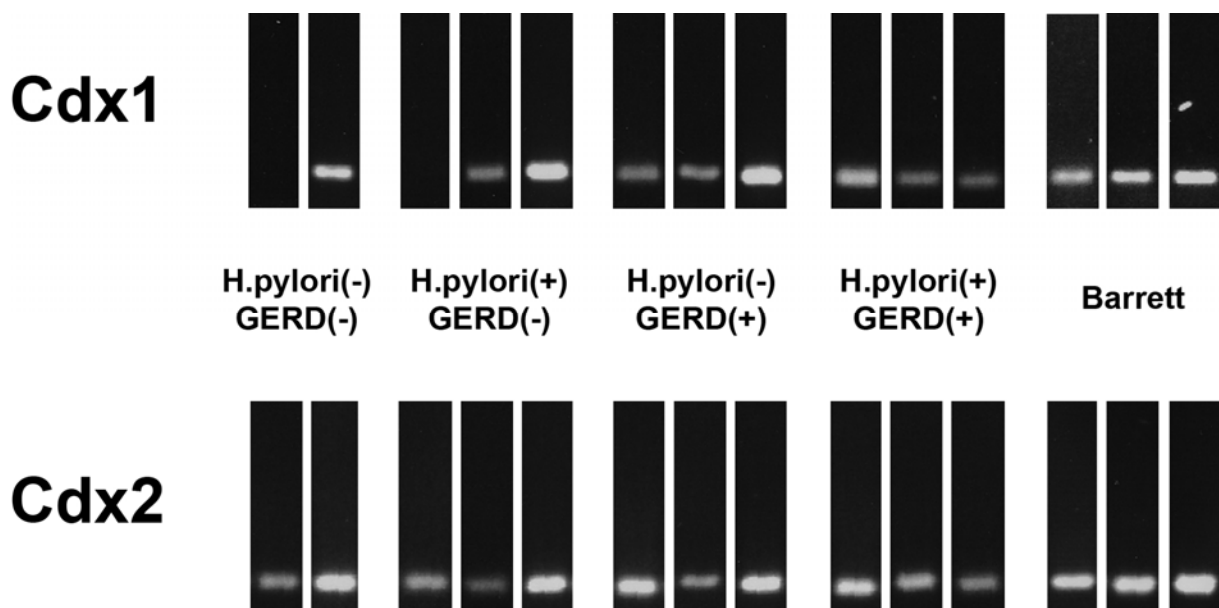


Abbildung 7: Elektrophoresebanden der RT-PCR-Produkte der einzelnen Gruppen

Exemplarische Darstellung der Elektrophoresebanden der RT-PCR-Produkte willkürlich ausgewählter Proben der einzelnen Subgruppen in 1,8%igen Agarosegelen. Oben für Cdx1, unten die entsprechenden Proben für Cdx2.

Hierbei wurde bis auf wenige Abweichungen analog zu der im Abschnitt 2.4.2 beschriebenen Elektrophorese vorgegangen. Zum einen wurde ein 1,8%iges Agarosegel verwendet (1,8g Agarose in 100ml TBE-Puffer), zum anderen erfolgte die zehnmünütige Inkubation des Gels im Ethidiumbromid-Bad bereits vor der Beschickung des Gels und der Elektrophorese.

2.6 Klonierung der Plasmide für die PCR-Standardkurve

1µl „Pdrive“ Vektorplasmid wurde zusammen mit 4µl des jeweiligen PCR-Produkts und 5µl Ligationsmastermix (Quiagen, Hilden, Deutschland) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bevor das Gemisch zum Abbruch der Reaktion für 15 Minuten bei 60°C inkubiert wurde. 1,5µl des so gewonnenen Ligationsansatzes wurden zusammen mit 25µl kompetenter *E.coli*-Zellen, die bei -80 °C gelagert waren, für 25 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation des Ansatzes für 25 Sekunden im 42°C warmen Wasserbad, um die Aufnahme des Plasmids durch die Bakterien zu induzieren, und ein Abkühlen auf Eis, bevor unter keimfreien Bedingungen je 850µl Transformationsmedium hinzugefügt wurden und der Gesamtansatz für 75 Minuten bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert wurde. Mit dem Kulturgemisch wurden je 2 Agarplatten (LB-Agar, Ampicillin, L-Galaktose, IPTG) mit Hilfe eines Glasspatels beimpft. Dabei wurde je eine Agarplatte mit 50 µl und die andere mit 200 µl der Kulturflüssigkeit beimpft und anschließend über Nacht bei 37°C bebrütet.

Das Vektorplasmid enthielt ein β-Laktamase-Gen. *E.coli*, die das Plasmid und damit das darin enthaltene β-Lactamase-Gen gar nicht erst aufgenommen hatten, waren auf dem Ampicillin-haltigen Agar nicht lebensfähig.

Unter Nutzung der β-Galaktosidase, deren Gen sich auf dem Plasmid befand, konnte anhand der Koloniefärbung differenziert werden, ob die zur Kolonie gewachsenen Klone potentiell ein Insert, das klonierte PCR-Produkt, enthielten.

Um zu überprüfen, ob das entsprechende PCR-Fragment enthalten war, wurde mit einer sterilen Pipettenspitze ein Teil der weissen Kolonien abgenommen, 10 Minuten bei 95°C in H₂O abgekocht und mittels PCR entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll analysiert (Ansatz: 40µl RT-PCR-Reaktionsgemisch, bestehend aus 4µl 10x Puffer, 8µl Q-Puffer, 1µl dNTP (je 25 nM), 0,3µl „upstream-Primer“ (50µM), 0,3µl „downstream-Primer“ (50µM), 24,9µl Aqua, 1µl Lysat).

Klone, welche das jeweilige Gen (β -Aktin, Cdx1, Cdx2) korrekt enthielten, wurden zur weiteren Plasmidpräparation verwendet. Hierzu wurden 10ml LB-Selektivmedium (Ampicillin 50 μ g/ml) beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurden aus jeweils 1,5ml der Bakteriensuspension unter Verwendung des QIAprep[®] Miniprep Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) die Plasmid-DNA isoliert. Zum Ausschluss etwaiger Veränderungen in der Nukleotidsequenz der jeweiligen Gene, wurde der entsprechende Bereich der isolierten Plasmid-DNA sequenziert.

Anschließend wurden die Klone über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler in 250ml LB/Ampicillin-Selektivmedium bebrütet und abschließend die Plasmid-DNA unter Verwendung des EndoFree[®] Plasmid Maxi Kits (Qiagen) extrahiert.

2.7 Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemischen Analysen wurden von Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben 3 μ m dicke Serienschnitte angefertigt. Diese wurden nach einer Wärmephase von 30 Minuten bei 55 °C zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und anschließend rehydriert. Es folgte ein zwanzigminütiges Erhitzen der Schnitte in 0,01M EDTA-Puffer in der Mikrowelle bei 450 Watt.

Für die Detektion des CDX2-Proteins wurden monoklonale Primärantikörper der Maus (IgG1 κ) verwendet (CDX2-88; Verdünnung 1:200; BioGenex Laboratories Inc., San Ramon, CA, USA). Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4°C für zwölf Stunden.

Die eigentliche Färbereaktion wurde mittels der Avidin-Biotin-Methode durchgeführt, für die der „Vectastain ABC-AP-Kit“ der Firma Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) zur Verfügung stand. Es folgte die Gegenfärbung der Proben mit Hämatoxylin, bevor die gefärbten Schnitte mit DEPEX[™] in Einschlussharz fixiert und eingedeckelt wurden.

Die Spezifität der Immunfärbung wurde durch weitere Färbungen unter Ersatz des Primärantikörpers durch nicht-immunogenes Serum geprüft. Die immunhistochemischen Färbungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Dörthe Küster aus dem Institut für Pathologie evaluiert.

2.8 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurden nicht-parametrische Tests benutzt. Bei Stichprobenvergleichen wurde der U-Test nach Mann-Whitney, bei Korrelationsanalysen der Rang-Korrelations-Test nach Spearman angewandt. Es galt jeweils ein zweiseitiges Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Sämtlich statistischen Analysen wurden unter Verwendung von SPSS-Software, Version 11.0, durchgeführt (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Die graphisch-statistischen Darstellungen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism, Version 4.0, erstellt (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Studienkollektiv A

3.1.1 Expression von Cdx1 und Cdx2 in der Referenzgruppe *H.pylori*(-)/GERD(-)

Die Genexpression von Cdx1 und Cdx2 wurde in Biopsien von Patienten des Studienkollektivs A mittels RT-PCR analysiert. Als Referenzgruppe galten Patienten, bei denen weder eine *H.pylori*-Infektion noch eine Refluxerkrankung nachgewiesen werden konnte [*H.pylori*(-)/GERD(-)]. Bei dieser Gruppe zeigte sich an allen Lokalisationen (Antrum, Korpus, Kardia) eine deutliche Genexpression beider Transkriptionsfaktoren, wobei Cdx2 höhere mediane Expressionswerte aufwies als Cdx1 (**Tab. 3**).

Tabelle 3: Expression von Cdx1 und Cdx2 bei der Gruppe *H.pylori*(-)/GERD(-)
Angegeben sind Median, Minimum und Maximum in arbitrary units (a.u.).

Lokalisation	Cdx1-Expression	Cdx2-Expression
Antrum	9,1e ⁻⁰⁶ (0-1,7e ⁻⁰²)	1,6e ⁻⁰⁴ (0-2,8e ⁻⁰²)
Korpus	1,4e ⁻⁰⁶ (0-1,3e ⁻⁰³)	2,0e ⁻⁰⁴ (4,5e ⁻⁰⁸ -3,9e ⁻⁰¹)
Kardia	4,9e ⁻⁰⁶ (0-8,6e ⁻⁰⁴)	1,5e ⁻⁰⁵ (0-6,8e ⁻⁰²)
Gesamt	3,8e ⁻⁰⁶ (0-1,7e ⁻⁰²)	7,5e ⁻⁰⁵ (0-3,9e ⁻⁰¹)

3.1.2 Expressionsvergleich der einzelnen Gruppen

Generell ist zu bemerken, dass der Anteil an Proben bei denen mittels RT-PCR eine Genexpression von Cdx1 und/oder Cdx2 nachweisbar war zwischen den einzelnen untersuchten Gruppen und Lokalisationen deutlich variierte (**Tab. 4**).

Tabelle 4: Anteile von Patienten mit nachgewiesener Genexpression von Cdx1 oder Cdx2

Angegeben sind die relativen Anteile von Biopsien, bei denen in der RT-PCR eine Expression von entweder Cdx1 oder Cdx2 nachgewiesen werden konnte, aufgeteilt nach den einzelnen Gruppen und Lokalisationen.

	Antrum		Korpus		Kardia		Gesamt	
	Cdx1	Cdx2	Cdx1	Cdx2	Cdx1	Cdx2	Cdx1	Cdx2
<i>H.pylori</i> (-) GERD(-)	95,5%	95,5%	90,9%	95,5%	95,5%	86,4%	93,9%	95,5%
<i>H.pylori</i> (+) GERD(-)	90,9%	90,9%	63,6%	81,8%	72,7%	72,7%	75,8%	81,8%
<i>H.pylori</i> (-) GERD(+)	94,1%	94,1%	58,8%	76,5%	58,8%	82,4%	70,6%	84,3%
<i>H.pylori</i> (+) GERD(+)	89,5%	94,7%	52,6%	84,2%	84,2%	89,5%	75,4%	89,5%
Barrett	48,1%	96,3%	63,0%	96,3%	25,9%	88,9%	45,7%	93,8%

Im Folgenden wurden die Transkriptmengen für Cdx1 und Cdx2 in den einzelnen Gruppen, die jeweils eine *H.pylori*-Infektion und/oder eine GERD vorwies, quantitativ mit denen der Referenzgruppe (siehe Abschnitt 3.1.1) verglichen (**Abb. 8, 9**).

Diese Untersuchungen zeigten im Patientenkollektiv A für alle Gruppen im Wesentlichen keine Veränderungen der Cdx1-Expression im Vergleich zur Referenzgruppe. Signifikante Unterschiede waren nur im Antrum und der Kardia bei Patienten mit einem Barrett-Ösophagus und in der Korpusmukosa von Patienten mit sowohl *H.pylori* als auch GERD nachweisbar. In allen drei Fällen zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Cdx1-Genexpression gegenüber den Werten der Referenzgruppe (**Abb. 8**).

Für Cdx2 zeigte sich dagegen bei allen Gruppen im Antrum eine höhere Expression als bei der Referenzgruppe (4,9- bis 25,6-fach). Im Korpus ergab sich nur bei Patienten der Gruppe *H.pylori*(+)/GERD(-) ein signifikanter Unterschied der Cdx2-Werte, die in diesem Fall erniedrigt waren. An der Kardia wurde, verglichen mit der Referenzgruppe, Cdx2 stärker bei Patienten, die sowohl eine *H.pylori*-Infektion als auch eine GERD aufwiesen [(*H.pylori*(+)/GERD(+); 100x] als auch bei solchen mit einem Barrett-Ösophagus (27,3-fach) stärker exprimiert (**Abb. 9**).

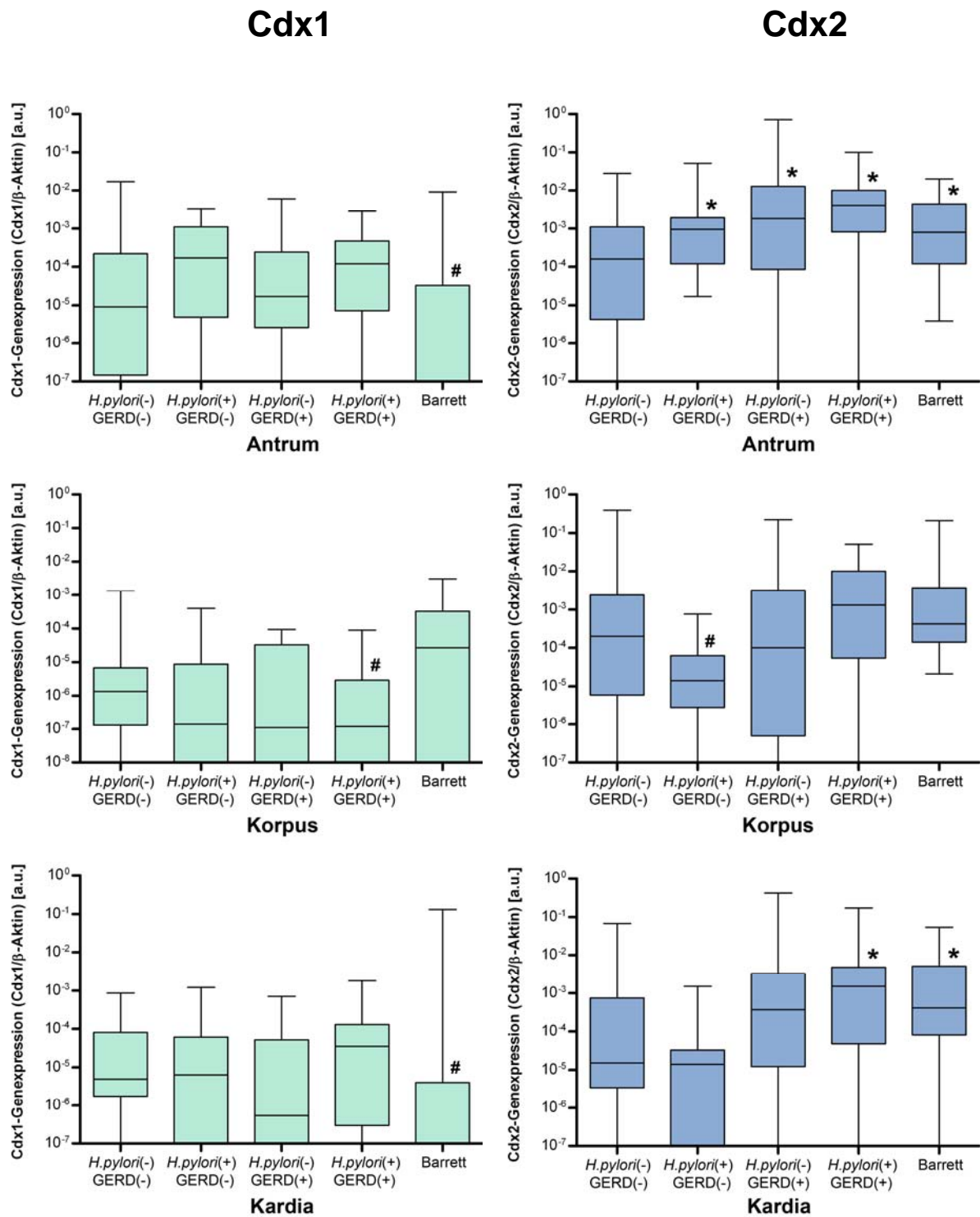


Abbildung 8: Expression von Cdx1 und Cdx2 in den einzelnen Gruppen

Dargestellt ist die Expression von Cdx1 (hellblau) und Cdx2 (dunkelblau) der einzelnen Subgruppen an den jeweiligen Lokalisationen in arbitrary units (a.u.). Die Diagramme geben jeweils Median, 25er- und 75er-Perzentilen, sowie Minimum und Maximum wieder. Der Wert „0“ kann auf der logarithmischen Y-Skalierung nicht dargestellt werden. Die Expression wurde mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. Ist die Expression bei einer Gruppe im Vergleich zur Referenzgruppe [*H.pylori*(-)/GERD(-)] signifikant erhöht, so ist sie mit (*) markiert. Ist sie signifikant niedriger, so ist diese Gruppe mit (#) markiert. Als signifikant wurde $p < 0,05$ angesehen.


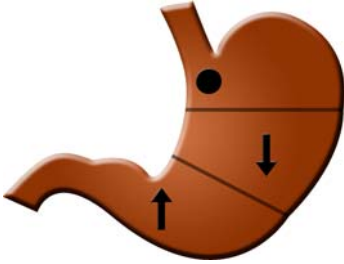

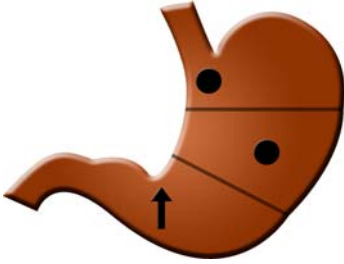
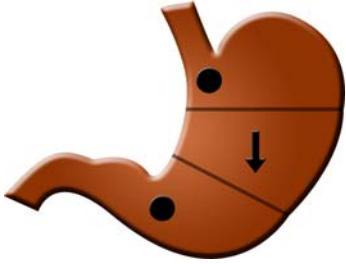
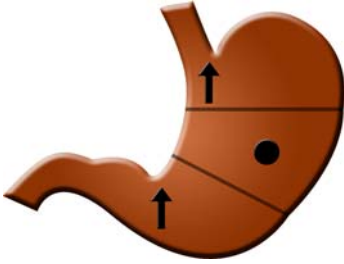
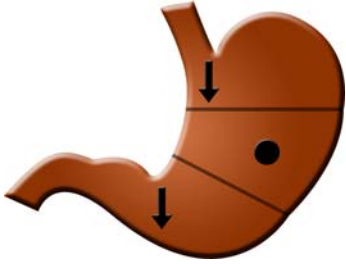
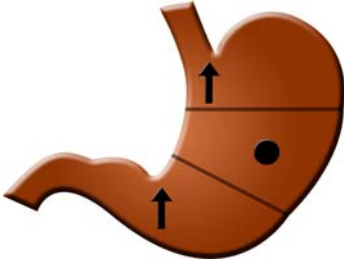
	Cdx1-Expression	Cdx2-Expression
<i>H.pylori</i> (+) GERD(-)		
<i>H.pylori</i> (-) GERD(+)		
<i>H.pylori</i> (+) GERD(+)		
Barrett		

Abbildung 9:
Schematische Darstellung des Expressionsvergleichs

Für die Lokalisationen Antrum, Korpus und Kardie wird eine Veränderung der Expression von Cdx1 und Cdx2 in den einzelnen Gruppen im Vergleich zur Gruppe [*H.pylori*(-)/GERD(-)] dargestellt.

Pfeil nach oben: höhere Expression;

Pfeil nach unten: niedrigere Expression;

Punkt: keine signifikante Veränderung.

3.1.3 Allgemeiner Einfluss von *H.pylori* und GERD auf die Cdx-Expression

Zur Untersuchung eines generellen Einflusses von entweder *H.pylori* oder GERD auf die Expression von Cdx1 und Cdx2 wurde die Gruppen neu stratifiziert und entweder allein im Hinblick auf das Vorhandensein einer *H.pylori*-Infektion oder einer GERD eingeteilt.

Die *H.pylori*-positiven Patienten dieser Analyse umfassten die Patienten mit ausschließlicher *H.pylori*-Infektion sowie die Patienten mit einem gleichzeitigen Auftreten einer *H.pylori*-Infektion und einer GERD (n = 33). Die *H.pylori*-negativen Patienten umfassten solche ohne

beide Faktoren, als auch solche ausschließlich mit GERD (n = 39). Die Gruppe der Patienten mit Barrett-Ösophagus wurde nicht berücksichtigt.

Beim Vergleich der Cdx1-Expression *H.pylori*-positiver Patienten mit der *H.pylori*-negativer, zeigte sich für keine der Lokalisationen ein Einfluss durch die Infektion (Daten nicht dargestellt). Für Cdx2 hingegen zeigte sich im Antrum eine deutlich erhöhte Expression (8-fach; p=0,033) und an der Kardia die Tendenz zur erhöhten Expression, allerdings ohne Erreichen einer statistischen Signifikanz (**Abb. 10**). Die Expression von Cdx2 im Korpus war nicht verändert (Daten nicht gezeigt).

Der analoge Vergleich von Patienten mit GERD mit solchen ohne Refluxerkrankung zeigte für Cdx1 ebenfalls keine signifikante Veränderung des Transkriptgehaltes, für Cdx2 allerdings sowohl im Antrum (14,4-fach; p=0,003) als auch an der Kardia (63,6-fach; p=0,001) eine erhöhte Expression (**Abb. 10**). Die Expression im Korpus wurde nicht beeinflusst (Daten nicht dargestellt).

