

Aus dem Institut für Pathologie  
(Direktor: Prof. Dr. med. A. Roessner)  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

# **Untersuchungen am Mausmodell zur Bedeutung von Kathepsin X in der gastralen Karzinogenese**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
Dr. med.  
(doctor medicinae)

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

vorgelegt von Katrin Frauenschläger  
aus Leipzig  
Magdeburg 2015

## Dokumentationsblatt

### Kurzreferate

**Frauenschlaeger, K.**, Schlien, J., Schmidt, S., Jechorek, D., Roessner, A., Franke, S. Inhibition von Cathepsin X beeinflusst die Immunantwort in *Helicobacter pylori*-infizierten Mäusen. 98. Jahrestagung der DGP in Berlin 2014.

**Frauenschlaeger, K.**, Schlien, J., Schmidt, S., Jechorek, D., Roessner, A., Franke, S. Inhibition of Cathepsin X influences the immune response to *Helicobacter pylori*-infected mice. EAGEN Symposium in Berlin 2014.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	1
<b>1.1 <i>H. pylori</i></b>	1
1.1.1 Bakteriologie und Virulenzfaktoren	2
1.1.2 <i>H. pylori</i> -assoziierte Erkrankungen	3
<b>1.2 Das Magenkarzinom</b>	3
1.2.1 Epidemiologie und Prognose	4
1.2.2 Ätiologie	4
1.2.3 Gastritis	5
1.2.4 Vorläuferläsionen	6
<b>1.3 Gastrale Karzinogenese im Mausmodell</b>	7
<b>1.4 Kathepsine</b>	8
<b>1.5 Vorarbeiten</b>	9
<b>2 Zielsetzung der Arbeit</b>	11
<b>3 Material und Methoden</b>	12
<b>3.1 Material</b>	12
3.1.1 Technische Voraussetzungen	12
3.1.2 Versuchstiere	12
Mausstämme	12
Genetisches Profil/ Kreuzungen	12
Haltung	13
3.1.3 <i>H. pylori</i>	13
Stamm <i>H. pylori</i> Sydney strain 1	13
<b>3.2 Methoden</b>	14
3.2.1 Versuchsaufbau	14
3.2.2 Kultivierung von <i>H. pylori</i>	14
3.2.3 Orale Infektion	15
3.2.4 Infektionsnachweis	15
3.2.5 Abbruchkriterien	16
3.2.6 Tötung und Materialgewinnung	16

3.2.7 Gewebepräparation und Schnitthanfertigung	16
3.2.8 Anatomie und Histomorphologie	17
3.2.9 Beurteilung histomorphologischer Veränderungen: modifizierte Klassifikation nach Rogers	18
3.2.10 Molekularbiologische Methoden (PCR-Nachweis von <i>H. pylori</i> )	22
3.2.11 Statistik	22
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Kollektiv</b>	<b>23</b>
<b>4.2 Geschlecht</b>	<b>23</b>
<b>4.3 <i>H. pylori</i>-PCR</b>	<b>23</b>
<b>4.4 Entzündung</b>	<b>25</b>
4.4.1 Chronizität	25
4.4.2 Aktivität	27
<b>4.5 Oxyntische Atrophie</b>	<b>28</b>
<b>4.6 Metaplasie</b>	<b>30</b>
4.6.1 Intestinale Metaplasie	30
4.6.2 SPEM	31
<b>4.7 Intraepitheliale Neoplasie</b>	<b>32</b>
<b>4.8 Epitheldefekte</b>	<b>34</b>
<b>4.9 Foveoläre Hyperplasie</b>	<b>35</b>
<b>4.10 Regeneratepithel</b>	<b>37</b>
<b>4.11 Zystische Schleimhautveränderungen</b>	<b>38</b>
<b>4.12 Herniation</b>	<b>40</b>
<b>4.13 Vergleich mit CXW</b>	<b>42</b>
<b>5 Diskussion</b>	<b>44</b>
<b>5.1 <i>H. pylori</i>-Kolonisationsfähigkeit</b>	<b>45</b>
<b>5.2 Geschlecht</b>	<b>46</b>
<b>5.3 Correa-Kaskade</b>	<b>47</b>
<b>5.4 Weitere histomorphologische Veränderungen</b>	<b>49</b>
<b>5.5 Zielmoleküle von Kathepsin X</b>	<b>51</b>
<b>5.6 Einfluss von Maustyp und Infektion</b>	<b>52</b>
<b>5.7 Schlussfolgerungen</b>	<b>54</b>
<b>5.8 Anwendung</b>	<b>55</b>
<b>5.9 Kritische Betrachtung</b>	<b>56</b>

## INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>6 Zusammenfassung</b>	57
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	58
<b>8 Danksagung</b>	65
<b>9 Ehrenerklärung</b>	66
<b>10 Anhang</b>	67

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BHI	Brain-heart Infusionsmedium
cagA	Cytotoxin associated gene A
cagPAI	Cytotoxin assoziierte Pathogenitätsinsel
CFU	Colony forming unit
CXG	INS-GAS-Maus mit Kathepsin X-knockout
CXW	Maus mit Kathepsin X-knockout in FVB/N-Hintergrund ( <i>ctsz</i> <sup>-/-</sup> )
DNA	Desoxyribonucleinsäure
FVB/N	Genutzter Maus-Inzuchtstamm
HE	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
<i>H. felis</i>	<i>Helicobacter felis</i>
HpSS1	<i>Helicobacter pylori</i> Sydney stain 1
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IARC	The International Agency for Research on Cancer
IG	INS-GAS-Maus (insulin-gastrin transgenic mice, INS-GAS/FVB/N)
IM	Intestinale Metaplasie
IVC	<i>Individually ventilated cages</i>
KCXG	nicht infizierte Kontrollgruppe für CXG
KCXW	nicht infizierte Kontrollgruppe für CXW
KIG	nicht infizierte Kontrollgruppe für IG
L.	Lamina
LPS	Lipopolysaccharide
MALT	Mucosa associated lymphatic tissue
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
mpi	Monate <i>post infectionem</i>
M.	Muscularis
MNU	N-methyl-N-nitrosamin
OMP	Oberflächenmembranprotein
PCR	Polymerasekettenreaktion
SPEM	Spasmolytic polypeptide expressing metaplasia
SPF	Spezifische pathogenfreie Bedingungen
T4SS	Typ IV-Sekretionssystem
TFF2	Trefoil factor 2
TierSchG	Tierschutzgesetz
u. a.	unter anderem

vacA	vakuolisierendes Zytotoxin
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wpi	Wochen <i>post infectionem</i>

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: modifizierte Klassifikation nach Rogers

Tabelle 2: Name und Anschrift des Züchters

Tabelle 3: Geräte

Tabelle 4: Labormaterialien

Tabelle 5: Reagenzien

Tabelle 6: Antibiotika

Tabelle 7: Antikörper

Tabelle 8: Kits



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: *H. pylori*-Erstbeschreibung

Abb. 2: Correa-Kaskade der gastralen Karzinogenese

Abb. 3: Resektion und Präparation des Magens

Abb. 4: Histomorphologie des Mausmagens

Abb. 5: Vergleichende histomorphologische Verlaufs-Übersicht von CXG, IG und CXW

Abb. 6: Statistische Auswertung der *H. pylori*-Besiedelung (PCR-Werte)

Abb. 7: Chronische Entzündung

Abb. 8: Statistische Auswertung der chronischen Entzündung

Abb. 9: Akute Entzündung

Abb. 10: Statistische Auswertung der akuten Entzündung

Abb. 11: Oxyntische Atrophie

Abb. 12: Statistische Auswertung der oxyntischen Atrophie

Abb. 13: Intestinale Metplasie und SPEM

Abb. 14: Statistische Auswertung der intestinalen Metaplasie

Abb. 15: Statistische Auswertung der SPEM

Abb. 16: Intraepitheliale Neoplasie und Adenokarzinom

Abb. 17: Statistische Auswertung der intraepithelialen Neoplasien

Abb. 18: Epitheldefekte

Abb. 19: Statistische Auswertung der Epitheldefekte

Abb. 20: Foveoläre Hyperplasie

Abb. 21: Statistische Auswertung der foveolären Hyperplasie

Abb. 22: Regeneratepithel

Abb. 23: Statistische Auswertung des Regeneratepithels

Abb. 24: Zystische Schleimhautveränderungen

Abb. 25: Statistische Auswertung der zystischen Schleimhautveränderungen

Abb. 26: Schleimhaut-Herniation

Abb. 27: Statistische Auswertung der Herniation

Abb. 28: Statistische Auswertung der Herniationstiefe

# 1 Einleitung

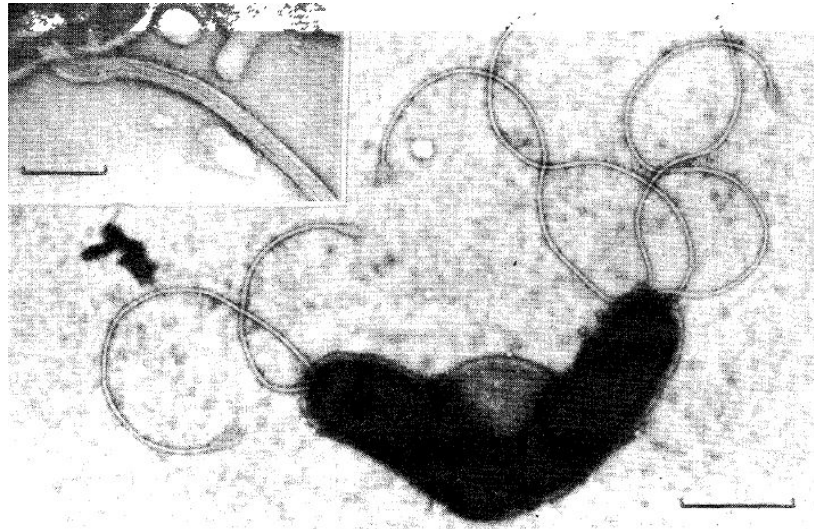
In der Gruppe der Kathepsine, welche als primär lysosomale Proteasen an mehreren physiologischen und auch pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind, wurden bereits zahlreiche Vertreter identifiziert [52]. Unter diesen nimmt Kathepsin X aufgrund seiner Molekülstruktur und seiner enzymatischen Funktionsweise eine Sonderstellung ein [70]. Als einziger Vertreter seiner Gruppe wird es gastral sowohl im Rahmen einer *H. pylori*-Infektion, als auch im Magenkarzinom überexprimiert [10, 49]. Die pathophysiologischen Zusammenhänge sind hierbei noch weitgehend ungeklärt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich, aufbauend auf vorangegangenen Untersuchungen, mit einem Tiermodell zur Identifikation der Rolle von Kathepsin X in der helicobacterassoziierten fortgeschrittenen gastralen Karzinogenese.

## 1.1 *H. pylori*

Im Jahr 1983 wurde durch J. R. Warren und B. Marshall erstmals ein spiralig gewundenes, gebogenes Bakterium in der gastralen Antrum mukosa von Patienten mit aktiv-chronischer Gastritis, Duodenalulzera und Magenulzera beschrieben. Zunächst wurde dieses Bakterium, welches in Abb. 1 dargestellt ist, der Gattung *Campylobacter* zugeordnet [63, 112]. Die in den darauffolgenden Jahren durchgeführten Untersuchungen zeigten allerdings biochemische und strukturelle Unterschiede zu *Campylobacter* und anderen Enterobakterien [33, 53]. Aufgrund dessen wurde dieses Bakterium 1989 als Vertreter einer neuen Gattung postuliert und in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) umbenannt [32]. Für die Erstbeschreibung von *H. pylori* erhielten die Australier J. R. Warren und B. Marshall im Jahr 2005 den Medizin nobelpreis.

Es konnte gezeigt werden, dass *H. pylori* bereits seit 60000 Jahren in enger Ko-Evolution mit dem Menschen steht. Anhand unterschiedlicher DNA-Sequenzen der *H. pylori*-Stämme war es möglich, die geographische Ausbreitung des Menschen ausgehend von Afrika zu rekapitulieren [23, 65].

Die Prävalenz von *H. pylori* liegt in den industrialisierten Ländern zwischen 20% und 50%, in Entwicklungsländern sogar bei über 80%. Bei nahezu der Hälfte der Weltbevölkerung liegt eine Infektion vor [62]. Diese erfolgt meist in der frühen Kindheit und persistiert ohne Eradikation ein Leben lang [6].



**Abb. 1: *H. pylori*-Erstbeschreibung [112]**

Nahaufnahme von *H. pylori* mit kommaförmiger Struktur und 6 Flagellen; Inset: Detailaufnahme einer Flagelle und seiner Insertionsstelle

### 1.1.1 Bakteriologie und Virulenzfaktoren

*H. pylori* ist ein mikroaerophiles und spiralig gewundenes, gramnegatives Stäbchenbakterium, das auf der Oberfläche des Magenepithels vorkommt. Durch den Besatz mit 4 bis 6 Flagellen ist es in der Lage, sich aktiv in der Muzinschicht des Magenepithels zu bewegen [62, 63, 79].

Das Bakterium nimmt mit zahlreichen Virulenzfaktoren Einfluss auf das klinische Outcome der Patienten. Diese lassen sich in 3 Hauptkategorien unterteilen. Zunächst gibt es stammspezifische Gene, die nur in manchen *H. pylori*-Stämmen vorkommen. Hierzu zählt u. a. *cagPAI*. Bei Kontakt mit den Epithelzellen wird das Onkoprotein *cagA* mittels eines über *cagPAI* codierten Typ IV Sekretionssystems (T4SS) in die Zelle eingeschleust. Hierdurch werden Funktionen der zellulären Signaltransduktion wie auch die Zellmorphologie modifiziert. Diese Ereignisse sind mit einer verstärkten onkogenen Transformation assoziiert. Die zweite Gruppe wird aus phasenvariablen Genen gebildet, deren Expression im Rahmen von Wachstum oder Umweltfaktoren geändert, und damit an die neuen Bedingungen angepasst werden kann. Als Beispiel hierfür gelten 6 Oberflächenmembranproteine (OMPs), die in allen *H. pylori*-Stämmen vorkommen und u. a. als Adhäsine wirken: *oipA*, *sabA*, *sabB*, *babA*, *babC*, and *hopZ*. Die dritte Gruppe wird durch Gene mit variabler Struktur beziehungsweise Genotyp, abhängig vom Stamm, gebildet. Als Vertreter dieser Gruppe lässt sich *vacA* nennen. *VacA* ist ein zytotoxisches Polypeptid, das eine Vakuolisierung der Epithelzellen initiiert, die intrinsische Apoptose triggert und die Aktivität von Immunzellen beeinflusst [12, 79, 116].

Das Enzym Urease ist ein überlebenswichtiger Virulenzfaktor für *H. pylori*. Durch die Hydrolyse von Harnstoff wird neben Kohlenstoffdioxid auch Ammoniak gebildet, der das Bakterium gegen das saure Magenmilieu schützt [21, 36, 86]. Mit Hilfe von Urease und Flagellen kolonisiert *H. pylori* den Magen. Um nicht abgeschwemmt zu werden und Nährstoffe leichter zu erreichen, ist anschließend eine Adhärenz zu den Magenepithelien nötig. Da diese gleichzeitig näheren Kontakt zu den Zellen der Immunabwehr mit sich führt, hat *H. pylori* eine hohe genetische Diversität entwickelt [12].

### 1.1.2 *H. pylori*-assoziierte Erkrankungen

*H. pylori* gilt inzwischen als Hauptverursacher von chronischen Gastritiden und der peptischen Ulkuskrankheit. Darüber hinaus ist das Bakterium an der Entstehung von MALT-Lymphomen und über 90% aller Adenokarzinome des Magens beteiligt [61]. Letzterem wurde durch die IARC Rechnung getragen, indem *H. pylori* im Jahr 1994 für das Magenkarzinom als Karzinogen erster Ordnung eingestuft wurde [37].

Eine langfristige Entzündung auf dem Boden einer *H. pylori*-Infektion stellt den Hauptmechanismus für die Entstehung eines Magenkarzinoms dar. Dabei gilt die Schleimhautatrophie im Gegensatz zur Entzündung als ein Risikofaktor, der auch nach der Eradikation bestehen bleibt. Weiterhin ist *H. pylori* mit Vitamin B12-Mangel, nicht ulzeröser Dyspepsie, Eisenmangelanämie und thrombozytopenischer Purpura assoziiert [62]. Auch für die Ausbildung kolorektaler Adenome und Karzinome wurde ein gering erhöhtes Risiko im Rahmen einer *H. pylori*-Infektion nachgewiesen [87].

## 1.2 Das Magenkarzinom

Das Magenkarzinom ist das vierthäufigste Karzinom weltweit [24]. Etwa 75% der distalen Magenkarzinome sind mit einer *H. pylori*-Infektion assoziiert, und liegen vor allem im Antrum und Pylorusbereich. Nach histomorphologischen Gesichtspunkten werden durch die Laurén-Klassifikation ein intestinales und ein diffuses Wachstum unterschieden. Beim häufiger auftretenden intestinalen Typ finden sich glanduläre Formationen und ein kohäsives Zellwachstum. Der diffuse Typ liegt vor, wenn die Zellen gering kohäsiv wachsen und keine, oder nur wenig Drüsen ausbilden. Wenn beide Formen in etwa ausgeglichener Menge nebeneinander vorliegen, handelt es sich um einen gemischten Typ. Undifferenzierte Karzinome werden als indeterminant klassifiziert [6, 31, 54].

Das sporadische Magenkarzinom hat 3 Hauptrisikofaktoren: die Infektion mit *H. pylori*, eine spezifische patientenindividuelle Suszeptibilität, und verschiedene Umweltfaktoren.

Das Karzinomrisiko im Rahmen einer *H. pylori*-Infektion ist für den intestinalen und den diffusen Typ nach Laurén etwa gleich hoch [5, 100]. Das distale Magenkarzinom tritt am häufigsten im Antrum beziehungsweise Pylorus an der kleinen oder großen Kurvatur auf. Magenkarzinome werden oft initial über endoskopische Verfahren detektiert. Das makroskopische Wachstumsmuster wird nach der Borrmann-Klassifikation in polypoid (Typ 1), fungiform (Typ 2), ulzeriert (Typ 3) und infiltrativ (Typ 4) untergliedert. Die WHO unterscheidet mehrere histologische Haupttypen. Hierzu zählen das tubuläre, das papilläre und das muzinöse Adenokarzinom, gering kohäsive Karzinome inklusive dem Siegelringzellkarzinom, sowie gemischte Karzinome [6].

### 1.2.1 Epidemiologie und Prognose

Das Magenkarzinom macht mit 7,8% aller Karzinome weltweit das vierthäufigste Malignom aus, und stellt mit mehr als 700000 verstorbenen Patienten pro Jahr die zweithäufigste Krebstodesursache dar. Männer sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen [6, 31, 116]. Die Prognose ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 24% schlecht, zumal die Inzidenz der Therapieresistenz hoch ist [5, 9, 116]. Hochinzidenzgebiete liegen in Ostasien, Osteuropa, und Teilen Zentral-, und Südamerikas [6, 9].

### 1.2.2 Ätiologie

Risikofaktoren sind eine *H. pylori*-Infektion, männliches Geschlecht, Rauchen und eine positive Familienanamnese, wenngleich sich mehr als 90% der Fälle sporadisch entwickeln [9, 82].

*H. pylori* stellt dabei den wichtigsten Faktor für die Entstehung des distalen Magenkarzinoms dar. Im Rahmen einer chronischen Infektion können verschiedene morphologische Veränderungen induziert werden, welche der Entwicklung eines Magenkarzinoms vom intestinalen Typ nach Laurén vorgeschaltet sind. Dazu zählen die chronische Gastritis, Schleimhautatrophie, intestinale Metaplasie und Dysplasie [6].

Das Rauchen wirkt direkt und auch indirekt, über eine Potenzierung der karzinogenen Effekte bei Infektion mit *cagA*-positiven *H. pylori*, begünstigend auf die Entstehung eines Magenkarzinoms. Auch verschiedene diätetische Faktoren spielen eine Rolle, insbesondere für den intestinalen Typ nach Laurén. Hierzu zählt die gesteigerte Aufnahme gepökelter und geräucherter Speisen, von Fleisch allgemein und im

Besonderen von rotem Fleisch. Für die verminderte Aufnahme von Obst und Gemüse konnte vor allem im Zusammenhang mit einer *H. pylori*-Infektion eine gesteigerte Magenkarzinom-Inzidenz nachgewiesen werden. Magenoperationen, insbesondere *Billroth II* mit resultierendem gesteigerten Gallenreflux, stellen einen weiteren Risikofaktor dar [6]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass das Karzinomrisiko auch von den Virulenzfaktoren des Bakteriums abhängt, hier vor allem von *cagA* [5].

### 1.2.3 Gastritis

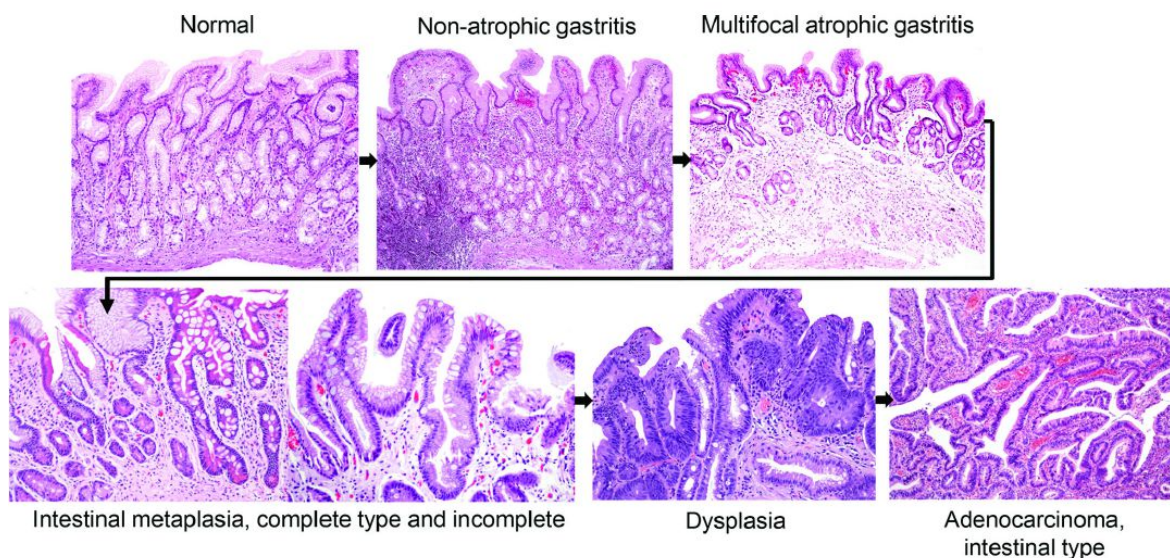
Die Magenschleimhaut verfügt physiologisch über einzelne locker verteilte monozytäre Zellen. Eine Gastritis ist durch eine gesteigerte Zahl mononukleärer Leukozyten (chronische Entzündung) beziehungsweise neutrophiler Granulozyten (akute Entzündung) in der *L. propria* gekennzeichnet [14].

Die Sydney-Klassifikation ermöglicht eine schematische Einteilung der verschiedenen Gastritisformen in Abhängigkeit von Topographie, Histomorphologie und Ätiologie. Die autoimmune Gastritis, oder auch Typ A-Gastritis, geht typischerweise mit der Bildung von Autoantikörpern gegen Parietalzellen einher, und resultiert in einer diffusen oxyntischen Atrophie des Fundus und Corpus ventriculi mit intestinaler Metaplasie und erhöhtem Risiko für Magenkarzinome, vor allem des intestinalen Typs nach Laurén. Die Antrumschleimhaut ist histomorphologisch unauffällig. Klinisch kann sich das Bild einer perniziösen Anämie zeigen. Kreuzreaktive Interaktionen zwischen *H. pylori* und Antigenen des Magenepithels lassen einen ähnlichen Effekt vermuten, der ursächlich oder zumindest unterstützend auf die gastrale Karzinogenese wirkt [6, 14, 100].

Neben der Typ C-Gastritis, einer chemisch-toxischen Form [73], bedingt die Gastritis vom Typ B einen Großteil aller chronischen gastralen Schleimhautentzündungen. Die häufigste Ursache einer Typ B-Gastritis ist die Infektion mit *H. pylori*. Dabei kann die Stärke der Entzündung abhängig vom *H. pylori*-Stamm und den bakteriellen Virulenzfaktoren variieren. Histomorphologisch finden sich sowohl mononukleäre Leukozyten, als auch neutrophile Granulozyten, die das Epithel infiltrieren und Mikroabszesse ausbilden können. Ein weiteres Charakteristikum stellt das Auftreten lymphozytärer Aggregate mit Ausbildung von Keimzentren dar. Diese initial nicht atrophische Gastritis kann persistieren oder in ihrer Stärke zunehmen und Drüsendestruktionen aufweisen. So zeigen *cagA*-positive *H. pylori* in Kombination mit bestimmten *vacA*-Varianten häufiger eine Progression zum Magenkarzinom, während die nicht-atrophische Gastritis mit *cagA*-negativem *H. pylori* ohne erhöhtes Karzinomrisiko einhergeht [14, 100].

### 1.2.4 Vorläuferläsionen

Magenkarzinome, insbesondere vom intestinalen Typ nach Laurén, entstehen wie in Abb. 2 gezeigt auf dem Boden der sogenannten Correa-Kaskade. Dabei handelt es sich um eine definierte sequentielle Abfolge histomorphologischer Veränderungen in der Magenmukosa: chronische Gastritis, Atrophie, intestinale Metaplasie (IM) und mukoide Metaplasie (spasmolytic polypeptide expressing metaplasia, SPEM), Dysplasie und letztlich das invasive Karzinom [13]. Der diffuse Typ nach Laurén entwickelt sich auf dem Boden einer kürzeren, weniger gut charakterisierten Sequenz von Veränderungen der Epithelzellen [116].



**Abb. 2: Correa-Kaskade der gastralen Karzinogenese [29]**

Histomorphologie der Correa-Kaskade ausgehend von unauffälliger Magenschleimhaut bis zum Adenokarzinom vom intestinalen Typ nach Laurén

Die *H. pylori*-Infektion führt stets zu einer chronisch-aktiven Gastritis. Diese Entzündung kann entweder ohne Atrophie persistieren, oder zu einer multifokalen atrophischen Gastritis fortschreiten. Während die Entzündung selbst nicht mit einem erhöhten Karzinomrisiko assoziiert ist, gelten die Schleimhautatrophie und die metaplastischen Veränderungen als präkanzeröse Läsionen [14, 60].

Die Atrophie ist durch einen Verlust des spezifischen Drüsenkörpers gekennzeichnet und stellt den ersten Schritt in der präkanzerösen Kaskade dar. Sie liegt meist herdförmig multifokal vor. Die Ausprägung der Atrophie nimmt dabei im Verlauf zu. Teilweise ist der Verlust des Drüsenkörpers auch mit einer Fibrose der *L. propria* assoziiert [14]. Die der Atrophie folgenden Metaplasien lassen sich in zwei Typen unterteilen: Die IM, welche in eine komplette und eine inkomplette Form unterschieden wird, und die SPEM. Die IM

stellt grundsätzlich einen prädisponierenden Faktor für Malignität dar, wobei die inkomplette intestinale Metaplasie mit einem höheren Karzinomrisiko assoziiert ist. Neben dem Typ der IM ist auch die Ausdehnung der Atrophie und der intestinalen Metaplasie für das Karzinomrisiko von Relevanz. Die SPEM, auch pseudopylorische Metaplasie genannt, ähnelt morphologisch Antrumdrüsen. Sie exprimiert das spasmodische Polypeptid TFF2 und ist mit der oxyntischen Atrophie assoziiert. Charakteristischerweise entwickelt sie sich im Corpus und Fundus ventriculi und zeigt eine starke Assoziation mit einer chronischen *H. pylori*-Infektion sowie mit gastralen Adenokarzinomen [14, 34].

In der Folge können intraepitheliale Neoplasien entstehen. Diese werden nach der WHO abhängig von ihrer Ausprägung in low grade und high grade untergliedert. Es handelt sich dabei um epitheliale neoplastische Prolifere, die durch variable zytologische und architektonische Atypien gekennzeichnet sind, jedoch kein invasives Wachstum zeigen [6, 14]. Den letzten Schritt in der gastralen Karzinogenese stellt die maligne Transformation mit Ausbildung eines invasiven Karzinoms dar, von dem man annimmt, dass es mit einer Degradation der Interzellulärmatrix assoziiert ist [14].

### 1.3 Gastrale Karzinogenese im Mausmodell

Für *in vivo*-Untersuchungen zum Magenkarzinom werden heute vorrangig Mäuse genutzt, da ihre Haltung kosteneffektiv ist und wenig Platz einnimmt, die Reproduktion schnell erfolgt, und nicht zuletzt, weil die Möglichkeit zur genetischen Manipulation besteht [29].

Die Nutzung von Karzinogenen wie MNU (N-methyl-N-nitrosamin) zur Induktion muriner Magenkarzinome ist inzwischen weitgehend verlassen worden, da die Malignome auf diesem Weg zwar zuverlässig generiert werden können, jedoch nicht über die pathophysiologische Correa-Kaskade entstehen [94, 114].

Die Infektionsversuche von Mäusen mit *Helicobacter*spezies erwiesen sich zunächst als erfolglos [11, 22]. Erst mit *H. felis* gelang eine dauerhafte Infektion [56]. Kolonisationsversuche mit *H. pylori* gestalteten sich schwieriger [11, 22, 41]. Die Etablierung von *H. pylori* Sydney stain 1 (HpSS1) ermöglichte erstmals eine dauerhafte Kolonisation mit einem mausadaptierten *H. pylori*, und bildet noch heute die Grundlage für zahlreiche Mausexperimente [57].

Mit beiden Bakterienstämmen entwickeln die infizierten Mäuse, ähnlich der humanen Karzinogenese, in verschiedenem Ausmaß die Sequenzen der Correa-Kaskade [25, 30, 71, 84, 107]. Allerdings bilden Wildtyp-Mäuse im Rahmen der Infektion mit *H. pylori* keine Magenkarzinome aus [81], und auch zahlreiche Maus-Inzuchtstämme sind gegenüber der malignen Transformation resistent [34]. Erst anhand der Etablierung von IG-Mäusen konnten auch invasive Adenokarzinome des Magens beobachtet werden [107].



Inzwischen existieren zahlreiche Mausstämme [72], anhand derer u. a. mit Hilfe genetischer knockout-Modelle verschiedenste Untersuchungen zur helicobacterinduzierten gastralen Karzinogenese und assoziierten immunologischen Prozessen durchgeführt werden können [3, 26, 43, 113].

## 1.4 Kathepsine

Kathepsine sind lysosomale Proteasen der Papainfamilie, die zunächst als inaktive Proenzyme synthetisiert, und anschließend zu aktiven Enzymen umgewandelt werden [52]. Bei der Cysteinprotease Kathepsin X (auch Kathepsin Z oder P) handelt es sich um eine Exopeptidase mit Carboxymonopeptidaseaktivität [1, 69, 85, 95, 98]. Seine Struktur unterscheidet sich durch eine ungewöhnlich kurze Propeptid-Region [18] sowie 3 residuelle Insertionsmotive, die einen charakteristische "mini loop" bilden [45, 96], deutlich von jener anderer Cysteinproteasen. Die Aktivierung des Proenzym erfolgt über Endopeptidasen wie Kathepsin L [70]. Kathepsin X wird vorrangig in Zellen des Immunsystems exprimiert, vor allem in Monozyten, Makrophagen, Mikroglia und dendritischen Zellen [46]. Erhöhte Kathepsin X-Werte beziehungsweise eine Korrelation mit einer meist schlechteren Prognose wurden auch in verschiedenen Malignomen nachgewiesen, wie Mammakarzinomen [17], kolorektalen Karzinomen [35, 38, 101, 103], Lungenkarzinomen [118], Prostatakarzinomen [67], neuroendokrinen Pankreasneoplasien [1], hepatozellulären Karzinomen [104], Melanomen [83] und Magenkarzinomen [50].

Aufgrund seiner Carboxymonopeptidaseaktivität ist Kathepsin X nicht in der Lage, die Extrazellulärmatrix zu degradieren [59]. Die Förderung der Tumorprogression wird daher über andere Mechanismen vermutet. So wird die Adhäsion, Migration und Invasivität von Tumorzellen u. a. durch eine Kathepsin X-abhängige Inaktivierung von Profilin 1 gesteigert [77]. Über die Aktivierung der  $\beta$ 2-Integrinrezeptoren Mac-1 und LFA-1 beeinflusst es die Interaktion mit der Extrazellulärmatrix sowie verschiedene Prozesse wie Zelladhäsion, Reifung dendritischer Zellen, Phagozytose, Antigenpräsentation und T-Lymphozyten-Aktivierung, und zeigt damit wichtige Funktionen in Prozessen von Entzündung und Immunantwort [1, 40, 45, 75, 102]. Darüber hinaus wurden weitere Zielmoleküle identifiziert, wie  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Enolase, CXCL-12, Bradykinin, Kallidin und Huntingtin [46, 66, 74, 90, 102].

## 1.5 Vorarbeiten

2004 konnte für Kathepsin X als einzigen Vertreter der Kathepsine in humaner Magenschleimhaut eine Induktion durch *H. pylori* nachgewiesen werden. Dabei wurde das Enzym vor allem in intramukosalen Makrophagen exprimiert [10].

In darauffolgenden Untersuchungen zeigte sich eine weitere Hochregulation bei Magenkarzinomen, insbesondere vom intestinalen Typ nach Laurén. Diese war immunhistochemisch überwiegend in den intramukosalen Makrophagen, aber auch in den Karzinomzellen nachweisbar. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass Kathepsin X für die gastrale Karzinogenese eine Rolle spielt. Zusätzliche Experimente mit Zellkulturen deuteten auf eine interzelluläre Kommunikation von *H. pylori*-infizierten Magenepithelien und Makrophagen hin [49].

Im Rahmen von *in vitro*-Experimenten wurde die Rolle von *cagA* und seiner Signalwege in der Kathepsin X-Überexpression untersucht. Dabei konnte eine durch *H. pylori* induzierte Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine in Makrophagen festgestellt werden. Die Ergebnisse ließen darauf schließen, dass *H. pylori* über *cagA*-abhängige Signalwege Zytokine induziert, welche die Kathepsin X-Überexpression in Makrophagen und Epithelzellen verursachen [50].

Auch in Untersuchungen von murinen Magenepithelien ließ sich im Rahmen der *H. pylori*-Infektion die Expression von Kathepsin X steigern. Bei Makrophagen in Kokultur mit Kathepsin X-defizienten Epithelzellen war dieser Effekt stärker ausgeprägt, als mit Wildtyp-Zellen. Korrespondierend dazu wurde auch eine stärkere Zytokininduktion beobachtet. In Monokultur wiesen die Kathepsin X-defizienten Epithelien ohne Infektion eine geringere Sekretion proinflammatorischer Zytokine als die Wildtyp-Zellen auf, zeigten aber eine stärkere *H. pylori*-assoziierte Induktion [4].

Im Anschluss wurde ein Mausmodell mit C57BL/6-Hintergrund mit und ohne Kathepsin X-Defizienz entwickelt. Im Rahmen initialer Infektionsversuche mit verschiedenen *Helicobacter*-stämmen erwies sich lediglich HpSS1 als geeignet zur suffizienten und dauerhaften Kolonisation. Nach der Infektion mit HpSS1 beziehungsweise Beimpfung mit keimfreier Suspension wurden die Mäuse 24, 36 und 50 wpi getötet und ihre Mägen untersucht. Histomorphologisch erfolgte die Beurteilung relevanter Veränderungen der frühen gastralen Karzinogenese. Die keimfreien Tiere zeigten keine entzündlichen Veränderungen, während die infizierten Mäuse eine starke Entzündung, foveoläre Hyperplasie, Atrophie und glanduläre Zystenbildung entwickelten. Die infizierten Kathepsin X-defizienten Mäusen unterschieden sich 50 wpi in Form einer signifikant stärker ausgeprägten SPEM, gesteigerter epithelialer Proliferation und einer höheren Zahl von Gewebsmakrophagen. Weiterhin wiesen sie eine stärkere und prolongierte Induktion

verschiedener proinflammatorischer Zytokine auf. Zusammenfassend deuteten diese Ergebnisse auf eine protektive Wirkung von Kathepsin X in der *H. pylori*-assoziierten gastralen Karzinogenese hin [48].

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit setzt sich mit der Frage nach der spezifischen Funktion von Kathepsin X im fortgeschrittenen gastralen Entzündungsprozess, der Bildung prämaligener Veränderungen und der Karzinomentstehung auseinander. Das vorliegende Modell baut dabei auf den Ergebnissen der vorangegangenen internen Mausexperimente auf. Kathepsin X ist das einzige Kathepsin, welches sowohl bei der *H. pylori*-assoziierten Genese, als auch beim Magenkarzinom des intestinalen Typs nach Laurén in den Entzündungszellen und in den gastralen Epithelien verstärkt exprimiert wird. In einem ersten Tiermodell wurden daher Kathepsin X-suffiziente Wildtyp-Mäuse und Kathepsin X-defiziente Mäuse mit *H. pylori* infiziert, und deren Mägen nach definierten Zeitintervallen histomorphologisch untersucht. Die hierbei gewonnene Information, dass Kathepsin X-defiziente Mäuse mit *H. pylori*-Infektion eine verstärkte Entzündung und vermehrt Metaplasien aufweisen, wurde im jetzigen zweiten Schritt vor dem Hintergrund eines abgeänderten Mausmodells betrachtet. Hierfür wurden INS-GAS-Mäuse mit FVB/N-Hintergrund (insulin-gastrin transgenic mice, INS-GAS/FVB/N, im Folgenden IG) genutzt, die bekannt dafür sind, im Verlauf regelmäßig präkanzeröse Veränderungen und auch Karzinome zu entwickeln. Durch Kreuzung mit Kathepsin X-defizienten Mäusen wurden doppeltransgene Tiere (CXG) generiert. Diese CXG-Mäuse und die IG-Mäuse wurden, im Gegensatz zu *H. pylori*-negativen Kontrolltieren, entsprechend infiziert und im zeitlichen Verlauf in Bezug auf histomorphologische Parameter verglichen.

Die Kathepsin X-defizienten knockout-Tiere (*ctsz*<sup>-/-</sup>) ohne IG-Merkmale (CXW) wurden ebenfalls entsprechend untersucht, da sie eine Brücke zum Vorexperiment schlagen, in dem u. a. Kathepsin X-defiziente Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund genutzt wurden, während im aktuellen Experiment ein Wechsel auf FVB/N-Mäuse erfolgt war.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Technische Voraussetzungen

Die verwendeten Gebrauchsmaterialien und Gerätschaften sind in den Tabellen 2-8 im Anhang detailliert aufgelistet.

#### 3.1.2 Versuchstiere

##### Mausstämme

Als Grundlage für die vorliegende Arbeit dienten Mäuse des Inzuchtstammes FVB/N. Dieser Mausstamm mit Albino-Mutation wurde bereits in den frühen 70er Jahren erzeugt, und wird bis heute bevorzugt für tierexperimentelle Studien genutzt. FVB/N-Mäuse haben im Vergleich zu anderen Inzuchtstämmen den Vorteil, sehr fertil zu sein, eine gut abschätzbare Zahl an Ausfällen zu haben, und sind aufgrund großer Pronuclei für die Mikroinjektion von DNA und damit die Bildung transgener Mäuse gut geeignet [93].

Die verwendeten Tiere wurden nach erfolgreicher Anzucht in erforderlichem Umfang im Zentralen Tierlabor (ZTL) der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg weiter gezüchtet.

##### Genetisches Profil/ Kreuzungen

Für die Versuchsdurchführung wurden Kathepsin X-defiziente knockout-Mäuse (CXW) genutzt, die uns dankenswerter Weise von Prof. Christoph Peters aus dem Institut für Molekulare Medizin und Zellforschung in Freiburg zu Verfügung gestellt wurden. Als zweite Gruppe wurden transgene IG-Mäuse verwendet. Diese weisen aufgrund eines zugeführten Fusionsgens aus einem humanen Gastringen und einem Ratteninsulinfragment als Promoter permanent hohe Mengen Gastrin auf. Da dieses humane Gastrin in den Inselzellen des Pankreas gebildet wird, persistiert die für IG-Mäuse typische Hypergastrinämie auch bei atrophischer Gastritis. IG-Mäuse stellen ein attraktives transgenes Tiermodell für die Untersuchung von Magenkarzinomen dar, da die histologischen Schritte in der Progression zum Magenkarzinom vom intestinalen Typ nach Laurén denen des humanen Magens ähneln [30, 105, 106]. Dieser Mausstamm wurde uns freundlicherweise von Timothy Wang von der *Division of Digestive and Liver Diseases* der Columbia University New York für unsere Studien zur Verfügung gestellt.

Durch Kreuzung beider Stämme generierten wir ein genetisches Mausprofil, in welchem die Hypergastrinämie der IG-Mäuse und die Kathepsin X-Defizienz kombiniert vorlagen (CXG).

Die Mäuse wurden im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg gezüchtet und weiter gehalten.

## **Haltung**

Die Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) in Gruppen von bis zu 5 Tieren gleichen Geschlechts (mit Ausnahme der Zuchtpaare) in speziell einzelbelüfteten IVC-Käfigen (*individually ventilated cages*, Techniplast, Buguggiate, Italien) von 25 x 40 x 20 cm (Typ II-Käfige) gehalten. Der Boden wurde mit einer Streu von Säge- bzw. Holzspänen (Allspan Tierstreu, Niederlande) befüllt, welche regelmäßig gewechselt wurde.

In den klimatisierten Tierhaltungsräumen herrschte kontinuierlich eine Temperatur von  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  sowie eine relative Luftfeuchte von  $50 \pm 5\%$ . Der Tageszyklus wurde mittels eines Lichtregimes von 12 : 12 Stunden mit „Licht an“ um 6.00 Uhr mitteleuropäischer Zeit (MEZ) geregelt.

Die Tiere wurden mit pelletiertem Standardfutter (Altromin 7024, Altromin GmbH Lage) ernährt, zusätzlich stand ihnen frisches Leitungswasser *ad libitum* zur Verfügung. Alle Mäuse waren frei von viralen, bakteriellen und parasitären Erkrankungen.

Die Bestimmungen der Deutschen Tierschutzverordnung wurden bei allen tierexperimentellen Arbeiten eingehalten, und die Haltung der Mäuse sowie die Tierversuchsvorhaben erfolgten entsprechend der Genehmigung nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) durch das Landesverwaltungsamt Halle/Saale (AZ 42502-2-792 UniMD).

### **3.1.3 *H. pylori***

#### **Stamm *H. pylori* Sydney strain 1**

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde der mausadaptierte *H. pylori* Stamm Sydney strain 1 (HpSS1) verwendet, welcher freundlicherweise von Prof. Steffen Backert (*School of Biomolecular & Biomedical Science, University College Dublin*) bereitgestellt wurde.

HpSS1 besitzt ein hohes Kolonisations-Potenzial sowie eine im Vergleich mit anderen Stämmen gesteigerte antigene Fähigkeit, die sich primär durch seine Virulenzfaktoren erklären lässt. Hierzu gehören üblicherweise *vacA* und *cagA*, sowie bestimmte oberflächliche Lipopolysaccharide (LPS), die die gastrale Säureproduktion steigern [7].

Obwohl HpSS1 ein nicht funktionierendes Typ IV Sekretionssystem (T4SS) besitzt, gilt er dennoch als einer der *Helicobacter*-Stämme, der in der Lage ist, die Mukosa von Mäusemägen effizient zu kolonisieren [48].

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Versuchsaufbau

Um die Rolle von Kathepsin X in der gastralen Karzinogenese *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Mausmodell mit transgenen Tieren entwickelt. Den Ausgangspunkt hierfür bildeten zum einen IG-Mäuse, zum anderen CXW-Mäuse, jeweils mit FVB/N-Hintergrund. Durch gezielte Kreuzungen miteinander wurden die benötigten doppeltransgenen, jeweils homozygoten IG-Mäuse mit zusätzlicher Kathepsin X-Defizienz gezüchtet. Nach Abschluss dieser Kreuzungen lagen somit 3 genetische Gruppen vor: IG, CXW und CXG, wobei das Hauptaugenmerk auf dem Vergleich von IG und CXG lag. Die CXW-Gruppe bildete eine Brücke zu den vorangegangenen Untersuchungen, in denen im Unterschied zur hier vorliegenden Arbeit nur Kathepsin X-defiziente Mäuse und Wildtyp-Mäuse mit jeweils C57BL/6-Hintergrund unter jedoch gleichen Versuchsbedingungen untersucht wurden.

Diese drei Gruppen wurden unabhängig vom Geschlecht jeweils zur Hälfte mit HpSS1 infiziert, zur Hälfte als Kontrollgruppen mit keimfreier Suspension beimpft. In definierten Zeitabständen nach der Infektion (12, 24, 36 und 50 Wochen) wurden die Tiere getötet. Die entnommenen Mägen wurden mikroskopisch untersucht und deren histomorphologische Parameter semiquantitativ beurteilt. Unter Zuhilfenahme mikroskopischer Methoden (Warthin-Starry-Färbung, Immunfluoreszenz) als auch einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgte die Überprüfung der *H. pylori*-Infektionspersistenz. Darüber hinaus wurden zum Zeitpunkt der Tötung aus jeder der beschriebenen infizierten und nicht-infizierten Gruppen von einzelnen Tieren die Mägen für weitere Untersuchungen eingefroren. Die ermittelten Daten der drei Gruppen und ihrer Kontrollgruppen wurden statistisch ausgewertet.

### 3.2.2 Kultivierung von *H. pylori*

Für die Kultivierung von HpSS1 wurde das Bakterium auf Agarplatten (37 g/l GC-Agar-Base, 18 g Bakto Proteose Pepton (Difco/Becton Dickenson, Maryland, USA), und in BHI-Flüssigmedium (BHI-Medium mit 10 % FCS, 1 % Vitaminmix, 0,1 % Vancomycin) kultiviert. Den Agarplatten wurde nach Abkühlung ein Vitaminmix, Pferdeserum (100 ml/l) und Vancomycin zugefügt.

Alle Arbeiten wurden unter der Sterilbank in dafür zugelassenen S2-Laborräumen durchgeführt. Zur Stammerhaltung wurde der HpSS1 einer dicht bewachsenen Platte resuspendiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  als Glycerolstock (200  $\mu\text{l}$  Glycerol + 800  $\mu\text{l}$  BHI) dauerhaft gelagert. Für die Kultivierung wurde das Bakterium aus dem Glycerolstock auf den Agarplatten mit einer sterilen Impföse ausgestrichen und 48 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  in Anaerobiertöpfen kultiviert. Durch Zugabe von Campygen (Oxoid, Wesel, Deutschland) herrschten währenddessen mikroaerobe Bedingungen (5%  $\text{O}_2$ , 10%  $\text{CO}_2$ , 85%  $\text{N}_2$ ). Im Anschluss wurden Verdünnungsausstriche hergestellt, indem das Bakterium mit einem sterilen Wattestäbchen von der Agarplatte abgenommen und in 1 ml BHI-Flüssigkeitsmedium resuspendiert wurde. Diese Suspension wurde auf einer neuen Agarplatte ausgestrichen (erste Verdünnung). In gleicher Weise erfolgten zwei weitere Verdünnungsausstriche (zweite und dritte Verdünnung). Die Agarplatte mit dem dritten Verdünnungsausstrich wurde 48 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter mikroaeroben Bedingungen in Anaerobiertöpfen inkubiert. Für die Infektionsexperimente wurden die dritten Verdünnungen von *H. pylori* in BHI-Flüssigkeitsmedium resuspendiert und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter Campygen-Atmosphäre im Anaerobiertopf inkubiert.

### 3.2.3 Orale Infektion

Die Infektion der Mäuse erfolgte zwischen der 8. und 10. Lebenswoche in einem 2-Tagesrhythmus dreimalig aufeinanderfolgend. Für die Applikation wurden 1 ml Tuberkulin-Spritzen mit angebrachtem gekürzten Ureterkatheter sowie steriler, abgeschliffener Kanülenspitze verwendet, mit denen die HpSS1-Suspension aufgenommen wurde. Während die Tiere mit der Hand fixiert wurden, konnte der Ureterkatheter enoral eingeführt, und die 0,2 ml der Bakteriensuspension ( $5 \times 10^7$  bis  $5 \times 10^9$  CFU des *H. pylori* in 0,2 ml) appliziert werden. Die Kontrollmäuse erhielten in analoger Weise intragastral 0,2 ml keimfreies BHI-Flüssigkeitsmedium.

Über den gesamten Versuchsverlauf erfolgten regelmäßige Kontrollen des Körpergewichts der Tiere.

### 3.2.4 Infektionsnachweis

Der Infektionsnachweis erfolgte initial zum Nachweis der erfolgreichen Infektion 12 Wochen *post infectionem* an jeweils einem der gleichzeitig infizierten Tiere einer Gruppe, als auch später im Rahmen der versuchsbedingten Tötung an allen in Paraffin eingebetteten Mausmägen.



Hierzu wurden mikroskopische Schnittpräparate mit Warthin-Starry-Färbung sowie einer fluoreszenzimmunhistochemische Färbung zur mikroskopischen Darstellung von *H. pylori* angefertigt. Die Stärke der bakteriellen Besiedelung wurde durch einen Score von 0 (keine) bis 3 (hochgradig) graduiert. Als weitere nicht-mikroskopische Kontrolle wurde an dem im Paraffin eingebetteten Material eine PCR zum Nachweis von *H. pylori* durchgeführt.

### **3.2.5 Abbruchkriterien**

Als Abbruchkriterien wurden apathisches Verhalten sowie ein Gewichtsverlust von mehr als 20% des Ausgangsgewichtes definiert. Ein weiteres Abbruchkriterium lag bei misslungener *H. pylori*-Infektion vor. Der Versuchsabbruch wurde durch sofortige Tötung dieser Tiere durch zervikale Dislokation durchgeführt.

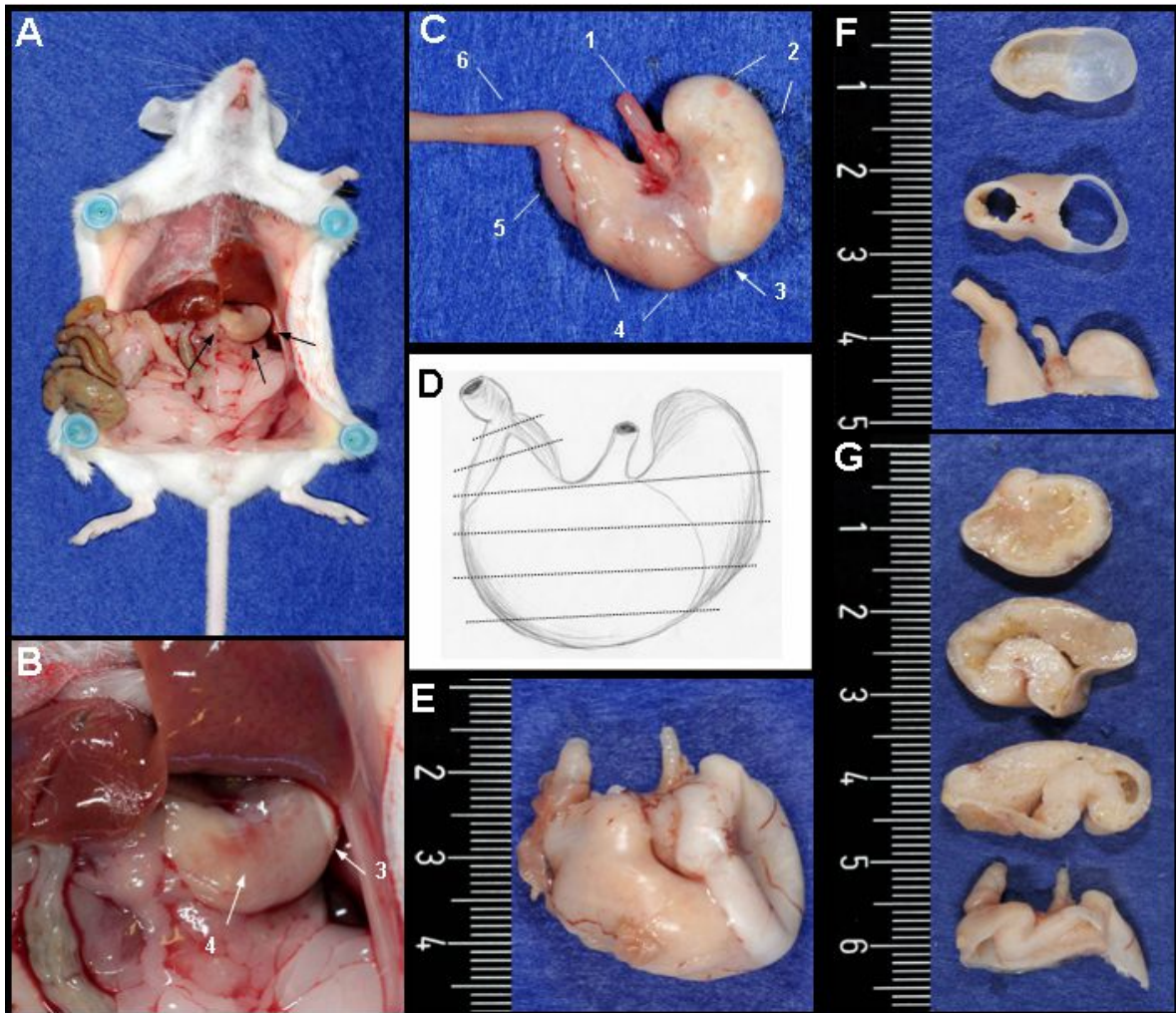
### **3.2.6 Tötung und Materialgewinnung**

Die infizierten und nicht infizierten Mäuse wurden im Alter von 12, 24, 26 und 50 Wochen *post infectionem* (wpi) gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz durch zervikale Luxation getötet. Anschließend wurde das Abdomen mit 70%igem Ethanol desinfiziert und mit sterilem Sektionsbesteck eröffnet. Der zum Vorschein kommende Magen wurde mobilisiert und stumpf vom umgebenden Bindegewebe freipräpariert. Nach einem scharfen Schnitt durch Ösophagus und Duodenum erfolgte die komplette Lösung und Entnahme des Magens. Vor der Aufarbeitung wurde das Organ 24 Stunden in 4%igem gepuffertem Formalin fixiert. Die Mägen der Tiere, die für eine spätere Proteinanalyse bestimmt waren, wurden stattdessen direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C eingelagert.