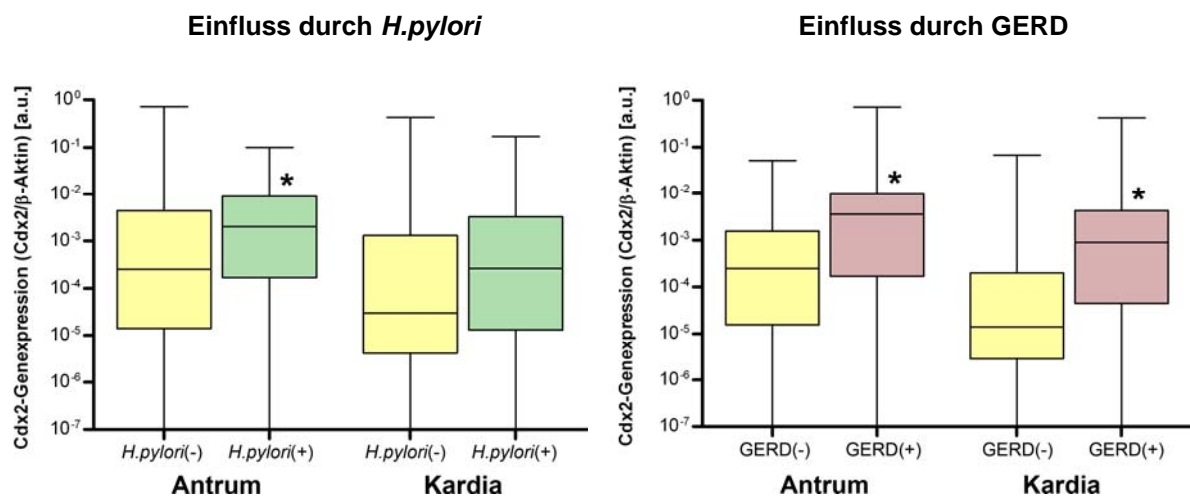


Abbildung 10: Einfluss durch *H.pylori* oder GERD auf die Cdx2-Expression

Dargestellt ist die Expression von Cdx2 im Antrum und der Kardia von Patienten mit oder ohne *H.pylori*-Infektion (links) beziehungsweise mit oder ohne GERD (rechts). Die Diagramme geben jeweils Median, 25er- und 75er-Perzentilen, sowie Minimum und Maximum wieder. Der Wert „0“ kann auf der logarithmischen Y-Skalierung nicht dargestellt werden. Die Expression wurde mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. Ist die Expression bei einer Gruppe im Vergleich zur jeweils negativen Gruppe signifikant erhöht, so ist sie mit * markiert. Als signifikant wurde p<0,05 angesehen.

3.1.4 Interaktion von *H.pylori* und GERD im Hinblick auf die Cdx-Expression

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich der Einfluss einer *H.pylori*-Infektion oder einer GERD auf die Cdx-Expression verändert, wenn der jeweils andere Faktor zusätzlich vorhanden ist.

Im Abschnitt 3.1.2 wurde bereits überprüft, welchen Effekt eine *H.pylori*-Infektion allein, das heißt bei Patienten ohne Refluxerkrankung, auf die Expression von Cdx1 und Cdx2 hat [*H.pylori*(+)/GERD(-) vs *H.pylori*(-)/GERD(-)] (**Abb. 9**). Es wurde nun zusätzlich evaluiert, ob bei Patienten mit GERD der Einfluss durch *H.pylori* ein anderer ist [*H.pylori*(+)/GERD(+) vs *H.pylori*(-)/GERD(+)] als der bereits beschriebene bei Patienten ohne Refluxerkrankung (**Abb. 11**).

Analog dazu wurde verglichen, welche Auswirkungen das Vorhandensein einer GERD auf die Transkriptmengen von Cdx2 hat, jeweils bei Patienten mit *H.pylori*-Infektion und bei solchen ohne (**Abb. 12**).

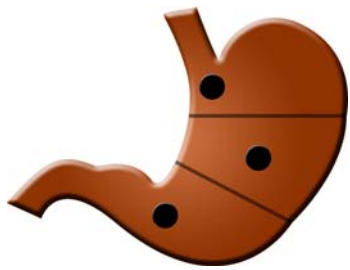
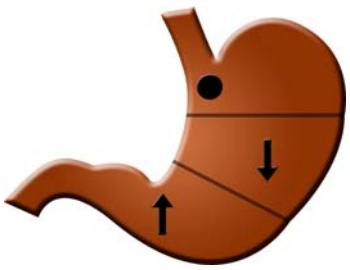


	Cdx1-Expression	Cdx2-Expression	
Einfluss durch <i>H.pylori</i> bei Patienten ohne GERD			<i>H.pylori</i> (+)/GERD(-) vs <i>H.pylori</i> (-)/GERD(-)
Einfluss durch <i>H.pylori</i> bei Patienten mit GERD			<i>H.pylori</i> (+)/GERD(+) vs <i>H.pylori</i> (-)/GERD(+)

Abbildung 11: Einfluss einer *H.pylori*-Infektion auf die Cdx1-/2-Genexpression bei Patienten mit GERD im Vergleich zu solchen ohne GERD

Dargestellt ist der Unterschied der jeweiligen Expression von Cdx1 und Cdx2 an den Lokalisationen Antrum, Korpus und Kardia unter dem Einfluss einer *H.pylori*-Infektion. Die obere Zeile zeigt diese für Patienten mit, die untere für solche ohne Refluxerkrankung. In der rechten Spalte ist aufgeführt, welche Gruppen im Einzelnen miteinander verglichen wurden. Pfeil nach oben: höhere Expression; Pfeil nach unten: niedrigere Expression; Punkt: keine signifikante Veränderung.

An keiner der untersuchten Lokalisationen hatte eine Infektion mit *H.pylori* einen Einfluss auf die Expression von Cdx1. Dies galt sowohl für Patienten ohne Refluxerkrankung als auch für solche mit GERD (**Abb. 11**). Die Auswirkungen von *H.pylori* auf die Cdx2-Expression bei Patienten ohne Refluxerkrankung zeigten sich im Antrum in einem 5,9-fach erhöhten ($p=0,047$) und im Korpus in einem verminderten ($p=0,036$) Transkriptgehalt im Vergleich zu Patienten ohne Infektion. Keine Veränderungen zeigten sich an der Kardia. Bei Patienten mit GERD hatte eine *H.pylori*-Infektion keinerlei zusätzlichen Einfluss auf die Expression von Cdx2 (**Abb. 11**).

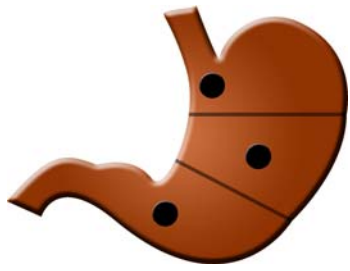
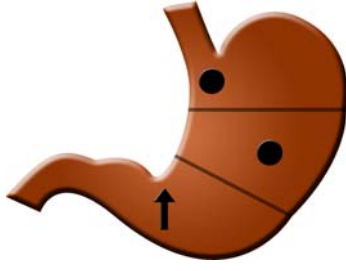

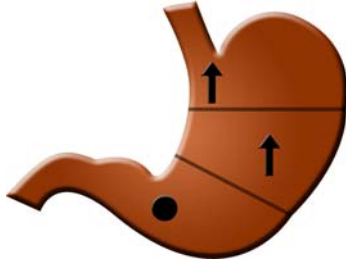
	Cdx1-Expression	Cdx2-Expression	
Einfluss durch GERD bei Patienten ohne <i>H.pylori</i> -Infektion			<i>H.pylori</i> (-)/GERD(+) vs <i>H.pylori</i> (-)/GERD(-)
Einfluss durch GERD bei Patienten mit <i>H.pylori</i> -Infektion			<i>H.pylori</i> (+)/GERD(+) vs <i>H.pylori</i> (+)/GERD(-)

Abbildung 12: Einfluss der GERD auf die Cdx1-/2-Genexpression bei Patienten mit *H.pylori*-Infektion im Vergleich zu solchen ohne die Infektion

Dargestellt ist der Unterschied der jeweiligen Expression von Cdx1 und Cdx2 an den Lokalisationen Antrum, Korpus und Kardia unter dem Einfluss einer GERD. Die obere Zeile zeigt diese für Patienten mit, die untere für solche ohne *H.pylori*-Infektion. In der rechten Spalte ist aufgeführt, welche Gruppen im Einzelnen miteinander verglichen wurden. Pfeil nach oben: höhere Expression; Pfeil nach unten: niedrigere Expression; Punkt: keine signifikante Veränderung.

Sowohl bei Patienten mit als auch bei solchen ohne *H.pylori*-Infektion war kein Einfluss einer GERD auf die Cdx1-Expression in der Mukosa des Magens nachweisbar. Die Expression von Cdx2 war bei *H.pylori*-negativen Patienten mit GERD im Antrum 11,3-fach erhöht verglichen mit *H.pylori*-negativen Patienten ohne Refluxerkrankung ($p=0,032$). Im Korpus und an der Kardia blieb sie unbeeinflusst. Bei *H.pylori*-positiven Patienten zeigte sich ein anderer Effekt

durch eine GERD: die Cdx2-Expression von Patienten mit GERD blieb im Antrum unverändert, während sie im Korpus ($p=0,005$) und der Kardia ($p=0,003$) 92,9-beziehungsweise 107,1-fach erhöht war (**Abb. 12**).

3.1.5 Histologische Evaluation der Gewebeproben

Biopsien der gastralen Mukosa, die nicht für die Expressionsanalyse verwendet worden waren, wurden von zwei Pathologen unabhängig voneinander histologisch charakterisiert. Dabei wurden die Gewebeproben entsprechend der Sydney-Klassifikation hinsichtlich des entzündlichen und metaplastischen Geschehens befundet.[88]

3.1.5.1 Entzündung

An allen Lokalisationen zeigte sich bei *H.pylori*-positiven Gruppen eine signifikant höhere Entzündungsaktivität und –chronizität als bei Patienten ohne Infektion (**Tab. 5**). Die Entzündungsparameter von Patienten mit einer Refluxerkrankung ohne Barrett-Ösophagus und solche aus der Gruppe mit einem Barrett-Ösophagus lagen im Bereich der Gruppe *H.pylori*(-)/GERD(-).

Tabelle 5: Aktivität und Chronizität der Entzündung im Patientenkollektiv A

Die Bewertung der Entzündungsaktivität und Chronizität wurde nach der Sydney-Klassifikation vorgenommen. Die Unterschiede *H.pylori*-positiver Gruppen gegenüber der Referenzgruppe [*H.pylori*(-)/GERD(-)] sind signifikant (*). Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung.

	Antrum		Korpus		Kardia		Gesamt	
	Aktivität	Chronizität	Aktivität	Chronizität	Aktivität	Chronizität	Aktivität	Chronizität
<i>H.pylori</i> (-) GERD(-)	0,18 \pm 0,395	1,05 \pm 0,575	0,18 \pm 0,588	1,00 \pm 0,756	0,41 \pm 0,590	1,18 \pm 0,501	0,26 \pm 0,535	1,08 \pm 0,615
<i>H.pylori</i> (+) GERD(-)	1,45 \pm 0,522*	1,82 \pm 0,405*	0,91 \pm 0,539*	1,73 \pm 0,467*	1,45 \pm 0,522*	1,82 \pm 0,405*	1,27 \pm 0,574*	1,79 \pm 0,415*
<i>H.pylori</i> (-) GERD(+)	0,24 \pm 0,437	0,88 \pm 0,485	0,12 \pm 0,332	0,71 \pm 0,588	0,35 \pm 0,606	1,35 \pm 0,606	0,24 \pm 0,437	0,98 \pm 0,616
<i>H.pylori</i> (+) GERD(+)	1,63 \pm 0,684*	1,95 \pm 0,229*	1,11 \pm 0,459*	1,58 \pm 0,607*	1,26 \pm 0,452*	1,89 \pm 0,315*	1,33 \pm 0,577*	1,81 \pm 0,441*
Barrett	0,22 \pm 0,577	0,96 \pm 0,587	0,15 \pm 0,362	0,85 \pm 0,534	0,15 \pm 0,362	0,96 \pm 0,518	0,17 \pm 0,441	0,93 \pm 0,543

3.1.5.2 Intestinale Metaplasie

Tabelle 6 gibt die Anteile an den einzelnen Gruppen wieder, bei denen an den jeweiligen Lokalisationen eine intestinale Metaplasie (IM) nachgewiesen wurde. Die deutlichste Präsenz zeigte sich an der Kardia (28,9% aller Patienten), wohingegen im Korpus nur ein Patient aus der Barrett-Gruppe eine intestinale Metaplasie aufwies (1,0%). Bei der Auswertung der Gruppen zeigten Patienten mit gemeinsamen Auftreten einer *H.pylori*-Infektion und einer GERD [*H.pylori*(+)/GERD(+)] den größten Anteil an intestinaler Metaplasie (24,6%).

Ein statistisch signifikanter Einfluss im Einzelnen von *H.pylori* und GERD auf die Entstehung von IM lässt sich nur an der Kardia zeigen, wo bei Patienten, bei denen sowohl die Infektion als auch die Refluxerkrankung vorlag der Anteil mit IM erhöht war ($p=0,003$), verglichen mit den Gewebeproben der Referenzgruppe *H.pylori*(-)/GERD(-).

Tabelle 6: Verteilung von intestinaler Metaplasie im Studienkollektiv A

Absolute und relative Anteile an Proben, die in den jeweiligen Gruppen und an den jeweiligen Lokalisationen Vorkommen von intestinaler Metaplasie (IM) zeigten. (*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zur Referenzgruppe an ($p<0,05$).

	Antrum		Korpus		Kardia		Gesamt	
	Anteil mit IM (abs.)	Anteil mit IM (rel.)	Anteil mit IM (abs.)	Anteil mit IM (rel.)	Anteil mit IM (abs.)	Anteil mit IM (rel.)	Anteil mit IM (abs.)	Anteil mit IM (rel.)
<i>H.pylori</i> (-) GERD(-)	1/22	4,5%	0/22	0%	2/22	9,1%	3/66	4,5%
<i>H.pylori</i> (+) GERD(-)	2/11	18,2%	0/11	0%	3/11	27,3%	5/33	15,2%
<i>H.pylori</i> (-) GERD(+)	2/17	11,8%	0/17	0%	3/17	17,6%	5/51	9,8%
<i>H.pylori</i> (+) GERD(+)	4/19	21,1%	0/19	0%	10/19	52,6%*	14/57	24,6%
Barrett	2/27	7,4%	1/27	3,7%	8/27	29,6%	11/81	13,6%

3.1.6 Zusammenhang zwischen der Genexpression von Cdx1 und Cdx2 und dem histologischen Befund

Mögliche Zusammenhänge zwischen den histologischen Befunden und der Genexpression von Cdx1 und Cdx2 wurden mittels Spearmans Rang-Korrelationstest untersucht.

3.1.6.1 Assoziation der Cdx1- und Cdx2-Genexpression mit dem Grad der Entzündung

Für keine der untersuchten Lokalisationen und Patientengruppen ergab sich eine Assoziation der Cdx1-Transkriptmengen mit dem Ausmaß des Entzündungsgeschehens.

Der Transkriptgehalt der Biopsien an Cdx2 korrelierte bei Patienten mit *H.pylori*-Infektion mit dem Grad der Entzündung. So ergab sich sowohl im Antrum als auch an der Kardie eine positive Assoziation mit der Entzündungsaktivität bei der Gruppe *H.pylori*(+)/GERD(+) ($p=0,02$; $r=0,363$; bzw. $p=0,046$; $r=0,340$; **Abb. 13**). Eine Korrelation der Chronizität der Entzündung mit der Cdx2-Expression konnte nur im Antrum nachgewiesen werden, hier allerdings bei beiden *H.pylori*-positiven Gruppen: *H.pylori*(+)/GERD(-) beziehungsweise *H.pylori*(+)/GERD(+) ($p=0,029$; $r=0,381$; bzw. $p=0,003$; $r=0,448$; **Abb. 14**).

In den Korpusproben der Gruppe *H.pylori*(+)/GERD(-) ergab sich ein inverses Verhältnis der Cdx2-Expression sowohl mit der Aktivität als auch mit der Chronizität der vorliegenden Entzündung ($p=0,046$; $r=-0,349$; bzw. $p=0,026$; $r=-0,388$; Daten nicht dargestellt).

Für Patienten allein mit GERD [*H.pylori*(-)/GERD(+)] konnte an keiner der Lokalisationen eine Korrelation des Transkriptgehaltes an Cdx1 oder Cdx2 mit dem Grad der Entzündung nachgewiesen werden.

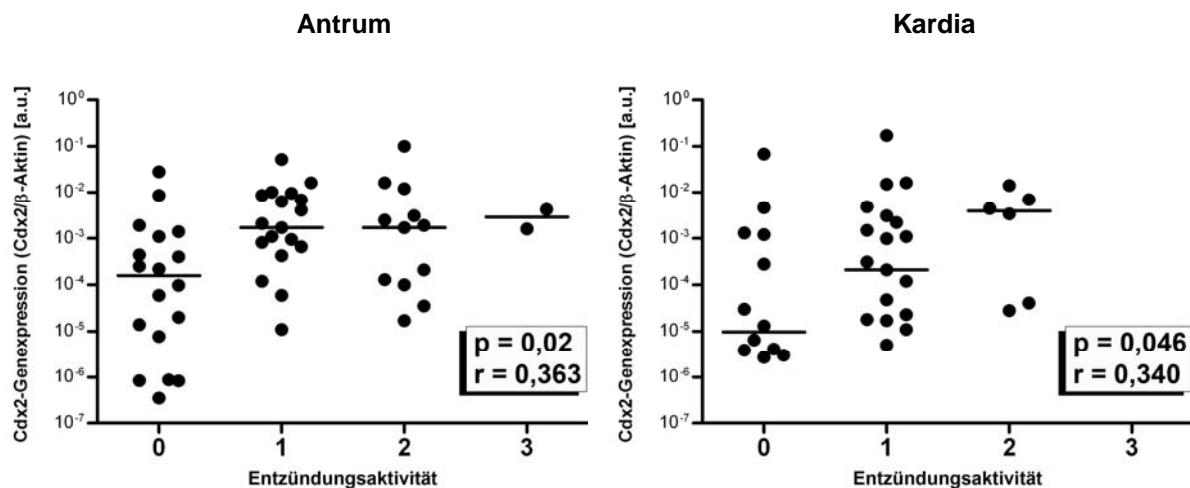


Abbildung 13: Korrelation der Cdx2-Expression mit der Entzündungsaktivität

Im Antrum (links) und an der Kardie (rechts) der Gruppe *H.pylori*(+)/GERD(+) korreliert die Cdx2-Expression (a.u.) positiv mit dem Grad der Entzündungsaktivität. Die Punkte zeigen die einzelnen Expressionwerte an, die Balken den Median je Aktivitätsgrad der Entzündung. In die Korrelationsanalysen wurden jeweils die Werte der Referenzgruppe *H.pylori*(-)/GERD(-) einbezogen. p- und r-Werte wurden mittels Spearmans Rang-Korrelationstest berechnet, Signifikanz galt bei $p<0,05$.

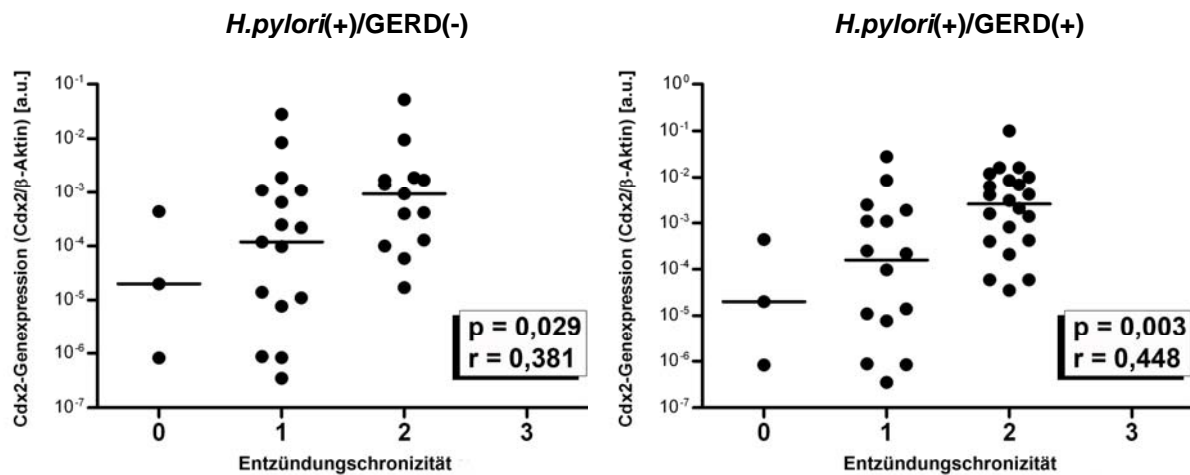


Abbildung 14: Korrelation der Cdx2-Expression mit der Entzündungsschönizität

Im Antrum der Gruppen *H.pylori*(+)/GERD(-) (links) und *H.pylori*(+)/GERD(+) (rechts) korreliert die Cdx2-Expression (a.u.) positiv mit dem Grad der Entzündungsschönizität. Die Punkte zeigen die einzelnen Expressionswerte an, die Balken den Median je Schönizitätsgrad der Entzündung. In die Korrelationsanalysen wurden jeweils die Werte der Referenzgruppe *H.pylori*(-)/GERD(-) einbezogen. p- und r-Werte wurden mittels Spearman's Rang-Korrelationstest berechnet, Signifikanz galt ab $p < 0,05$.

3.1.6.2 Assoziation der Cdx1- und Cdx2-Genexpression mit dem Grad der intestinalen Metaplasie

Bei der Korrelationsanalyse der Cdx-Expression bezüglich des Auftretens einer IM wurde die Barrett-Gruppe nicht in die Analyse mit einbezogen. Die verbleibenden vier Gruppen wurden zunächst zusammengefasst beurteilt. Eine erhöhte Cdx1-Expression bei IM-positiven Proben zeigte sich im Antrum (131,6-fach; $p = 0,013$) und der Kardia (20,8-fach; $p < 0,001$), eine erhöhte Cdx2-Expression nur an der Kardia (53,6-fach; $p = 0,001$).

Bei der Korrelationsanalyse des Cdx-Transkriptgehaltes mit dem Grad der IM, wurden aufgrund der geringen Fallzahlen für Proben mit intestinaler Metaplasie in allen Gruppen (mit Ausnahme der Barrett-Gruppe) und die Lokalisationen Antrum, Korpus und Kardia zusammengefasst. Sowohl für Cdx1 ($p < 0,001$; $r = 0,333$) als auch für Cdx2 ($p = 0,002$; $r = 0,218$) konnte ein Zusammenhang der Expression mit dem Grad der IM nachgewiesen werden (**Abb. 15**).

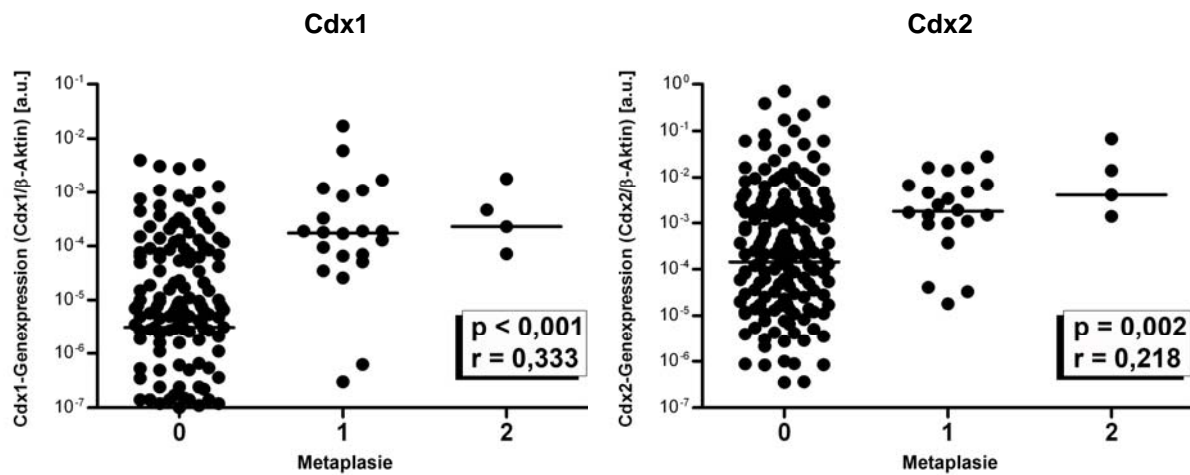


Abbildung 15: Korrelation der Cdx-Expression mit dem Grad der intestinalen Metaplasie

Dargestellt ist die Cdx-Expression (a.u.) nach Grad der intestinalen Metaplasie für das gesamte Kollektiv (mit Ausnahme der Barrett-Gruppe) und alle Lokalisationen. Die Punkte zeigen die einzelnen Expressionswerte an, die Balken den Median je Metaplasiegrad. p- und r-Werte wurden mittels Spearmans Rang-Korrelationstest berechnet. Signifikanz galt ab $p < 0,05$.

Bei den analogen Analysen für die einzelnen Lokalisationen konnte dieser Zusammenhang für Cdx1 im Antrum ($p=0,015$; $r=0,290$) und an der Kardia ($p=0,000$; $r=0,493$) sowie für Cdx2 an der Kardia ($p < 0,001$; $r=0,421$) bestätigt werden. Im Korpus und für Cdx2 im Antrum waren entsprechende Analysen aufgrund der geringen Fallzahl für IM nicht möglich beziehungsweise erreichten nicht das Signifikanzniveau.

Eine Korrelationsanalyse der einzelnen Gruppen an den jeweiligen Lokalisationen war aufgrund der geringen Fallzahlen für IM nur für Proben aus der Kardia von Patienten der Gruppen *H.pylori*(+)/GERD(+) und Barrett sinnvoll. Für die Genexpression von Cdx2 konnte bei beiden Gruppen eine positive Korrelation mit dem Grad der IM bestätigt werden, für die Cdx1-Expression war dies nur bei der Gruppe *H.pylori*(+)/GERD(+) der Fall (**Tab. 7**).

Tabelle 7: Korrelation der Cdx-Expression mit dem Grad der IM an der Kardia

Statistische Ergebnisse der Analyse der Korrelation der Expression von Cdx1 und Cdx2 mit dem Grad der intestinalen Metaplasie an der Kardia. Die Berechnungen wurden mittels Spearmans Rang-Korrelationstest durchgeführt. Angegeben sind Signifikanzniveau (p) und Korrelationskoeffizient (r). Signifikanz galt ab $p < 0,05$.

	Cdx1		Cdx2	
	p	R	p	R
<i>H.pylori</i> (+)/GERD(+)	0,001	0,509	<0,001	0,538
Barrett	n.s.	n.s.	0,005	0,395

3.1.7 Vergleich von ERD mit NERD

Weiterhin wurden alle Patienten mit erosiver Refluxerkrankung (ERD) mit denjenigen mit der nicht-erosiven Form (NERD) verglichen hinsichtlich Cdx-Expression, Aktivität und Chronizität der Entzündung, IM und Dichte der *H.pylori*-Besiedelung.

Hierbei fiel auf, dass bei Patienten mit ERD sowohl im Antrum ($p=0,028$) als auch im Korpus ($p=0,045$) und der Kardia ($p=0,015$) eine signifikant höhere *H.pylori*-Dichte vorlag als bei Patienten mit NERD. Ansonsten zeigten sich keine weiteren signifikanten Unterschiede (**Tab. 8**).

Tabelle 8: *H.pylori*-Dichte bei Refluxerkrankung

Vergleich der gemäß der nach Sydney-Klassifikation bewerteten *H.pylori*-Dichte bei Patienten mit ERD ($n=17$; davon 12 *H.pylori*-positiv) oder NERD ($n=19$; davon 7 *H.pylori*-positiv) an den einzelnen Lokalisationen. Bei Patienten mit NERD ist diese im Vergleich zu Patienten mit ERD signifikant niedriger (*). Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

	ERD	NERD
Antrum	1,29 \pm 0,985	0,58 \pm 0,838*
Korpus	1,06 \pm 0,899	0,53 \pm 0,841*
Kardia	0,94 \pm 0,748	0,37 \pm 0,684*
Gesamt	1,10 \pm 0,878	0,49 \pm 0,782*

3.2 Studienkollektiv B

3.2.1 Entzündung

Zur Durchführung immunhistochemischer Färbungen wurde retrospektiv das Studienkollektiv B zusammengestellt. Als Referenzgruppe galten Patienten, bei denen weder eine *H.pylori*-Infektion noch eine GERD vorlag. Zusätzlich wurden Patienten, bei denen entweder eine *H.pylori*-Infektion oder eine GERD vorlag, unabhängig vom jeweilig anderen Faktor in Gruppen stratifiziert. Überschneidungen waren möglich. Zusätzlich gab es eine Gruppe von fünf Patienten mit einem Barrett-Ösophagus, von denen wiederum drei *H.pylori*-positiv waren.

Analog dem Vorgehen bei Kollektiv A wurden die Gewebeproben des Kollektivs B zunächst histopathologisch gemäß der Sydney-Klassifikation bezüglich einer eventuell vorhandenen Entzündung charakterisiert (**Tab. 9**).[88] Insgesamt zeigte sich bei allen drei Gruppen (*H.pylori*(+), GERD(+)) und Barrett) sowohl eine erhöhte Aktivität als auch Chronizität einer vorliegenden Entzündung im Vergleich zur Referenzgruppe.

Für *H.pylori*-positive Patienten galt dies für beide Parameter an allen Lokalisationen, während bei Patienten mit GERD im Vergleich zur Referenzgruppe im Einzelnen nur eine statistisch signifikant erhöhte Entzündungschronizität in Proben aus dem Korpus und der Kardia gezeigt werden konnte.

Patienten mit Barrett-Ösophagus zeigten generell erhöhte Entzündungswerte verglichen mit der Referenzgruppe. Ausnahme war Chronizität der Entzündung im Korpus. Hier wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht.

Tabelle 9: Aktivität und Chronizität der Entzündung im Studienkollektiv B

Die Bewertung der Entzündungsaktivität und -chronizität wurde nach der Sydney-Klassifikation vorgenommen. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Referenzgruppe [*H.pylori*(-)/GERD(-)] sind markiert (*). Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung. Der Stichprobenvergleich wurde mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, als statistisch signifikant galt $p < 0,05$.

	Antrum		Korpus		Kardia		Gesamt	
	Aktivität	Chronizität	Aktivität	Chronizität	Aktivität	Chronizität	Aktivität	Chronizität
Referenzgruppe	0,1 \pm 0,316	0,9 \pm 0,568	0,1 \pm 0,316	0,5 \pm 0,707	0,22 \pm 0,441	0,78 \pm 0,441	0,14 \pm 0,351	0,72 \pm 0,591
<i>H.pylori</i>(+)	1,43 \pm 0,504*	1,79 \pm 0,630*	1,14 \pm 0,448*	1,5 \pm 0,577*	1,07 \pm 0,550*	1,52 \pm 0,58*	1,22 \pm 0,519*	1,60 \pm 0,604*
GERD(+)	0,44 \pm 0,712	1,08 \pm 0,572	0,38 \pm 0,697	1,04 \pm 0,662*	0,42 \pm 0,578	1,42 \pm 0,504*	0,42 \pm 0,656*	1,18 \pm 0,601*
Barrett	1,0 \pm 0,707*	1,6 \pm 0,548*	1,0 \pm 0,707*	1,2 \pm 0,837	0,8 \pm 0,447*	1,6 \pm 0,548*	0,93 \pm 0,594*	1,47 \pm 0,640*

3.2.2 Intestinale Metaplasie

Tabelle 10 demonstriert die Anteile der Patienten des Kollektivs B, bei denen eine intestinale Metaplasie gefunden wurde. Antrum und Kardia zeigten eine vergleichbare Häufigkeit bezüglich des Auftretens der intestinalen Metaplasie, wenn auch mit unterschiedlichen Anteilen in den einzelnen Gruppen. Im Korpus wurde abgesehen von einer Probe aus der Gruppe GERD(+) keine intestinale Metaplasie gefunden

Tabelle 10: Verteilung von intestinaler Metaplasie in den Magenbiopsien des Studienkollektivs B

Absolute Anzahl und relative Anteile von Proben, bei denen in den jeweiligen Gruppen und an den jeweiligen Lokalisationen intestinale Metaplasie nachgewiesen wurde. Die Lokalisationen bei den einzelnen Gruppen waren zum Teil nicht vollständig.

	Antrum		Korpus		Kardia		Gesamt	
	Anteil mit IM (abs.)	Anteil mit IM (rel.)	Anteil mit IM (abs.)	Anteil mit IM (rel.)	Anteil mit IM (abs.)	Anteil mit IM (rel.)	Anteil mit IM (abs.)	Anteil mit IM (rel.)
Referenzgruppe	3/10	30%	0/10	0%	1/9	11,1%	4/29	13,8%
<i>H.pylori</i>(+)	4/27	14,8%	0/28	0%	2/27	7,4%	6/82	7,3%
GERD(+)	2/25	8%	1/26	3,8%	2/26	7,7%	5/77	6,5%
Barrett	0/5	0%	0/5	0%	3/5	60%	3/15	20%

3.2.3 Immunhistochemischer Nachweis von CDX2

Die Gewebeprobe des Kollektivs B wurden mittels immunhistochemischer Färbemethoden auf das Vorhandensein des CDX2-Proteins analysiert. Eine positive Färbereaktion wurde sowohl in Schleimhautarealen mit intestinaler Metaplasie beobachtet, als auch in solchen, die lediglich entzündliche Veränderungen ohne Metaplasie zeigten. Darüber hinaus gab es Biopsien, die eine positive Reaktion sowohl in metaplastischen als auch in nicht-metaplastischen Bereichen zeigten. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in **Tabelle 11** dargestellt.

Tabelle 11: Anteile mit positiver Färbereaktion für CDX2 im Studienkollektiv B

Wiedergegeben sind die relativen Anteile von Proben mit positiver immunhistochemischer Färbereaktion für CDX2 in den einzelnen Gruppen. Diese trat entweder in Bereichen entzündlich veränderter Mukosa, in Bereichen mit intestinaler Metaplasie (IM) oder sowohl in entzündeter Mukosa als auch in intestinaler Metaplasie auf. Die Verteilung der immunhistochemisch nachgewiesenen epithelialen Cdx2-Expression ist wie folgt angegeben: positive Färbung von Bereichen mit Entzündung/IM/Entzündung und IM.

	Antrum		Korpus		Kardia		Gesamt	
	CDX2-positiv	Verteilung	CDX2-positiv	Verteilung	CDX2-positiv	Verteilung	CDX2-positiv	Verteilung
Referenzgruppe	20%	1/1/0	0%	0/0/0	33,3%	2/0/1	17,2%	3/1/1
<i>H.pylori</i>(+)	37%	5/2/3	3,6%	1/0/0	22,2%	5/1/0	22%	11/3/3
GERD(+)	16%	2/1/1	3,8%	0/1/0	11,5%	3/0/0	10,4%	5/2/1
Barrett	40%	1/0/1	0%	0/0/0	40%	1/1/0	26,7%	2/1/1

Diskussion

4.1 Allgemeine Bemerkungen

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen eines übergeordneten Forschungsprojektes des NBL3-Programmes erstellt. Die zentrale Frage dieses Projektes bestand in der Analyse der Entzündungsmuster am ÖGÜ, insbesondere in der Kardiaschleimhaut, welche durch eine *H.pylori*-Infektion beziehungsweise einen abnormen gastroösophagealen Reflux verursacht werden. Für das bessere Verständnis der Ergebnisse soll noch einmal auf zwei grundsätzliche Punkte im Studienaufbau hingewiesen werden.

Um die Entzündungsvorgänge an der Kardialmucosa zu charakterisieren, wurden Patienten mit einer Refluxerkrankung und manifestiertem Barrett-Ösophagus als eigenständige Gruppe betrachtet und als solche analysiert. So beinhalten Gruppen, die mit GERD(+) gekennzeichnet sind, sowohl Patienten mit NERD als auch solche mit ERD, jedoch keine Patienten mit Barrett-Ösophagus, welcher nicht als gleichwertige Manifestation der Refluxerkrankung ausgewertet wurde.

Des Weiteren möchte ich daran erinnern, dass für die immunhistochemischen Färbungen (IHC) Biopsien anderer Patienten (Studienkollektiv B) verwendet wurden als für die übrigen Analysen (Studienkollektiv A). Grund hierfür war, dass die Proben des Studienkollektivs A im Rahmen des NBL3-Projektes und anderer Studien verwendet wurden und somit nicht mehr ausreichend Material für immunhistochemische Färbungen zur Verfügung stand. Das Kollektiv B wurde retrospektiv aus Gewebeproben aus dem Archiv des Institutes für Pathologie zusammengestellt.

Die Ergebnisse der IHC-Färbungen des Kollektivs B sind als exemplarische Ergänzung zur Validierung der Resultate der RT-PCR-Analysen des Kollektivs A zu werten. Es wurde daher auf eine detaillierte Stratifizierung der Untergruppen verzichtet und diese Proben nur nach *H.pylori*- beziehungsweise GERD-Status eingeteilt. Darüber hinaus erfolgte auch keine statistische Auswertung der Ergebnisse. Ferner ist anzumerken, dass aufgrund der retrospektiven Zusammenstellung des Kollektivs B bei einzelnen Patienten nicht alle Lokalisationen komplett vorhanden waren.

In der folgenden Diskussion beziehe ich mich auf die Ergebnisse der Analysen des Studienkollektivs A. Werden Resultate aus den Experimenten des Studienkollektivs B einbezogen, so wird dies explizit erwähnt.

4.2 Histologische Befunde

Zunächst soll auf die Auffälligkeiten bezüglich der histologischen Charakterisierung der Schleimhautproben eingegangen werden.

4.2.1 Entzündung

Die an allen Lokalisationen erwartungsgemäß hohen Werte für Aktivität und Chronizität der Entzündung bei Patienten mit *H.pylori*-Infektion stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Uemura, der bei allen *H.pylori*-positiven Patienten seines Studienkollektivs eine Entzündung der gastralen Mukosa nachweisen konnte, bei 27% sogar eine Pangastritis.[39] Auch andere Autoren berichteten über hohe Inzidenzen sowohl distaler als auch proximaler Gastritiden bei *H.pylori*-positiven Patienten.[91, 92]

In der vorliegenden Studie ist die Entzündung im Bereich des Antrums bezüglich der Aktivität und Chronizität mit den Werten an der Kardie vergleichbar, wohingegen die Entzündungsaktivität im Korpus dieser Patienten deutlich schwächer ausgeprägt war. Auch wenn vereinzelt von einer stärkeren Entzündung im Antrum im Vergleich zur Kardie berichtet wurde, [93] so werden inflammatorische Prozesse in beiden Lokalisationen bisher als vergleichbar angesehen und setzen sich in ihrem Charakter deutlich von Entzündungen des Korpus ab.[41, 92]

Im Unterschied zu Patienten mit einer *H.pylori*-Infektion zeigten Patienten mit GERD ohne *Helicobacter*-Beteiligung an keiner der untersuchten Lokalisationen des Magens eine Veränderung des Entzündungsgeschehens im Vergleich zur Referenzgruppe. Insbesondere an der Kardie wird der Einfluss eines abnormen Refluxes in der Literatur unterschiedlich bewertet. Goldblum fand hinsichtlich entzündlicher Prozesse an der Kardie keinen Unterschied zwischen Patienten mit und solchen ohne GERD.[94] Öberg dagegen stellte einen Zusammenhang zwischen Karditis und refluxbedingten Erscheinungen wie höherer Säurebelastung des Ösophagus, erosiver Ösophagitis, Störungen des unteren Ösophagussphinkters und dem Vorliegen einer Hiatushernie her.[42] Daraus und aus der Tatsache, dass er typische Kardiamukosa nur bei 73,7% seiner Patienten nachweisen konnte, zog er den Schluss, die Mukosa vom Kardiatyp sei ein refluxbedingtes, metaplastisches Epithel. Einen Zusammenhang zwischen Karditis und einer *H.pylori*-Infektion konnte er nicht belegen.[42]

Andere Studien, die ebenfalls das inflammatorische Potential einer *H.pylori*-Infektion und einer GERD an der Kardia evaluierten, konnten eine deutliche Assoziation der Entzündung zu *H.pylori* zeigen und stellten dagegen den Zusammenhang mit der Refluxerkrankung in Frage.[95, 96] Ein Faktor, der die Ergebnisse derartiger Studien beeinflusst, ist die Anzahl der entnommenen Biopsien, da bei höherer Anzahl der entnommenen Proben auch der Anteil an Patienten mit Karditis und positivem *H.pylori*-Nachweis in der Histologie anstieg.[96]

Oksanen differenzierte bei Patienten mit Karditis solche, bei denen keinerlei Anzeichen für weitere inflammatorische Foci in der Magenmukosa vorhanden waren, von solchen, bei denen zusätzlich eine distale Gastritis vorlag. Erstere waren in der Regel mit einer GERD assoziiert, letztere waren *H.pylori*-infizierte Patienten.[97]

Die Theorie, dass am ÖGÜ eine GERD eher entzündliche Veränderungen in der Mukosa des distalen Ösophagus bedingt und eine *H.pylori*-Infektion in der Schleimhaut des proximalen Magens, also an der Kardia, wird durch unsere Ergebnisse gestützt. Nur Patienten mit *H.pylori*-Infektion nicht jedoch solche mit GERD alleine zeigten eine Entzündung in diesem Bereich. Im Widerspruch zu dieser Theorie sind jedoch relativ hohe Anteile entzündlich veränderter Schleimhautproben aus der Kardia von Patienten mit GERD in den Studien von Öberg und Der. Beide Autoren zogen den Schluss, dass, falls Kardiamukosa vorhanden sei, diese im Regelfall auch immer eine deutliche Entzündung zeige.[42, 91]

Zu bemerken ist, dass auch im Studienkollektiv B Patienten der Gruppe *H.pylori*(+) im Vergleich zur Referenzgruppe die höchsten Entzündungswerte zeigten. Dies galt sowohl für die Aktivität als auch für die Chronizität der Entzündung an den einzelnen Lokalisationen. Der Unterschied zu den anderen Gruppe [GERD(+), Barrett] zeichnete sich allerdings nicht so deutlich ab, wie dies bei Kollektiv A der Fall war. Bei diesen Gruppen lag, wenn auch geringer ausgeprägt als bei der Gruppe *H.pylori*(+), ebenfalls ein deutliches Entzündungsgeschehen vor. Dieser Unterschied im Vergleich zum Kollektiv A liegt höchstwahrscheinlich daran, dass in die Gruppen mit Refluxerkrankung auch *H.pylori*-positive Patienten mit einbezogen worden waren.