### **3.2.7 Gewebepräparation und Schnitthanfertigung**

Für die mikroskopische Untersuchung wurden die Mägen im Labor gereinigt und anschließend transversal in mehrere Ringe geschnitten, so dass alle anatomischen Lokalisationen auf einer Schnittebene erfasst werden konnten. In Abb. 3 sind die Schritte der Materialgewinnung sowie der Gewebepräparation illustriert. Die in Einbettkassetten gelegten Ringe wurden in Einbettautomaten (HyperCenter) mehrstündig über aufsteigende Alkoholreihen entwässert, und abschließend in Xylol gespült. Danach wurde das entwässerte Gewebe per Hand in erwärmtes flüssiges Paraffin gegossen. Nach dem Abkühlen der Paraffinblöcke wurden von Selbigen an Rotationsmikrotomen (Mikrom

HM335E) mehrere jeweils 2-3 µm dicke Schnitte angefertigt und auf mikroskopische Objektträger aufgezogen. An den Schnittpräparaten wurden im Anschluss am Färbeautomaten (Leica) mit Standardprotokollen jeweils folgende Färbungen durchgeführt: Hämatoxilin–Eosin (HE), Warthin-Starry, Alzianblau/PAS und Immunfluoreszenz zum *H. pylori*-Nachweis.



**Abb. 3: Resektion und Präparation des Magens [51]**

A und B: Situs bei Magenresektion (Pfeile bezeichnen Magen); C: Anatomie eines *in toto* entnommenen Magens einer Wildtyp-Maus: 1 = Ösophagus, 2 = Vormagen, 3 = Margo plicatus, 4 = pars fundica, 5 = pars pylorica, 6 = Duodenum; D: Verlauf der Sektionsgrenzen bei Zuschnitt des Magens vor Einbettung; E: Magen einer IG-Maus; F: Magen einer Wildtyp-Maus nach Zuschnitt; G: Magen einer IG-Maus nach Zuschnitt

### 3.2.8 Anatomie und Histomorphologie

Der Magen von Nagetieren untergliedert sich in einen nicht-glandulären Vormagen, und den glandulären Magen. Der Vormagen wird von mehrreihigem verhornendem Plattenepithel ausgekleidet. Die angrenzende Margo plicatus ist eine plattenepithelial

überkleidete Schleimhautfalte mit prominenter Verhornung, und bildet eine scharfe Grenze zum glandulären Anteil (Abb. 4).



**Abb. 4: Histomorphologie des Mausmagens [97]**

Proximaler glandulärer Magen mit angrenzender Margo plicatus und Vormagen

Der glanduläre Magen untergliedert sich in 3 Regionen: Kardie, Fundus und Antrum. Die Kardie ist schmal und grenzt direkt an die Margo plicatus. Der Fundus macht den größten Teil des glandulären Magens aus, und ist durch einen Drüsenkörper mit reichlich Parietalzellen und basal gelegenen Hauptzellen (auch zymogene Zellen) gekennzeichnet. Das Antrum beherbergt muzinreiche Zellen sowie dazwischen liegende enterochromaffine Zellen. Parietal- und Hauptzellen treten hier nicht auf. Das Oberflächenepithel ist in allen drei Regionen hoch- bis isoprismatisch, und bildet gerade verlaufende Foveolen. Unter dem Epithel liegt die *L. propria*, die sich durch eine zarte *L. muscularis mucosae* von der Submukosa abgrenzt. Der Submukosa liegt die dreischichtige Muscularis propria an, welche durch Mesothelzellen der Serosa überkleidet wird [97].

### **3.2.9 Beurteilung histomorphologischer Veränderungen: modifizierte Klassifikation nach Rogers**

Die mikroskopische Beurteilung der histomorphologischen Parameter erfolgte in 200-, und 400-facher Vergrößerung an den HE-Schnittpräparaten der zuvor beschriebenen Gruppen im Alter von 12, 24, 36 und 50 wpi. Zur Minimierung der Intraobservervariabilität wurde in engen Zeiträumen jeweils 1 Parameter an sämtliche Proben untersucht.

Als Grundlage zur Auswertung diente ein 2005 von Rogers et al. veröffentlichtes Modell für Nagetiermägen, in welchem die Parameter semiquantitativ von 0-4 aufsteigend evaluiert wurden. Als histomorphologische Parameter der klassischen Correa-Kaskade [13] wurden die chronische Gastritis, Atrophie, IM, SPEM und Intraepitheliale Neoplasie beurteilt. Weiterhin wurde die Ausprägung von Epitheldefekten, foveolärer Hyperplasie, Regeneratepithel, Zystenbildung sowie die Herniationstiefe bei Pseudoinvasion evaluiert.

Einzelne Punkte der Rogers-Klassifikation wurden für die vorliegende Arbeit in Anlehnung an die modifizierte Sydney-Klassifikation [19] sowie die WHO-Klassifikation der intraepithelialen Neoplasien [6] modifiziert beziehungsweise ergänzt. Dies betrifft die Entzündung, intraepitheliale Neoplasien und Regeneratepithel (Tabelle 1).

Die Entzündung wurde analog zur modifizierten Sydney-Klassifikation [19] in eine akute und eine chronische Komponente unterteilt. Die akute Entzündung ist durch neutrophile Granulozyten gekennzeichnet, die in unterschiedlicher Konzentration auftreten können und teils Erosionen und foveoläre Abszesse verursachen. Die chronische Entzündung ist durch mononukleäre Immunzellen charakterisiert. Diese können in unterschiedlicher Ausprägung in der *L. propria* und auch in den tieferen Wandschichten vertreten sein.

Als oxyntische Atrophie wird ein Verlust des spezifischen Drüsenkörpers bezeichnet, der im Fundus von Parietalzellen und Hauptzellen gebildet wird. Abhängig vom prozentualen Verlust dieser Zellen in Bezug auf die physiologische Gesamtmenge erfolgte die Graduierung.

Die IM ist durch den Ersatz des foveolären Schleimhautepithels mit intestinalem Epithel gekennzeichnet. Das histomorphologische Korrelat hierfür ist ein intraepithelialer Becherzellbesatz sowie eine apikaler Mikrovillisaum. Die zweite Form von Metaplasien, die im Magenfundus zu finden sind und morphologisch den tiefen Drüsen des Antrums ähneln, wird als SPEM bezeichnet [51]. Die Graduierung der jeweiligen Metaplasie erfolgte abhängig von der Größe und der Ausdehnung der Metaplasieherde.

Für die Beurteilung intraepithelialer Neoplasien erfolgte unter Berücksichtigung sowohl zytologischer als auch architektonischer Veränderungen in Anlehnung an die dichotome Einteilung durch die WHO [6] eine Untergliederung in „low grade“ und „high grade“. Insofern die entzündliche Umgebungsreaktion stark ausgeprägt war, wurde in Grenzfällen der niedrigere Score gewählt.

Low grade intraepitheliale Neoplasien sind durch Kerngrößenschwankungen und Hyperchromasien gekennzeichnet, welche im Gegensatz zu regenerativen Epithelveränderungen keine Ausreifung nach apikal zeigen. Die Zellen imponieren durch pseudostratifizierte basalständige Zellkerne und hypereosinophiles Zytoplasma sowie eine vermehrte Mitose- und Apoptosezahl. Die Drüsenarchitektur ist unregelmäßig und zeigt geringe Verzweigungen. Für die Klassifikation von high grade intraepithelialen Neoplasien sind diese Veränderungen, insbesondere die architektonischen Querverzweigungen und die Kernveränderungen, deutlich stärker ausgeprägt. Zum Teil fällt auch ein Polarisationsverlust der Zellkerne auf. Beim Vorliegen eines Karzinoms sind kleine, dicht gelegenen Tumordrüsen mit Kernatypien und Stromadesmoplasie zu beobachten, deren Basalmembran aufgrund des invasiven Wachstums nicht mehr intakt ist.

In Anlehnung an die histopathologische Untersuchung humaner Magengewebeproben erfolgte eine zusätzliche Beurteilung von regenerativen Epithelveränderungen (Regeneratepithel). Diese sind im klinischen Alltag insbesondere bei akuten Entzündungen anzutreffen. Sie sind durch hyperchromatische, teils gering unregelmäßige, jedoch polarisierte Zellkerne gekennzeichnet, die typischerweise zunächst an der Foveolenbasis liegen, sich jedoch je nach Ausprägung unterschiedlich weit in den Foveolenhals ausbreiten können. Im Gegensatz zu intraepithelialen Neoplasien zeigt Regeneratepithel eine meist gut abgrenzbare Ausreifung der Zellkerne nach apikal. Im Rahmen der Routinediagnostik am menschlichen Gewebe stellt es eine wichtige Differenzialdiagnose zur intraepithelialen Neoplasie dar.

Epitheldefekte wurden anhand zellulärer Veränderungen beurteilt, die von epithelialen Abflachungen in dilatierten Drüsen bis hin zu Störungen der Epithelintegrität mit Erosionen oder Ulzerationen reichen.

Für die Einteilung der Ausprägung der foveolären Hyperplasie wurde die vorliegende Foveolenlänge in Bezug auf die physiologische Länge semiquantitativ beurteilt.

Zystische Schleimhautveränderungen in den Foveolen und intraglandulär wurden anhand ihrer Größe und Ausprägung in Bezug auf die Mukosa ebenfalls semiquantitativ erfasst.

In einigen Schnittpräparaten fanden sich durch die *L. muscularis mucosae* hernierte Mukosaanteile, welche typischerweise in direkter Nachbarschaft zu Blutgefäßen lagen. Das Fehlen (Score 0) beziehungsweise das Vorliegen (Score 1) sowie die tiefste Lokalisation wurden hierbei erfasst.

Tabelle 1: Modifizierte histopathologische Klassifikation nach Rogers

	chronische Entzündung	akute Entzündung	Onkozytäre Atrophie	Intestinale Metaplasie	SPEM	Intra-epitheliale Neoplasie	Epitheldefekte	Foveoläre Hyperplasie	Regenerat-epithel	zystische Veränderungen	Herniations-tiefe
<b>0</b>	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keines	keine	keine Herniation
<b>1</b>	Einzelne sehr kleine Herde/diffus gering vermehrt in <i>L. propria</i> , insgesamt minimal vermehrt	Einzelne neutrophile Granulozyten, geringe Kryptitis	Verlust von 50% der Hauptzellen und 25% der Parietalzellen	Einzelne kleine Herde, nahe der Kardia	Einzelne kleine Herde, Foci im Corpus	low grade	Einzelne dilatierte Drüsen und/oder verschmälertes Epithel	1,5fache Länge	An Foveolen-basis	Einzelne gering ektatische Drüsenanteile, longitudinal verlaufend	<i>L. muscularis mucosae</i>
<b>2</b>	Einzelne Herde in <i>L. propria</i>	Einzelne foveoläre Abszesse	Verlust von 100% der Hauptzellen und 50% der Parietalzellen	Mäßig große Herde in Kardia und <1/3 der Corpus-schleimhaut	Mäßig große Herde, weniger als 1/3 der Parietalzellen einnehmend	high grade	Regelmäßig dilatierte Drüsen, einzelne auch größer, Oberflächen-epithel "zerfleddert"	2fache Länge	In unterer Foveolen-hälfte	Einzelne rundliche Zysten, Drüsenkörper überwiegt deutlich in der Übersichts-vergrößerung	Submukosa
<b>3</b>	Mehrere, teils konfluente Herde, auch in Submukosa	Mehrere foveoläre Abszesse, oder mehrere Erosionen	keine Hauptzellen, Verlust von 75% der Parietalzellen	Große Herde in 1/3 - 2/3 der Corpus-schleimhaut	Große Herde, 1/3- 2/3 der Parietalzellen einnehmend	Adeno-karzinom	Oberflächliche Erosionen und Drüsenatrophie	3fache Länge	Über die untere Hälfte hinaus- gehend, aber meist nicht nach apikal reichend	Zahlreiche größere Zysten, dazwischen- liegend noch erkennbare Drüsenkörper- anteile, „Schweizer- Käse-Muster“	<i>M. propria</i>
<b>4</b>	Schon in Übersichts- vergrößerung erkennbar, transmural	Massenhaft neutrophile Granulozyten, foveoläre Abszesse und Erosionen	keine Hauptzellen, Verlust von >75% der Parietalzellen	>2/3 der Corpus- schleimhaut	Schaumige Veränderungen in >2/3 der Parietal- zellen	--	Über die gesamte Mukosadicke Ulzerationen, Drüsenatrophie und Fibrose	>4fache Länge	Offt bis apikal, disseminiert	Zahlreiche stark ektatische Drüsen, keine originale Magenschleim- hautstruktur mehr, Mukosa stark verbreitert	--

### 3.2.10 Molekularbiologische Methoden (PCR-Nachweis *H. pylori*)

Die DNA-Präparation erfolgte aus jeweils 3 Paraffinschnitten eines repräsentativen Magenrings mit dem NucleoSpin Tissue-Kit der Firma Macherey&Nagel über Filtersäulen nach dem vorgegebenen Protokoll des Herstellers. Die Elution erfolgte mit 80 µl EB-Puffer. Die DNA-Lösungen wurden bei -21°C konserviert bzw. gleich in die PCR eingesetzt.

Für den PCR-Nachweis wurden folgende *H. pylori*-spezifische Primer verwendet: Hp1vw 5'-CTG GAG AGA CTA AGC CCT CC-3' und Hp2rw 5'-ATT ACT GAC GCT GAT TGT GC-3'. Die Amplifikation der Genprodukte erfolgte mittels myTaq™ HS DNA Polymerase nach 5-minütiger Inkubation bei 95°C über 35 Zyklen mit jeweils 1 min Denaturierung bei 95°C, 1 min Annealing bei 60°C und 1,5 min Elongation bei 72°C. Nach einer abschließenden Inkubation für 10 min bei 72°C wurden die PCR-Produkte auf Eis gekühlt und nach Gelelektrophorese semiquantitativ nach einem Score von 0 (kein *H. pylori*-Nachweis) - 3 (starker *H. pylori*-Befall) ausgewertet.

### 3.2.11 Statistik

Die ermittelten Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben und mittels Scatter plots grafisch dargestellt. Zur statistischen Analyse fand der Student's t-Test Anwendung. Ab einem  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  lag Signifikanz vor, bei einem Wert von  $p \leq 0,001$  war der Wert hochsignifikant, bei  $p \leq 0,0001$  höchstsignifikant. Für die Auswertung der Daten wurde eine GraphPad Prism Software genutzt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Kollektiv

Das untersuchte Mauskollektiv umfasste 301 Tiere (n=301), wovon 177 männlich und 124 weiblich waren. Diese verteilten sich auf die 6 zuvor beschriebenen Untersuchungsgruppen (CXG, KCXG, IG, KIG, CXW, KCXW). Zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten (12, 24, 36 und 50 wpi) lag die Mindestgruppengröße bei 9 Tieren, wobei der Mittelwert der Gruppengröße 12,5 betrug. Die männlichen Tiere waren im Durchschnitt mit 7,4 Tieren pro Gruppe vertreten, die weiblichen Tiere mit 5,2 Exemplaren. Abb. 5 zeigt dazu eine histomorphologische Übersicht der drei infizierten Maus-Gruppen bezogen auf die jeweiligen Untersuchungszeitpunkte.

### 4.2 Geschlecht

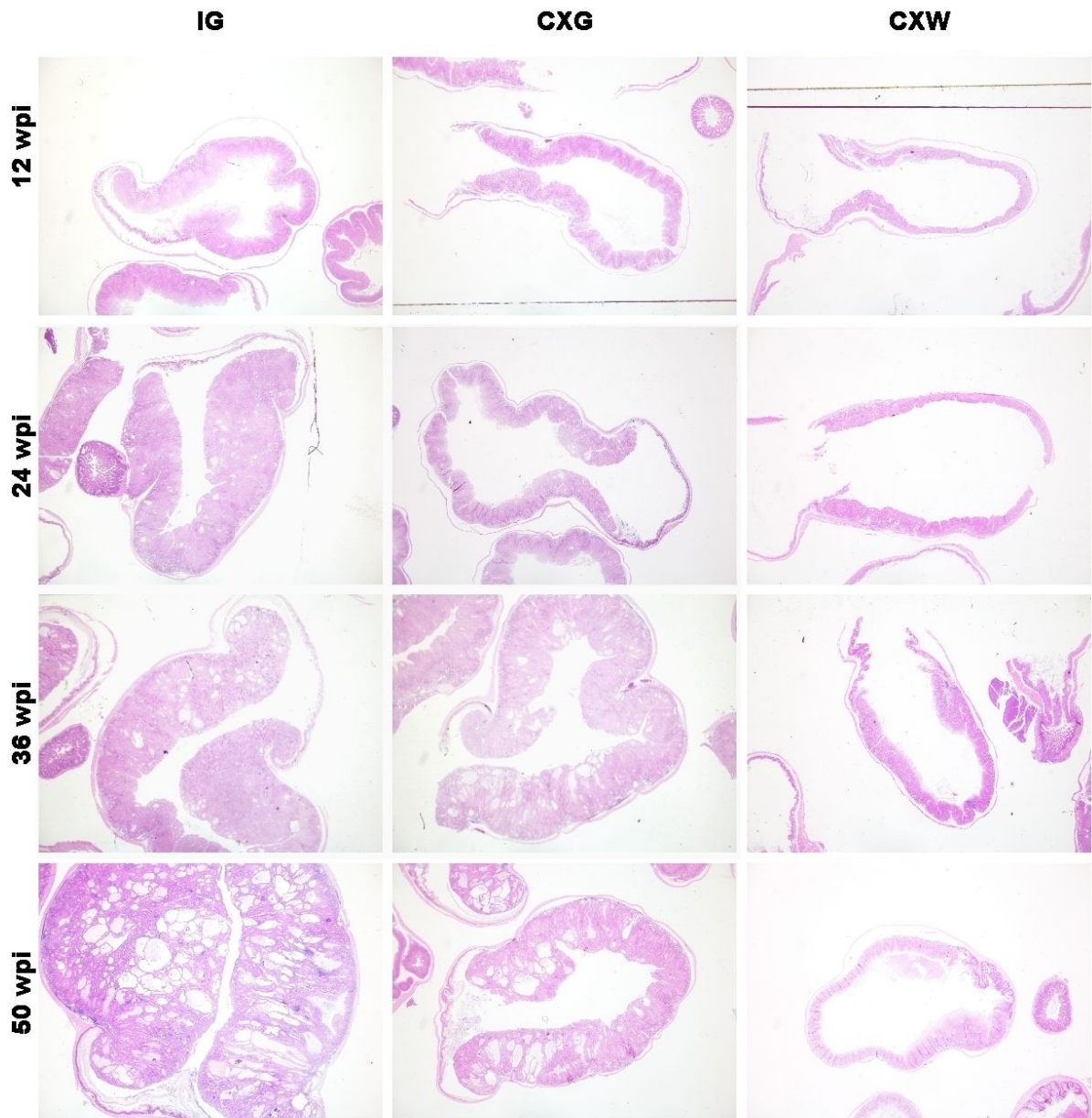
Die Untersuchungen zeigten signifikante Unterschiede zwischen den männlichen und weiblichen Tieren. So lagen sowohl bei den infizierten als auch bei den nicht infizierten Tieren die Werte der männlichen Mäuse für die chronische Entzündung, Atrophie, intestinale Metaplasie, SPEM und Dysplasie höher als jene der weiblichen Mäuse. Während die genannten morphologischen Veränderungen bei den IG-Weibchen 12 wpi im Durchschnitt eine geringe Ausprägung zeigten, wiesen die Männchen bereits mäßig bis stark ausgeprägte Veränderungen auf. Derartige Unterschiede zwischen den Geschlechtern ließen sich zu allen Untersuchungszeitpunkten beobachten. Auch die CXG-Tiere wiesen bei den genannten Karzinogenese-Parametern höhere Werte der männlichen Tiere auf, jedoch war die Differenz zwischen den Mittelwerten hier vergleichsweise geringer als in der IG-Gruppe.

Aufgrund der beschriebenen Unterschiede zwischen den Geschlechtern wurden für die folgende Auswertung allein die Werte der männlichen Tiere berücksichtigt.

### 4.3 *H. pylori*-PCR

Die Untersuchungen hierzu erfolgten nur an Tieren, deren Infektionsgruppe im zuvor beschriebenen exemplarischen Test jeweils eines Tieres 12 wpi als erfolgreich infiziert gewertet wurde.

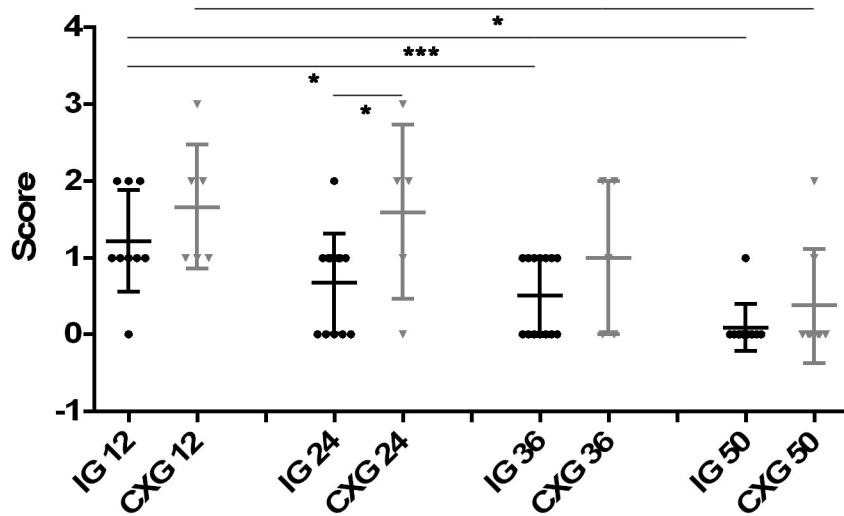




**Abb. 5: Vergleichende histomorphologische Verlaufs-Übersicht von CXG, IG und CXW**

Im Vergleich der drei Maustypen zeigen vor allem CXG und IG eine gut sichtbare Mukosaverbreiterung und glanduläre Ektasien. Die Veränderungen treten vorrangig im Corpus ventriculi auf und nehmen im Verlauf zu. Korrespondierend geht damit eine Magenlumen-Verkleinerung einher. Die Mägen der CXW-Mäuse weisen vergleichsweise erheblich geringer ausgeprägte Schleimhautveränderungen auf. (HE, 10x)

Wie in Abb. 6 gezeigt, trat bei IG und CXG im Verlauf eine erhebliche Verminderung des *H. pylori*-Status bis zum kompletten Keimverlust auf. Diese war bei IG verglichen mit 12 wpi erheblich stärker ausgeprägt (50 wpi  $p < 0,0001$ ) als bei CXG (50 wpi  $p = 0,0094$ ). 50 wpi ließ sich in der IG-Gruppe noch bei einem von 11 Tieren *H. pylori* nachweisen, bei CXG traf dies auf 2 von 8 Tieren zu. Die CXG-Gruppe zeigte im gesamten Verlauf höhere *H. pylori*-Werte als IG. Diese Werte waren jedoch nur 24 wpi knapp signifikant ( $p = 0,0472$ ).

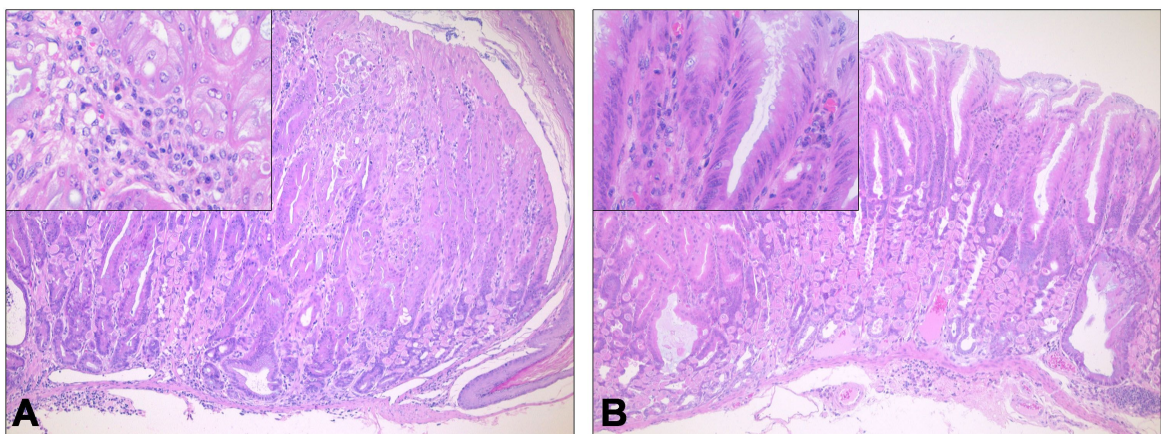


**Abb. 6: Statistische Auswertung der *H. pylori* Besiedelung (PCR-Werte)**  
 Jeder dargestellte Datenpunkt entspricht einer IG (schwarz) bzw. CXG (grau) Maus.  
 Signifikanzen: \* =  $\leq 0,05$ ; \*\*\* =  $\leq 0,0001$

## 4.4 Entzündung

### 4.4.1 Chronizität

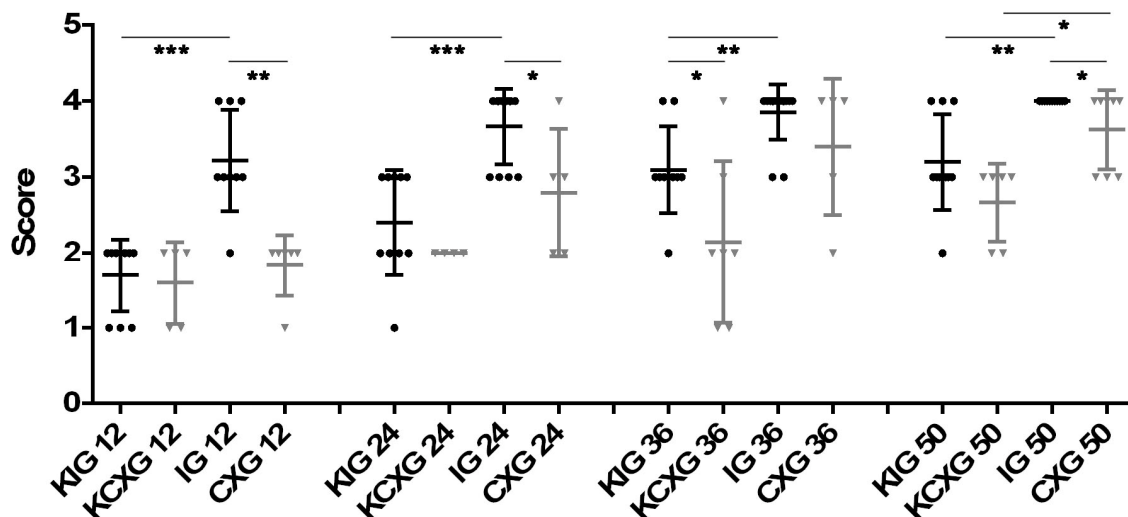
Die Stärke der mononukleären Entzündungszellinfiltrate in der *L. propria* und Submukosa der IG-Mäuse war vergleichsweise stärker ausgeprägt, als bei CXG (Abb. 7).