4.2.2 Intestinale Metaplasie

Der Zusammenhang einer *H.pylori*-Infektion mit dem Vorkommen von intestinaler Metaplasie in der gastralen Mukosa und insbesondere im Antrum wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen belegt.[39, 40, 93] Auch in dem in der vorliegenden Studie untersuchten

Patientenkollektiv zeigte sich eine vergleichsweise hohe Frequenz von Proben mit positivem Nachweis einer intestinalen Metaplasie bei den Gruppen mit *H.pylori*-Infektion. Insbesondere galt dies für Proben aus der Kardialmucosa, ein Sachverhalt, der auch von anderen Autoren beschrieben wurde.[44, 45, 94-96] Einige Arbeitsgruppen weisen in diesem Zusammenhang explizit auf eine fehlende Assoziation zwischen GERD und der intestinalen Metaplasie an der Kardialmucosa hin.[44, 45, 94] Beispielsweise lehnt Öberg einen Zusammenhang zwischen der *H.pylori*-Infektion mit intestinaler Metaplasie in der Kardialmucosa ab.[42]

Andere Autoren postulieren dagegen einen gemeinsamen ätiologischen Einfluss der *H.pylori*-Infektion und der Refluxerkrankung bei der Entstehung der Metaplasie, weisen jedoch darauf hin, dass es sich um unterschiedliche Entitäten von intestinaler Metaplasie handele: *H.pylori* sei eher mit dem kompletten Typ der intestinalen Metaplasie assoziiert, während sich bei GERD häufiger eine inkomplette intestinale Metaplasie nachweisen lasse, welche auch bei einem Barrett-Ösophagus vorliegt.[47, 48, 95] In der Regel wird GERD mit metaplastischem Barrett-Epithel des distalen Ösophagus in Verbindung gebracht. Es gibt nur vereinzelte Studien, die sich mit dem Vorkommen von intestinaler Metaplasie im proximalen Magen dieser Patienten beschäftigten.[98, 99] Im Abschnitt 1.1 und 1.5 wurde bereits darauf hingewiesen, wie schwierig es aufgrund unterschiedlicher Definitionen der anatomischen Strukturen im Bereich des ÖGÜ ist, die Vergleichbarkeit einzelner Studien sicherzustellen.

Unerwartet war der Nachweis der erhöhten Prävalenz von intestinaler Metaplasie im Antrum von Patienten mit Refluxerkrankung im Vergleich zur Referenzgruppe. Darauf wird in den folgenden Abschnitten noch detaillierter eingegangen.

Generell kann darauf hingewiesen werden, dass die Tendenz zu metaplastischen Läsionen in der Magenschleimhaut von Patienten mit ausschließlich GERD geringer ausgeprägt war, als bei denen mit einer *H.pylori*-Infektion.

Die Tatsache, dass sich im Vergleich der Prävalenz der intestinalen Metaplasie an den einzelnen Lokalisationen allein für Proben aus der Kardialmucosa von Patienten der Gruppe *H.pylori*(+)/GERD(+) im Vergleich mit der Referenzgruppe ein signifikanter Unterschied zeigte, legt eine Interaktion beider Faktoren, das heißt der Infektion und des abnormen Refluxes, im Sinne eines additiven Effektes nahe. Hackelsberger berichtete bereits, dass eine *H.pylori*-bedingte intestinale Metaplasie an der Kardialmucosa deutlich häufiger auftritt bei Patienten, die zudem an einer ERD leiden.[93]

Patienten mit Barrett-Ösophagus zeigten ebenfalls eine höhere Rate von Proben mit intestinaler Metaplasie im Vergleich zur Referenzgruppe. Da diese jedoch ausschließlich für Proben aus der Kardialmucosa und nicht für die aus dem Antrum oder Korpus der jeweiligen

Patienten gilt, vermuten wir einen direkten Einfluss durch das angrenzende metaplastische Barrett-Epithel. Zudem muss auch die schwierige Lokalisation der korrekten Probenentnahme im Bereich des ÖGÜ in Betracht gezogen werden.

Im Studienkollektiv B zeigte sich ebenso wie bei der Beurteilung des Entzündungsgeschehens eine ähnliche Verteilung wie im Kollektiv A. So fanden sich beispielsweise hohe Anteile von intestinaler Metaplasie in der Antrum- und Kardiaschleimhaut, jedoch nicht im Korpus dieser Patienten. Auffallend sind die relativ hohen Anteile von Proben, in denen intestinale Metaplasie nachgewiesen werden konnte in der Referenzgruppe, bei der weder eine *H.pylori*-Infektion noch eine Refluxerkrankung vorlag.

4.2.3 Dichte der *Helicobacter pylori*-Besiedelung bei GERD

Die in unserem Kollektiv nachgewiesene erhöhte Dichte der *H.pylori*-Besiedelung bei Patienten mit ERD im Vergleich zu solchen mit NERD wurde nach meinem Wissensstand bislang noch nicht explizit beschrieben.

Kritisch ist allerdings zu bemerken, dass sich die Gruppen mit Refluxerkrankung aus unterschiedlichen Anteilen von Patienten mit jeweils NERD und ERD zusammensetzten: *H.pylori*(-)/GERD(+): NERD=12, ERD=5; *H.pylori*(+)/GERD(+): NERD=7, ERD=12. Dementsprechend lagen auch jeweils bei Patienten mit NERD und ERD unterschiedliche Anteile *H.pylori*-positiver Patienten vor. Um den nachgewiesenen Zusammenhang detaillierter zu untersuchen und die Ergebnisse zu validieren, wäre eine prospektive Studie erforderlich, deren Design speziell auf die Beantwortung dieser Frage zugeschnitten ist.

4.3 Expression von Cdx1 und Cdx2

Bei der Analyse der Genexpression von Cdx1 und Cdx2 fiel auf, dass beide Transkriptionsfaktoren deutlich häufiger exprimiert wurden als ursprünglich erwartet. So zeigte die RT-PCR bei 89,6% aller Proben ein positives Resultat für Cdx2. Dabei variierte der Anteil an den einzelnen Gruppen und an den einzelnen Lokalisationen von 72,7 % bis 96,3%. Der Anteil der Proben in denen Cdx1-mRNA nachgewiesen wurde lag mit 70,5% erwartungsgemäß unter dem Wert von Cdx2, allerdings zeigte sich eine breitere Streuung (25,9% bis 95,5%) der Ergebnisse in den einzelnen Gruppen und Lokalisationen.

Auffallend war der hohe Anteil an Proben mit positiver Cdx-Expression in der Referenzgruppe *H.pylori*(-)/GERD(-) (Cdx1: 90,9 - 95,5%; Cdx2: 86,4 – 95,5%). Dies war die Gruppe mit den größten Anteilen von Cdx1-positiven Biopsien, für Cdx2 zeigte nur die Barrett-Gruppe einen häufigeren Nachweis von Cdx2. Diese Ergebnisse stehen scheinbar im Widerspruch zur Literatur.

In den meisten Studien, die sich mit der Expression von Cdx1 oder Cdx2 in der Magenschleimhaut befassten, wurde beschrieben, dass eine normale, unveränderte Magenschleimhaut frei von Cdx1- und Cdx2-Transkript sei.[65, 70, 72, 74, 100, 101] Auch wenn Proben angrenzend zu eventuell vorhanden Foci von intestinaler Metaplasie entnommen wurden, konnte in der Regel keine Cdx1- oder Cdx2-Expression nachgewiesen werden.[66, 73, 75] Diese Diskrepanz zu unseren Daten lässt sich durch verschiedene Ansätze erklären.

Zum einen gab es in unserer Studie kein gesundes Kontrollkollektiv, wie dies in anderen Arbeiten der Fall gewesen ist.[100, 102, 103] Zwar konnte bei den Patienten unserer Referenzgruppe *H.pylori*(-)/GERD(-) keine *H.pylori*-Infektion und keine GERD nachgewiesen werden, aber da alle Patienten aufgrund dyspeptischer Beschwerden eine Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) erhielten, können sie nicht als „gesunde“ Kontrollen angesehen werden.

Zum anderen wurde in den meisten Studien, die eine Expression von Cdx1 und Cdx2 in der normalen gastralen Mukosa ausschlossen, ausschließlich immunhistochemische Färbungen (IHC) als Nachweismethode angewandt, so dass der Nachweis hier ausschließlich auf Proteinebene erfolgte. Sensitivere Verfahren wie die RT-PCR oder Northern Blotting, mit denen der Nachweis des Cdx-Transkriptes möglich wäre, kamen nicht zum Einsatz.[66, 72-75, 100, 101]

Vallböhmer *et al.* untersuchten bei 107 Patienten mit Symptomen einer GERD die Genexpression von Cdx2 am ÖGÜ auf der mRNA-Ebene systematisch mittels RT-PCR. Ösophageales Plattenepithel galt als negative, duodenale Mukosa als positive Kontrolle. In allen Schleimhaut-Typen konnte anteilig eine Cdx2-Expression nachgewiesen werden (Plattenepithel < Kardiales/Oxyntokardiales Epithel < intestinale Metaplasie < Barrett-Ösophagus < Duodenale Mukosa).[104] Auch Tsukamoto *et al.* konnten bei Patienten mit Magenkarzinom mittels RT-PCR die Expression von sowohl Cdx1 als auch Cdx2 in noch unveränderten Schleimhautabschnitten nachweisen.[105] Kerkhof *et al.* konnten bei ihren Untersuchungen bei 34% ihrer Biopsien aus dem Bereich der Kardia Cdx2 immunhistochemisch zeigen und postulierten, dass dieser Nachweis auf das Vorliegen von

fokaler intestinaler Metaplasie in Abschnitten des Magens hindeute, die bei der Biopsieentnahme nicht erfasst worden waren.[106]

Diese Schlussfolgerung wird auch partiell durch die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen bezüglich Cdx2 am Studienkollektiv B gestützt. So zeigten nicht nur Schleimhautareale mit einer intestinalen Metaplasie eine deutlich positive Färbereaktion, sondern CDX2 konnte immunhistochemisch auch in Bereichen, die noch nicht metaplastisch aber entzündlich verändert waren, nachgewiesen werden. Dies galt sowohl für Patienten, in deren Gewebeproben eine intestinale Metaplasie dokumentiert wurde, als auch für solche, bei denen keine intestinale Metaplasie nachgewiesen werden konnte.

Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass es bereits vor dem Auftreten von intestinaler Metaplasie zur Induktion der Genexpression von Cdx2 kommt und diese einen initialen Schritt in der Transdifferenzierung des gastralen Epithels darstellt. Weiterhin fiel auf, dass der Anteil CDX2-positiver Proben ohne gleichzeitigen Nachweis einer intestinalen Metaplasie bei *H.pylori*-positiven Patienten höher war als bei den anderen Gruppen. Diese Beobachtung konnte aufgrund der Fallzahlen jedoch nicht statistisch validiert werden.

Ein weiterer Grund für die hohen Anteile Cdx-positiver Proben in unserem Kollektiv kann an den technischen Spezifikationen des RT-PCR Protokolls liegen. So wurden bei uns Bindungstemperaturen für die Primer von 60°C angewandt sowie 38 PCR-Zyklen durchgeführt statt der sonst üblichen 30 oder 35. Der Nachweis der Transkripte mit Hilfe eines spezifischen, aber sehr sensitiven RT-PCR-Protokolls legt nahe, dass es sich bei den identifizierten Transkriptmengen um relativ geringe Mengen handelt.

4.4 Analyse der Genexpression von Cdx1 und Cdx2

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Expressionsanalyse von Cdx1 und Cdx2 sowie der Einfluss von *H.pylori* und/oder GERD näher diskutiert. Hierbei werden zunächst die einzelnen Lokalisationen gesondert betrachtet.

4.4.1 Antrum

In keiner Gruppe zeigte sich ein Unterschied der Genexpression von Cdx1 im Vergleich zur Referenzgruppe. Allenfalls *H.pylori*-positive Patienten zeigten die Tendenz einer erhöhten

Expression, eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht. Dies ist nicht ungewöhnlich, da Cdx1 sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Prozessen später als Cdx2 exprimiert wird.[63, 70, 102] Die tendenziell erhöhte Cdx1-Expression bei Patienten mit positivem *Helicobacter*-Nachweis stimmt mit den Ergebnissen von Murata-Kamiya *et al.* überein. Sie zeigten, dass es über eine direkte Interaktion von CagA mit E-Cadherin und vor allem β -Catenin zur Transaktivierung von Cdx1 kommt.[107] Um diesen Zusammenhang in unserem Studienkollektiv genauer zu evaluieren, wäre die Auswertung des CagA-Status der *H.pylori*-positiven Patienten erforderlich. Aufgrund der kleinen Fallzahlen, wurde hierauf allerdings verzichtet.

Die erhöhte Cdx2-Expression im Antrum von Patienten mit *H.pylori*-Infektion im Vergleich zur Referenzgruppe wurde erwartet. Das Antrum ist Prädilektionsstelle für eine *H.pylori*-Besiedelung des Magens und die damit verbundene Entzündung.[39, 40, 92, 93, 102] Darüber hinaus zeigten sich im Antrum von *H.pylori*-positiven Patienten deutlich höhere Anteile mit intestinaler Metaplasie als bei den anderen Gruppen.

Überraschend war die hohe Cdx2-Expression im Antrum von Patienten mit GERD im Vergleich zur Referenzgruppe. Zwar zeigte sich auch hier ein erhöhter Anteil von Proben mit intestinaler Metaplasie, jedoch wurde ein Einfluss auf die Cdx-Expression eher am ÖGÜ und der Kardia erwartet, nicht im Antrum. Eine mögliche Erklärung wäre die Existenz eines duodenogastralen Reflux bei unseren Patienten. Untersuchungen an Refluxpatienten haben gezeigt, dass bei 41% von Patienten mit GERD ein duodenogastraler Reflux vorliegt.[28] Bis zu 30% der Patienten mit gastroösophagealem Reflux zeigen darüber hinaus einen duodenogastroösophagealen Reflux bei abnormen duodenogastralem Reflux.[28-30] Gerade am ÖGÜ korreliert der duodenogastroösophageale Reflux mit dem Ausmaß der Schädigung beziehungsweise der metaplastischen Veränderungen der Schleimhaut.[30, 108]

Das karzinogene Potential von Gallensäuren wurde in verschiedenen Tierexperimenten bestätigt. Kazumori und Tatsuta konnten mit ihren Arbeitsgruppen im Rattenmodell am ÖGÜ die Progression einer initialen Entzündung über hyperplastische und metaplastische Läsionen bis hin zu Adenokarzinomen unter dem Einfluss eines duodenogastroösophagealen Refluxes nachweisen.[109, 110] Attwood berichtete in einem Rattenmodell explizit über ein Auftreten von Adenokarzinomen am ÖGÜ ausschließlich unter Applikation von Duodenalsaft mit Gallensäuren, nicht aber bei der alleinigen Exposition mit saurem Magensaft. [27] Derartige Prozesse waren mit einer Induktion der cdx2-Expression verbunden.[109, 110]

Wong *et al.* konnten bei ösophagealen Epithelzelllinien eine Induktion von Cdx1 durch die Applikation von konjugierten Gallensäuren zeigen, was durch die Behandlung mit Salzsäure

alleine nicht gelang.[111] Im Gegensatz dazu hatte Marchetti für *cdx2* gezeigt, dass die gezielte Säureexposition von Keratinozyten der Maus ausreichte, um die Transkription dieses Faktors zu induzieren.[112]

Generell könnte die erhöhte antrale Expression von *Cdx2* in unserem Kollektiv durch einen vermehrten DGR erklärt werden. Da allerdings keine Proben von Magensaft dieser Patienten auf den Gehalt an Duodenalsekret und/oder Gallensäuren untersucht worden waren, müsste dieser Hypothese in Zukunft in prospektiven Studien nachgegangen werden.

4.4.2 Korpus

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse für *Cdx1* und *Cdx2* im Korpus wichen deutlich von denen des Antrums und der Kardia ab. Bei letzteren beiden Lokalisationen konnten wir weitestgehend ähnliche Expressionsmuster bezüglich des *Cdx1*- und des *Cdx2*-Gens nachweisen.

Die Genexpression von *Cdx2* zeigte im Vergleich der einzelnen Gruppen inkongruente Muster, wobei ausschließlich bei der Gruppe *H.pylori*(+)/GERD(-) eine signifikant niedrigere Expression als bei der Referenzgruppe vorlag. Die *Cdx1*-Expression im Korpus war bei allen Gruppen tendenziell erniedrigt, wobei statistische Signifikanz nur für die Gruppe *H.pylori*(+)/GERD(+) erreicht wurde.

Ein Grund für diese Unterschiede zu den anderen Lokalisationen könnte darin liegen, dass der Magenkorpus sich nicht nur histologisch bezüglich des mukosalen Aufbaus, der vorhandenen Zelltypen und der Drüsenstruktur eindeutig von den Grenzbereichen des Magens (proximal: Kardia, distal: Antrum) unterscheidet, sondern dass dort auch ein anderes Milieu herrscht und dementsprechend andere pathogene Prozesse greifen. Für Antrum und Kardia wurde bereits angedeutet, dass sie ähnliche Eigenschaften bezüglich pathogener Einflüsse und Prozesse bei der *H.pylori*-Infektion und der GERD aufweisen und sich diesbezüglich vom Korpus unterscheiden. [92, 93, 98]

Darüber hinaus ist der Korpus Prädilektionsstelle für das Auftreten atrophischer Prozesse der Mukosa insbesondere im Zusammenhang mit einer *H.pylori*-Infektion, bei denen eine erniedrigte Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren erwartet werden kann. In den von uns untersuchten Biopsien konnte jedoch in beiden Untersuchungskollektiven keine nennenswerte Atrophie nachgewiesen werden, was die relativ geringen histologischen

Veränderungen als auch die im Wesentlichen unveränderte Expression von Cdx1 und Cdx2 erklären könnte.

4.4.3 Kardial

Die Genexpression von Cdx2 an der Kardial war im Wesentlichen mit der im Antrum vergleichbar, wenngleich eine geringere Rate von Proben mit positivem Transkriptnachweis vorlag. Dass an der Kardial im Gegensatz zu den Ergebnissen im distalen Magen eine *H.pylori*-Infektion alleine keinen Einfluss auf die Expression von Cdx2 hatte, kann daran liegen, dass im Antrum, welches als Prädilektionsstelle für eine Besiedelung durch *H.pylori* gilt, die Auswirkungen einer solchen wesentlich deutlicher ausgeprägt sind.[39]

Dass bei Patienten alleine mit GERD keine signifikant erhöhte Cdx2-Expression im Vergleich zur Referenzgruppe nachgewiesen wurde, wird durch die Ergebnisse anderer Studien bestätigt. So zeigten andere Arbeitsgruppen, dass abnormer Reflux vor allem die proximaleren Abschnitte des ÖGÜ beziehungsweise des distalen Ösophagus beeinflusst.[71, 113]

Eine weitere Erklärung wäre jedoch erneut der Einfluss von duodenogastroösophagealem Reflux, der allerdings deutlich schwächer ausgeprägt war, als im Antrum, wo die Mukosa diesem Faktor direkt ausgesetzt wird und noch keine Pufferung des Duodenalsaftes erfolgt ist. Dass eine signifikante Erhöhung der Cdx2-Expression an der Kardial nur nachgewiesen werden konnte, wenn sowohl eine *H.pylori*-Infektion als auch eine GERD vorhanden waren, legt erneut eine Interaktion beider Faktoren im Sinne eines additiven Effekts nahe. Dieses potentielle Zusammenspiel von GERD und *H.pylori*-Infektion wurde auch bereits von anderen Arbeitsgruppen dokumentiert.[93, 96]

Die Genexpression von Cdx1 war bei allen Gruppen unverändert gegenüber der Referenzgruppe. Dies galt trotz hoher Anteile von Proben mit positivem Nachweis einer intestinalen Metaplasie auch für die Gruppe *H.pylori*(+)/GERD(+), wofür keine plausible Erklärung gefunden wurde.

4.5 Genexpression von Cdx1 und Cdx2 bei Patienten mit Barrett-Ösophagus

Es wurde bereits mehrfach nachgewiesen, dass sowohl Cdx2 als auch Cdx1 in der spezialisierten intestinalen Metaplasie eines Barrett-Ösophagus verstärkt exprimiert wird.[66, 70, 71, 100, 104, 111] Im Gegensatz zu anderen Arbeitsgruppen haben wir allerdings nicht die Expression von Cdx1 und Cdx2 im metaplastischen Epithel des Barrett-Ösophagus selbst oder im angrenzenden Plattenepithel untersucht, sondern an der Kardie als dem direkt angrenzenden Abschnitt des Magens, sowie im Antrum und Korpus der jeweiligen Patienten. An dieser Stelle sei nochmals erwähnt, dass die Patienten mit Barrett-Ösophagus nicht hinsichtlich ihres *H.pylori*-Status stratifiziert wurden. Bei insgesamt acht der 27 Patienten (29,6%) zeigte der HUT ein positives Resultat. Vier dieser acht Patienten zeigten in der Histologie eine *H.pylori*-Besiedelung des Antrums (14,8%), drei des Korpus (11,1%), aber keiner der Patienten an der Kardie.

Auch bei Patienten mit Barrett-Ösophagus waren die Expressionsmuster sowohl für Cdx1 als auch für Cdx2 im Antrum und der Kardie vergleichbar. Dies ist ein weiterer Hinweis auf ähnliche Charakteristika der pathogenetischen Prozesse in diesen Bereichen der gastralen Mukosa.