**Abb. 7: Chronische Entzündung**  
 A: IG-Maus 12 wpi mit verstärktem chronischen Entzündungsinfiltrat in der *L. propria* sowie der Submukosa (HE, 100x); Inset: Nahaufnahme der *L. propria* mit vermehrt mononukleären Entzündungszellen (HE, 400x); B: CXG-Maus 12 wpi mit geringer Vermehrung des lymphoplasmazellulären Infiltrats in der Submukosa (HE, 100x); Inset: Nahaufnahme der *L. propria* mit spärlich eingestreuten Lymphozyten (HE, 400x)

Schon 12 wpi zeigten die IG-Tiere eine ausgeprägte chronische Entzündung (Mittelwert 3,2). Im Verlauf stieg dieser Wert weiter an. 50 wpi wiesen alle untersuchten männlichen IG-Mäuse die Maximalausprägung der chronischen Entzündung (4) auf. Verglichen dazu war das chronische Entzündungszellinfiltrat bei CXG über den gesamten Verlauf durchschnittlich geringer ausgeprägt (12 wpi  $p=0,0006$ ). Auch bei CXG war eine Zunahme der Werte zu verzeichnen. 12 wpi wiesen alle CXG-Tiere eine geringe oder mäßige Ausprägung auf (Mittelwert 1,8). Da die chronische Entzündung bei CXG im Verlauf deutlich zunahm, näherten sich die Werte 50 wpi jenen von IG an, bei jedoch noch bestehenden Signifikanzunterschieden ( $p=0,0265$ ).

Die nicht infizierten Mäuse beider Gruppen wiesen 12 wpi eine geringe bis mäßige chronische Entzündung auf. Im Verlauf stiegen die Werte von KIG trotz Fehlen von *H. pylori* auf einen Mittelwert von 3,2 (50 wpi) an. In allen Untersuchungsphasen war die chronische Entzündung bei IG signifikant stärker ausgeprägt als bei KIG. KCXG wies ebenfalls eine zunehmende chronische Entzündung auf, bis zu einem Mittelwert von 2,7 bei 50 wpi. Diese war jedoch stets geringer ausgeprägt als bei KIG. Ein Signifikanzunterschied ließ sich dabei jedoch lediglich 36 wpi ausmachen ( $p=0,0294$ ). Wenngleich CXG und KCXG 12 wpi die gleiche Range aufwiesen, nahm die chronische Entzündung in CXG stärker zu als bei den Kontrolltieren. 50 wpi resultierte daraus ein Signifikanzunterschied von  $p=0,005$ . In Abb. 8 sind die statistischen Daten zur chronischen Entzündung nochmals abgebildet.

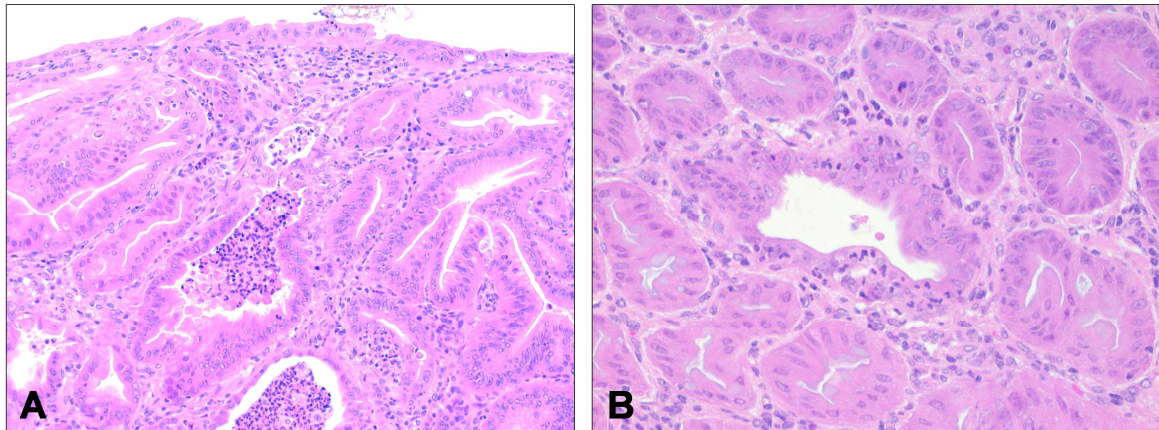


**Abb. 8: Statistische Auswertung der chronischen Entzündung**

Jeder dargestellte Datenpunkt entspricht einer IG (schwarz) bzw. CXG (grau) Maus. Signifikanzen: \* =  $\leq 0,05$ ; \*\* =  $\leq 0,001$ ; \*\*\* =  $\leq 0,0001$

#### 4.4.2 Aktivität

Im gesamten Experiment lag der höchste ermittelte Wert für die akute Entzündung bei 3. Ulzerationen, welche dem Maximalwert 4 entsprechen, wurden von keinem der Tiere ausgebildet. Dennoch ließ sich, wie in Abb. 9 dargestellt, in beiden Gruppen eine akute Entzündung nachweisen, welche bei IG gering höhere Werte zeigte als bei CXG.



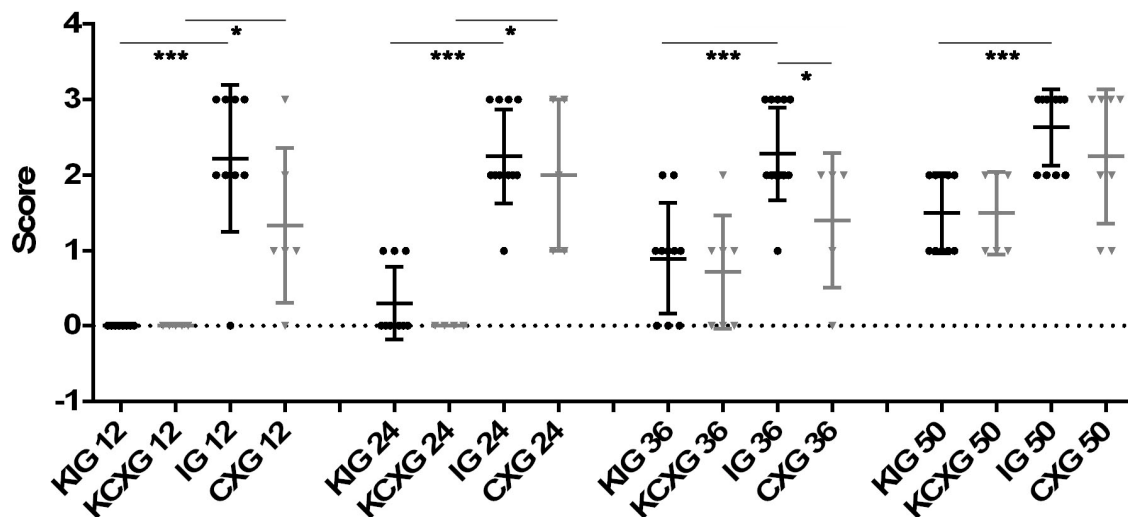
**Abb. 9: Akute Entzündung**

A: IG-Maus 36 wpi mit massiven Ansammlungen neutrophiler Granulozyten in den Drüsenlichtungen sowie teils auch intraepithelial (HE, 200x); B, einzelne neutrophile Granulozyten intraepithelial sowie in der *L. propria* einer CXG-Maus 36 wpi (HE, 400x)

Die Mäuse der IG-Gruppe zeigten bereits 12 wpi eine vergleichsweise ausgeprägte granulozytäre Entzündungskomponente (Mittelwert 2,2), die im Verlauf eine geringe Zunahme verzeichnete (50 wpi Mittelwert 2,6). Obwohl auch CXG schon 12 wpi bei 5 von 6 Mäusen eine akute Entzündung aufwies, lag diese im Durchschnitt stets niedriger als bei IG. Ein signifikanter Unterschied ließ sich allerdings nur 36 wpi ( $p=0,0244$ ) nachweisen. Auch CXG zeigte im Verlauf eine Zunahme der floriden Entzündung. 50 wpi lag bei 4 von 8 Tieren die stärkste ermittelte Ausprägung von 3 vor.

Die Kontrolltiere beider Gruppen wiesen 12 wpi keine floride Entzündung auf, jedoch lagen 24 wpi bei KIG und 36 wpi auch bei KCXG einzelne positive Werte vor. Bis 50 wpi nahmen die Werte beider Kontrollgruppen zu.

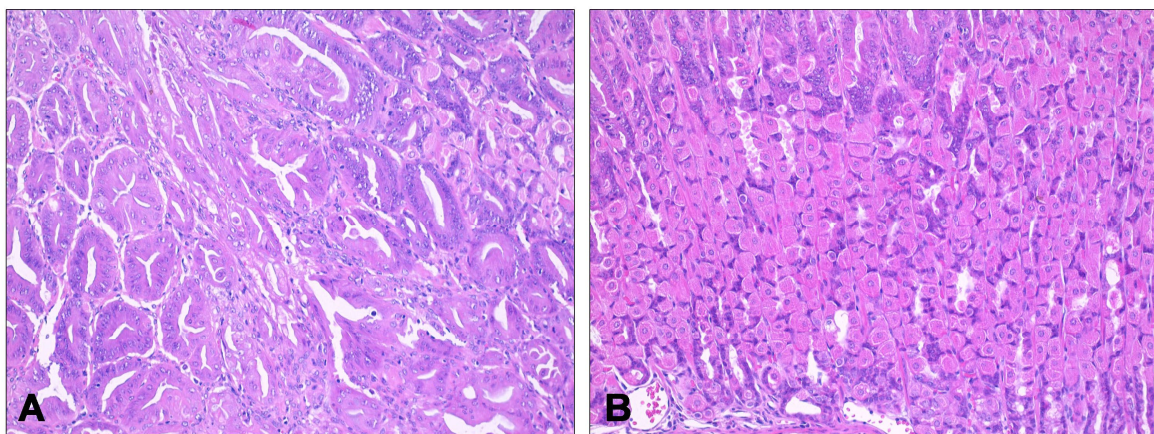
IG wies gegenüber seiner Kontrollgruppe zu allen Zeitpunkten signifikant höhere Werte auf (12 bis 50 wpi  $p<0,0001$ ). Auch die Mittelwerte von CXG lagen über jenen der Kontrolltiere, jedoch zeigten sich hier nur 12 wpi ( $p=0,0188$ ) und 24 wpi ( $p=0,0056$ ) signifikante Unterschiede. Eine Zusammenfassung dieser Daten zeigt Abb. 10.



**Abb. 10: Statistische Auswertung der akuten Entzündung**  
 Jeder dargestellte Datenpunkt entspricht einer IG (schwarz) bzw. CXG (grau) Maus.  
 Signifikanzen: \* =  $\leq 0,05$ ; \*\*\* =  $\leq 0,0001$

### 4.5 Oxyntische Atrophie

Abb. 11 illustriert die initialen deutlichen Unterschiede zwischen IG und CXG bezogen auf den Verlust des spezifischen Drüsenkörpers. So wiesen sämtliche IG-Tiere und deren Kontrollgruppe schon früh eine oxyntische Atrophie in unterschiedlicher Ausprägung auf.

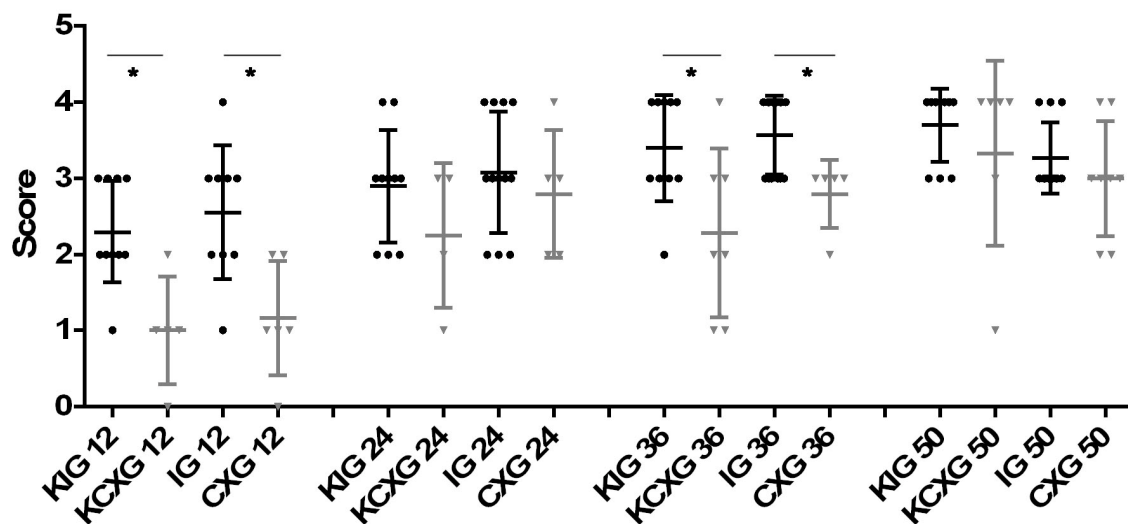


**Abb. 11: Oxyntische Atrophie**  
 A: IG-Maus 12 wpi mit erheblichem Verlust des oxyntischen Drüsenkörpers und nur noch einzelnen Parietalzellgruppen am rechten oberen Bildrand (HE, 200x); B: CXG-Maus 12 wpi mit noch gut erhaltenem Drüsenkörper (HE, 200x)

Bei IG trat 12 wpi bereits einmalig der höchste Untersuchungswert (4) auf. Insgesamt lag der initiale Mittelwert von IG (2,6) knapp über dem Wert von KIG (2,3). Im Verlauf

erreichte IG früh Maximalwerte: so wiesen 24 wpi bereits 9 von 12 Tieren einen Score von 3 oder 4 auf, mit einem arithmetischen Mittel von 3,1. Für KIG traf Gleiches auf 7 von 10 Tieren zu. IG und KIG zeigten über den Untersuchungszeitraum jeweils eine kontinuierliche Zunahme der oxyntischen Atrophie. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen bestanden nicht.

Im Gegensatz dazu lag 12 wpi die Range von KCXG als auch von CXG bei Werten von 0 bis 2, und damit deutlich unter jenen der entsprechenden IG- ( $p=0,0076$ ), beziehungsweise KIG-Gruppe ( $p=0,0042$ ). Auch bei CXG und KCXG zeigte sich eine Zunahme der oxyntischen Atrophie, bis zu einem maximalen Mittelwert von 3 (50 wpi) bei CXG. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe war die oxyntische Atrophie bei CXG 12 wpi und 36 wpi signifikant stärker ausgeprägt.



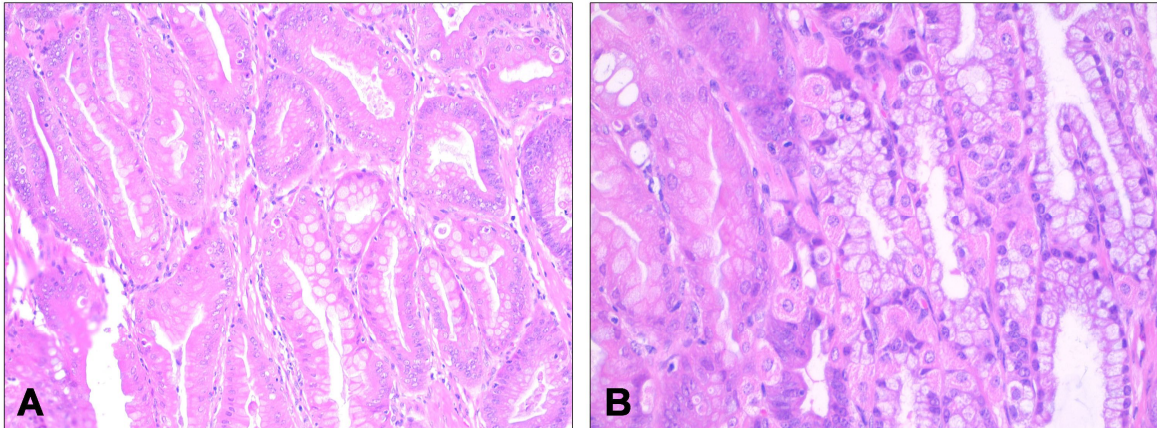
**Abb. 12: Statistische Auswertung der oxyntischen Atrophie**

Jeder dargestellte Datenpunkt entspricht einer IG (schwarz) bzw. CXG (grau) Maus.  
 Signifikanz: \* =  $\leq 0,05$

Wie in Abb. 12 als Scatter Plot zu erkennen ist, lagen die Mittelwerte von CXG im zeitlichen Verlauf stets unter jenen von IG. In den Kontrollgruppen zeigte sich ein gleichartiges Bild. Dabei war der Signifikanzunterschied 12 wpi ( $p=0,0076$  bzw.  $p=0,0042$ ) jeweils stärker ausgeprägt als 36 wpi ( $p=0,0086$  bzw.  $p=0,0224$ ).

## 4.6 Metaplasie

Metaplastische Veränderungen in Form einer SPEM oder einer intestinalen Metaplasie mit Ausbildung intraepithelialer Becherzellen, wie sie in Abb. 13 dargestellt sind, konnte bei allen Mausgruppen beobachtet werden. Im Fall von am HE-Präparat nicht eindeutig beurteilbaren Metaplasien erfolgte die Graduierung unter Zuhilfenahme einer zusätzlichen Alzianblau/ PAS-Färbung.



**Abb. 13: Intestinale Metaplasie und SPEM**

A: Intestinale Metaplasie mit charakteristischen intraepithelialen Becherzellen sowie Foveolarepithel ohne metaplastische Veränderungen (HE, 200x); B: zwischen den Parietalzellen gelegene Verbände muzinös umgewandelter Epithelien (SPEM) (HE, 400x)

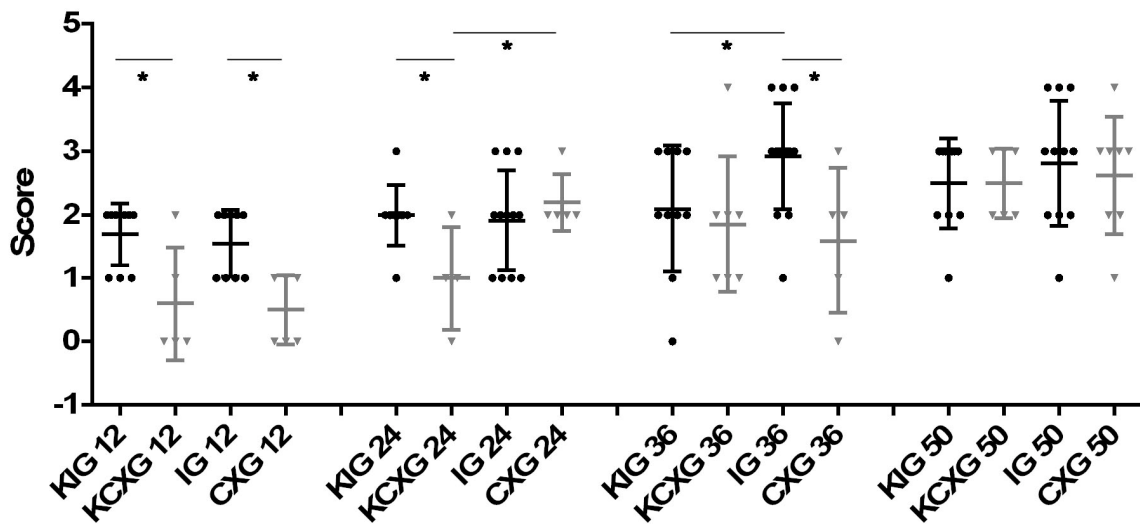
### 4.6.1 Intestinale Metaplasie

Sowohl bei den IG-Mäusen als auch deren Kontrollen lag bereits 12 wpi bei allen Tieren eine gering bis mäßig ausgeprägte intestinale Metaplasie vor. Im Gegensatz dazu wiesen maximal 50% der CXG-Tiere als auch der KCXG-Tiere intraepitheliale Becherzellen auf. Der Mittelwert von CXG betrug zu diesem Zeitpunkt 0,5 und lag damit signifikant unter dem Wert von IG mit 1,6 ( $p=0,0025$ ). Ein ähnliches Bild zeichnete sich bei dem Vergleich von KCXG zu KIG ab ( $p=0,0077$ ).

Wie in Abb. 14 illustriert, wiesen sowohl IG und KIG, als auch CXG und KCXG im Verlauf einen Anstieg der Mittelwerte auf. KCXG zeigten bis 24 wpi eine signifikant geringer ausgeprägte intestinale Metaplasie als KIG ( $p=0,0127$ ). Bis 50 wpi glich sich KCXG dem arithmetischen Mittel von KIG (je 1,7) an. Auch CXG zeigte gegenüber IG ein ähnliches Verhalten.

Die *H. pylori*-Infektion zeigte vergleichsweise geringe Effekte auf die intestinale Metaplasie. So führte die Infektion jeweils nur einmalig zu signifikant höheren Werten der

infizierten Tiere gegenüber den Kontrollgruppen. Dies betraf CXG 24 wpi ( $p=0,0255$ ) und IG 36 wpi ( $p=0,0368$ ).



**Abb. 14: Statistische Auswertung der intestinalen Metaplasie**

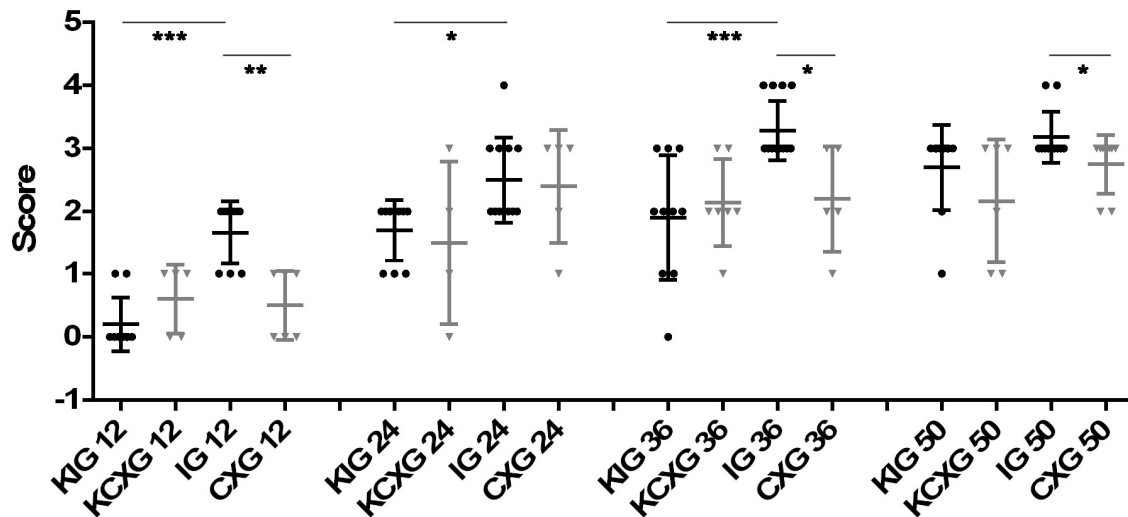
Jeder dargestellte Datenpunkt entspricht einer IG (schwarz) bzw. CXG (grau) Maus.  
Signifikanz: \* =  $\leq 0,05$

#### 4.6.2 SPEM

Zu Versuchsbeginn lagen die Mittelwerte beider Kontrollgruppen sowie auch von CXG bei  $\leq 0,6$ . Allein IG wies bei einem Mittelwert von 1,7 bereits in allen Proben eine SPEM auf, zum überwiegenden Anteil mit mäßiggradiger Ausprägung. Damit war die SPEM signifikant stärker ausgeprägt als bei CXG ( $p=0,0009$ ) als auch bei KIG ( $p<0,0001$ ). Ab 24 wpi erreichte IG den Maximalscore 4. Weder CXG, noch KIG oder KCXG erreichten diesen Wert, trotz zunehmender SPEM im Verlauf der Untersuchungen. Auch IG zeigte, wie in Abb. 15 dargestellt, steigende Mittelwerte. Dennoch ließ sich bis 36 wpi weiterhin eine signifikant stärkere SPEM bei IG als bei KIG beobachten ( $p=0,0001$ ). Die SPEM in CXG war ebenfalls signifikant geringer ausgeprägt als bei IG, näherte sich im Verlauf jedoch den Werten von IG an (50 wpi  $p=0,045$ ).

Obwohl die Mittelwerte von KCXG ab 24 wpi gering unter jenen von CXG lagen, ließen sich hier im gesamten Verlauf keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Auch zwischen den beiden Kontrollgruppen fanden sich keine relevanten Unterschiede.