Die erhöhte Expression im Antrum ließe sich durch die Existenz des vermuteten duodenogastralen Refluxes erklären. Dieser kommt bei Patienten mit abnormen gastroösophagealen Reflux, welcher für die Entstehung eines Barrett-Ösophagus verantwortlich ist, recht häufig vor.[16, 17, 28, 29] So wurde beschrieben, dass der Anteil an Patienten mit pathologischem duodenogastroösophagealen Gallereflux proportional zu dem Schweregrad der Schleimhautschädigung bei Refluxpatienten ansteigt.[30, 108] Patienten mit Barrett, insbesondere der komplizierten Form, zeigten eine deutlich höhere Prävalenz eines duodenogastroösophagealen Refluxes als solche mit erosiver Ösophagitis. Noch ausgeprägter war der Unterschied im Vergleich zu Patienten, die eine NERD oder eine nicht-ulzerierende Dyspepsie zeigten.[30, 108]

Im Rattenmodell wurde gezeigt, dass Duodenalsaft im distalen Ösophagus den metaplastischen Umbau der Mukosa in Barrett-Epithel auslösen kann.[109, 110] Die Effekte eines duodenogastroösophagealen Refluxes sollten gerade im Antrum stark ausgeprägt sein, da dies die Region ist, die dem duodenalen Refluxat direkt ausgesetzt ist. Im Einklang mit dieser Theorie befinden sich die Ergebnisse von Voutilainen *et al.*, die zeigten, dass spezialisierte Zylinderepithelmetaplasie am ÖGÜ mit intestinaler Metaplasie im Antrum assoziiert ist.[98]

Die im Vergleich zur Referenzgruppe erhöhte Expression von Cdx2 in der Kardiaschleimhaut von Patienten mit einem Barrett-Ösophagus lässt sich zu einem gewissen Grade durch die gleichen Prozesse wie im Antrum erklären. Darüber hinaus ist die Kardialregion des Magens, die direkt an das metaplastische Epithel des ÖGÜ beziehungsweise des distalen Ösophagus angrenzt, so dass direkte, lokale Einflüsse hier postuliert werden könnten. Derartiges ist allerdings bislang noch umstritten. Obwohl einige Arbeitsgruppen über einen positiven Nachweis von Cdx1 oder Cdx2 in Schleimhautarealen, welche an intestinale oder spezialisierte intestinale Metaplasie angrenzen, berichteten, [100, 113] konnte dies in der Mehrzahl der momentan vorliegenden Studien jedoch nicht bestätigt werden. [70, 73, 75, 114] Moons *et al.* erzielten unterschiedlichen Resultate je nachdem, welche Nachweismethode angewandt wurde und wie sensitiv diese war.[71]

Allerdings erschweren auch in diesem Fall die zum Teil unterschiedlichen Definitionen der Strukturen im Bereich des ÖGÜ die vergleichende Bewertung der vorliegenden Literatur.

Den Resultaten der Auswertung der Cdx2-Expression steht eine im Vergleich zur Referenzgruppe verminderte Cdx1-Expression im Antrum und der Kardialregion von Patienten mit Barrett-Ösophagus gegenüber, die momentan nicht erklärt werden kann. Hierzu wären eine genaue Analyse des molekularen Milieus sowie „Follow-up“ Kontrollen an den gleichen Patienten erforderlich.

4.6 Interaktion von GERD und *H.pylori* im Hinblick auf die Cdx-Expression

Der wechselseitige Einfluss von *H.pylori* und GERD wurde bereits ausführlich untersucht. Auch wenn vieles auf eine inverse Korrelation der *H.pylori*-Infektion mit der GERD hinweist, [20, 92, 115] so konnte dieser Zusammenhang jedoch bisher nicht bestätigt werden.[116]

Um die unterschiedlichen Effekte einer *H.pylori*-Infektion oder einer GERD auf die Genexpression von Cdx1 und Cdx2 und deren Zusammenspiel differenzierter zu betrachten, wurde untersucht, ob sich die Wirkung des jeweils einen Faktors unter dem Einfluss des jeweils anderen ändert.

Die Tatsache, dass eine *H.pylori*-Infektion unabhängig vom Vorhandensein einer GERD an keiner der untersuchten Lokalisationen einen Einfluss auf die Cdx1-Expression hatte, kann mit dem Zeitpunkt der Probenentnahme zusammenhängen. Im Vergleich zu Cdx2 wird Cdx1 auch im Rahmen der Transdifferenzierung zu intestinaler Metaplasie erst in einem späteren Stadium exprimiert.[70] Es wäre daher denkbar, dass bei dem untersuchten Studienkollektiv

die Probenentnahme erfolgt war, bevor es zu einer Induktion der Cdx1-Expression gekommen ist. Eine weitere Hypothese wäre, dass noch zusätzliche Einflüsse wirksam werden müssen, um eine Induktion von Cdx1 zu bewirken. Beide Erklärungsansätze sind jedoch rein hypothetisch und müssten durch „Follow-up“ Studien am gleichen Patientenkollektiv weiterführend untersucht werden. Für die Theorie einer zu frühen Probenentnahme im Falle von Cdx1 spricht auch die Tatsache, dass das Auftreten einer Refluxerkrankung, unabhängig vom *H.pylori*-Status, keinerlei Einfluss auf die Expression dieses Transkriptionsfaktors zeigte.

Eine Erhöhung der Cdx2-Expression im Antrum sowie eine Verringerung im Korpus von *H.pylori*-positiven Patienten ließ sich unter dem Einfluss einer GERD nicht mehr zeigen. Hier könnte die Veränderung des chemischen Milieus für den Verlust des Effekts einer *H.pylori*-Infektion verantwortlich sein. Benahmed *et al.* hatte bei der Untersuchung humaner Kolonkarzinomzelllinien gezeigt, dass eine Expression von Cdx2 stark von dem die Tumorzellen umgebenden Mikromilieu abhängt.[117]

Abgesehen davon, erfolgte in unseren Analysen der Vergleich jeweils unterschiedlicher Gruppen miteinander. Bei Patienten ohne Refluxerkrankung wurde beispielsweise der Einfluss einer *H.pylori*-Infektion im Vergleich zur Referenzgruppe untersucht, während dagegen bei Patienten mit GERD mit solchen Individuen verglichen wurde, bei denen zwar kein *Helicobacter* nachgewiesen werden konnte, aber eine Refluxerkrankung vorlag. Das Ergebnis besagt daher lediglich, dass in diesem Fall eine *H.pylori*-Infektion bei Refluxpatienten, bei denen bereits eine erhöhte Expression im Antrum vorlag, keinen zusätzlichen Einfluss auf die Cdx2-Expression hatte.

Dass unter den *H.pylori*-negativen Patienten solche mit GERD eine erhöhte Genexpression von Cdx2 im Antrum zeigten, kann mit dem oben bereits diskutierten Einfluss eines möglichen duodenogastralen Refluxes zusammenhängen. Die Induktion der Cdx2-Expression durch eine Refluxerkrankung ist bei *H.pylori*-positiven Patienten nicht mehr nachzuweisen, da bei diesen bereits ebenfalls eine grundsätzlich erhöhte Expression von Cdx2 im Antrum vorlag.

Dagegen zeigte sich bei *H.pylori*-positiven Patienten erhöhte Expressionswerte von Cdx2 im Korpus und an der Kardie unter dem Einfluss einer GERD. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass eine durch den *Helicobacter* vorgeschädigte Mukosa empfindlicher auf den aggressiven Magensaft von Refluxpatienten reagiert als Schleimhaut, in der keine *H.pylori*-Infektion vorliegt. In dieser Analyse deutet sich daher insbesondere im proximalen Magen ein additiver Effekt beider Faktoren im Hinblick auf die Induktion der Cdx2-Expression an.

4.7 Cdx-Expression im Zusammenhang mit intestinaler Metaplasie

Bei der Korrelationsanalyse der Genexpression von Cdx1 und Cdx2 mit der Ausprägung einer eventuell vorhandenen intestinalen Metaplasie im Studienkollektiv A wurden Patienten mit Barrett-Ösophagus nicht berücksichtigt. Zum einen war fraglich, welchen Einfluss die definitionsgemäß vorhandene spezialisierte intestinale Metaplasie im distalen Ösophagus auf die Cdx-Expression an der Kardia haben könnte. Zum anderen sollte auch eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine unklare Differenzierung beider Bereiche (distaler Ösophagus vs proximaler Magen) bei der Probenentnahme ausgeschlossen werden.

Die beobachtete Korrelation von sowohl Cdx1 als auch Cdx2 mit der Ausprägung der intestinalen Metaplasie entspricht der derzeitigen Studienlage, nach der im Regelfall eine erhöhte Expression beider Faktoren in intestinaler Metaplasie nachweisbar ist.[66, 71-75, 101, 102] Eine Korrelation des Transkriptgehaltes von Cdx1 oder Cdx2 mit dem nach der Sydney-Klassifikation bewerteten Grad der intestinalen Metaplasie ist bislang nur von Shiotani *et al.* beschrieben worden.[118] Bei der Betrachtung der einzelnen Lokalisationen konnte dies für Cdx1 im Antrum und an der Kardia bestätigt werden, für Cdx2 nur an der Kardia.

Dass die Cdx2-Expression im Antrum, obwohl signifikant erhöht, nicht mit der Ausprägung von intestinaler Metaplasie korrelierte, kann daran liegen, dass Cdx2 schon sehr früh exprimiert wird, das heißt bereits während der Entzündung, in der noch keine intestinale Metaplasie vorliegt. Diese Erklärung wird durch die immunhistochemischen Untersuchungen am Studienkollektiv B gestützt. Hier zeigten sich positive Färbereaktionen für Cdx2 in Schleimhautarealen, in der lediglich entzündliche und keine metaplastischen Veränderungen vorlagen. Dies konnte insbesondere im Bereich des Antrums gezeigt werden. Cdx1 wird in der Regel erst in einem späteren Stadium exprimiert, wenn bereits eine manifeste intestinale Metaplasie vorliegt. Diesem Modell entsprechend war hier eine Korrelation des Transkriptgehaltes mit der Ausprägung der intestinalen Metaplasie zu erwarten, die sich durch unsere Ergebnisse auch bestätigte.

Aufgrund der geringen Fallzahlen für intestinale Metaplasie war eine Korrelationsanalyse der einzelnen Subgruppen an den jeweiligen Lokalisationen nur für die Kardiaproben von Patienten mit einem gemeinsamen Auftreten der *H.pylori*-Infektion und der GERD [*H.pylori*(+)/GERD(+)] und von Patienten mit Barrett-Ösophagus sinnvoll. Die Genexpression von Cdx1 korrelierte nur bei der Gruppe *H.pylori*(+)/GERD(+) mit dem Grad der intestinalen Metaplasie, während die Cdx2-Expression beider Gruppen eine positive Korrelation mit der Ausprägung der intestinalen Metaplasie zeigte. Diese Resultate für

Gruppen mit kompliziertem Reflux [*H.pylori*(+)/GERD(+); Barrett] weisen auf die pathogene Potenz eines abnormen Refluxats im Bereich der Kardialia hin.

Des Weiteren wurde von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, dass eine GERD eher mit der inkompletten Form der intestinalen Metaplasie assoziiert ist, während bei einer *H.pylori*-Infektion eher eine intestinale Metaplasie vom kompletten Typ vorliegt.[95] Bei inkompletter intestinaler Metaplasie zeigt sich eine stärkere Expression von Cdx2 als bei kompletter intestinaler Metaplasie, so dass hier eine Korrelation wahrscheinlicher ist.[118]

Aufgrund der klar belegten Zusammenhänge einer Cdx-Induktion im Rahmen der epithelialen Transdifferenzierung zu intestinaler Metaplasie im oberen Gastrointestinaltrakt (siehe Abschnitt 4.3) spricht der Nachweis einer positiven Korrelation der Expression von sowohl Cdx1 als auch Cdx2 mit dem Grad der intestinalen Metaplasie gegen einen grundsätzlichen „sampling error“ bei der Biopsieentnahme. Vor diesem wird wegen des fokalen Auftretens der intestinalen Metaplasie häufig gewarnt. Generell wurde im vorliegenden Kollektiv die Prävalenz von intestinaler Metaplasie höchstwahrscheinlich nicht wesentlich unterschätzt, da grundsätzlich mehrere Biopsien (mindestens zwei) für die histologischen Untersuchungen und mindestens eine weitere für die Expressionsanalyse entnommen worden waren. Dies schließt allerdings vereinzelte Fehler im Sinne eines „sampling errors“ nicht aus. Dass derartige Probleme auftreten, zeigt sich in der IHC-Analyse des Patientenkollektivs B. Hier konnten wir bei zwei von 203 Proben (1,0%) in der immunhistochemischen Färbung intestinale Metaplasie mit Cdx2-Expression nachweisen, bei denen in der nativen histologischen Bewertung keine intestinale Metaplasie dokumentiert worden war. Umgekehrt zeigten zwölf von 203 Proben (5,9%) in der histologischen Evaluierung eine intestinale Metaplasie, nicht jedoch in der immunhistochemischen Analyse. In der Gesamtbewertung dieser Problematik können wir aber einen studienrelevanten Einfluss dieser Fehlerquelle auf unseren Untersuchungen ausschließen.

4.8 Cdx-Expression im Zusammenhang mit Entzündung

Eine Korrelation der Werte für die Entzündungsaktivität und der Entzündungschronizität ließ sich generell nur für Cdx2 nachweisen. Dies liegt daran, dass Cdx1 im inflammatorischen Stadium noch nicht exprimiert wird, sondern erst später im Zusammenhang mit einer intestinalen Metaplasie auftritt.[70, 102]

Die Tatsache, dass sich trotz erhöhter Entzündungsaktivität im Antrum *H.pylori*-positiver Patienten und trotz erhöhter Cdx2-Expression bei allen Gruppen nur beim gemeinsamen Vorliegen von sowohl einer *H.pylori*-Infektion als auch einer GERD eine Korrelation beider Parameter (Entzündungsaktivität und Cdx2-Expression) nachweisen ließ, weist deutlich auf eine Interaktion der Infektion und der Refluxerkrankung hin. Unterstützt wird dies durch die Untersuchungsergebnisse an der Kardia, wo eine Korrelation des Cdx2-Transkriptgehalts mit der Entzündungsaktivität dokumentiert wurde. Allerdings war hier die Gruppe *H.pylori*(+)/GERD(+) auch die einzige, bei der sich eine Erhöhung der Cdx2-Expression zeigte. Dies unterstreicht die pathogene Potenz, die eine *H.pylori*-Infektion und GERD in Kombination entwickeln.

Die Chronizität einer vorhandenen Entzündung korrelierte dagegen nur im Antrum von *H.pylori*-positiven Patienten mit der Cdx2-Genexpression. Der Einfluss durch eine GERD scheint im Zusammenhang mit der Entzündungschronizität wesentlich geringer ausgeprägt zu sein. Allerdings ist auch bei dieser Analyse der Zusammenhang zwischen Entzündung und Cdx2-Expression deutlich ausgeprägter bei Patienten der Gruppe *H.pylori*(+)/GERD(+) im Vergleich zu Patienten der Gruppe *H.pylori*(+)/GERD(-).

Im Bereich des Korpus zeigt sich eine inverse Korrelation der Entzündungswerte mit der Expression von Cdx2 bei Patienten der Gruppe *H.pylori*(+)/GERD(-). Dies könnte daran liegen, dass eine *Helicobacter*-Infektion in diesem Bereich aufgrund der unterschiedlichen mukosalen Architektur im Vergleich zum Antrum und der Kardia zunächst zu atrophischen Prozessen führt und die Transdifferenzierung zu einer intestinalen Metaplasie erst später initiiert wird.

4.9 Erkenntnisse

Wir konnten demonstrieren, dass sowohl bei Patienten mit *H.pylori*-Infektion als auch bei solchen mit Refluxerkrankung eine erhöhte Genexpression von Cdx2 vorliegt, während die Cdx1-Expression weitestgehend unverändert bleibt. Die nachgewiesenen Transkriptmengen von Cdx2 korrelierten dabei mit dem Ausmaß einer vorhandenen intestinalen Metaplasie. Immunhistochemisch konnten wir das CDX2-Protein auch in entzündlich veränderten Schleimhautabschnitten ohne Metaplasie nachweisen.

Bei *H.pylori*-positiven Patienten zeigte sich an allen untersuchten Lokalisationen eine deutliche Entzündung der Magenschleimhaut, wobei wir teilweise einen Zusammenhang

zwischen dem Grad der Entzündung und der Expression von Cdx2 dokumentieren konnten. Die erhöhte Cdx2-Expression bei Patienten mit GERD war nicht mit einer mukosalen Entzündung assoziiert.

Weiterhin konnten wir deutlich erhöhte Transkriptmengen im Antrum von Patienten mit abnormem Reflux nachweisen, welche wahrscheinlich auf den pathogenen Einfluss von duodenogastralem Reflux zurückzuführen sind.

Bei gemeinsamem Vorliegen einer *H.pylori*-Infektion und einer GERD erhöht sich das pathogene Potential beider ätiologischer Faktoren.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Einfluss einer Infektion mit *H.pylori* sowie der gastroösophagealen Refluxerkrankung auf die Genexpression von Cdx1 und Cdx2 in der Magenschleimhaut untersucht. Dies sind Transkriptionsfaktoren, die maßgeblich an der Transdifferenzierung gastraler Mukosa in eine intestinale Metaplasie beteiligt sind, welche als prämaligene Läsion bei der Entstehung von Adenokarzinomen des Magens und des gastroösophagealen Übergangs gilt.

Die Studie umfasste 96 Patienten mit dyspeptischen Beschwerden, welche nach dem Vorhandensein einer *H.pylori*-Infektion oder dem Vorliegen einer gastroösophagealen Refluxerkrankung in Subgruppen unterteilt wurden. Nach der Extraktion und Aufarbeitung der RNA-Fraktion aus mukosalen Biopsien erfolgte die Bestimmung der Cdx1- und Cdx2-Transkriptgehalte mittels quantitativer RT-PCR. Darüber hinaus wurden die Proben hinsichtlich des Entzündungsgrades und dem Vorliegen einer intestinalen Metaplasie histopathologisch charakterisiert. Des Weiteren wurden immunhistochemische Färbungen zum Nachweis des CDX2-Proteins in einem zweiten Studienkollektiv durchgeführt.

Die RT-PCR-Analyse zeigte, dass die Cdx-1 und Cdx-2 Transkripte in der Mehrzahl der untersuchten Proben (48,1-96,3%) nachweisbar waren, wobei Cdx1 signifikant geringer exprimiert war als Cdx2. Die Genexpression von Cdx2 konnte auch in entzündlichen Schleimhautarealen ohne metaplastische Veränderungen nachgewiesen werden, was seine Bedeutung als einen initialen Faktor in der Pathogenese von intestinaler Metaplasie unterstreicht.

Des Weiteren konnte für die *H.pylori*-Infektion eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Entzündung und der Cdx2-Genexpression gezeigt werden, was für Cdx1 nicht der Fall war. Die Genexpression beider Faktoren zeigte eine positive Korrelation mit dem Grad einer eventuell vorhandenen intestinalen Metaplasie, insbesondere bei Patienten mit ausgeprägter Refluxerkrankung.

Erstmals konnte eine erhöhte Cdx2-Genexpression im Antrum von Patienten mit einer Refluxerkrankung nachgewiesen werden, was eine Bedeutung des duodenogastralen Refluxes in dieser Region vermuten lässt. Im Bereich der Kardia waren keine eindeutigen Auswirkungen eines pathologischen Refluxes bezüglich der Entzündung und der Genexpression von Cdx1 und Cdx2 nachweisbar. Dies unterstreicht die These, dass der abnorme gastroösophageale Reflux eher im distalen Ösophagus als im proximalen Magen eine pathophysiologische Rolle spielt.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die Genexpression von Cdx1 und Cdx2 bei der *H.pylori*-Infektion mit der Entzündung der gastralen Mukosa assoziiert ist, während dies bei einer GERD nicht der Fall ist. Bei letzterer Erkrankung kann es ohne wesentliche entzündliche Veränderungen bereits zur Entstehung einer intestinalen Metaplasie kommen.

Am gastroösophagealen Übergang existieren demnach zwei unterschiedliche Entitäten von intestinaler Metaplasie, die *H.pylori*- und die durch abnormen Reflux induzierte Metaplasie. Dabei kommt es zwischen beiden ätiologischen Faktoren (*H.pylori* und abnormem Reflux) zu einer wechselseitigen Beeinflussung, so dass es bei gemeinsamen Vorkommen beider zu einer additiven Verstärkung des pathogenen Potentials bezüglich mukosaler Veränderungen am gastroösophagealen Übergang kommt.

Die in dieser Dissertation dargestellten Ergebnisse unterstreichen die These einer unterschiedlichen Pathogenese von gastraler intestinaler Metaplasie und sind wegweisend für zukünftige Studien zu den pathologischen Mechanismen, wie zum Beispiel dem Einfluss des duodenogastralen Reflux, welche zu Entzündung und zu der Entstehung von intestinaler Metaplasie im proximalen Magen beziehungsweise am ösophagogastralen Übergang führen.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Wallner B, Sylvan A, Stenling R, Janunger KG. The esophageal Z-line appearance correlates to the prevalence of intestinal metaplasia. *Scand J Gastroenterol* 2000;35(1):17-22.
- (2) Armstrong D. Review article: towards consistency in the endoscopic diagnosis of Barrett's oesophagus and columnar metaplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20 Suppl;5:40-7.
- (3) Malfertheiner P, Peitz U. The interplay between *Helicobacter pylori*, gastro-oesophageal reflux disease, and intestinal metaplasia. *Gut* 2005;54 Suppl;1:i13-i20.
- (4) Chandrasoma P. Controversies of the cardiac mucosa and Barrett's oesophagus. *Histopathology* 2005; 46(4):361-73.
- (5) Lauren P. THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA. AN ATTEMPT AT A HISTO-CLINICAL CLASSIFICATION. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64:31-49.
- (6) Siewert J, Stein HJ. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br J Surg* 1998;85(11):1457-9.
- (7) Jenkins TD, Friedman LS. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *Dig Dis* 1999; 17(3):153-62.
- (8) Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF, Jr. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 1991;13;265(10):1287-9.
- (9) Pera M, Cameron AJ, Trastek VF, Carpenter HA, Zinsmeister AR. Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Gastroenterology* 1993;104(2):510-3.
- (10) Botterweck AA, Schouten LJ, Volovics A, Dorant E, van Den Brandt PA. Trends in incidence of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in ten European countries. *Int J Epidemiol* 2000;29(4):645-54.
- (11) Keeney S, Bauer TL. Epidemiology of adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *Surg Oncol Clin N Am* 2006;15(4):687-96.
- (12) Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998;15;83(10):2049-53.
- (13) Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G, et al. Gastric precancerous process in a high risk population: cross-sectional studies. *Cancer Res* 1990;1;50(15):4731-6.
- (14) Welin M, Holmgren NM, Nilsson P, Enroth H. Statistical model of the interactions between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer development. *Helicobacter* 2003;8(1):72-8.
- (15) Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006; 101(8):1900-20.
- (16) Mann NS, Tsai MF, Nair PK. Barrett's esophagus in patients with symptomatic reflux esophagitis. *Am J Gastroenterol* 1989;84(12):1494-6.
- (17) Winters C, Jr., Spurling TJ, Chobanian SJ, Curtis DJ, Esposito RL, Hacker JFI, et al. Barrett's esophagus. A prevalent, occult complication of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 1987;92(1):118-24.
- (18) Spechler SJ. Clinical practice. Barrett's Esophagus. *N Engl J Med* 2002;14;346(11):836-42.