**Abb. 15: Statistische Auswertung der SPEM**

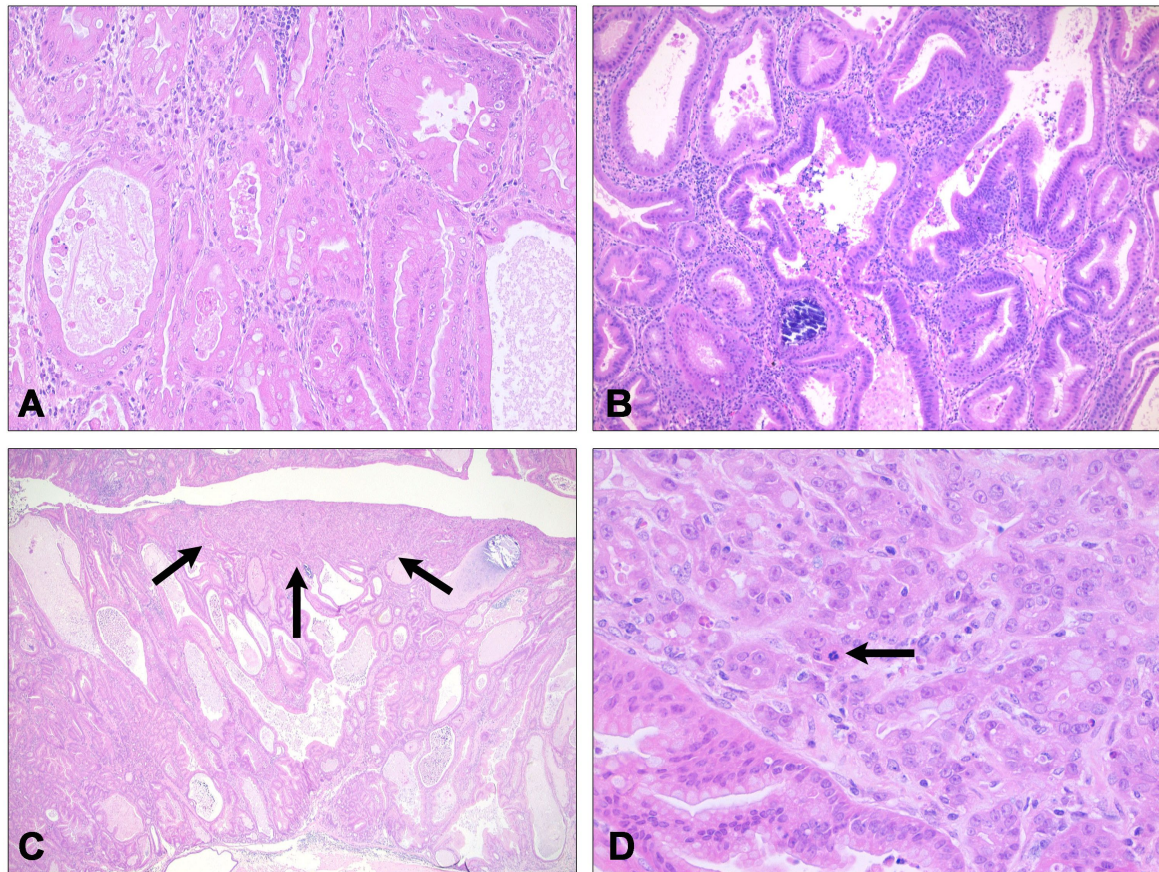
Jeder dargestellte Datenpunkt entspricht einer IG (schwarz) bzw. CXG (grau) Maus. Signifikanzen: \* =  $\leq 0,05$ ; \*\* =  $\leq 0,001$ ; \*\*\* =  $\leq 0,0001$

## 4.7 Intraepitheliale Neoplasie

Sämtliche Maus-Gruppen wiesen im Verlauf in unterschiedlichem Ausmaß progrediente intraepitheliale Neoplasien auf.

Allein KCXG bildete initial keine dysplastischen Veränderungen aus. Bis 36 wpi traf dies weiterhin auf mehr als 50% der männlichen Tiere zu. Der Mittelwert lag zu diesem Zeitpunkt bei 0,3. Die Proben der drei anderen Gruppen beinhalteten 36 wpi ausnahmslos intraepitheliale Neoplasien. Erst 50 wpi zeigte sich auch bei KCXG eine deutliche Zunahme (Mittelwert 1,5). KIG hingegen zeigte zu allen Zeitpunkten eine deutliche Progredienz. Obwohl auch hier die Mittelwerte unter jenen von IG lagen, ließ sich nur 12 wpi ein Signifikanzunterschied von  $p=0,0071$  nachweisen. So wiesen 24 wpi bereits 9 von 10 KIG-Tieren intraepitheliale Neoplasien auf, davon 6 high grade. Bei KCXG hingegen war zu diesem Zeitpunkt nur einmalig eine low grade intraepitheliale Neoplasie (Abb. 16A) nachweisbar. Die Werte von KCXG lagen damit bis 36 wpi ( $p<0,0001$ ) signifikant niedriger als von KIG.

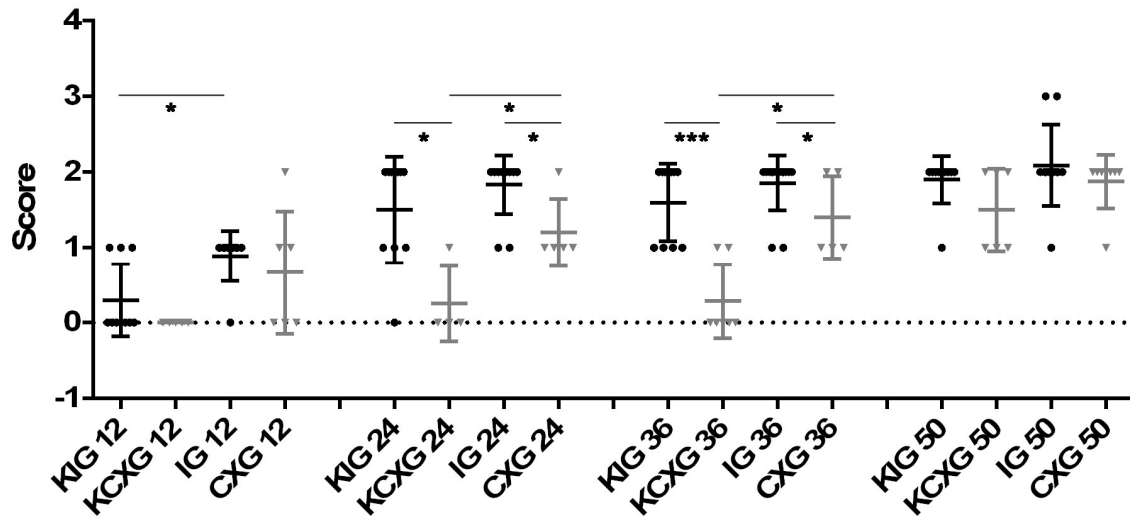
IG zeigte bereits früh erhebliche dysplastische Veränderungen: 24 wpi wiesen 10 von 12 Tieren high grade Dysplasien (Abb. 16B) auf. Des Weiteren entwickelten sich 50 wpi in 2 der 11 männlichen IG-Tiere intramukosale Adenokarzinome. Ein solches ist exemplarisch in Abb. 16C/D dargestellt. Weder in CXG, noch in KIG oder KCXG konnte ein Adenokarzinom nachgewiesen werden.



**Abb. 16: Intraepitheliale Neoplasie und Adenokarzinom**

A: Low grade intraepitheliale Neoplasie mit unregelmäßigen Drüsen mit hypereosinophilem Zytoplasma und Kernpleomorphien sowie vermehrt Apoptosen (HE, 200x); B: High grade intraepitheliale Neoplasie mit stark verzweigten Drüsen und hyperchromatischen, pseudostratifizierten Kernen mit teilweise Polaritätsverlust (HE, 100x); C: Übersichtsbild eines oberflächlichen Adenokarzinoms (Pfeile) im Corpus ventriculi einer männlichen IG-Maus 50 wpi (HE, 25x); D: Nahaufnahme des Adenokarzinoms mit kleinazinären invasiven Tumorzellverbänden mit Infiltration der *L. propria* sowie einer Mitose (Pfeil) und randständig angrenzendem Foveolarepithel (HE, 400x)

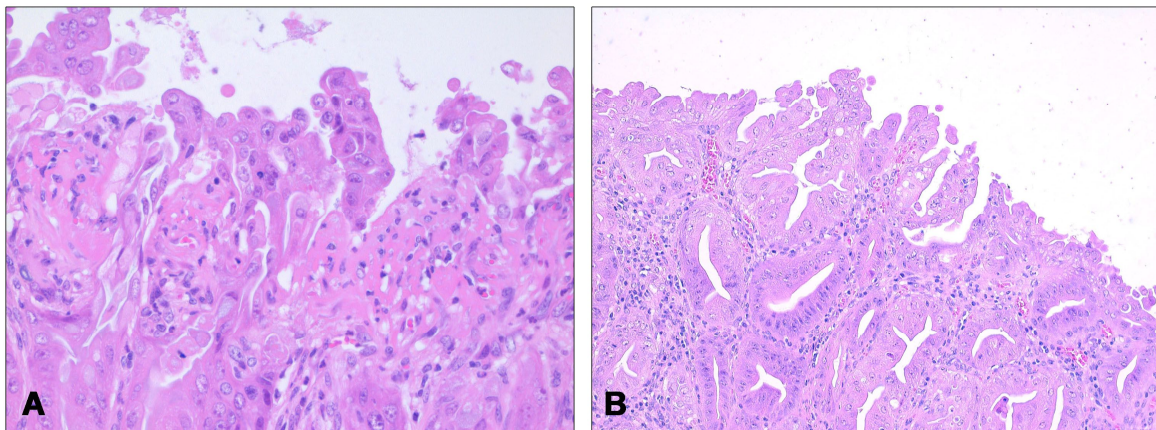
CXG zeigte zu allen Untersuchungszeitpunkten durchschnittlich geringere Ausprägungen als IG. Dies war 24 wpi am deutlichsten mit  $p=0,0103$ . Bis 50 wpi erhöhten sich die Werte von CXG (Mittelwert 1,9), und glichen sich allmählich dem Niveau von IG (Mittelwert 2,1) an. Im Vergleich zu KCXG wies CXG stets ausgeprägtere dysplastische Veränderungen auf, die sich 24 wpi auch in einer Signifikanz von  $p=0,0197$  widerspiegeln. Auch hier glichen sich die Werte der Kontrollgruppe jenen von CXG im Verlauf an, mit dem Resultat eines Verlusts signifikanter Unterschiede bei 50 wpi. Die Daten hierzu sind in Form eines Scatter plots in Abb. 17 dargestellt.



**Abb. 17: Statistische Auswertung der intraepithelialen Neoplasien**  
 Jeder dargestellte Datenpunkt entspricht einer IG (schwarz) bzw. CXG (grau) Maus.  
 Signifikanzen: \* =  $\leq 0,05$ ; \*\*\* =  $\leq 0,0001$

### 4.8 Epitheldefekte

Das Oberflächenepithel insbesondere der infizierten Mausgruppen wies Epitheldefekte in Form deutlicher Unregelmäßigkeiten bis hin zu Erosionen auf (Abb. 18).

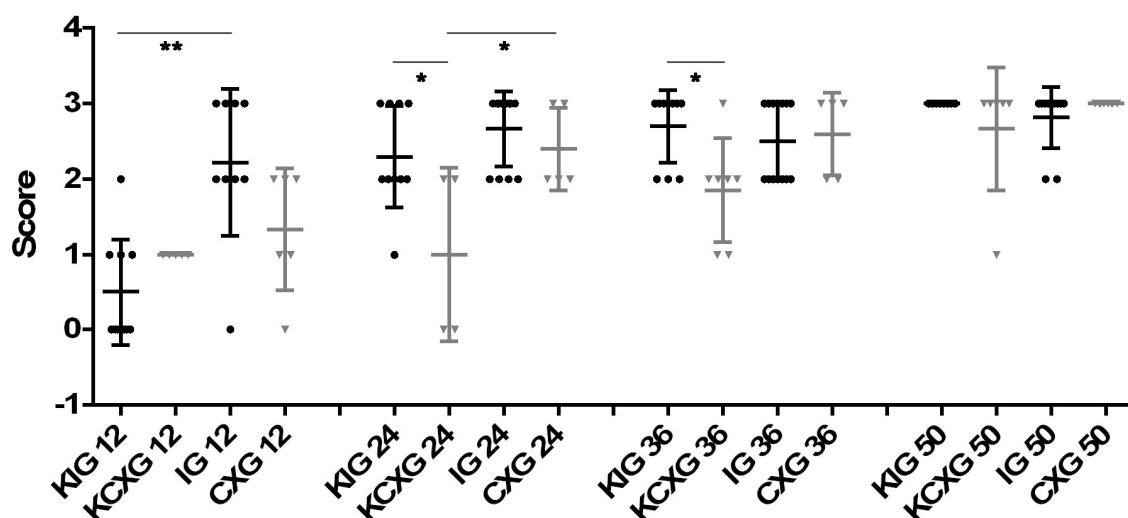


**Abb. 18: Epitheldefekte**  
 A: IG-Maus 36 wpi mit hyperplastischen Epithelien und oberflächlichen fibrinbelegten Erosionen mit neutrophilen Granulozyten (HE, 400x); B: CXG-Maus 36 wpi mit hyperplastischen Epithelien mit stark unregelmäßiger, „zerfledderter“ Oberflächenstruktur (HE, 200x)

Erhebliche Defekte des Epithels lagen in der IG-Gruppe bereits 12 wpi vor. So wiesen bereits 4 von 9 Tieren mit Epitheldefekten den Score 3 auf. Im Verlauf erhöhte sich deren Mittelwert von initial 2,2 auf 2,8 bei 50 wpi. Signifikant geringer ausgeprägte Epitheldefekte der Kontrollgruppe KIG lagen lediglich 12 wpi vor ( $p=0,0004$ ). Zu diesem

Zeitpunkt waren bei 6 von 10 Tieren der KIG-Gruppe keine Epitheldefekte nachweisbar. Bereits 24 wpi hatten sich die Epitheldefekte von KIG deutlich verstärkt und ein arithmetisches Mittel von 2,3 erreicht. Damit glich sich KIG den Werten von IG an, und behielt dies im Verlauf bei.

CXG lag 12 wpi in einer Range von 0 bis 2, und zeigte damit eine geringere Ausprägung als IG. Signifikanzunterschiede waren jedoch nicht zu verzeichnen. 24 wpi trat bei CXG eine sprunghafte Zunahme von Epitheldefekten auf einen Mittelwert von 2,4 auf. Damit glich sich auch CXG bis zum Versuchsende den Werten von IG und KIG an. Die epithelialen Defekte in KCXG waren zwar im Durchschnitt geringer ausgeprägt als in CXG, jedoch zeigte sich hierfür nur 24 wpi ein signifikanter Unterschied von  $p=0,046$ . Auch KCXG zeigte im zeitlichen Verlauf eine Zunahme epithelialer Defekte. Während jedoch die drei Gruppen IG, KIG und CXG schon 24 wpi einen Mittelwert über 2 aufwiesen, erreicht KCXG dies erst 50 wpi. Wie Abb. 19 zu entnehmen ist, wurde der Maximalscore von 4 zu keiner Zeit erreicht.



**Abb. 19: Statistische Auswertung der Epitheldefekte**

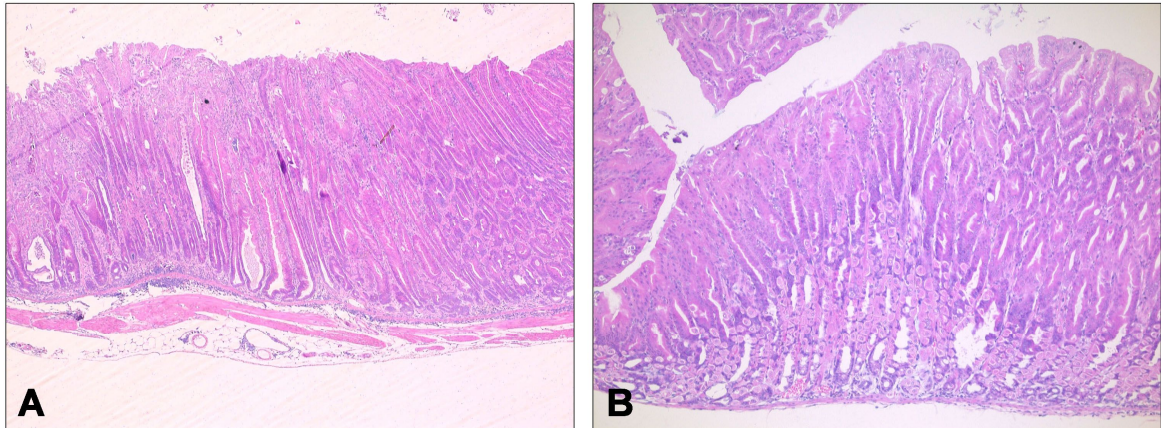
Jeder dargestellte Datenpunkt entspricht einer IG (schwarz) bzw. CXG (grau) Maus.

Signifikanzen: \* =  $\leq 0,05$ ; \*\* =  $\leq 0,001$

## 4.9 Foveoläre Hyperplasie

Elongierte, hyperplastische Foveolen waren zu allen Untersuchungszeitpunkten bei IG im Durchschnitt am stärksten vertreten. Bereits initial lag hier bei 8 von 9 Tieren eine foveoläre Hyperplasie Grad 3 vor. Dahingegen wies 12 wpi lediglich je ein Tier von KIG und CXG ebenfalls Grad 3 auf, die restlichen Werte lagen niedriger. Somit war die foveoläre Hyperplasie bei CXG ( $p=0,0025$ ) und KIG ( $p<0,0001$ ) signifikant geringer ausgeprägt. Ein histologischer Vergleich dieser Unterschiede zwischen den infizierten

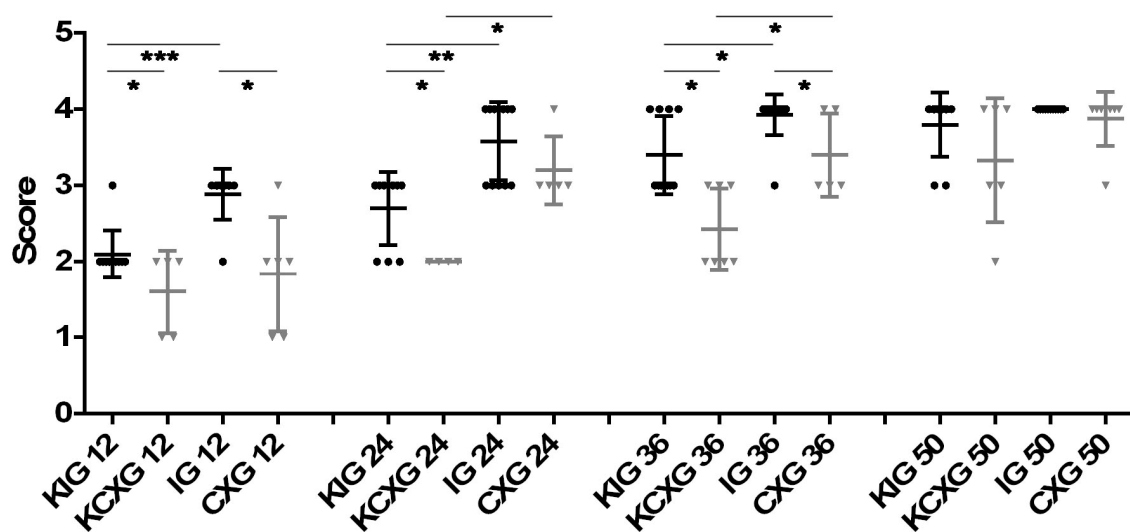
Gruppen findet sich in Abb. 20. 24 wpi erreichten 7 von 12 männlichen IG-Tieren bereits den Maximalwert 4. Bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt steigerte sich dies auf einen Mittelwert von 4.



**Abb. 20: Foveoläre Hyperplasie**

A: IG-Maus 12 wpi mit stark elongierten, hyperplastischen Foveolen, welche teils bis an die *L. muscularis mucosae* heranreichen (HE, 50x); B: gering hyperplastische Foveolen einer CXG-Maus 12 wpi (HE, 100x)

Zwar lagen die Mittelwerte für CXG ab 24 wpi ebenfalls über 3 und stiegen im Verlauf bis 3,9, jedoch waren sie stets geringer ausgeprägt als bei IG. 36 wpi trat diesbezüglich ein Signifikanzunterschied von  $p=0,0107$  auf. Auch bei KIG war die foveoläre Hyperplasie bis 36 wpi geringer ausgeprägt als bei IG ( $p=0,0034$ ). Erst 50 wpi glich sich auch KIG mit einem Mittelwert von 3,8 den hohen Werten von IG an.



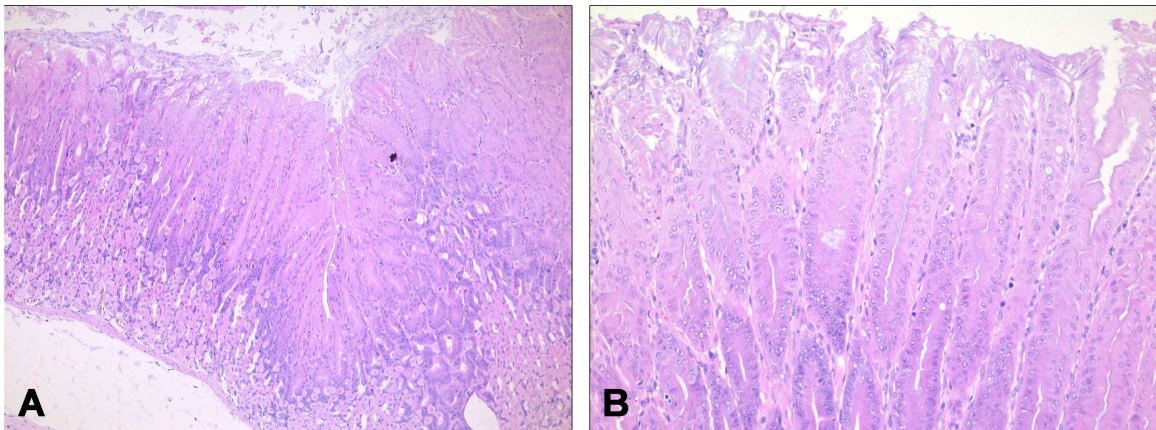
**Abb. 21: Statistische Auswertung der foveolären Hyperplasie**

Jeder dargestellte Datenpunkt entspricht einer IG (schwarz) bzw. CXG (grau) Maus. Signifikanzen: \* =  $\leq 0,05$ ; \*\* =  $\leq 0,001$ ; \*\*\* =  $\leq 0,0001$

Im Vergleich der Kontrollgruppen zueinander wies KCXG adäquat zu den infizierten Tieren eine geringere foveoläre Hyperplasie auf als KIG. Bis 36 wpi waren die Werte diesbezüglich signifikant verschieden. 50 wpi zeigte sich auch bei KCXG in 3 von 6 Tieren der Maximalwert 4, so dass der Mittelwert die 3 überschritt und sich KIG, CXG und IG annäherte (Abb. 21).

#### 4.10 Regeneratepithel

Die Ausbildung regenerativer Epithelveränderungen, die sich als Folge gesteigerter proliferativer Prozesse in Form sichtbarer Kernhyperchromasien vom Foveolengrund auf die Foveolenhäse ausdehnt, ist in Abb. 22 festgehalten.



**Abb. 22: Regeneratepithel**

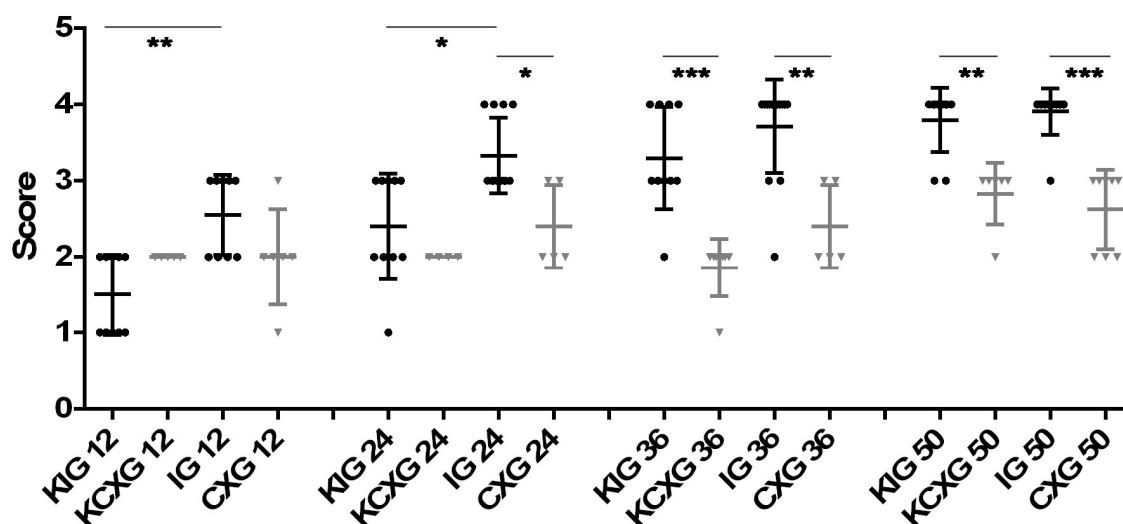
A: Im Foveolengrund verstärkt hyperchromatische Zellkerne, welche nach apikal ausreifen (HE, 100x); B: die hyperchromatischen Zellkerne zeigen keinen Polarisationsverlust und reichen bis in den Foveolenhals (HE, 200x)

Während die beiden Kontrollgruppen 12 wpi den Wert 2 bei der Ausprägung von regenerativen Epithelveränderungen nicht überschritten, wiesen die beiden mit *H. pylori*-infizierten Gruppen zum Teil bereits stärkere Veränderungen (Grad 3) auf. Hierbei zeigte IG einen höheren Mittelwert (2,6) als CXG (2). Zwar wiesen beide Gruppen im Verlauf zunehmende Werte auf, jedoch war diese Zunahme bei IG erheblich stärker ausgeprägt als bei CXG. Dies spiegelte sich bei CXG ab 24 wpi in einem Signifikanzunterschied von  $p=0,0035$  wider. Dieser Unterschied wurde bis 50 wpi noch deutlicher ( $p<0,0001$ ). Auch die Werte von KIG lagen in der ersten Untersuchungshälfte signifikant niedriger als bei IG. Bis zum Versuchsende stiegen die Werte von KIG jedoch ebenfalls kontinuierlich an, so dass 50 wpi 8 von 10 Tieren die Maximalausprägung (Grad 4) aufwiesen. Im Gegensatz

zu IG und KIG erreichte weder CXG, noch die entsprechenden Kontrollgruppe diese höchste Ausprägung des Regeneratepithels.

Die Tiere der Gruppen CXG und KCXG wiesen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede bei der Ausprägung regenerativer Epithelveränderungen auf.

Ähnlich wie beim Vergleich der infizierten Gruppen zeigten auch die Kontrollgruppen erst in der zweiten Versuchshälfte signifikante Unterschiede. Während KCXG erst 50 wpi den Mittelwert 2 überschritt, war dies bei KIG durch eine frühere und stärker ausgeprägte Zunahme regenerativer Epithelveränderungen bereits 24 wpi eingetreten. So lag 36 wpi der Mittelwert von KCXG bei 1,9, während KIG zu diesem Zeitpunkt im Durchschnitt 3,3 erreichte ( $p=0,0001$ ). Die statistischen Daten zur Ausbildung von Regeneratepithel sind in Abb. 23 dargestellt.