- (19) Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, Chejfec G, Metz A, Sontag SJ. Hiatal hernia size, Barrett's length, and severity of acid reflux are all risk factors for esophageal adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 2002;97(8):1930-6.
- (20) Weston AP, Badr AS, Hassanein RS. Prospective multivariate analysis of clinical, endoscopic, and histological factors predictive of the development of Barrett's multifocal high-grade dysplasia or adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 1999;94(12):3413-9.
- (21) Sampliner RE. Updated guidelines for the diagnosis, surveillance, and therapy of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2002;97(8):1888-95.
- (22) Shaheen NJ, Crosby MA, Bozynski EM, Sandler RS. Is there publication bias in the reporting of cancer risk in Barrett's esophagus? *Gastroenterology* 2000;119(2):333-8.
- (23) Hirota WK, Loughney TM, Lazas DJ, Maydonovitch CL, Rholi V, Wong RK. Specialized intestinal metaplasia, dysplasia, and cancer of the esophagus and esophagogastric junction: prevalence and clinical data. *Gastroenterology* 1999;116(2):277-85.
- (24) Sharma P, Weston AP, Morales T, Topalovski M, Mayo MS, Sampliner RE. Relative risk of dysplasia for patients with intestinal metaplasia in the distal oesophagus and in the gastric cardia. *Gut* 2000;46(1):9-13.
- (25) Ruol A, Parenti A, Zaninotto G, Merigliano S, Costantini M, Cagol M, et al. Intestinal metaplasia is the probable common precursor of adenocarcinoma in barrett esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *Cancer* 2000;1;88(11):2520-8.
- (26) Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999;18;340(11):825-31.
- (27) Attwood SE, Smyrk TC, DeMeester TR, Mirvish SS, Stein HJ, Hinder RA. Duodeno-esophageal reflux and the development of esophageal adenocarcinoma in rats. *Surgery* 1992;111(5):503-10.
- (28) Fein M, Fuchs KH, Freys SM, Maroske J, Tigges H, Thiede A. [Is duodeno-gastro-esophageal reflux just a bystander of acid reflux?]. *Zentralbl Chir* 2002;127(12):1068-72.
- (29) Koek GH, Tack J, Sifrim D, Lerut T, Janssens J. The role of acid and duodenal gastroesophageal reflux in symptomatic GERD. *Am J Gastroenterol* 2001;96(7):2033-40.
- (30) Vaezi MF, Richter JE. Role of acid and duodenogastroesophageal reflux in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 1996;111(5):1192-9.
- (31) Dent J, el-Serag HB, Wallander MA, Johansson S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut* 2005;54(5):710-7.
- (32) Quigley EM. Non-erosive reflux disease: part of the spectrum of gastro-oesophageal reflux disease, a component of functional dyspepsia, or both? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13 Suppl;1:S13-S18.
- (33) Fass R, Ofman JJ. Gastroesophageal reflux disease--should we adopt a new conceptual framework? *Am J Gastroenterol* 2002;97(8):1901-9.
- (34) Labenz J, Jaspersen D, Kulig M, Leodolter A, Lind T, Meyer-Sabellek W, et al. Risk factors for erosive esophagitis: a multivariate analysis based on the ProGERD study initiative. *Am J Gastroenterol* 2004;99(9):1652-6.
- (35) Marshall BJ, Warren J. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;16;1(8390):1311-5.
- (36) Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994;61:1-241.

- (37) Malfertheiner P, Sipponen P, Naumann M, Moayyedi P, Megraud F, Xiao SD, et al. Helicobacter pylori eradication has the potential to prevent gastric cancer: a state-of-the-art critique. *Am J Gastroenterol* 2005;100(9):2100-15.
- (38) Huang J, Lam SK, Malfertheiner P, Hunt RH. Has education about Helicobacter pylori infection been effective? Worldwide survey of primary care physicians. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18(5):512-20.
- (39) Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, et al. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001;13;345(11):784-9.
- (40) Zhang C, Yamada N, Wu YL, Wen M, Matsuhisa T, Matsukura N. Helicobacter pylori infection, glandular atrophy and intestinal metaplasia in superficial gastritis, gastric erosion, erosive gastritis, gastric ulcer and early gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005;14;11(6):791-6.
- (41) Genta RM, Huberman RM, Graham DY. The gastric cardia in Helicobacter pylori infection. *Hum Pathol* 1994;25(9):915-9.
- (42) Oberg S, Peters JH, DeMeester TR, Chandrasoma P, Hagen JA, Ireland AP, et al. Inflammation and specialized intestinal metaplasia of cardiac mucosa is a manifestation of gastroesophageal reflux disease. *Ann Surg* 1997;226(4):522-30.
- (43) Castro ML, Fachal C, Pineda J, Dominguez F, Prada JI, Hermo JA, et al. [Intestinal metaplasia at the esophagogastric junction. Prevalence and association in patients undergoing endoscopy]. *Gastroenterol Hepatol* 2002;25(8):487-92.
- (44) Goldblum J, Richter JE, Vaezi M, Falk GW, Rice TW, Peek RM. Helicobacter pylori infection, not gastroesophageal reflux, is the major cause of inflammation and intestinal metaplasia of gastric cardiac mucosa. *Am J Gastroenterol* 2002;97(2):302-11.
- (45) Morini S, Zullo A, Hassan C, Lorenzetti R, Stella F, Martini MT. Gastric cardia inflammation: role of Helicobacter pylori infection and symptoms of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96(8):2337-40.
- (46) Hackelsberger A, Gunther T, Schultze V, Manes G, Dominguez-Munoz JE, Roessner A, et al. Intestinal metaplasia at the gastro-oesophageal junction: Helicobacter pylori gastritis or gastro-oesophageal reflux disease? *Gut* 1998;43(1):17-21.
- (47) Voutilainen M, Farkkila M, Mecklin JP, Juhola M, Sipponen P. Chronic inflammation at the gastroesophageal junction (carditis) appears to be a specific finding related to Helicobacter pylori infection and gastroesophageal reflux disease. The Central Finland Endoscopy Study Group. *Am J Gastroenterol* 1999;94(11):3175-80.
- (48) Voutilainen M, Farkkila M, Juhola M, Mecklin JP, Sipponen P. Complete and incomplete intestinal metaplasia at the oesophagogastric junction: prevalences and associations with endoscopic erosive oesophagitis and gastritis. *Gut* 1999;45(5):644-8.
- (49) Spechler SJ, Goyal RK. The columnar-lined esophagus, intestinal metaplasia, and Norman Barrett. *Gastroenterology* 1996;110(2):614-21.
- (50) Chandrasoma P. Controversies of the cardiac mucosa and Barrett's oesophagus. *Histopathology* 2005; 46(4):361-73.
- (51) Ormsby AH, Kilgore SP, Goldblum J, Richter JE, Rice TW, Gramlich TL. The location and frequency of intestinal metaplasia at the esophagogastric junction in 223 consecutive autopsies: implications for patient treatment and preventive strategies in Barrett's esophagus. *Mod Pathol* 2000; 13(6):614-20.
- (52) Derdoy JJ, Bergwerk A, Cohen H, Kline M, Monforte HL, Thomas DW. The gastric cardia: to be or not to be? *Am J Surg Pathol* 2003;27(4):499-504.

- (53) De HG, Van EP, Ectors N, Tack J, Geboes K. On the existence and location of cardiac mucosa: an autopsy study in embryos, fetuses, and infants. *Gut* 2003;52(6):791-6.
- (54) Kilgore SP, Ormsby AH, Gramlich TL, Rice TW, Richter JE, Falk GW, et al. The gastric cardia: fact or fiction? *Am J Gastroenterol* 2000;95(4):921-4.
- (55) Margalit Y, Yarus S, Shapira E, Gruenbaum Y, Fainsod A. Isolation and characterization of target sequences of the chicken CdxA homeobox gene. *Nucleic Acids Res* 1993;25;21(21):4915-22.
- (56) Suh E, Chen L, Taylor J, Traber PG. A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol Cell Biol* 1994;14(11):7340-51.
- (57) Bonner CA, Loftus SK, Wasmuth JJ. Isolation, characterization, and precise physical localization of human CDX1, a caudal-type homeobox gene. *Genomics* 1995;20;28(2):206-11.
- (58) James R, Erler T, Kazenwadel J. Structure of the murine homeobox gene *cdx-2*. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *J Biol Chem* 1994;27;269(21):15229-37.
- (59) Suh E, Traber PG. An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol* 1996;16(2):619-25.
- (60) Soubeyran P, Mallo GV, Moucadel V, Dagorn JC, Iovanna JL. Overexpression of Cdx1 and Cdx2 homeogenes enhances expression of the HLA-I in HT-29 cells. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000; 3(5):271-6.
- (61) Chawengsaksophak K, de GW, Rossant J, Deschamps J, Beck F. Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;18;101(20):7641-5.
- (62) van den AE, Forlani S, Chawengsaksophak K, de GW, Beck F, Meyer BI, et al. Cdx1 and Cdx2 have overlapping functions in anteroposterior patterning and posterior axis elongation. *Development* 2002; 129(9):2181-93.
- (63) Silberg DG, Swain GP, Suh ER, Traber PG. Cdx1 and *cdx2* expression during intestinal development. *Gastroenterology* 2000;119(4):961-71.
- (64) Subramanian V, Meyer B, Evans GS. The murine Cdx1 gene product localises to the proliferative compartment in the developing and regenerating intestinal epithelium. *Differentiation* 1998;64(1):11-8.
- (65) Mizoshita T, Inada K, Tsukamoto T, Kodera Y, Yamamura Y, Hirai T, et al. Expression of Cdx1 and Cdx2 mRNAs and relevance of this expression to differentiation in human gastrointestinal mucosa--with special emphasis on participation in intestinal metaplasia of the human stomach. *Gastric Cancer* 2001;4(4):185-91.
- (66) Silberg DG, Furth EE, Taylor JK, Schuck T, Chiou T, Traber PG. CDX1 protein expression in normal, metaplastic, and neoplastic human alimentary tract epithelium. *Gastroenterology* 1997; 113(2):478-86.
- (67) Mutoh H, Sakurai S, Satoh K, Osawa H, Hakamata Y, Takeuchi T, et al. Cdx1 induced intestinal metaplasia in the transgenic mouse stomach: comparative study with Cdx2 transgenic mice. *Gut* 2004;53(10):1416-23.
- (68) Mutoh H, Sakurai S, Satoh K, Tamada K, Kita H, Osawa H, et al. Development of gastric carcinoma from intestinal metaplasia in Cdx2-transgenic mice. *Cancer Res* 2004;1;64(21):7740-7.
- (69) Silberg DG, Sullivan J, Kang E, Swain GP, Moffett J, Sund NJ, et al. Cdx2 ectopic expression induces gastric intestinal metaplasia in transgenic mice. *Gastroenterology* 2002;122(3):689-96.
- (70) Eda A, Osawa H, Satoh K, Yanaka I, Kihira K, Ishino Y, et al. Aberrant expression of CDX2 in Barrett's epithelium and inflammatory esophageal mucosa. *J Gastroenterol* 2003;38(1):14-22.

- (71) Moons LM, Bax DA, Kuipers EJ, Van DH, Haringsma J, Van Vliet AH, et al. The homeodomain protein CDX2 is an early marker of Barrett's oesophagus. *J Clin Pathol* 2004;57(10):1063-8.
- (72) Bai YQ, Yamamoto H, Akiyama Y, Tanaka H, Takizawa T, Koike M, et al. Ectopic expression of homeodomain protein CDX2 in intestinal metaplasia and carcinomas of the stomach. *Cancer Lett* 2002;8;176(1):47-55.
- (73) Seno H, Oshima M, Taniguchi MA, Usami K, Ishikawa TO, Chiba T, et al. CDX2 expression in the stomach with intestinal metaplasia and intestinal-type cancer: Prognostic implications. *Int J Oncol* 2002;21(4):769-74.
- (74) Mizoshita T, Tsukamoto T, Inada K, Ogasawara N, Hirata A, Kato S, et al. Immunohistochemically detectable Cdx2 is present in intestinal phenotypic elements in early gastric cancers of both differentiated and undifferentiated types, with no correlation to non-neoplastic surrounding mucosa. *Pathol Int* 2004;54(6):392-400.
- (75) Almeida R, Silva E, Santos-Silva F, Silberg DG, Wang J, De BC, et al. Expression of intestine-specific transcription factors, CDX1 and CDX2, in intestinal metaplasia and gastric carcinomas. *J Pathol* 2003;199(1):36-40.
- (76) Ha KG, Am SG, Youn PD, Han LS, Hyun LD, Oh KT, et al. CDX2 expression is increased in gastric cancers with less invasiveness and intestinal mucin phenotype. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41(8):880-6.
- (77) Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, Gown AM. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2003;27(3):303-10.
- (78) Barbareschi M, Roldo C, Zamboni G, Capelli P, Cavazza A, Macri E, et al. CDX-2 homeobox gene product expression in neuroendocrine tumors: its role as a marker of intestinal neuroendocrine tumors. *Am J Surg Pathol* 2004;28(9):1169-76.
- (79) Hansel DE, Maitra A, Lin JW, Goggins M, Argani P, Yeo CJ, et al. Expression of the caudal-type homeodomain transcription factors CDX 1/2 and outcome in carcinomas of the ampulla of Vater. *J Clin Oncol* 2005;20;23(9):1811-8.
- (80) Wu XS, Akiyama Y, Igari T, Kawamura T, Hiranuma S, Shibata T, et al. Expression of homeodomain protein CDX2 in gallbladder carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131(5):271-8.
- (81) Osawa H, Kita H, Satoh K, Ohnishi H, Kaneko Y, Mutoh H, et al. Aberrant expression of CDX2 in the metaplastic epithelium and inflammatory mucosa of the gallbladder. *Am J Surg Pathol* 2004; 28(9):1253-4.
- (82) Chawengsaksophak K, James R, Hammond VE, Kontgen F, Beck F. Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 1997;6;386(6620):84-7.
- (83) Bonhomme C, Duluc I, Martin E, Chawengsaksophak K, Chenard MP, Kedinger M, et al. The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut* 2003;52(10):1465-71.
- (84) Mallo GV, Soubeyran P, Lissitzky JC, Andre F, Farnarier C, Marvaldi J, et al. Expression of the Cdx1 and Cdx2 homeotic genes leads to reduced malignancy in colon cancer-derived cells. *J Biol Chem* 1998;29;273(22):14030-6.
- (85) Guo RJ, Huang E, Ezaki T, Patel N, Sinclair K, Wu J, et al. Cdx1 inhibits human colon cancer cell proliferation by reducing beta-catenin/T-cell factor transcriptional activity. *J Biol Chem* 2004; 27;279(35):36865-75.
- (86) Domon-Dell C, Freund JN. Stimulation of Cdx1 by oncogenic beta-catenin/Tcf4 in colon cancer cells; opposite effect of the CDX2 homeoprotein. *FEBS Lett* 2002;8;518(1-3):83-7.

- (87) Suh ER, Ha CS, Rankin EB, Toyota M, Traber PG. DNA methylation down-regulates CDX1 gene expression in colorectal cancer cell lines. *J Biol Chem* 2002;27;277(39):35795-800.
- (88) Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996;20(10):1161-81.
- (89) Malfertheiner P, Enrique Dominguez-Munoz J, Heckenmuller H, Neubrand M, Fischer HP, Sauerbruch T. Modified rapid urease test for detection of *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8(1):53-6.
- (90) Wex T, Treiber G, Lendeckel U, Malfertheiner P. A two-step method for the extraction of high-quality RNA from endoscopic biopsies. *Clin Chem Lab Med* 2003;41(8):1033-7.
- (91) Der R, Tsao-Wei DD, Demeester T, Peters J, Groshen S, Lord RV, et al. Carditis: a manifestation of gastroesophageal reflux disease. *Am J Surg Pathol* 2001;25(2):245-52.
- (92) Wu JC, Sung JJ, Ng EK, Go MY, Chan WB, Chan FK, et al. Prevalence and distribution of *Helicobacter pylori* in gastroesophageal reflux disease: a study from the East. *Am J Gastroenterol* 1999;94(7):1790-4.
- (93) Hackelsberger A, Gunther T, Schultze V, Labenz J, Roessner A, Malfertheiner P. Prevalence and pattern of *Helicobacter pylori* gastritis in the gastric cardia. *Am J Gastroenterol* 1997;92(12):2220-4.
- (94) Goldblum J, Vicari JJ, Falk GW, Rice TW, Peek RM, Easley K, et al. Inflammation and intestinal metaplasia of the gastric cardia: the role of gastroesophageal reflux and *H. pylori* infection. *Gastroenterology* 1998;114(4):633-9.
- (95) McNamara D, Buckley M, Crotty P, Hall W, O'Sullivan M, O'Morain C. Carditis: all *Helicobacter pylori* or is there a role for gastro-oesophageal reflux? *Scand J Gastroenterol* 2002;37(7):772-7.
- (96) Sharma P, McElhinney C, Topalovski M, Mayo MS, McGregor DH, Weston A. Detection of cardia intestinal metaplasia: do the biopsy number and location matter? *Am J Gastroenterol* 2004;99(12):2424-8.
- (97) Oksanen A, Sipponen P, Karttunen R, Rautelin H. Inflammation and intestinal metaplasia at the squamocolumnar junction in young patients with or without *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 2003;52(2):194-8.
- (98) Voutilainen M, Farkkila M, Juhola M, Nuorva K, Mauranen K, Mantynen T, et al. Specialized columnar epithelium of the esophagogastric junction: prevalence and associations. The Central Finland Endoscopy Study Group. *Am J Gastroenterol* 1999;94(4):913-8.
- (99) Csendes A, Smok G, Quiroz J, Burdiles P, Rojas J, Castro C, et al. Clinical, endoscopic, and functional studies in 408 patients with Barrett's esophagus, compared to 174 cases of intestinal metaplasia of the cardia. *Am J Gastroenterol* 2002;97(3):554-60.
- (100) Groisman GM, Amar M, Meir A. Expression of the intestinal marker Cdx2 in the columnar-lined esophagus with and without intestinal (Barrett's) metaplasia. *Mod Pathol* 2004;17(10):1282-8.
- (101) Kim HS, Lee JS, Freund JN, Min KW, Lee JS, Kim W, et al. CDX-2 homeobox gene expression in human gastric carcinoma and precursor lesions. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21(2):438-42.
- (102) Eda A, Osawa H, Yanaka I, Satoh K, Mutoh H, Kihira K, et al. Expression of homeobox gene CDX2 precedes that of CDX1 during the progression of intestinal metaplasia. *J Gastroenterol* 2002;37(2):94-100.
- (103) Satoh K, Mutoh H, Eda A, Yanaka I, Osawa H, Honda S, et al. Aberrant expression of CDX2 in the gastric mucosa with and without intestinal metaplasia: effect of eradication of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2002;7(3):192-8.

- (104) Vallbohmer D, Lenz HJ. Predictive and prognostic molecular markers in outcome of esophageal cancer. *Dis Esophagus* 2006;19(6):425-32.
- (105) Tsukamoto T, Inada K, Tanaka H, Mizoshita T, Mihara M, Ushijima T, et al. Down-regulation of a gastric transcription factor, Sox2, and ectopic expression of intestinal homeobox genes, Cdx1 and Cdx2: inverse correlation during progression from gastric/intestinal-mixed to complete intestinal metaplasia. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130(3):135-45.
- (106) Kerkhof M, Bax DA, Moons LM, van Vuuren AJ, Van DH, Steyerberg EW, et al. Does CDX2 expression predict Barrett's metaplasia in oesophageal columnar epithelium without goblet cells? *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24(11-12):1613-21.
- (107) Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, Yamahashi Y, Saito Y, Higashi H, et al. Helicobacter pylori CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* 2007;22:[Epub ahead of Print]
- (108) Dixon MF, Neville PM, Mapstone NP, Moayyedi P, Axon AT. Bile reflux gastritis and Barrett's oesophagus: further evidence of a role for duodenogastro-oesophageal reflux? *Gut* 2001;49(3):359-63.
- (109) Kazumori H, Ishihara S, Rumi MA, Kadowaki Y, Kinoshita Y. Bile acids directly augment caudal-related homeobox gene Cdx2 expression in esophageal keratinocytes in Barrett's epithelium. *Gut* 2006;55(1):16-25.
- (110) Tatsuta T, Mukaisho K, Sugihara H, Miwa K, Tani T, Hattori T. Expression of Cdx2 in early GRCL of Barrett's esophagus induced in rats by duodenal reflux. *Dig Dis Sci* 2005;50(3):425-31.
- (111) Wong NA, Wilding J, Bartlett S, Liu Y, Warren BF, Piris J, et al. CDX1 is an important molecular mediator of Barrett's metaplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;24;102(21):7565-70.
- (112) Marchetti M, Caliot E, Pringault E. Chronic acid exposure leads to activation of the cdx2 intestinal homeobox gene in a long-term culture of mouse esophageal keratinocytes. *J Cell Sci* 2003; 15;116(Pt8):1429-36.
- (113) Steininger H, Pfofe DA, Muller H, Haag-Sunjic G, Fratianu V. Expression of CDX2 and MUC2 in Barrett's mucosa. *Pathol Res Pract* 2005;201(8-9):573-7.
- (114) Mizoshita T, Inada K, Tsukamoto T, Nozaki K, Joh T, Itoh M, et al. Expression of the intestine-specific transcription factors, Cdx1 and Cdx2, correlates shift to an intestinal phenotype in gastric cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130(1):29-36.
- (115) Hackelsberger A, Schultze V, Gunther T, von AU, Manes G, Malfertheiner P. The prevalence of Helicobacter pylori gastritis in patients with reflux oesophagitis: a case-control study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998;10(6):465-8.
- (116) Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection - The Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007;17; [Epub ahead of Print]
- (117) Benahmed F, Gross I, Guenot D, Jehan F, Martin E, Domon-Dell C, et al. The microenvironment controls CDX2 homeobox gene expression in colorectal cancer cells. *Am J Pathol* 2007;170(2):733-44.
- (118) Shiotani A, Ishii H, Uedo N, Ishihara R, Ishiguro S, Tatsuta M, et al. Helicobacter pylori-induced atrophic gastritis progressing to gastric cancer exhibits sonic hedgehog loss and aberrant CDX2 expression. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24 Suppl;4:71-80.

7 Anhang

Anhang 1: Basenfolge des Cdx1- und Cdx2-Transkripts

Dargestellt ist die jeweilige Basenfolge des Transkriptionsproduktes des Cdx1-Gens (a) und des Cdx2-Gens (2). Die einzelnen Codons sind farblich abgesetzt. Nicht-translatierte Bereiche sind gelb unterlegt. Die Exons 1 und drei sind jeweils in schwarzen Buchstaben, Exon 2 in blauen dargestellt. Die mittels RT-PCR in dieser Studie vervielfältigten Abschnitte sind unterstrichen, die spezifischen Primer-Sequenzen fett gedruckt und grau unterlegt. (Quelle: www.ensemble.org)

a) Cdx1

```

1  ATGTATGTGGGCTATGTGCTGGACAAGGATTGCGCCCGTGTAACCCGGCCAGCCAGGCCA
61  GCCAGCCTCGGCCTGGGCCCGCAAGCCTACGGCCCCCGGCCCGCCCCGGCGCCCCCG
121 CAGTACCCCGACTTCTCCAGCTACTCTCACGTGGAGCCGGCCCCCGCGCCCCGACGGCC
181 TGGGGGGCGCCCTTCCCTGCGCCCAAGGACGACTGGGCGCCGCTACGGCCCGGGCCCC
241 GCGGCCCTGCCGCCAGCCAGCTTCGCTGGCATTTCGGGCCCCCTCCAGACTTTAGCCCG
301 GTGCCGGCGCCCCCTGGGCCCGGCCCGGGCCTCCTGGCGCAGCCCCTCGGGGGCCGGGC
361 ACACCGTCCTCGCCCGGAGCGCAGAGGCCGACGCCCTACGAGTGGATGCGGCGCAGCGTG
421 GCGGCCGGAGGCGGCGGTGGCAGCGGTAAGACTCGGACCAAGGACAAGTACCGCGTGGTC
481 TACACCGACCACCAACGCCTGGAGCTGGAGAAGGAGTTTCATTACAGCCGTTACATCACA
541 ATCCGGCGGAAATCAGAGCTGGCTGCCAATCTGGGGCTCACTGAACGGCAGGTGAAGATC
601 TGGTTCCAAAACCGGCGGGCAAAGGAGCGCAAAGTGAACAAGAAAGAAACAGCAGCAGCAA
661 CAGCCCCACAGCCGCGGATGGCCCACGACATCACGGCCACCCAGCCGGGCCATCCCTG
721 GGGGGCCTGTGTCCCAGCAACACCAGCCTCCTGGCCACCTCCTCTCCAATGCCTGTGAAA
781 GAGGAGTTTCTGCCATAGCCCCATGCCAGCCTGTGCGCCGGGGGACCTGGGGACTCGGG
841 TGCTGGGAGTGTGGCTCCTGTGGGCCCAGGAGGTCTGGTCCGAGTCTCAGCCCTGACCTT
901 CTGGGACATGGTGGACAGTCACCTATCCACCCTCTGCATCCCCCTTGGCCCATCTGTGCAG
961 TAAGCCTGTTGGATAAAGACCTTCCAGCTCCTGTGTTCTAGACCTCTGGGGGATAAGGGA
1021 GTCCAGGGTGGATGATCTCAATCTCCCGTGGGCATCTCAAGCCCCAAATGGTTGGGGGAG
1081 GGGCCTAGACAAGGCTCCAGGCCCCACCTCCTCCTCCATACGTTTCCAGAGGTGCAGCTGGA
1141 GGCTGCTGTGGGGACCACACTGATCCTGGAGAAAAGGGATGGAGCTGAAAAAGATGGAAT
1201 GCTTGCAGAGCATGACCTGAGGAGGGAGGAACGTGGTCAACTCACACCTGCCTCTTCCTG
1261 CAGCCTCACTTCTACCTGCCCCCATCATAAGGGCACTGAGCCCTTCCAGGCTGGATACT
1321 AAGCACAAGCCCATAGCACTGGGCTCTGATGGCTGCTCCACTGGGTACAGAATCACAG
1381 CCCTCATGATCATTCTCAGTGAGGGCTCTGGATTGAGAGGGAGGCCCTGGGAGGAGAGAA
1441 GGGGGCAGAGTCTTCCCTACCAGTTTCTACACCCCCGCCAGGCTGCCCATCAGGGCCCA
1501 GGGAGCCCCAGAGGACTTTATTTCGGACCAAGCAGAGCTCACA

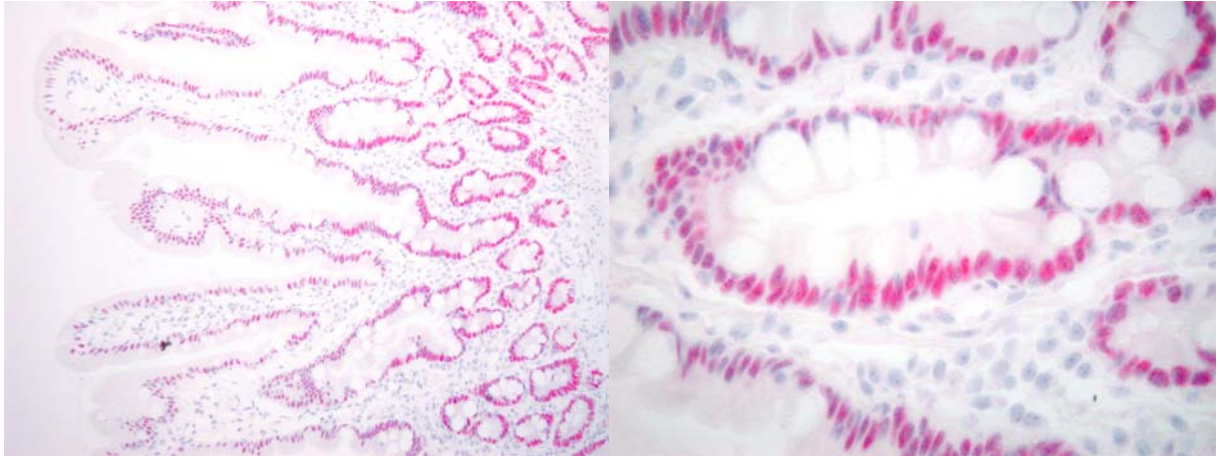
```

b) Cdx2

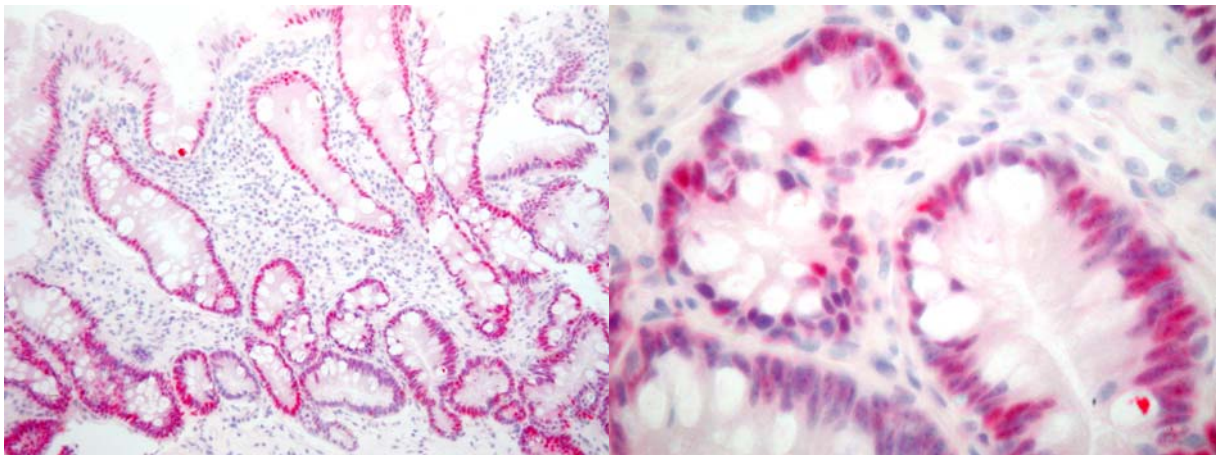
1 GGGACCGCCTCGGAGGCAGAAGAGCCGCGAGGAGCCAGCGGAGCACCGCGGGCTGGGGCG
 61 CAGCCACCCGCGCTCCTCGAGTCCCCTCGCCCCTTTCCCTTCGTGCCCCCGGCAGCCT
 121 CCAGCGTCGGTCCCCAGGCAGCATGGTGAGGTCTGCTCCCGGACCCCTCGCCACCATGTAC
 181 GTGAGCTACCTCCTGGACAAGGACGTGAGCATGTACCCTAGCTCCGTGCGCCACTCTGGC
 241 GGCCTCAACCTGGCGCCGAGAACTTCGTGAGCCCCCGCAGTACCCGGACTACGGCGGT
 301 TACCACGTGGCGGCCGAGCTGCAGCGGCAGCGAACTTGGACAGCGCGCAGTCCCCGGGG
 361 CCATCCTGGCCGGCAGCGTATGGCGCCCCACTCCGGGAGGACTGGAATGGCTACGCGCC
 421 GGAGGCGCCGCGGCCGCCAACGCCGTGGCTCACGGCCTCAACGGTGGCTCCCCGGCC
 481 GCAGCCATGGGCTACAGCAGCCCCGAGACTACCATCCGCACCACCACCCGCATCACCAC
 541 CCGCACCACCCGGCCGCCGCGCCTTCTGCGCTTCTGGGCTGCTGCAAACGCTCAACCCC
 601 GGCCCTCCTGGGCCCGCCGCCACCGCTGCCGCCGAGCAGCTGTCTCCCGCGGCCAGCGG
 661 CGGAACCTGTGCGAGTGGATGCGGAAGCCGCGCAGCAGTCCCTCGGCAGCCAAGTGA
 721 ACCAGGACGAAAGACAAATATCGAGTGGTGTACACGGACCACCAGCGGCTGGAGCTGGAG
 781 AAGGAGTTTCACTACAGTCGCTACATCACCATCCGGAGGAAAGCCGAGCTAGCCGCCAGC
 841 CTGGGGCTCTCTGAGAGGCAGGTTAAAATCTGGTTTCAGAACCCGAGAGCAAAGGAGAGG
 901 AAAATCAACAAGAAGAAGTTGCAGCAGCAACAGCAGCAGCCACCACAGCCGCTCCG
 961 CCGCCACCACAGCCTCCCCAGCCTCAGCCAGGTCTCTGAGAAGTGTCCAGAGCCCTTG
 1021 AGTCCGGTGTCTTCCCTGCAAGCCTCAGTGCCTGGCTCTGTCCCTGGGGTTCTGGGGCCA
 1081 ACTGGGGGGGTGCTAAACCCCACCGTCACCCAGTGA~~CCCACCGGGTCTGCAGCGGCAGA~~
 1141 GCAATTCCAGGCTGAGCCATGAGGAGCGTGGACTCTGCTAGACTCCTCAGGAGAGACCCC
 1201 TCCCCTCCCACCCACAGCCATAGACCTACAGACCTGGCTCTCAGAGGAAAAATGGGAGCC
 1261 AGGAGTAAGACAAGTGGGATTTGGGGCCTCAAGAAATATACTCTCCAGATTTTACTTT
 1321 TTCCCATCTGGCTTTTTCTGCCACTGAGGAGACAGAAAGCCTCCGCTGGGCTTCATTCGG
 1381 GACTGGCAGAAGCATTGCCTGGACTGACCACACCAACCAGGCCTTCATCCTCCTCCCCAG
 1441 CTCTTCTCTTCTTAGATCTGCAGGCTGCACCTCTGGCTAGAGCCGAGGGGAGAGAGGGAC
 1501 TCAAGGAAAGGCAAGCTTGAGGCCAAGATGGCTGCTGCCTGCTCATGGCCCTCGGAGGT
 1561 CCAGCTGGGCCTCCTGCCTCCGGGCAGGCAAGGTTTACACTGCGGAAGCCAAAGGCAGCT
 1621 AAGATAGAAAGCTGGACTGACCAAGACTGCAGAACCCCCAGGTGGCCTGCGTCTTTTTT
 1681 CTCTTCCCTTCCCAGACCAGGAAAGCCTTGGCTGGTGTATGCACAGGGTGTGGTATGAGG
 1741 GGGTGGTTATTGGACTCCAGGCCTGACCAGGGGGCCGAACAGGGACTTGTTTAGAGAGC
 1801 CTGTCACCAGAGCTTCTCTGGGCTGAATGTATGTCAGTGCTATAAATGCCAGAGCCAACC
 1861 TGGACTTCTGTCATTTTTACAATCTTGGGGCTGATGAAGAAGGGGTGGGGGGAGTTTG
 1921 TGTTGTTGTTGCTGCTGTTTTGGGTTGTTGGTCTGTGTAACATCCAAGCCAGAGTTTTTAA
 1981 AGCCTTCTGGATCCATGGGGGGAGAAGTGATATGGTGAAGGGAAGTGGGGAGTATTTGAA
 2041 CACAGTTGAATTTTTTCTAAAAAGAAAAAGAGATAAATGAGCTTTCAGATTTCA

Anhang 2: Immunhistochemische Färbung des CDX2-Proteins

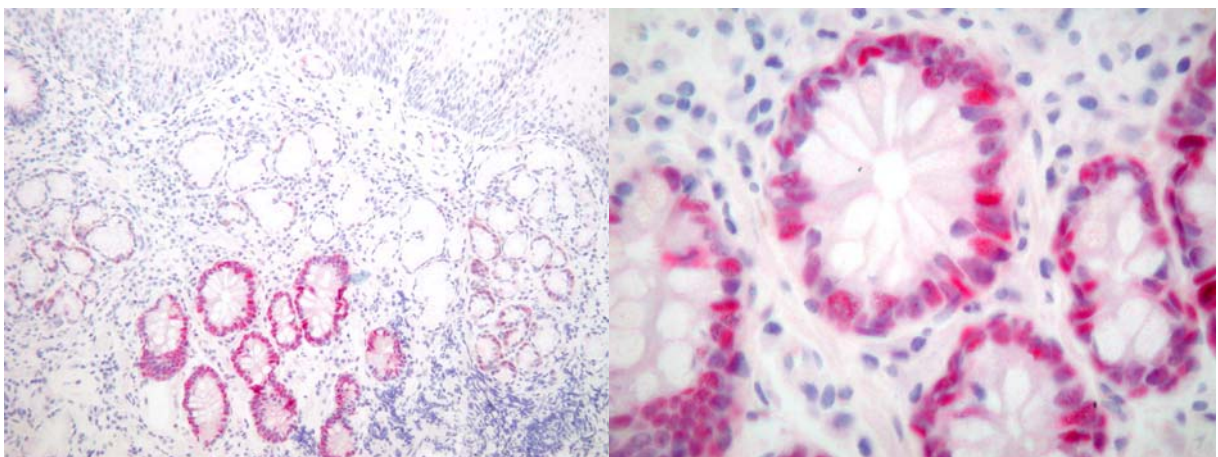
Abgebildet sind exemplarisch Proben mit positivem immunhistochemischen Nachweis des CDX2-Proteins im Epithel, jeweils in 10-facher (links) und 40-facher (rechts) Vergrößerung.



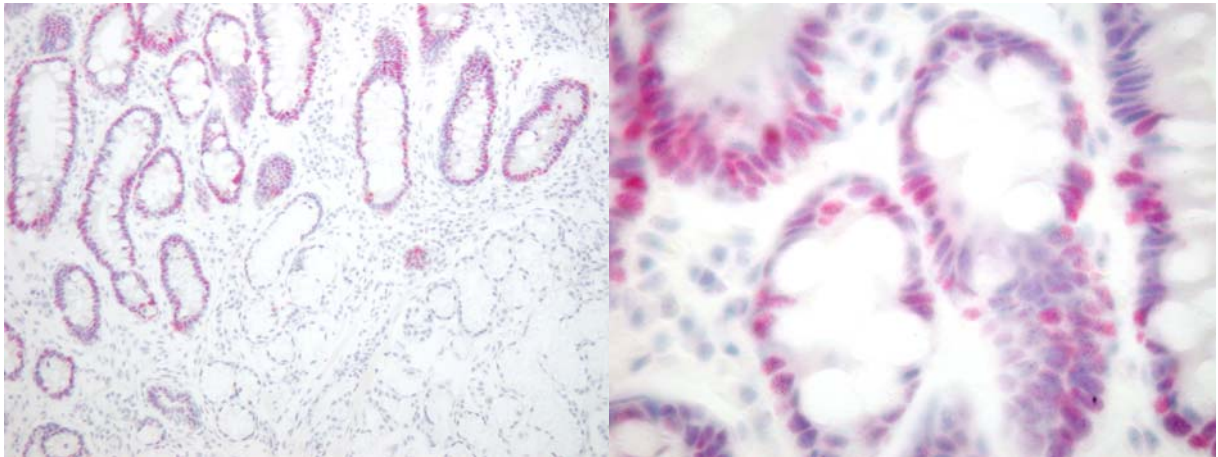
a) Duodenalschleimhaut als Positivkontrolle



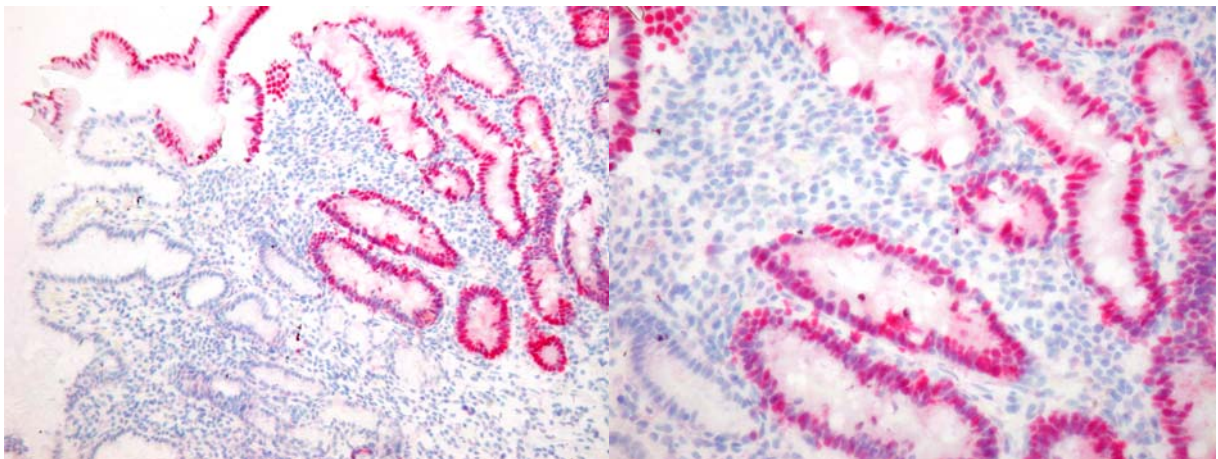
b) Barrett-Metaplasie (Längsschnitt)



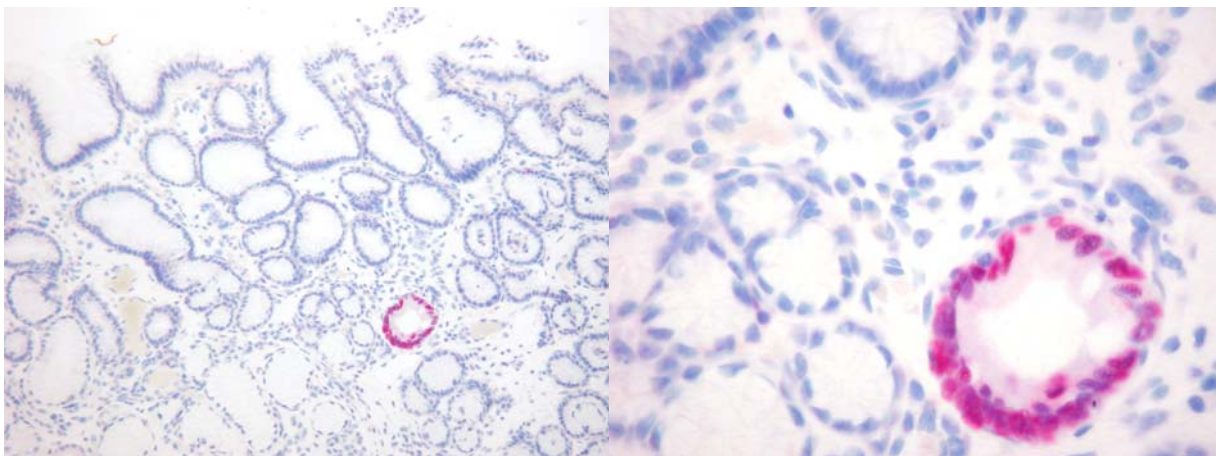
c) Barrett-Metaplasie (Querschnitt)