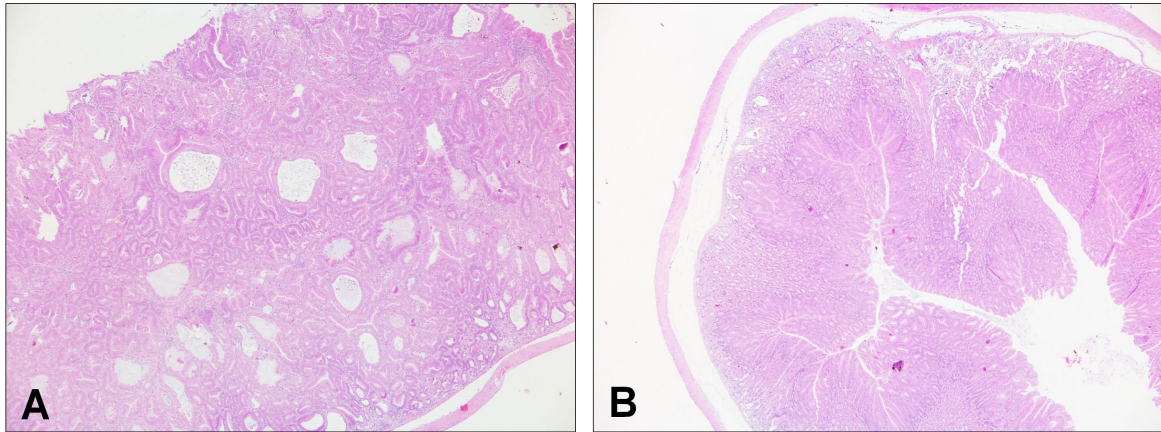


**Abb. 23: Statistische Auswertung des Regeneratepithels**

Jeder dargestellte Datenpunkt entspricht einer IG (schwarz) bzw. CXG (grau) Maus. Signifikanzen: \* =  $\leq 0,05$ ; \*\* =  $\leq 0,001$ ; \*\*\* =  $\leq 0,0001$

### 4.11 Zystische Schleimhautveränderungen

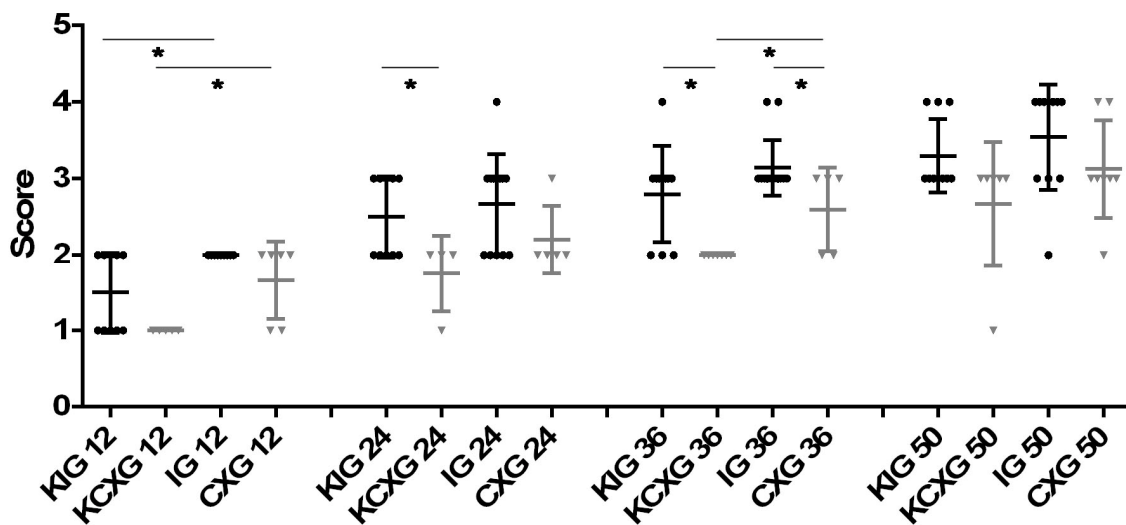
Die Magenschleimhaut der Mäuse mit IG-Hintergrund entwickelte im Verlauf teils erhebliche glanduläre Ektasien des Corpus ventriculi, korrespondierend mit einer deutlichen Verdickung der Mukosa. Wie in Abb. 24 illustriert, waren diese zystischen Läsionen in den Kathepsin X-suffizienten Mäusen stärker ausgeprägt, als in jenen mit Kathepsin X-Defizienz.



**Abb. 24: Zystische Schleimhautveränderungen**

A: schon in der Übersicht erkennbare ektatische Drüsen der Corpasmukosa einer IG-Maus 24 wpi (HE, 40x); B: CXG-Maus 24 wpi mit vereinzelt, deutlich geringer ausgeprägten glandulären Ektasien (HE, 40x)

In allen 4 Gruppen ließ sich über den gesamten zeitlichen Verlauf eine kontinuierliche Zunahme der zystischen Veränderungen nachweisen. Dabei zeigte IG stets die höchsten, und KCXG stets die niedrigsten Ausprägungen. Während KCXG den Mittelwert 2 erst 50 wpi überschritt (Mittelwert=2,7), wurde dies von den 3 anderen Gruppen bereits 24 wpi erreicht. Damit waren die zystischen Schleimhautveränderungen auch bei KIG stärker ausgeprägt als bei KCXG. Während 12 wpi diesbezüglich noch keine Signifikanzunterschiede vorlagen, betrug  $p$  zum Zeitpunkt 24 wpi 0,0314. Der Unterschied nahm 36 wpi weiter zu ( $p=0,0047$ ). 50 wpi näherte sich KCXG verzögert den Werten von KIG (Mittelwert 3,3) an, so dass zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied mehr bestand.



**Abb. 25: Statistische Auswertung der zystischen Schleimhautveränderungen**

Jeder dargestellte Datenpunkt entspricht einer IG (schwarz) bzw. CXG (grau) Maus. Signifikanz: \* =  $\leq 0,05$



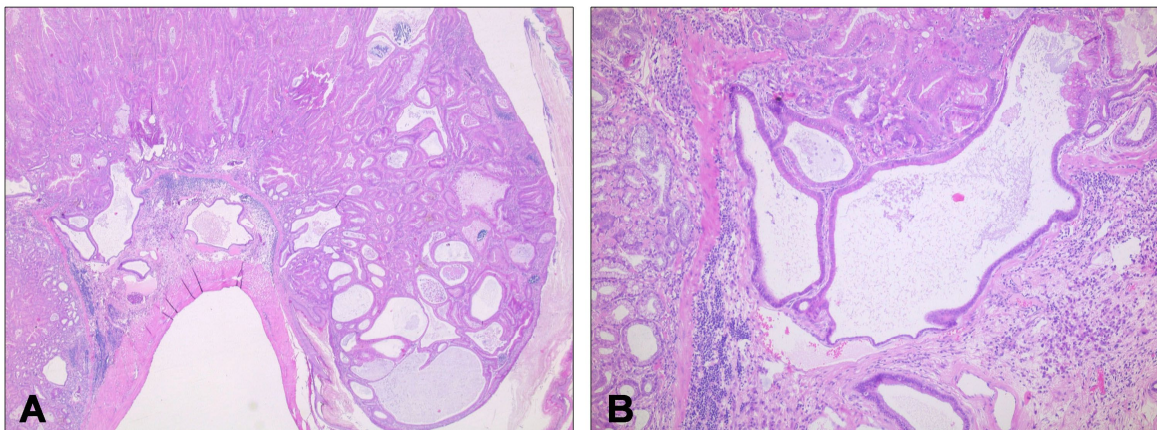
CXG wies stets einen um mindestens 0,4 höheren Mittelwert als KCXG auf, was sich teils auch in signifikanten Unterschieden widerspiegelte. So lag der  $p$ -Wert 36 wpi bei 0,0143. Im Gegensatz zu KCXG war die Zunahme zystischer Veränderungen bei CXG jedoch linear ausgeprägt.

Bei den *H. pylori*-infizierten Gruppen IG und CXG zeigte sich ein gleichartiges Bild wie bei den Kontrollen. So wies CXG zu allen Untersuchungszeitpunkten eine geringere Ausprägung zystischer Schleimhautveränderungen als IG auf. Allerdings war dies nur 36 wpi mit  $p=0,0222$  auch signifikant.

Der Vergleich von IG zu KIG zeigte ebenfalls stärker ausgeprägte zystische Veränderungen bei den infizierten Tieren. Dabei lagen die Mittelwerte bis auf 12 wpi ( $p=0,0114$ ) mit einer maximalen Differenz von 0,3 dicht beieinander. Ein zusammenfassender Vergleich der statistischen Daten zu den einzelnen Gruppen ist in Abb. 25 zu finden.

#### 4.12 Herniation

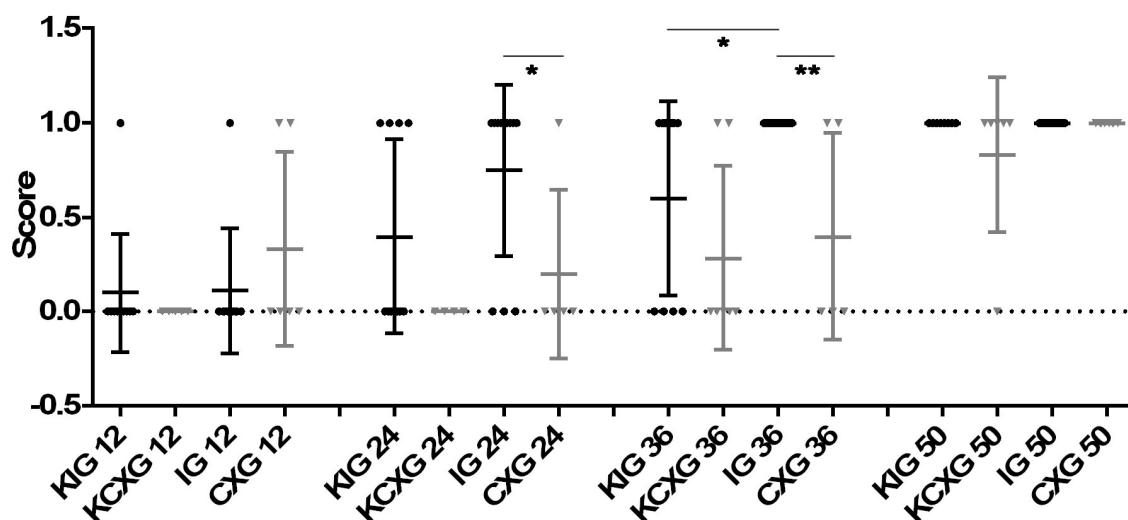
In der Magenwand fanden sich im Verlauf zunehmend Areale mit außerhalb der Mukosa gelegenen Drüsen. In der optischen Vergrößerung betrachtet, war die glanduläre Basalmembran intakt und es fand sich kein korrespondierendes desmoplastisches Stroma. Stattdessen lagen diese Drüsen regelmäßig in der Nähe von Lücken der *L. muscularis mucosae* beziehungsweise hindurchtretenden Blutgefäßen. Eine solche Schleimhaut-Herniation ist in Abb. 26 zu sehen.



**Abb. 26: Schleimhaut-Herniation**

A: Mehrere in der Submukosa gelegene hernierte Schleimhautanteile (HE, 25x); B: vergrößerter Ausschnitt aus A mit durch eine Lücke der *L. muscularis mucosae* hernierten Drüsen, keine epithelialen Atypien oder desmoplastisches Stroma, angrenzend zeigt sich ein Blutgefäß (HE, 100x)

Zu Versuchsbeginn traten bei vereinzelt Tieren von KIG, IG und CXG Schleimhautherniationen auf. Nur bei KCXG fanden sich keine entsprechenden Veränderungen. Im Verlauf nahm der Anteil von Tieren mit Herniationen in allen Gruppen bis 50 wpi zu. Dabei zeigte KCXG einen verzögerten Verlauf, so dass in dieser Gruppe Herniationen erstmals 36 wpi nachweisbar waren. Insbesondere bei den infizierten Tieren wies IG gegenüber CXG 24 wpi ( $p=0,0368$ ) und 36 wpi ( $p=0,0005$ ) signifikant häufiger Herniationen auf. 50 wpi zeigten alle Tiere, mit Ausnahme von KCXG, mukosale Herniationen. Für KCXG traf dies auf 83% der Tiere zu. Wie Abb. 27 zu entnehmen ist, wiesen die infizierten Tiere zwar im Mittelwert stets häufiger Herniationen auf als ihre nicht infizierten Kontrollgruppen, jedoch lag hierfür nur einmalig ein Signifikanzunterschied zwischen KIG und IG vor (36 wpi  $p=0,0078$ ).



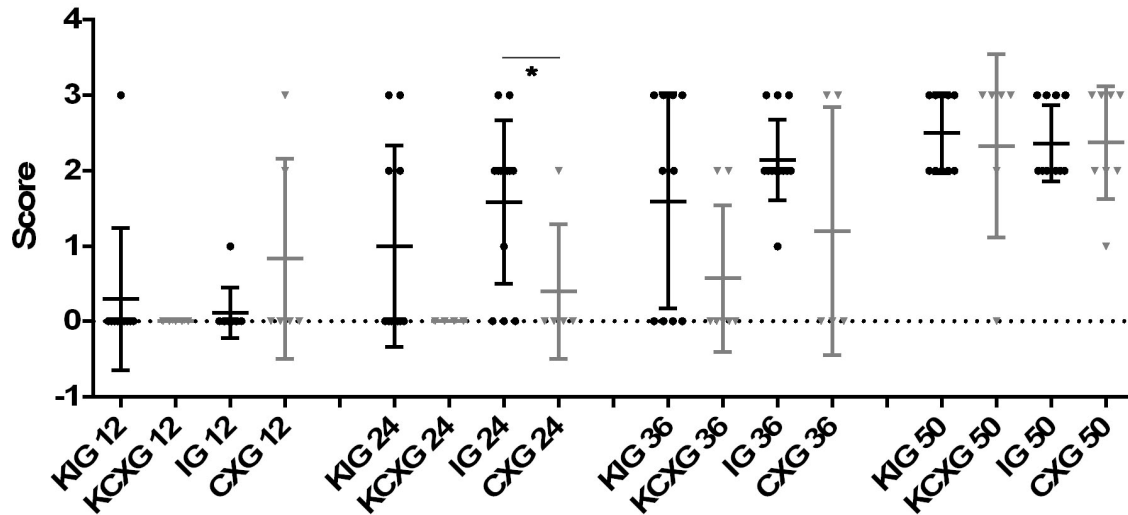
**Abb. 27: Statistische Auswertung der Herniation**

Jeder dargestellte Datenpunkt entspricht einer IG (schwarz) bzw. CXG (grau) Maus.  
 Signifikanzen: \* =  $\leq 0,05$ ; \*\* =  $\leq 0,001$

Es erfolgte auch eine statistische Analyse der Hernierungstiefe der betroffenen Drüsen (Abb. 28). Diese nahm bis zum Versuchsende bei allen Gruppen zu, und lag 50 wpi mit Mittelwerten von 2,3 bis 2,5 dicht beieinander.

KCXG wies im Vergleich zu allen Gruppen die geringsten Herniationstiefen auf. Erst 36 wpi zeigten sich bei 2 von 7 Tieren Herniationen, 50 wpi beinhaltete KCXG als einzige Gruppe noch ein Tier ohne hernierte Drüsen. Im Gegensatz dazu wiesen sowohl KIG als auch CXG höhere Mittelwerte auf. Bei KIG fand sich bereits 12 wpi bei einem von 10 Tieren eine Herniation. Im Verlauf nahm diese Zahl wie auch die Herniationstiefe bei KIG zu. So hatten 24 wpi bereits 2 von 10 Tieren die Maximalausprägung (3) erreicht, während dies bei KCXG erst 50 wpi auftrat.

Adäquat zu den Kontrolltieren wies CXG ab 24 wpi geringere Herniationstiefen als IG auf. Bis 50 wpi hatte sich die Ausprägung auf einen Mittelwerte von 2,4 angeglichen. Ein geringer Signifikanzunterschied ließ sich lediglich 24 wpi ( $p=0,0488$ ) ausmachen.



**Abb. 28: Statistische Auswertung der Herniationstiefe**

Jeder dargestellte Datenpunkt entspricht einer IG (schwarz) bzw. CXG (grau) Maus.  
Signifikanz: \* =  $\leq 0,05$

### 4.13 CXW-Vergleich

Das Untersuchungskollektiv umfasste 86 FVB/N-Tiere mit Kathepsin X-Defizienz, jedoch ohne IG-Komponente (CXW und KCXW). Davon waren 45 männlich. Die weiblichen Tiere zeigten eine geringere Ausprägung der zuvor benannten histomorphologischen Parameter als die männlichen Tiere. Dies kam bei den infizierten Tieren (CXW) stärker zum Tragen als bei den Kontrolltieren (KCXW).

Die *H. pylori*-Infektion persistierte bei CXW deutlich stärker als bei IG und CXG. Während bei den beiden genetisch hypergastrinämischen Mausgruppen zum Zeitpunkt 50 wpi mindestens 75% der Tiere keine nachweisbare Infektion mehr aufwiesen, traf dies nur auf 2 von 8 Tieren der CXW-Gruppe zu. Auch zeigten im Gegensatz zu IG und CXG ausnahmslos alle CXW-Tiere zu den vorangegangenen Untersuchungszeitpunkten eine nachweisbare Infektion.

Das chronische Entzündungszellinfiltrat war bei KCXW stets signifikant geringer ausgeprägt als bei CXW. Auch im Vergleich mit den beiden anderen Kontrollgruppen wies KCXW signifikant niedrigere Werte auf. Zwischen CXW und IG zeigten sich ebenfalls entsprechende Unterschiede, wenngleich 50 wpi keine Signifikanzen mehr nachweisbar waren. Nur im Vergleich von CXW mit CXG lagen einander ähnliche chronische Entzündungsbilder vor, ohne signifikante Unterschiede. Bezüglich der akuten Entzündung

wies KCXW zu keinem Zeitpunkt positive Werte auf und lag damit signifikant niedriger als CXW, wie auch KIG und KCXG. Während CXW wiederum statistisch klar niedrigere Werte zeigte als IG, traf dies nicht auf den Vergleich mit CXG zu.

Die oxyntische Atrophie war bei den infizierten CXW-Tieren ab 24 wpi stets signifikant stärker ausgeprägt als bei den entsprechenden Kontrolltieren. Auch waren die KCXW-Werte signifikant geringer als die der beiden anderen Kontrollgruppen. Bei den infizierten Tieren zeigten sich wieder nur signifikant geringere Ausprägungen im Vergleich mit IG, während zu CXG keine relevanten Unterschiede bestanden.

Für die intestinale Metaplasie fielen die Werte von KCXW ebenfalls signifikant niedriger aus als in den beiden anderen Kontrollgruppen. Auch IG lag wieder signifikant höher als CXW. Im Gegensatz zur Atrophie und Entzündung gab es aber Unterschiede im Vergleich von CXW zu KCXW sowie von CXW zu CXG. So lag der Wert der Kontrolltiere nur einmalig 24 wpi signifikant ( $p=0,0188$ ) unter jenen der infizierten Gruppe. Und 50 wpi war die intestinale Metaplasie bei CXG mit einem Mittelwert von 2,6 signifikant ( $p=0,0081$ ) höher als bei CXW mit einem Mittelwert von 1,2.

Auch die SPEM war bei CXW beziehungsweise KCXW geringer ausgeprägt als bei den beiden anderen Gruppen und deren Kontrolltieren. Allerdings wurde dies beim Vergleich der Kontrolltiere erst 36 wpi statistisch manifest. Weiterhin zeigte CXW im Vergleich mit den nicht infizierten Tieren 50 wpi signifikant höhere Ausprägungen. Und auch für den Vergleich zu CXG ließ sich für die SPEM, wie auch für die intestinale Metaplasie, teilweise eine signifikant geringere Ausprägung nachweisen.

Dysplastische Schleimhautveränderungen ließen sich sowohl bei KCXW als auch bei CXW nachweisen. Dabei zeigte CXW im Vergleich mit KCXW stärker ausgeprägte Dysplasien. KCXW zeigte wiederum teils signifikant geringere Ausprägungen als die beiden anderen Kontrollgruppen, wobei der Unterschied zu KCXG hier erst 50 wpi statistisch manifest wurde. Während CXW zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant geringer ausgeprägte Dysplasien zeigte als IG, war der Unterschied zu CXG statistisch nicht signifikant.

## 5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit setzt sich mit der Frage nach der Bedeutung von Kathepsin X in der *H. pylori*-assoziierten fortgeschrittenen gastralen Karzinogenese auseinander. Kathepsin X greift regulierend in Prozesse der Proliferation, Maturation, Migration und Adhäsion von Immunzellen, Phagozytose und Signaltransduktion ein [102], und scheint dadurch an malignen Prozessen beteiligt zu sein. Die Chromosomenregion 20q13, in der Kathepsin X genetisch verankert ist, liegt in verschiedenen Malignomtypen amplifiziert vor [35]. Korrelationen mit einer erhöhten Expression beziehungsweise einer schlechteren Prognose treten bei Lungenkarzinomen [118], Mammakarzinomen [17, 88] kolorektalen Adenomen und Karzinomen [38, 101], Prostatakarzinomen [67], Ovarialkarzinomen [44], bestimmten Formen maligner Melanome [83] und hepatozellulären Karzinomen [104] auf. Des Weiteren wurden erhöhte Kathepsin X-Werte nach schweren Traumata [68] sowie auch bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet [74].

In Untersuchungen an humanen Magenbiopsien konnte eine Hochregulation von Kathepsin X sowohl im Rahmen einer Infektion mit *H. pylori* [10], als auch im Magenkarzinom, insbesondere beim intestinalen Typ nach Laurén, nachgewiesen werden. Diese war primär in den intramukosalen Makrophagen aber auch in den Epithelien des Antrums nachweisbar [49]. *In vitro* erfolgten weitere Untersuchungen zur Pathophysiologie des verstärkt exprimierten Kathepsin X [4, 50]. Für die darauffolgend geplanten *in vivo* Untersuchungen wurden C57BL/6-Mäuse verwendet, da diese in der Lage sind, im Magen helicobacter-assoziierte präkanzeröse Veränderungen zu entwickeln [20, 34, 81, 109, 111].

Um den äußeren Bedingungen in der humanen gastralen Karzinogenese zu entsprechen, wurde als infektiöses Agens HpSS1 als typisches Korrelat der humanen *H. pylori*-Infektion genutzt [57], und von Versuchen mit dem ebenfalls mauspathogenen *H. felis* [56], sowie auch von der Nutzung zusätzlicher Karzinogene zur Magenkarzinominduktion [115, 116] abgesehen. 2013 wurden die Daten dieses Mausmodells zur Rolle des Kathepsin X-knockouts in der frühen gastralen Karzinogenese veröffentlicht. Da die beobachteten Veränderungen nicht das Stadium der Metaplasie überschritten [48], war für die Untersuchung fortgeschrittener präkanzeröser Veränderungen bis hin zum Karzinom ein zweites, auf den Voruntersuchungen basierendes Mausmodell notwendig. Dabei handelt es sich um das dieser Arbeit zugrunde liegende Versuchsmodell. Zu diesem Zweck erfolgte ein Wechsel des Mausmodells hin zu Gastrin-überexprimierenden Mäusen (IG-Mäuse). Vor dem Hintergrund dieser transgenen Tiere mit hohem *H. pylori*-assoziierten karzinogenen Potenzial [27] wurde via genetischer Ausschaltung von Kathepsin X dessen Rolle in der fortgeschrittenen Phase der gastralen *H. pylori*-assoziierten Karzinogenese

untersucht. Diese Kombination des C57BL/6-Mausmodells und des IG-Modells im Zusammenspiel mit einer *H. pylori*-Infektion ist ein etabliertes Verfahren, um durch gezielten Gen-knockout einzelner Proteine deren genaue Bedeutung für die gastrale Karzinogenese zu untersuchen [47].

### 5.1 *H. pylori*-Kolonisationsfähigkeit

Die Besiedelung mit HpSS1 war nach intensiver Prüfung im Rahmen der Vorexperimente [48] bei den infizierten Tieren aller Gruppen erwartungsgemäß analog zu den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen erfolgreich [25, 57, 111]. In den untersuchten Mägen der IG-, und CXG-Mäuse ließ sich eine progressive Verminderung der *H. pylori*-Kolonisationsdichte über den Untersuchungsverlauf, bis hin zum kompletten Keimverlust, nachweisen. Ähnliche Beobachtungen wurden sowohl bereits für mit *H. pylori*-infiziertes humanes Gewebe in Zusammenhang mit einer länger bestehenden chronischen Gastritis beschrieben [109], als auch für mit *H. pylori*-infizierte C57BL/6-Mäuse [25]. Im Rahmen einer chronischen *H. felis*-Infektion wurde in C57BL/6-Mäusen im Verlauf ebenfalls eine sinkende Kolonisationsdichte nachgewiesen, korrelierend mit der Zunahme der Atrophie [84, 109]. Dem entgegen wurden in einer Publikation aus dem Jahr 2009 sowohl in C57BL/6- als auch in IG-Mäusen trotz fortgeschrittener atrophischer und dysplastischer Veränderungen über einen Zeitraum von 18 mpi stabile *H. felis*-Kolonisationsstärken beschrieben [92].

Der Magen ist nicht selbständig in der Lage *Helicobacter* zu eliminieren [108], so dass die Ursache für die sich vermindernde Kolonisationsdichte vielmehr in den vorherrschenden Umgebungsbedingungen zu suchen ist. So war in einer estnischen Langzeitstudie die gastrale *H. pylori*-Besiedelungsdichte in nicht atrophischen Mägen relativ konstant, jedoch war eine signifikante Abnahme in Abhängigkeit von der Zunahme atrophischer Veränderungen nachweisbar [42]. Der Keimverlust lässt sich zum Teil mit der in den späteren Abschnitten beschriebenen oxyntischen Atrophie erklären. Während eine intakte Magenschleimhaut Säure bildet, die von *H. pylori* durch dessen Ureaseaktivität mittels Bildung von Ammoniumionen neutralisiert wird [12, 36], wird durch den atrophisch bedingten Verlust der Magensäure produzierenden Parietalzellen im Corpus ventriculi der pH-Wert des Magensafts verändert, und damit die Umgebungsbedingungen von *H. pylori* beeinflusst. Des Weiteren ist die epithelnahe Muzinschicht, in der sich das Bakterium aufhält [86], von Bedeutung. Die Kolonisationsfähigkeit ist streng mit der Art der extrazellulären Muzine assoziiert [99]. Da sich im Rahmen metaplastischer Veränderungen auch die Muzine verändern [8, 13, 15], findet sich hier eine weitere Erklärung für den Keimverlust. Passend dazu wiesen die IG-Mäuse, für die ausgeprägtere

atrophische und metaplastische Veränderungen als bei CXG beobachtet wurden, im Vergleich auch einen stärker ausgeprägten Keimverlust auf.

In den eigenen 2013 veröffentlichten Voruntersuchungen mit HpSS1 in C57BL/6-Mäusen war die Kolonisationsdichte 50 wpi verglichen mit 12 wpi nur minimal vermindert. Es ließen sich auch keine Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen nachweisen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die bis dahin beschriebenen atrophischen beziehungsweise metaplastischen Veränderungen noch nicht ausgeprägt genug waren, um die Kolonisationsfähigkeit von *H. pylori* zu beeinträchtigen. Da sich in diesem ersten Modell der frühen gastralen Karzinogenese auch keine Unterschiede bezüglich der zellulären Kathepsin X-Defizienz auf die *H. pylori*-Besiedelung ergaben [48], diese im vorliegenden Modell aber nachweisbar waren, lässt sich ursächlich nächstliegend ein sekundärer Effekt von Kathepsin X auf die *H. pylori*-Besiedelung im Sinne morphologischer Veränderungen vermuten.