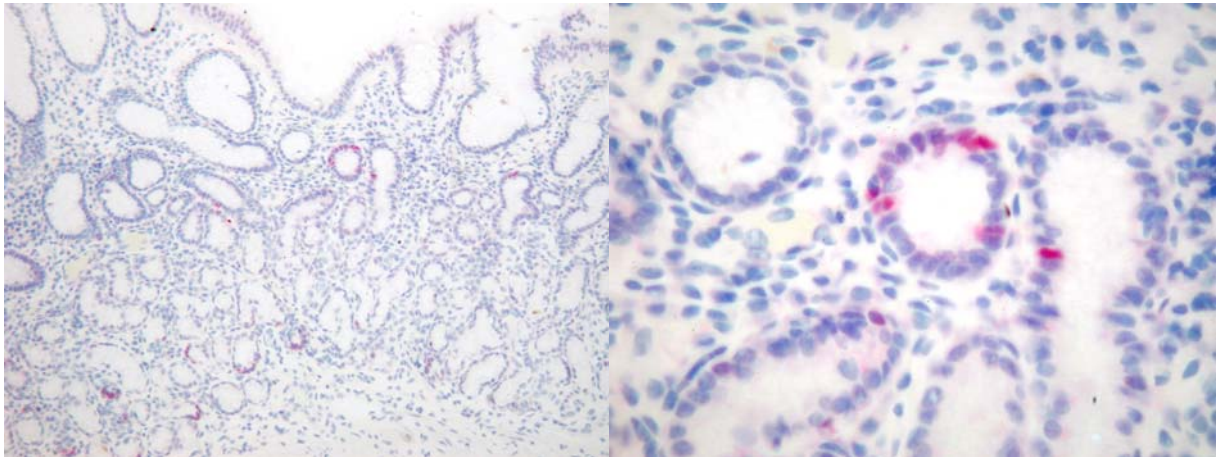
d) Intestinale Metaplasie im Antrum eines *H.pylori*-positiven Patienten



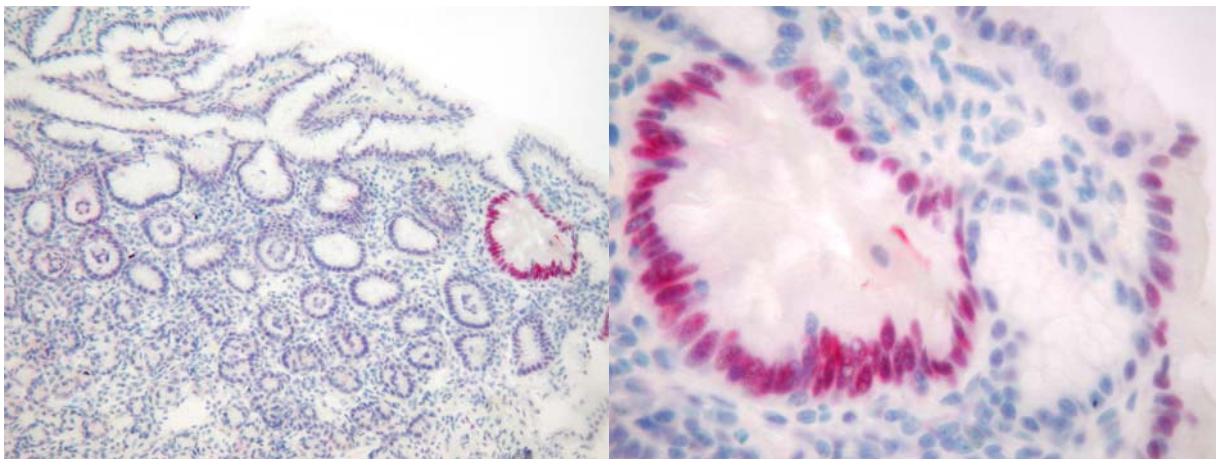
e) Intestinale Metaplasie im Antrum eines *H.pylori*-positiven Patienten



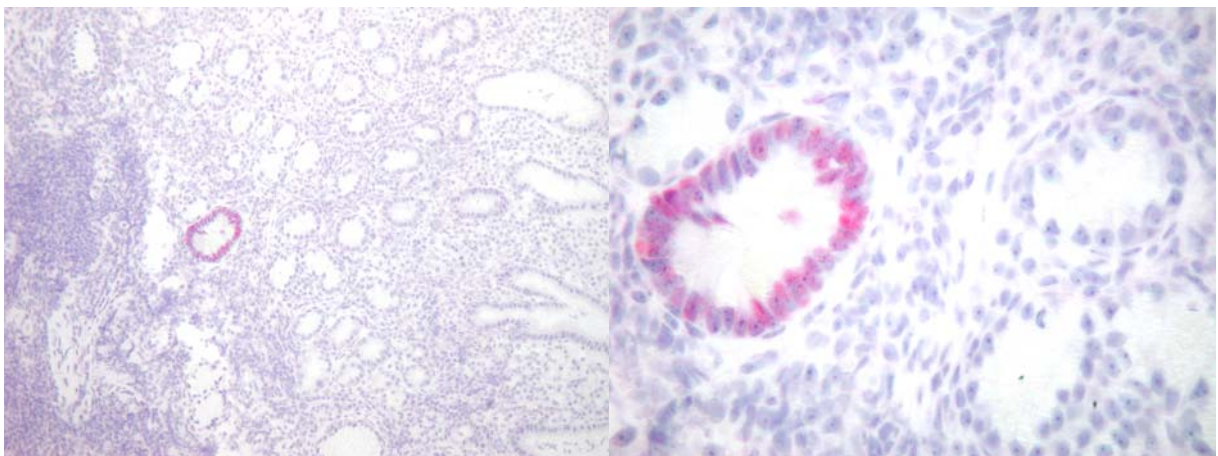
f) Antrum-Gastritis ohne intestinale Metaplasie eines *H.pylori*-positiven Patienten



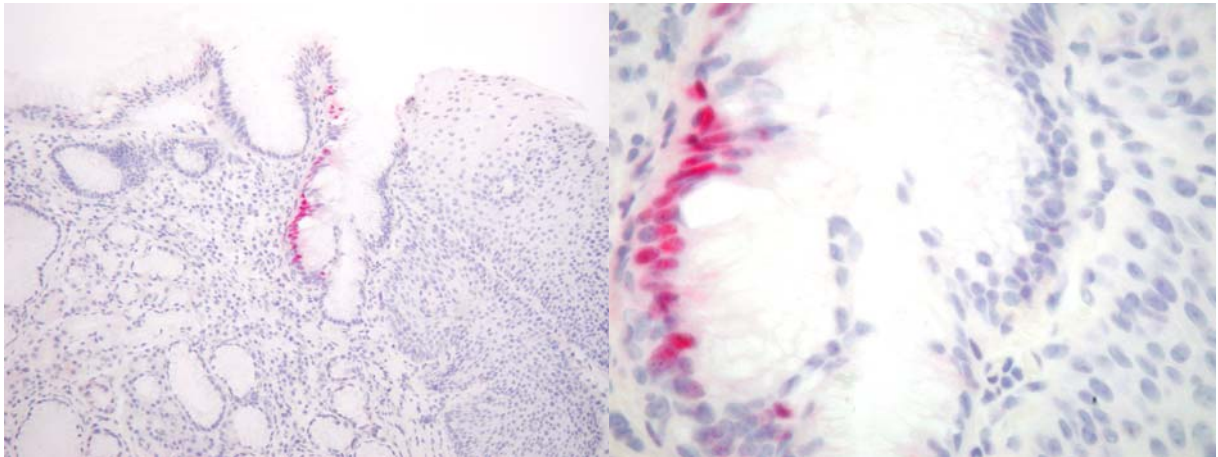
g) Antrum-Gastritis ohne intestinale Metaplasie eines *H.pylori*-positiven Patienten



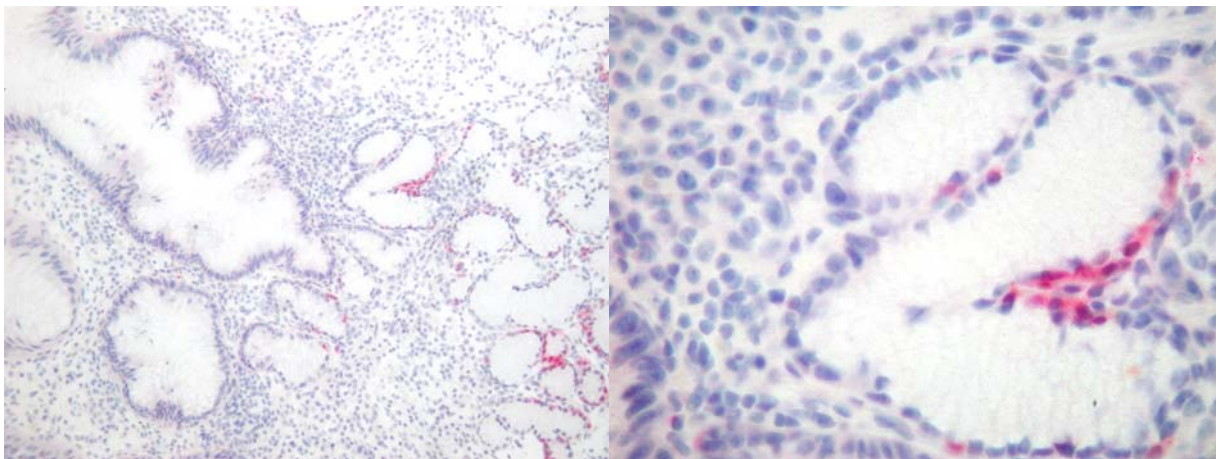
h) Antrum-Gastritis ohne intestinale Metaplasie eines *H.pylori*-negativen Patienten



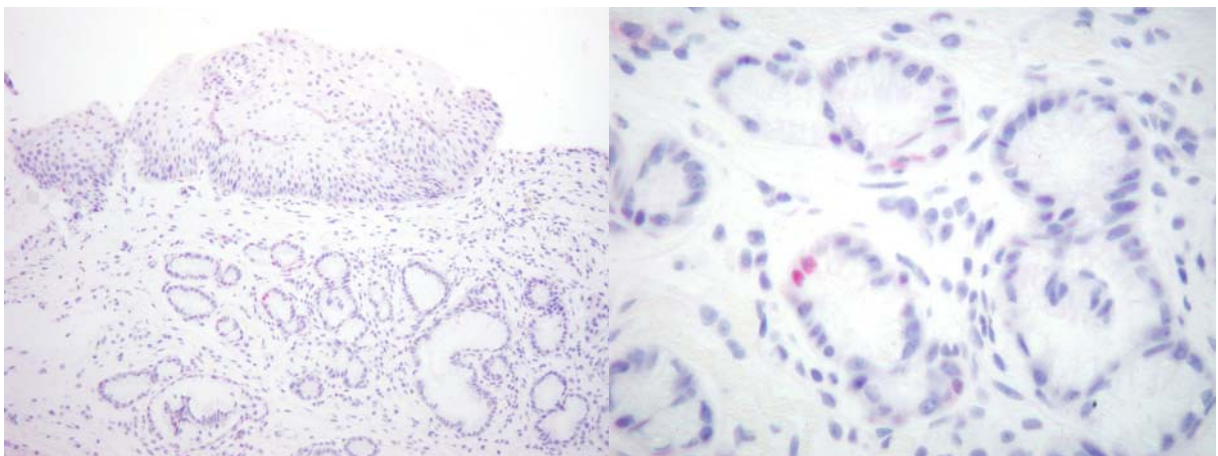
i) Korpus-Gastritis ohne intestinale Metaplasie eines *H.pylori*-positiven Patienten



j) Karditis ohne intestinale Metaplasie eines *H.pylori*-positiven Patienten mit GERD



k) Karditis ohne intestinale Metaplasie eines *H.pylori*-negativen Patienten mit GERD



l) Karditis ohne intestinale Metaplasie eines *H.pylori*-negativen Patienten ohne GERD

Danksagungen

Ich möchte mich bei all jenen bedanken, die mich in den letzten Jahren bei diesem Projekt unterstützt haben und ohne die diese Dissertation nicht möglich geworden wäre.

Bei Herrn Professor Dr. med. Peter Malfertheiner, der mich vor einigen Jahren im Laufe einer recht langatmigen Fakultätsratssitzung angesprochen hatte, ob ich nicht Interesse hätte, ein Promotionsthema in seiner Klinik zu übernehmen. Die durch ihn vermittelte Begeisterung für die Gastroenterologie war eine große Motivation für diese Arbeit und der Grund dafür, sich auch klinisch für dieses Fach zu entscheiden.

Bei Herrn Privatdozenten Dr. rer. nat. Thomas Wex möchte ich mich für endlose Geduld in den letzten Jahren bedanken. Ohne ihn wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen. Er brachte mir nicht nur die experimentelle Methodik im Zusammenhang mit dieser Arbeit bei, sondern auch die Grundzüge wissenschaftlichen Arbeitens.

Unter anderem verdanke ich letztendlich ihm die Einsicht, dass es sinnvoller ist, einen Abstract (trotz diverser Veranstaltungen und Verpflichtungen) auch schon mal zwei Wochen vor „deadline“ fertig zu stellen, anstatt in der Nacht vor Ablauf der Einreichungsfrist. (Entschuldige bitte nochmals einige der Abstracts, die Du lesen und korrigieren musstest.)

Danke für die exzellente fachliche Betreuung, die allzeit offene Tür und das allzeit offene Ohr!

Ein ganz besonderer Dank gilt Nadine Schüler, Simone Philipsen und Ursel Stolz, die ebenfalls nicht müde geworden sind, ihre fachlichen Kenntnisse und Fertigkeiten zu vermitteln und eine große Unterstützung bei der Durchführung der Experimente waren. Darüber hinaus waren sie im Wesentlichen für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor verantwortlich, aufgrund der es immer großen Spaß gemacht hat, dort zu arbeiten.

Großer Dank gebührt auch Frau Dr. med. Dörthe Küster für die hervorragende Betreuung der Studie seitens des Instituts für Pathologie. Frau Dr. Küster war eine wesentliche Stütze in diesem Projekt, sei es durch die histologische Befundung der Biopsien oder die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Danke auch an Herrn Chefarzt Privatdozent Dr. med. Ulrich Peitz für die klinische Betreuung des Projekts sowie ihm, Herrn Oberarzt Dr. med. Klaus Mönkemüller und dem gesamten Team der Endoskopie der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie für die Entnahme und Katalogisierung der Gewebeproben.

Ein besonderer Dank gilt auch Professor Irvin Modlin und Dr. Mark Kidd von der GI Surgical Research Group der Yale School of Medicine. Durch Ihre freundliche Unterstützung war es mir möglich, trotz Erfüllung meiner Arbeiten und Pflichten vor Ort den ersten Entwurf dieser Dissertation zu verfassen. Darüber hinaus waren sie – da in dem Projekt nicht involviert - meine ersten „externen Gutachter“ und haben nachhaltig meinen Sinn für wissenschaftliche Präzision geschliffen (auch wenn dieser Prozess bei Weitem noch nicht abgeschlossen ist).

Danke auch die anderen Doktoranden der Klinik, insbesondere Michael Selgrad, Christian Meinhardt und im Speziellen Arne Kandulski. Zusammen haben wir zahlreiche Stunden (oder vielmehr Tage) im Labor verbracht, uns auf Präsentationen und Tagungen vorbereitet und uns durch gegenseitige kritische Begutachtung angespornt oder auch mal in produktivem Sinne zur Weißglut getrieben.

Diese Dissertation sowie auch mein gesamtes Studium wären nicht möglich gewesen ohne die Unterstützung meiner Eltern Manfred Bornschein und Anke Hlauschka-Bornschein und meiner Großmutter Barbara Hlauschka-Steffe. Sie haben mir mein Studium nicht nur ermöglicht, sondern mich auch dazu ermutigt und mir auch auf Durststrecken immer wieder das Gefühl gegeben, dass meine Arbeit einem sinnvollen Ziel dient. Ich hoffe, dass ich Euch in Zukunft etwas von dem zurückgeben kann, was Ihr mir gegeben habt!

An alle Genannten und an alle, die ich vergessen haben sollte: DANKE!

Erklärung

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

**„Expression der intestinalen Transkriptionsfaktoren Cdx1 und Cdx2
in der gastralen Mukosa unter Einfluss der
Helicobacter pylori-Infektion und der
gastroösophagealen Refluxerkrankung“**

in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. med. Peter Malfertheiner und Herrn PD Dr. rer. nat. Thomas Wex

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

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

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

Magdeburg, den 22.04.2007

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Bornschein
Vornamen: Jan Alexander
Geburtsdatum: 02.07.1980

Geburtsort: Baden-Baden

Wohnhaft: Hegelstr. 21
 39104 Magdeburg

Schulische Ausbildung

Grundschule: 1986-1990 Klosterschule Lichtenthal, Baden-Baden
Gymnasium: 1990-1999 Gymnasium Hohenbaden, Baden-Baden
Abiturnote: 1.0

Zivildienst

1999/2000 Stadtklinik Baden-Baden, Abteilung für Viszeral- und Gefäßchirurgie (OP und Station)

Hochschulstudium

10/2000-11/2006 Studium der Humanmedizin and der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

 11/2006 Staatsexamen: Note 1.83
 12/2006 Approbation als Arzt

 03/2003 Famulatur an der Stadtklinik Baden-Baden (Klinik für Chirurgie)
 03/2004 Famulatur am Universitätsklinikum Magdeburg (Ambulanz der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie)
 08/2004 Famulatur am Adelaide&Meath Hospital, Trinity College Dublin, Irland (Klinik für Gastroenterologie)
 03/2005 Famulatur am Groote-Schuur-Hospital, Cape Town University, Kapstadt, Südafrika (Klinik für Traumatologie/Notaufnahme)

- 10/2005-09/2006 Praktisches Jahr
1. Terial: Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Klinik für Anästhesie, Intensivmedizin und Schmerztherapie)
 2. Terial: Adelaide&Meath Hospital, Trinity College Dublin, Irland (Klinik für Gastroenterologie)
 3. Terial: Yale New Haven Hospital, Yale School of Medicine, New Haven, CT, USA (Klinik für Viszeralchirurgie)

Berufliche Laufbahn

Seit 01/2007 Assistenzarzt in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie am Universitätsklinikum der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Promotion

04/2003 Beginn der experimentellen Promotionsarbeit in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Thema: Expression von Cdx1 und Cdx2 in der gastralen Mukosa unter Einfluss von *Helicobacter pylori*-Infektion und gastroösophagealer Refluxerkrankung

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Buchkapitel

Modlin IM, **Bornschein J**, Kidd M:
Gastrointestinal carcinoids
in “Gastrointestinal Oncology – A multidisciplinary approach” Jankowski J, Sampliner R,
Kerr D, Fong Y (eds) (2006) (in press).

Modlin IM, Latich I, Drozdov I, **Bornschein J**, Kidd M:
Somatostatin analog therapy
in “Molecular targeting in oncology” Kaufman HL (ed) Humana Press (2006) (in press).

Originalarbeiten (peer-reviewed)

Modlin IM, Champaneria MC, **Bornschein J**, Kidd M:
Evolution of the Diffuse Neuroendocrine System – Clear Cells and Cloudy Origins
Neuroendocrinology 2006; 84: 69-82.

Poster

Bornschein J, Peitz U, Wex T, Gebert I, Vieth M, Roessner A, Malfertheiner P:
Die Genexpression des epithelialen Transkriptionsfaktors CDX-2 ist in der Magen- und
Kardiaschleimhaut von Patienten mit chronischer Entzündung und Barrett-Ösophagus
signifikant erhöht.
13. Kongress der Mitteldeutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, 6.-8. Mai 2005, Suhl,
Deutschland.
Preis „Bestes Poster in der Sektion Magen/Ösophagus“

Bornschein J, Peitz U, Wex T, Gebert I, Vieth M, Roessner A, Malfertheiner P:
In der Kardiaschleimhaut von Patienten mit Barrett-Ösophagus ist die erhöhte CDX2-
Expression unabhängig vom histologischen Nachweis einer intestinalen Metaplasie.
59. Jahrestagung der DGVS, 1.-4. September 2004, Leipzig, Deutschland.

Wex T, Peitz U, **Bornschein J**, Vieth M, Roessner A, Malfertheiner P:
CDX-2 is up-regulated in cardia mucosa of patients with chronic inflammation induced by
H.pylori or Gastroesophageal Reflux Disease (GERD).
XVIIth. International Workshop of the Helicobacter Study Group, 22.-24. September 2004,
Wien, Österreich.

Bornschein J, Wex T, Peitz U, Küster D, Roessner A, Malfertheiner P:
Nachweis einer Induktion der CDX2-Genexpression in der Antrumschleimhaut von Patienten mit Refluxerkrankung ohne Vorliegen einer Gastritis.
14. Kongress der Mitteldeutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, 5.-7. Mai 2005, Bad Nauheim, Deutschland.

Wex T, Peitz U, **Bornschein J**, Vieth M, Roessner A, Malfertheiner P:
Upregulation Of Cdx-2 in Cardia Mucosa Of Patients With Barrett's Esophagus Is Independent Of Chronic Inflammation and the Presence Of Intestinal Metaplasia in the Cardia Mucosa Of These Patients.
Digestive Disease Week, 14.-19. Mai 2005, Chicago, USA.

Bornschein J, Peitz U, Wex T, Küster D, Roessner A, Malfertheiner P:
Die durch die *H.pylori*-Infektion und Refluxerkrankung induzierte CDX2-Expression in der Antrum- und Kardiaschleimhaut korreliert unterschiedlich mit dem Entzündungsgrad.
60. Jahrestagung der DGVS, 14.-17. September 2005, Köln, Deutschland.

Bornschein J, Wex T, Küster D, Roessner A, Malfertheiner P:
Einfluss von *H.pylori*-Infektion und GERD auf die Expression von Cdx2 in der gastralen Mukosa
16. Kongress der Mitteldeutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, 10.-12. Mai 2007, Dessau, Deutschland.