## 5.2 Geschlecht

Bei beiden Geschlechtern ließen sich alle Stufen der prä-, beziehungsweise parakanzerösen Correa-Kaskade nachweisen [13]. Dennoch war die Prävalenz und Intensität bei den männlichen IG- und CXG-Mäusen höher als bei den weiblichen Tieren. Darüber hinaus wiesen zwei männliche IG-Mäuse 50 wpi ein intramukosales Adenokarzinom des Magens auf. Eine erhöhte Suszeptibilität des männlichen Geschlechts wurde auch in anderen Mausexperimenten beschrieben [27, 30, 117]. Diese Ergebnisse passen zu den epidemiologischen Daten des Menschen. Demnach sind Männer etwa doppelt so häufig von Magenkarzinomen betroffen wie Frauen [39]. Als ursächlich wurde hierfür ein protektiver Effekt von Östrogen auf den Verlauf der gastralen Karzinogenese identifiziert [76, 89].

Bei den infizierten Kathepsin X-suffizienten Mäusen waren die Geschlechtsunterschiede bezüglich der Mittelwerte stärker ausgeprägt als bei den CXG-Mäusen. Diese Beobachtung steht in Zusammenhang mit der generellen Wirkung von Kathepsin X auf die gastrale Karzinogenese. Da die Kathepsin X-defizienten CXG-Mäuse auch allgemein geringer ausgeprägte pathologische Histomorphologien des Magens aufweisen, wird die geringere Abweichung hierdurch erklärbar.

### 5.3 Correa-Kaskade

Das **chronische Entzündungszellinfiltrat** war in IG und KIG jeweils stärker ausgeprägt als in CXG beziehungsweise KCXG, wobei die Unterschiede in den mit *H. pylori*-infizierten Gruppen überwiegend signifikant waren. 50 wpi näherten sich die Werte einander an. Die **floride Entzündungskomponente** lag bei den Kathepsin X-exprimierenden Mäusen ebenfalls durchschnittlich höher. Jedoch war dieser Unterschied nur im Vergleich der nicht infizierten Mäuse einmalig signifikant. Kein Tier erreichte die Maximalausprägung einer floriden Entzündung mit massenhaft neutrophilen Granulozyten. Für die **oxyntische Atrophie** mit dem Verlust spezifischer Magendrüsen im Corpus ventriculi wiesen IG und KIG ebenfalls höhere Werte auf als die Kathepsin X-defizienten Tiere. Die größten Unterschiede bestanden 12 wpi. Auch hier näherten sich die Werte 50 wpi einander an. Die **intestinale Metaplasie** und die **SPEM** zeigten einen ähnlichen Verlauf. Beide Metaplasieformen waren in den Kathepsin X-exprimierenden Tieren durchschnittlich meist stärker vertreten als in CXG beziehungsweise KCXG. Die deutlichsten Signifikanzunterschiede bestanden 12 wpi. Wiederum trat eine Annäherung der Werte 50 wpi auf. Lediglich für die SPEM bestand zwischen IG und CXG zu diesem Zeitpunkt ein gerade noch signifikanter Unterschied. **Intraepitheliale Neoplasien** traten in allen Gruppen auf, jedoch waren sie in den Kathepsin X-exprimierenden Mäusen stärker und früher vertreten als in den defizienten Mäusen. Lediglich die KCXG-Gruppe wies 12 wpi noch kein Tier mit intraepithelialen Neoplasien auf. Wie schon bei der chronischen Entzündung, der oxyntischen Atrophie und den Metaplasien beschrieben, näherten sich die Werte der intraepithelialen Neoplasien der Kathepsin X-defizienten Mäuse im Verlauf jenen von IG beziehungsweise KIG an. Allein bei zwei männlichen IG-Mäusen konnten 50 wpi gut differenzierte invasive **Adenokarzinome** des Magens nachgewiesen werden. Diese waren wenige Millimeter groß, lagen oberflächlich und noch innerhalb der Mukosa des Corpus ventriculi. Sie waren von kleinazinären, dicht gelagerten, gut differenzierten Tumorzellverbänden gekennzeichnet, im Sinne eines intestinalen Typs nach Laurén [54]. Lymphogene oder hämatogene Metastasen fielen bei der Präparation nicht auf.

In Untersuchungen von IG-Mäusen mit *H. felis*-Infektion entwickelten die Tiere 5-6 mpi Adenokarzinome. Die nicht infizierten IG-Mäuse bildeten nach 20 Monaten Adenokarzinome aus [107]. Auch durch *HpSS1* konnte bei männlichen IG-Mäusen Adenokarzinome induziert werden. Diese traten 7 Monate *post infectionem* auf [27].

Zusammengefasst wiesen die Kathepsin X-suffizienten IG-Mäuse eine beschleunigte gastrale Karzinogenese auf. Diese wurde durch die *H. pylori*-Infektion aggraviert. Die histomorphologischen Veränderungen waren, passend zu den eigenen Voruntersuchungen [48] wie auch zu den Beobachtungen anderer Forschungsgruppen



[25, 92, 109], im Corpus ventriculi lokalisiert. Es fiel auf, dass die am stärksten atrophisch veränderten Schleimhautareale in den glandulären Magenanteilen nahe der Margo plicatus lagen, während die SPEM eher distal hiervon lokalisiert war. Bezüglich dieser Beobachtungen erfolgen im Rahmen einer lokalisationspezifisch orientierten Dissertation weitere Untersuchungen (noch nicht veröffentlichte Daten).

Dass Kathepsin X eine Rolle in der gastralen *H. pylori*-Infektion spielt, wurde bereits 2004 aufgrund einer gesteigerten Enzymexpression bei der Untersuchung humaner Magenbiopsien postuliert [10]. Ein Jahr später konnte auch für das *H. pylori*-assoziierte Magenkarzinom eine gesteigerte Expression nachgewiesen werden [49]. Die Hochregulation von Kathepsin X scheint durch eine Überexpression verschiedener Zytokine mittels CagA-abhängiger Signalwege induziert zu werden [50]. Die gesteigerte Expression ist vor allem in den intramukosalen Makrophagen, aber auch in den Epithelzellen verstärkt, und lässt sich im den Großteil der gastralen Adenokarzinome vom intestinalen Typ nach Laurén nachweisen [49, 50]. Das lässt vermuten, dass Kathepsin X in die Prozesse der gastralen Karzinogenese involviert ist.

Im Rahmen der eigenen Voruntersuchungen wurden am C57BL/6-Mausmodell mit Kathepsin X-Defizienz und *H. pylori*-Infektion histomorphologische und immunhistochemische Parameter sowie das Zytokin-Expressionsmuster untersucht. Die infizierten Mäuse zeigten unabhängig vom Kathepsin X-Status eine relativ konstante, mäßig- bis hochgradige chronische und floride Entzündung mit regelmäßigem Nachweis intraglandulärer Neutrophilen-Ansammlungen und Lymphfollikeln. Die Kathepsin X-defizienten Mäusen wiesen interessanterweise im Rahmen der *H. pylori*-Infektion eine progrediente intramukosale Makrophagenmigration auf. Des Weiteren konnte die *H. pylori*-Infektion eine SPEM induzieren. Diese war 50 wpi bei den Kathepsin X-defizienten Mäusen signifikant stärker ausgeprägt. Intraepitheliale Neoplasien oder eine Progression zum Karzinom wurden nicht beschrieben [48]. Auch im Rahmen der Infektion mit *H. felis* wurde keine über eine SPEM hinausreichenden Veränderungen beobachtet [109]. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, insbesondere die stärker ausgeprägte SPEM bei Kathepsin X-Defizienz, ließen einen protektiven Effekt der Protease auf die frühe gastrale Karzinogenese vermuten [48].

Sämtliche Ergebnisse dieses C57BL/6-Mausmodells liegen bezüglich der gastralen Karzinogenese-Kaskade zeitlich noch vor dem ersten Untersuchungszeitpunkt des hier untersuchten IG-Modells. Die aktuellen Untersuchungsergebnisse, die der Phase der fortgeschrittenen gastralen Karzinogenese entsprechen, zeigen in allen Parametern der Correa-Kaskade eine direkte Assoziation zwischen einer Kathepsin X-Suffizienz und einer akzellerierten Karzinogenese. In Zusammenschau beider Tierexperimente lässt sich vermuten, dass Kathepsin X in der frühen Karzinogenese protektive Effekte aufweist,

diese sich im fortgeschrittenen Stadium aber ins Gegenteil verkehren. Diese Hypothese wird gestützt durch die Untersuchung der Makrophageneinwanderung. Während in den Vorexperimenten eine signifikant gesteigerte *H. pylori*-assoziierte Makrophagenmigration in den Kathepsin X-defizienten Mäusen zu finden war [48], trifft dies im IG-Modell der fortgeschrittenen Karzinogenese lediglich auf die nicht infizierten Mäuse zu (noch nicht veröffentlichte Daten). In unreifen dendritischen Zellen transloziert Kathepsin X in die Zellmembran, und wandert erst nach deren Ausreifung in perinukleäre Regionen zurück. Auf diese Weise wird die Fähigkeit zur Modifizierung von  $\beta$ 2-Integrinrezeptoren, und damit auch der zellulären Adhäsionsfähigkeit, beeinflusst [45]. Ähnliche Lokalisationsunterschiede von Kathepsin X werden auch in kolorektalen Karzinomen beschrieben [38]. Es ist zu vermuten, dass diese Lageveränderung eine Schlüsselrolle in der beschriebenen Wirkungsumkehr von Kathepsin X spielt. Die Ergebnisse von Kos et al. sowie die eigenen Vorexperimente deuten darauf hin, dass die prominente Einwanderung von Makrophagen beziehungsweise dendritischen Zellen in Wechselwirkung mit dieser enzymatischen Lageveränderung steht.

Die Kathepsin X Defizienz führt bei *H. pylori*-infizierten C57BL/6 Mäusen zu einer verstärkten Proliferation [48]. Diese ist mit einer Expansion der Proliferationszone verbunden, und führt zu einer deutlichen Ausbildung von Regeneratepithel. Sie tritt sowohl bei chronischen Gastritiden als auch im Rahmen eines gesteigerten Magenkarzinom-Risikos auf [26]. Die Beurteilung der Proliferation am vorliegenden IG-Modell erfolgt in separaten Untersuchungen. Jedoch weisen die aktuellen Ergebnisse im Gegensatz zu den Voruntersuchungen in den Kathepsin X-suffizienten Mäusen deutlich mehr **Regeneratepithel** auf. Diese Beobachtung stützt die Hypothese einer Wirkungsumkehr.

Insgesamt sind die Ergebnisse gut vereinbar mit den Daten aus Untersuchungen anderer Malignome, in denen für Kathepsin X eine Assoziation mit der Karzinomentstehung nachgewiesen werden konnte, und zum Teil auch bereits in den präneoplastischen Veränderungen eine verstärkte Expression vorlag [17, 38, 67, 88, 101, 103].

## 5.4 Weitere histomorphologische Veränderungen

Das Oberflächenepithel aller Mäuse wies schon früh teils erhebliche hyperplastische Epithelveränderungen und elongierte Foveolen auf. In deren Folge war die Corpusmukosa insbesondere der männlichen Tiere 50 wpi hochgradig verbreitert, mit dem Resultat eines teils erheblich verminderten Magenumens. Diese Beobachtungen sind auf die gesteigerte Gastrinsekretion der IG-Mäuse zurückzuführen, da das Peptidhormon das epitheliale Zellwachstum im Magen stimuliert [30, 110]. Die Infektion

mit *Helicobacter* führt ebenfalls zu hyperplastischen Epithelveränderungen [20]. Dementsprechend war die foveoläre Hyperplasie bei den infizierten Mäusen vergleichsweise stärker ausgeprägt und zeigte erst zum Versuchsende keine Signifikanzunterschiede mehr. Bezüglich des Kathepsin X-Status bestanden ebenfalls überwiegend statistisch relevante Unterschiede. So war die Hyperplasie bei den defizienten CXG-Mäusen bis 36 wpi schwächer ausgeprägt.

Die Kathepsin X-exprimierenden Mausgruppen zeigten im Mittelwert vergleichsweise stärker ausgeprägte **Epitheldefekte**. Allerdings waren die Unterschiede nur zwischen den beiden keimfreien Gruppen auch statistisch klar signifikant.

Alle Mäuse mit IG-Hintergrund wiesen in unterschiedlichem Ausmaß glanduläre Lumenektasien mit teils erheblicher **Zystenbildung** auf. Auch hier waren die zystischen Veränderungen in den Kathepsin X-suffizienten Tieren stärker ausgeprägt als in CXG und KCXG. Allerdings wiesen die nicht infizierten Tiere stärker ausgeprägte Signifikanzunterschiede auf, als die mit *H. pylori* infizierten Mäuse.

Die Verlagerung nicht maligner Schleimhautanteile in die unterhalb der *L. propria* gelegenen Magenwandregionen zeigte regelmäßig eine enge Lagebeziehung zu Blutgefäßen, die durch die *L. muscularis mucosae* dringen. Diese **hernierten Schleimhautanteile** traten schon früh auf und zeigten im zeitlichen Verlauf eine Frequenzzunahme. Lediglich zwischen den beiden infizierten Gruppen lagen signifikant häufiger Herniationen in den Kathepsin X-exprimierenden Mäusen vor. Über das Vorkommen von Hernien wurde bereits 2005 von Rogers et al. berichtet [81]. Die Herniationstiefe war in allen Gruppen ebenfalls progredient, wies allerdings allein 24 wpi einen gerade noch signifikanten Unterschied zwischen den beiden infizierten Gruppen auf.

Auch für IG-Mäuse mit *H. felis*-Infektion wurden ausgeprägte foveoläre Hyperplasien und eine erhebliche Magenwandverdickung beschrieben [107]. Die mit der hochgradigen Mukosahyperplasie einhergehende Lumenverkleinerung des Magens lässt vermuten, dass der intragastrale Druck insbesondere im Rahmen der Futteraufnahme erhöht ist. Dieser Mechanismus hat wahrscheinlich das Auftreten von Herniationen sowie die Ausprägung der oxyntischen Atrophien im Sinne einer Druckatrophie aggraviert. Weiterhin ist denkbar, dass auch die beschriebenen Epitheldestruktionen zum Teil im Rahmen mechanisch bedingter nahrungsmittelassoziierter Erosionen zu beurteilen sind.

Die C57BL/6-Mäuse aus dem Vorexperiment wiesen lediglich im Rahmen der *H. pylori*-Infektion eine foveoläre Hyperplasie und glanduläre Ektasien auf. Die Veränderungen traten jedoch unabhängig vom Kathepsin X Status auf. Beide morphologischen Parameter zeigten in Bezug auf die Untersuchungszeitpunkte konstante Werte [48]. Die hyperplastische Mukosaverbreiterung der Mausmägen des C57BL/6-Modells war im

Vergleich zu den IG-Mäusen der aktuellen Untersuchungen deutlich schwächer ausgeprägt (nachträgliche Beobachtung).

## 5.5 Zielmoleküle von Kathepsin X

Kathepsin X ist in mehrere intrinsische enzymatische Prozesse involviert. So wird Profilin 1, ein Tumorsuppressor, im Prostatakarzinom durch Kathepsin X inaktiviert. Hierdurch wird die Fähigkeit der Tumorzellen für Adhäsion, Migration und Invasivität gesteigert [77]. Profilin 1 wird auch in Mammakarzinomen, hepatozellulären Karzinomen, Urothelkarzinomen, Pankreaskarzinomen und bestrahlungsresistenten Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region herunterreguliert [46].

Als weitere Zielmoleküle sind die  $\beta$ 2-Integrinrezeptoren Mac-1 und LFA-1 bekannt. Beide werden durch Kathepsin X aktiviert. Die Mac-1-Aktivierung führt zu einer gesteigerten Adhäsion von Monozyten und Makrophagen an Fibrinogen. Des Weiteren werden phagozytotische Prozesse und die Reifung dendritischer Zellen reguliert. Die Aktivierung von LFA-1 wirkt sich auf die Proliferation und Migration von T-Lymphozyten aus. Somit beeinflusst Kathepsin X die Prozesse der Immunantwort [1, 40, 45, 55, 75, 77].

Weitere Substrate sind  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Enolase. Durch deren Inaktivierung wird ihre neurotrophe Aktivität, und damit die Neuritogenese, beeinflusst.  $\gamma$ -Enolase gilt auch als prognostischer Marker für das Therapieansprechen von Lungenkarzinomen und Neuroblastomen [45, 77, 90]. Durch den Verdau von CXCL-12 beeinflusst Kathepsin X hämatopoetische Stammzellen und Progenitorzellen des Knochenmarks [91]. Und auch Bradykinin und Kallidin, Mitglieder des Kallikrein-Kinin-Systems, werden durch Kathepsin X modifiziert und in ihrer Rezeptorspezifität beeinflusst. Des Weiteren ist Kathepsin X an der Bildung von Angiotensin II aus Angiotensin I beteiligt [66].

Somit weist Kathepsin X eine ganze Reihe von Substraten auf, die vorwiegend in Prozesse des Immunsystems, aber auch in weitere regulatorische Mechanismen des Körpers involviert sind. Diese Prozesse tragen wahrscheinlich grundlegend zu der weit verbreiteten Hypothese einer Promotorfunktion von Kathepsin X in der Karzinogenese bei. Diesbezüglich scheint insbesondere die inflammatorische Bedeutung, und im Speziellen die gastrale Interaktion zwischen Makrophagen und Epithelzellen, eine essenzielle Rolle zu spielen. Obwohl die hier vorgestellten Daten die immunmodulatorische Funktion von Kathepsin X im Magen untermauern, bedarf es weiterführender Untersuchungen, um die Funktionsweise dieser komplexen Mechanismen und ihrer Wechselwirkungen zu verstehen.

## 5.6 Einfluss von Maustyp und Infektion

Die beschriebenen histomorphologischen Veränderungen waren bereits 12 wpi deutlich fortgeschrittener und stärker ausgeprägt als im Vorexperiment. Im Unterschied zu den C57BL/6-Mäusen wiesen auch die nicht infizierten Tiere progrediente präkanzeröse Veränderungen bis hin zur hochgradigen intraepithelialen Neoplasie auf. Diese Beobachtungen sind in der Wahl des Mausmodells begründet. Hypergastrinämische IG-Mäuse entwickeln zuverlässig sowohl ohne Infektion, als auch akzelleriert mit Infektion durch *H. felis* [107] oder *H. pylori*, über die Correa-Kaskade hinaus Adenokarzinome des Magens [30]. Dabei wurde die Hypergastrinämie als begünstigend für die gastrale Karzinogenese identifiziert [92, 107]. So fördert Gastrin die Säuresekretion und sendet Wachstumsreize sowohl an unauffälliges, als auch an malignes gastrointestinales Gewebe, und führt zu einer hyperplastischen Mukosaverbreiterung im Bereich des Fundus [110]. Auch die alleinige Infektion mit *H. pylori* führt zu einer gesteigerten Gastrinbildung [78]. Gemeinsam mit der präexistenten Hypergastrinämie von IG-Mäusen ließen sich synergistische Effekte der Helicobacter-Infektion nachweisen [107]. So erklärt sich, dass die infizierten IG-Mäuse deutlich früher und stärker ausgeprägte morphologische Karzinogenesemerkmale aufweisen als die C57BL/6-Mäuse aus den Vorexperimenten. Aber auch die Veränderungen der nicht infizierten IG-Mäuse lassen sich dadurch herleiten. Die Annäherung an die Werte der Kathepsin X-exprimierenden Mäuse zum Zeitpunkt 50 wpi ist indirekt ebenfalls hierdurch erklärbar. So erreichen IG und KIG vergleichsweise früh die Maximalausprägungen spezifischer histopathologischer Veränderungen und stagnieren auf diesem Level. Obwohl die Kathepsin X-defizienten Mäuse eine verzögerte Karzinogenese aufweisen, sind sie in der Lage, sich diesen Werten durch ihren IG-Hintergrund sowie auch partiell die *H. pylori*-Infektion anzunähern. In der Folge kommt es zu dem mehrfach beschriebenen Signifikanzverlust 50 wpi.

Sämtliche histomorphologische Veränderungen zeigten in beiden genetischen IG-Mausvarianten eine deutliche *H. pylori*-assoziierte Zunahme. Wie bereits beschrieben, ist die Progredienz der Veränderungen zum großen Teil der genetisch bedingten Hypergastrinämie zuzuschreiben, weshalb auch bei den nicht infizierten Mäusen alle Parameter der präkanzerösen Correa-Kaskade nachweisbar sind. Da jedoch in den mit *H. pylori*-infizierten C57BL/6-Mäusen ebenfalls signifikant stärker ausgeprägte morphologische Veränderungen nachweisbar waren [48], ist dieser Effekt zumindest in der Voruntersuchung allein der Infektion zuzuschreiben.

Neben dem transgenen IG-Modell beeinflusst auch der FVB/N-Maushintergrund die Ergebnisse bezüglich der *H. pylori*-Besiedlungsfähigkeit und der inflammatorischen Antwort [64], sowie daraus resultierend auch der histopathologischen Veränderungen.

FVB/N-Mäuse sind ohne die transgenen Merkmale des IG-Modells nicht in der Lage, spontan Metaplasien, Dysplasien oder Karzinome zu entwickeln [107]. IG-Mäuse, welche üblicherweise im FVB/N-Hintergrund genutzt werden, weisen eine erhebliche Suszeptibilität für die helicobacterassoziierte Karzinogenese auf. Dahingegen sind sie in einem C57BL/6-Hintergrund nicht in der Lage, Karzinome auszubilden [34].

Um eine Brücke zum ersten Versuchsabschnitt mit den C57BL/6-Mäusen zu schlagen, wurden auch im vorliegenden Modell Kathepsin X-defiziente Mäuse mit FVB/N-Hintergrund, jedoch ohne IG-Transgenität mitgeführt. Für die Beurteilung der Auswirkungen der unterschiedlichen Inzuchtstämme sind in der Zukunft vergleichende Untersuchungen beider Kathepsin X-defizienter Mausgruppen geplant, die eine bessere Korrelation beider Versuchsabschnitte zueinander ermöglichen sollen.

Separat vorliegende Untersuchungen zur Zytokinexpression im IG-Mausmodell (noch nicht veröffentlichte Daten) zeigen, dass die proinflammatorischen Zytokine MCP-1, IL8, CXCR2, und TNF $\alpha$  durch die *H. pylori*-Infektion induziert werden. Ihre Werte nehmen über den Verlauf gering zu. Interessanterweise ist 50 wpi abrupt ein deutlicher Anstieg von MCP-1, IL8 und CXCR2 zu verzeichnen, der bei IG stärker ausgeprägt ist als bei CXG. Die Ursache hierfür ist unklar. Eventuell ist die bereits beschriebene, scheinbar mit der Ausreifung von Makrophagen und dendritischen Zellen assoziierte, Translokation von Kathepsin X an die Zellmembran beziehungsweise in die perinukleäre Region hierfür relevant [45]. Möglicherweise handelt es sich aber auch um einen dem Gastrin zuzuschreibenden Effekt. Bei IG-Mäusen wurde ein biphasischer Verlauf bezüglich der gastrinassoziierten Säuresekretion beschrieben. Dabei entwickelt sich nach initial gesteigerter Säuresekretion atrophiebedingt eine Hypochlorhydrie [107]. Dieser zweistufige Verlauf könnte mit dem beschriebenen Zytokinanstieg 50 wpi in Zusammenhang stehen. Passend dazu wiesen auch die nicht infizierten Tiere erst ab 50 wpi eine sprunghafte Zunahme von MCP-1, CXCR2, TNF $\alpha$  und CCL2 auf, während ein solch ausgeprägter Anstieg im Experiment mit den C57BL/6-Mäusen nicht nachweisbar war [48]. Die Kathepsin X-defizienten FVB/N-Mäuse ohne IG-Hintergrund (CXW) zeigten nur eine geringe Sekretion von CCL2 und MCP-1, die aber deutlich unter den Werten von IG und CXG lagen. Nur für MCP-1 fand sich eine Triggerung durch die *H. pylori*-Infektion. Im Rahmen der Voruntersuchungen am C57BL/6-Modell trat ebenfalls eine durch *H. pylori*-initiierte Zunahme der proinflammatorischen Zytokine CXCL1, MCP-1, IL-1 $\beta$ , und IL-6 auf. Diese wurden jedoch zum Teil signifikant stärker in den Kathepsin X-defizienten Mäusen exprimiert [48]. Bereits anhand vorangegangener *in vitro* Untersuchungen mit gastralen Epithelzellen und Makrophagen wurden die Zytokinexpressionsmuster untersucht. Im Infektionsmodell mit *H. pylori* ließ sich eine vom Kathepsin X-Status abhängige Interaktion beider Zellgruppen nachweisen. Die Autoren schlossen hierdurch

auf eine Bedeutung von Kathepsin X für die B- und T-Zell-Proliferation und -migration, sowie auch für die Adhäsion von Makrophagen [4].

Der für beide Untersuchungsphasen genutzte *H. pylori*-Stamm SS1 liegt in den oberen Foveolenabschnitten und zeigt sich teils adhärent zum Epithel [58]. Er exprimiert sowohl CagA und VacA [57], als auch die Pathogenitätsinsel cagPAI. Letztere, die für die Translokation von cagA in die Epithelzelle verantwortlich ist [79], gilt bei HpSS1 jedoch als nicht funktionstüchtig [29]. Dennoch wurde überraschenderweise im Rahmen der Voruntersuchungen cagA in den infizierten Zellen nachgewiesen [48]. Crabtree et al. beschreibt dazu, dass möglicherweise spontane genetische Veränderungen während der Mauspassage zu Funktionsveränderungen von cagA oder cagPAI führen können [16]. Möglicherweise spielt aber auch die genannte Fähigkeit zur Adhärenz eine Rolle für die zelluläre cagA-Positivität. Der Nachweis der IL-8-Expression unterstreicht diese Beobachtung [48], da dieses proinflammatorische Zytokin ohne intaktes cagPAI von den infizierten Zellen nicht gebildet werden kann [28, 29, 30]. Es wird vermutet, dass IL-8 die chronische Entzündung und die Karzinomentstehung unterstützt. Es wird im Magenkarzinom überexprimiert und korreliert negativ mit der Prognose [2].

## 5.7 Schlussfolgerungen

Anhand der aktuellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Kathepsin X in der späten Phase der gastralen Karzinogenese eine fördernde Wirkung auf die Tumorentstehung hat. So wiesen die IG-Mäuse mit Kathepsin X-Expression eine vergleichsweise verstärkte und akzellerierte Karzinogenese im Rahmen der Correa-Kaskade auf. Dieser Effekt wurde durch die *H. pylori*-Infektion zusätzlich unterstützt.

In Karzinomen der Prostata und des Kolorektums sowie deren vorausgehenden intraepithelialen Neoplasien konnte eine verstärkte Kathepsin X-Expression nachgewiesen werden [38, 67]. Diese Beobachtung sowie die aktuellen Untersuchungsergebnisse legen nahe, dass Kathepsin X innerhalb der Karzinogenese vor allem in die Prozesse der Promotion und der Progression involviert ist.

Interessanterweise deuten die Ergebnisse aus der ersten Untersuchungsphase ohne IG-Hintergrund auf einen initialen protektiven Effekt hin. Somit ist eine Wirkungsumkehr in der fortgeschrittenen Phase der gastralen Karzinogenese zu vermuten. Die gesteigerte Zahl F4/80 positiver Zellen in den Kathepsin X-defizienten Mausmägen des Vorexperiments [48] sowie die Vermehrung dendritischer Zellen in aktuellen Analysen des IG-Modells deuten darauf hin, dass die Kausalität in den Wechselwirkungen von Kathepsin X mit Makrophagen und dendritischen Zellen zu suchen ist. So ist Kathepsin X über die Aktivierung von Integrinrezeptoren an deren Ausreifung beteiligt. Die

Integrinrezeptoren scheinen ebenfalls eine Schlüsselfunktion zu besitzen. Bei ihnen handelt es sich um Zielmoleküle von Kathepsin X, die sich auf zahlreichen Tumorentitäten überexprimiert vorfinden und mit Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasierung assoziiert sind [45]. Somit steht Kathepsin X über seine enzymatische Wirkung in Verbindung mit für die gastrale Karzinogenese scheinbar relevanten immunologischen Prozessen.

## 5.8 Anwendung

Die Expression von Kathepsin X steht in Zusammenhang mit der Prognose verschiedener Malignome [102]. So geht eine gesteigerte Amplifikation der Genregion 20q13.2, welche Kathepsin X verschlüsselt, beim Mammakarzinom mit einer schlechteren Prognose einher, und tritt bei kolorektalen Karzinomen vermehrt im bereits metastasierten Tumorstadium auf [35]. Hohe Kathepsin X-Serumlevel sind bei kolorektalen Karzinomen und Lungenkarzinomen mit einem geringeren Gesamtüberleben assoziiert [102, 118] und korrelieren auch beim hepatozellulären Karzinom mit fortgeschrittenen klinischen Stadien [104]. Somit wäre eine Nutzung von Kathepsin X als Prognoseparameter vorstellbar. Möglicherweise lässt sich die Anwendung auch auf eine Vorhersagemöglichkeit zum Ansprechen auf eine Chemotherapie erweitern [102].

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit liegt im diagnostischen Bereich. Kathepsin X wird beim Magenkarzinom gegenüber der *H. pylori*-Gastritis nochmals hochreguliert [49]. Es ist denkbar, dass man sich diese Unterschiede zu Nutzen macht, um bei Risikogruppen bereits nicht invasiv die Gefahr des Vorliegens oder der Entstehung eines Karzinoms besser evaluieren zu können. Möglicherweise können hierbei serologische Grenzwerte bei der Risikoevaluation helfen. Da die gastrale Kathepsin X-Überexpression durch Mechanismen der CagA-abhängigen Signaltransduktion erfolgt [50], könnten diese Untersuchungen die PCR Analyse des Virulenzfaktorenstatus teils ersetzen und bezüglich einer Risikostratifizierung bei vorbestehenden präkanzerösen Magenläsionen von Nutzen sein.

In schwierigen Fällen könnte Kathepsin X auch unterstützend in der Zuordnung bestimmter Entitäten Anwendung finden. So sind bei Ovarialkarzinomen die Kathepsin X-Werte indirekt mit dem Tumorgrading assoziiert [44]. Mammakarzinome weisen, abhängig vom histologischen Subtyp, unterschiedliche Serumlevel auf [17]. Und auch innerhalb der verschiedenen Phänotypen Maligner Melanome unterscheiden sich die Expressionslevel [83].

Des Weiteren ist langfristig auch eine Nutzung von Kathepsin X als therapeutisches Zielmolekül und zur Testung des Therapieerfolges vorstellbar.



## 5.9 Kritische Betrachtung

Mausmodelle bringen zur Untersuchung bestimmter physiologischer und pathophysiologischer Mechanismen in der *H. pylori*-assoziierten Karzinogenese zahlreiche Vorteile mit sich. So zählen sie aufgrund ihrer hohen Reproduktionsrate, der geringen Kosten, geringen Körpergröße, einfachen Durchführbarkeit der Infektion und nicht zuletzt der genetischen Manipulierbarkeit zu einem der beliebtesten *in vivo*-Versuchsansätze [29, 80]. Allerdings weisen diese Experimente auch einige Limitierungen auf. So ähnelt die Histoarchitektur der einzelnen murinen glandulären Magenanteile zwar stark dem humanen Gewebe, dennoch ist die Organanatomie verschieden. Der Mausmagen gliedert sich in einen Vormagen, und einen glandulären Anteil [97]. Die anatomischen Unterschiede manifestieren sich pathologischerseits in unterschiedlichen Lokalisationen der präneoplastischen Veränderungen. Während diese sich beim Menschen zunächst in der Antrum-Corpus-Grenze entwickeln und später vorrangig Adenokarzinome dieser Region und des Antrum ventriculi bilden, liegen die präneoplastischen Veränderungen und Adenokarzinome insbesondere bei IG-Mäusen vorrangig im Corpus ventriculi [15, 30].

Interessanterweise scheint die gesteigerte Gastrinsekretion im IG-Modell unterschiedliche Effekte auf die Karzinogenese in Antrum und Corpus zu haben. Während gastrindefiziente Mäuse im Rahmen einer *H. felis*-Infektion Dysplasien im Antrum entwickeln, liegen diese bei den hypergastrinämischen IG-Mäusen im Corpus, und bei den mäßig gastrinproduzierenden C57BL/6-Mäusen in Antrum und Corpus [29, 92].

Weitere Limitierungen sind die relativ mild ausgeprägten Magenpathologien, die begrenzte Zahl der verwendbaren *H. pylori*-Stämme, die kurze Zeitspanne für die Karzinomprogression sowie die fehlende Ausbildung fortgeschrittener Magenkarzinome. Darüber hinaus spielen der genetische Hintergrund, Geschlecht, Ernährung und die Haltungsbedingungen eine wichtige Rolle [34, 116].

Des Weiteren müssen erhöhte Kathepsin X-Werte kritisch betrachtet werden. So wird das Enzym auch bei gesunden Patienten im Rahmen einer normwertigen Aktivierung von Immunzellen und ihrem Umsatz, aber auch bei verschiedenen nicht malignen Erkrankungen, verstärkt exprimiert [68,74]. Erhöhte Werte lassen also nicht automatisch auf das Vorliegen einer malignen Erkrankung oder eines erhöhten Malignomrisikos schließen und sollten stets in enger Verbindung zum klinischen Kontext betrachtet werden.

## 6 Zusammenfassung

Kathepsin X ist das einzige Enzym aus der Gruppe der Kathepsine, das im Magen durch eine *H. pylori*-Infektion induziert, und auch in Magenkarzinomen verstärkt exprimiert wird. In Zusammenhang mit dem karzinogenen Potenzial von *H. pylori* impliziert dies, dass Kathepsin X in die *H. pylori*-assoziierte gastrale Karzinogenese involviert ist.

Auf dem Boden mehrerer *in vitro*-Experimente erfolgten erste Untersuchungen, die in einem zweistufigen tierexperimentellen Ansatz zunächst mit *H. pylori*-infizierten C57BL/6-Mäusen mit Kathepsin X-knockout mündeten. Die dabei gewonnenen Daten deuteten entgegen der ersten Arbeitshypothese auf einen protektiven Effekt von Kathepsin X hin. Allerdings erreichten die murinen Pathologien in diesem Mausmodell nicht alle Stadien der Correa-Kaskade. Um auch fortgeschrittene Phasen wie intraepitheliale Neoplasien und die Karzinombildung histomorphologisch zu erfassen, wurde das hier vorgestellte Modell mit *H. pylori*-infizierten IG-Mäusen, die für eine akzellerierte Karzinogenese bekannt sind, mit Kathepsin X-knockout generiert und in einem Zeitraum von 50 Wochen histomorphologisch untersucht.

Die Mäuse zeigten unabhängig von Kathepsin X und der *H. pylori*-Infektion progrediente Magenpathologien aller Stadien der Correa-Kaskade. Jedoch waren diese bei den Kathepsin X-exprimierenden Mäusen signifikant früher und deutlicher ausgeprägt, als bei den defizienten Tieren. Die Infektion mit *H. pylori* verstärkte diesen Effekt.

Anhand der Ergebnisse dieser aktuellen Untersuchungen mit IG-Mäusen konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Expression von Kathepsin X und einer akzellerierten gastralen Karzinogenese nachgewiesen werden.

In Zusammenschau mit den vorausgegangenen tierexperimentellen Untersuchungen scheint eine Wirkungsumkehr von Kathepsin X im Verlauf der gastralen Karzinogenese aufzutreten. Möglicherweise liegt die Ursache hierfür in immunologischen Prozessen, die von Kathepsin X beeinflusst werden, wie der im Vorexperiment beschriebenen Rekrutierung von Histozyten. Entsprechende Untersuchungen hierzu sind am aktuellen Mausmodell mittels FACS-Analysen geplant.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der aktuellen Untersuchungen festgestellt werden, dass Kathepsin X adäquat zu anderen Tumorentitäten einen fördernden Einfluss auf die gastrale Karzinogenese zeigt. Damit besitzt Kathepsin X das Potenzial eines Prognose- und Diagnosemarkers, der möglicherweise auch für die Therapiekontrolle und als therapeutischer Ansatz genutzt werden könnte.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Akkari L, Gocheva V, Kester JC, Hunter KE, Quick ML, Sevenich L, Wang H, Peters C, Tang LH, Klimstra DS, Reinheckel T, Joyce JA: Distinct functions of macrophage-derived and cancer cell-derived cathepsin Z combine to promote tumor malignancy via interactions with the extracellular matrix. *Genes Dev.* 28. 2134–2150 (2014)
2. Asfaha S, Dubeykovskiy AN, Tomita H, Yang X, Stokes S, Shibata W, Friedman RA, Ariyama H, Dubeykovskaya ZA, Muthupalani S, Ericksen R, Frucht H, Fox JG, Wang TC: Mice that express human interleukin-8 have increased mobilization of immature myeloid cells, which exacerbates inflammation and accelerates colon carcinogenesis. *Gastroenterology.* 144. 155–166 (2013)
3. Berg DJ, Lynch NA, Lynch RG, Lauricella DM: Rapid development of severe hyperplastic gastritis with gastric epithelial dedifferentiation in *Helicobacter felis*-infected IL-10<sup>-/-</sup> mice. *Am J Pathol.* 152. 1377–1386 (1998)
4. Bernhardt A, Kuester D, Roessner A, Reinheckel T, Krueger S: Cathepsin X-deficient gastric epithelial cells in co-culture with macrophages: characterization of cytokine response and migration capability after *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem.* 285. 33691–33700 (2010)
5. Bornschein J, Malfertheiner P: Gastric carcinogenesis. *Langenbecks Arch Surg.* 396. 729–742 (2011)
6. Bosman, F.T., Carneiro, F., Hruban, R.H., Theise, N.D.: WHO classification of tumours of the digestive system. pp. 48-58. IARC Press, Lyon 2010.
7. Boziki M: *Helicobacter pylori* Immunomodulative Properties in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Immunogastroenterology.* 1. 34-39 (2012)
8. Bravo JC, Correa P: Sulphomucins favour adhesion of *Helicobacter pylori* to metaplastic gastric mucosa. *J Clin Pathol.* 52. 137–140 (1999)
9. Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V: Epidemiology of stomach cancer. *Methods Mol Biol.* 472. 467–477 (2009)
10. Bühling F, Peitz U, Krüger S, Küster D, Vieth M, Gebert I, Roessner A, Weber E, Malfertheiner P, Wex T: Cathepsins K, L, B, X and W are differentially expressed in normal and chronically inflamed gastric mucosa. *Biol Chem.* 385. 439–445 (2004)
11. Cantorna MT, Balish E: Inability of human clinical strains of *Helicobacter pylori* to colonize the alimentary tract of germfree rodents. *Can J Microbiol.* 36. 237–241 (1990)
12. Cid TP, Fernández MC, Benito Martínez S, Jones NL: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 18 Suppl 1. 12–17 (2013)
13. Correa P: Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* 52. 6735–6740 (1992)
14. Correa P, Piazuelo MB: The gastric precancerous cascade. *J Dig Dis.* 13: 2–9 (2012)
15. Correa P, Piazuelo MB, Wilson KT: Pathology of gastric intestinal metaplasia: clinical implications. *Am J Gastroenterol.* 105. 493–498 (2010)
16. Crabtree JE, Ferrero RL, Kusters JG: The mouse colonizing *Helicobacter pylori* strain SS1 may lack a functional *cag* pathogenicity island. *Helicobacter.* 7. 139-141 (2002)
17. Decock J, Obermajer N, Vozelj S, Hendrickx W, Paridaens R, Kos J: Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin X and cystatin C in sera of patients with early-stage and inflammatory breast cancer. *Int J Biol Markers.* 23. 161–168 (2008)

18. Deussing J, Olshausen I von, Peters C: Murine and human cathepsin Z: cDNA-cloning, characterization of the genes and chromosomal localization. *Biochim Biophys Acta.* 1491. 93–106 (2000)
19. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P: Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol.* 20. 1161–1181 (1996)
20. Doetschman T: GI GEMs: genetically engineered mouse models of gastrointestinal disease. *Gastroenterology.* 140. 380-385.e2 (2011)
21. Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S: Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.* 59. 2470–2475 (1991)
22. Ehlers S, Warrelmann M, Hahn H: In search of an animal model for experimental *Campylobacter pylori* infection: administration of *Campylobacter pylori* to rodents. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A.* 268. 341–346 (1988)
23. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Mégraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang X, Achtman M, Suerbaum S: Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science.* 299. 1582–1585 (2003)
24. Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 127. 2893–2917 (2010)
25. Fox JG, Dangler CA, Taylor NS, King A, Koh TJ, Wang TC: High-salt diet induces gastric epithelial hyperplasia and parietal cell loss, and enhances *Helicobacter pylori* colonization in C57BL/6 mice. *Cancer Res.* 59. 4823–4828 (1999)
26. Fox JG, Li X, Cahill RJ, Andrutis K, Rustgi AK, Odze R, Wang TC: Hypertrophic gastropathy in *Helicobacter felis*-infected wild-type C57BL/6 mice and p53 hemizygous transgenic mice. *Gastroenterology.* 110. 155–166 (1996)
27. Fox JG, Rogers AB, Ihrig M, Taylor NS, Whary MT, Dockray G, Varro A, Wang TC: *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer in INS-GAS mice is gender specific. *Cancer Res.* 63. 942–950 (2003)
28. Fox JG, Wang TC: Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest.* 117. 60–69 (2007)
29. Fox JG, Wang TC: Dietary factors modulate *Helicobacter*-associated gastric cancer in rodent models. *Toxicol Pathol.* 42. 162–181 (2014)
30. Fox JG, Wang TC, Rogers AB, Poutahidis T, Ge Z, Taylor N, Dangler CA, Israel DA, Krishna U, Gaus K, Peek RM: Host and microbial constituents influence *Helicobacter pylori*-induced cancer in a murine model of hypergastrinemia. *Gastroenterology.* 124. 1879–1890 (2003)
31. González CA, Sala N, Rokkas T: Gastric cancer: epidemiologic aspects. *Helicobacter.* 18 Suppl 1. 34–38 (2013)
32. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W, Harper, WES: Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., Respectively. *Int J Syst Bacteriol.* 39. 397–405 (1989)
33. Goodwin CS, McCulloch RK, Armstrong JA, Wee SH: Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J Med Microbiol.* 19. 257–267 (1985)
34. Hayakawa Y, Fox JG, Gonda T, Worthley DL, Muthupalani S, Wang TC: Mouse models of gastric cancer. *Cancers (Basel).* 5. 92–130 (2013)

35. Hidaka S, Yasutake T, Takeshita H, Kondo M, Tsuji T, Nanashima A, Sawai T, Yamaguchi H, Nakagoe T, Ayabe H, Tagawa Y: Differences in 20q13.2 copy number between colorectal cancers with and without liver metastasis. *Clin Cancer Res.* 6. 2712–2717 (2000)
36. Hu LT, Mobley HL: Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 58. 992–998. (1990)
37. IARC: Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. pp. 218-220. World Health Organization. Lyon, France 1994.
38. Jechorek D, Votapek J, Meyer F, Kandulski A, Roessner A, Franke S: Characterization of cathepsin X in colorectal cancer development and progression. *Pathol Res Pract.* 210. 822–829 (2014)
39. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 61. 69–90 (2011)
40. Jevnikar Z, Obermajer N, Bogyo M, Kos J: The role of cathepsin X in the migration and invasiveness of T lymphocytes. *J Cell Sci.* 121. 2652–2661 (2008)
41. Karita M, Kouchiyama T, Okita K, Nakazawa T: New small animal model for human gastric *Helicobacter pylori* infection: success in both nude and euthymic mice. *Am J Gastroenterol.* 86. 1596–1603 (1991)
42. Kekki M, Maaroos HI, Sipponen P, Uibo R, Tammur R, Tamm A, Villako K: Grade of *Helicobacter pylori* colonisation in relation to gastritis: a six-year population-based follow-up study. *Scand J Gastroenterol.* 186 Suppl. 142–150 (1991)
43. Kim DH, Kim SW, Song YJ, Oh TY, Han SU, Kim YB, Joo HJ, Cho YK, Kim DY, Cho SW, Kim MW, Kim JH, Hahm KB: Long-term evaluation of mice model infected with *Helicobacter pylori*: focus on gastric pathology including gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther.* 18 Suppl 1. 14–23 (2003)
44. Kolwijck E, Kos J, Obermajer N, Span PN, Thomas, Chris MG, Massuger, Leon FAG, Sweep, Fred CGJ: The balance between extracellular cathepsins and cystatin C is of importance for ovarian cancer. *Eur J Clin Invest.* 40. 591–599 (2010)
45. Kos J, Jevnikar Z, Obermajer N: The role of cathepsin X in cell signaling. *Cell Adh Migr.* 3. 164–166 (2014)
46. Kos J, Vižin T, Fonović UP, Pišlar A: Intracellular signaling by cathepsin X: Molecular mechanisms and diagnostic and therapeutic opportunities in cancer. *Semin Cancer Biol.* 31. 76-83 (2014)
47. Krakowiak MS, Noto JM, Piazuelo MB, Hardbower DM, Romero-Gallo J, Delgado A, Chaturvedi R, Correa P, Wilson KT, Peek RM: Matrix metalloproteinase 7 restrains *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and premalignant lesions in the stomach by altering macrophage polarization. *Oncogene.* 34. 1865–1871 (2015)
48. Krueger S, Bernhardt A, Kalinski T, Baldensperger M, Zeh M, Teller A, Adolf D, Reinheckel T, Roessner A, Kuester D: Induction of premalignant host responses by cathepsin x/z-deficiency in *Helicobacter pylori*-infected mice. *PLoS One.* 8. e70242 (2013)
49. Krueger S, Kalinski T, Hundertmark T, Wex T, Küster D, Peitz U, Ebert M, Nägler DK, Kellner U, Malfertheiner P, Naumann M, Röcken C, Roessner A: Up-regulation of cathepsin X in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *J Pathol.* 207. 32–42 (2005)
50. Krueger S, Kuester D, Bernhardt A, Wex T, Roessner A: Regulation of cathepsin X overexpression in *H. pylori*-infected gastric epithelial cells and macrophages. *J Pathol.* 217. 581–588 (2009)
51. Krueger S, Roessner A, Kuester D: Murine models of *H. pylori*-induced gastritis and gastric adenocarcinoma. *Pathol Res Pract.* 207. 599–607 (2011)

52. Kuester D, Lippert H, Roessner A, Krueger S: The cathepsin family and their role in colorectal cancer. *Pathol Res Pract.* 204. 491–500 (2008)
53. Kung JS, Ho B, Chan SH: Biotyping of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol.* 29. 203–206 (1989)
54. Lauren P: The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 64. 31–49 (1965)
55. Lechner AM, Assfalg-Machleidt I, Zahler S, Stoeckelhuber M, Machleidt W, Jochum M, Nägler DK: RGD-dependent binding of procathepsin X to integrin  $\alpha_v\beta_3$  mediates cell-adhesive properties. *J Biol Chem.* 281. 39588–39597 (2006)
56. Lee A, Fox JG, Otto G, Murphy J: A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis. *Gastroenterology.* 99. 1315–1323 (1990)
57. Lee A, O'Rourke J, De Ungria, MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF: A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology.* 112. 1386–1397 (1997)
58. Lee JY, Kim N, Choi YJ, Nam RH, Choi YJ, Kwon YH, Yoon K, Suh JH, Lee SM, Lee HS, Lee DH: Histologic Findings and Inflammatory Reactions After Long-term Colonization of *Helicobacter felis* in C57BL/6 Mice. *J Cancer Prev.* 19. 224–230 (2014)
59. Lines KE, Chelala C, Dmitrovic B, Wijesuriya N, Kocher HM, Marshall JF, Crnogorac-Jurcevic T: S100P-binding protein, S100PBP, mediates adhesion through regulation of cathepsin Z in pancreatic cancer cells. *Am J Pathol.* 180. 1485–1494 (2012)
60. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon, Anthony TR, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ: Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut.* 61. 646–664 (2012)
61. Malfertheiner P, Sipponen P, Naumann M, Moayyedi P, Mégraud F, Xiao S, Sugano K, Nyrén O: *Helicobacter pylori* eradication has the potential to prevent gastric cancer: a state-of-the-art critique. *Am J Gastroenterol.* 100. 2100–2115 (2005)
62. Malnick SD, Melzer E, Attali M, Duek G, Yahav J, Malnick, SDH, Melzer E, Attali M, Duek G, Yahav J: *Helicobacter pylori*: Friend or foe? *World J Gastroenterol.* 20. 8979–8985 (2014)
63. Marshall BJ, Warren JR: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 1. 1311–1315 (1984)
64. Meffert, N.: Untersuchungen zur genetischen Disposition für die *Helicobacter pylori*-Infektion im Mausmodell, unv. Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover 2002.
65. Moodley Y, Linz B, Yamaoka Y, Windsor HM, Breurec S, Wu J, Maady A, Bernhöft S, Thiberge J, Phuanukoonnon S, Jobb G, Siba P, Graham DY, Marshall BJ, Achtman M: The peopling of the Pacific from a bacterial perspective. *Science.* 323. 527–530 (2009)
66. Nägler DK, Kraus S, Feierler J, Mentele R, Lottspeich F, Jochum M, Faussner A: A cysteine-type carboxypeptidase, cathepsin X, generates peptide receptor agonists. *Int Immunopharmacol.* 10. 134–139 (2010)
67. Nägler DK, Krüger S, Kellner A, Ziomek E, Menard R, Buhtz P, Krams M, Roessner A, Kellner U: Up-regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate.* 60. 109–119 (2004)
68. Nägler DK, Lechner AM, Oettl A, Kozaczynska K, Scheuber H, Gippner-Steppert C, Bogner V, Biberthaler P, Jochum M: An enzyme-linked immunosorbent assay for human cathepsin X, a potential new inflammatory marker. *J Immunol Methods.* 308. 241–250 (2006)

69. Nägler DK, Ménard R: Human cathepsin X: a novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions. *FEBS Lett.* 434. 135–139 (1998)
70. Nägler DK, Zhang R, Tam W, Sulea T, Purisima EO, Ménard R: Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry.* 38. 12648–12654 (1999)
71. Nam KT, Lee H, Sousa JF, Weis VG, O'Neal RL, Finke PE, Romero-Gallo J, Shi G, Mills JC, Peek RM, Konieczny SF, Goldenring JR: Mature chief cells are cryptic progenitors for metaplasia in the stomach. *Gastroenterology.* 139. 2028-2037.e9 (2010)
72. Nishioka Y: The origin of common laboratory mice. *Genome.* 38. 1–7 (1995)
73. Noffsinger, A., Fenoglio-Preiser, C.M., Maru, D.: *Gastrointestinal diseases.* pp. 347-353. American Registry of Pathology in collaboration with the Armed Forces Institute of Pathology. Washington, D.C. 2007.
74. Obermajer N, Doljak B, Jamnik P, Fonović UP, Kos J: Cathepsin X cleaves the C-terminal dipeptide of alpha- and gamma-enolase and impairs survival and neuritogenesis of neuronal cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 41. 1685–1696 (2009)
75. Obermajer N, Premzl A, Zavasnik Bergant T, Turk B, Kos J.: Carboxypeptidase cathepsin X mediates beta2-integrin-dependent adhesion of differentiated U-937 cells. *Exp Cell Res.* 312. 2515–2527 (2006)
76. Ohtani M, García A, Rogers AB, Ge Z, Taylor NS, Xu S, Watanabe K, Marini RP, Whary MT, Wang TC, Fox JG: Protective role of 17 $\beta$ -estradiol against the development of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer in INS-GAS mice. *Carcinogenesis.* 28. 2597–2604 (2007)
77. Pečar Fonović U, Jevnikar Z, Rojnik M, Doljak B, Fonović M, Jamnik P, Kos J: Profilin 1 as a target for cathepsin X activity in tumor cells. *PloS One* 8. e53918 (2013)
78. Przemeczek, SMC, Varro A, Berry D, Steele I, Wang TC, Dockray GJ, Pritchard DM: Hypergastrinemia increases gastric epithelial susceptibility to apoptosis. *Regul Pept.* 146. 147–156 (2008)
79. Roesler BM, Rabelo-Gonçalves EMA, Zeitune JMR: Virulence Factors of *Helicobacter pylori*: A Review. *Clin Med Insights Gastroenterol.* 7. 9–17 (2014)
80. Rogers AB: Gastric *Helicobacter* spp. in animal models: pathogenesis and modulation by extragastric coinfections. *Methods Mol Biol.* 921. 175–188 (2012)
81. Rogers AB, Taylor NS, Whary MT, Stefanich ED, Wang TC, Fox JG: *Helicobacter pylori* but not high salt induces gastric intraepithelial neoplasia in B6129 mice. *Cancer Res.* 65. 10709–10715 (2005)
82. Rugge M, Capelle LG, Cappellesso R, Nitti D, Kuipers EJ: Precancerous lesions in the stomach: from biology to clinical patient management. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 27. 205–223 (2013)
83. Rumpler G, Becker B, Hafner C, McClelland M, Stolz W, Landthaler M, Schmitt R, Bosserhoff A, Vogt T: Identification of differentially expressed genes in models of melanoma progression by cDNA array analysis: SPARC, MIF and a novel cathepsin protease characterize aggressive phenotypes. *Exp Dermatol.* 12. 761–771 (2003)
84. Sakagami T, Dixon M, O'Rourke J, Howlett R, Alderuccio F, Vella J, Shimoyama T, Lee A: Atrophic gastric changes in both *Helicobacter felis* and *Helicobacter pylori* infected mice are host dependent and separate from antral gastritis. *Gut.* 39. 639–648 (1996)
85. Santamaría I, Velasco G, Pendás AM, Fueyo A, López-Otín C: Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *J Biol Chem.* 273. 16816–16823 (1998)
86. Schreiber S, Bückner R, Groll C, Azevedo-Vethacke M, Garten D, Scheid P, Friedrich S, Gatermann S, Josenhans C, Suerbaum S: Rapid loss of motility of

- Helicobacter pylori* in the gastric lumen in vivo. *Infect Immun.* 73. 1584–1589 (2005)
87. Selgrad M, Bomschein J, Rokkas T, Malfertheiner P: *Helicobacter pylori*: gastric cancer and extragastric intestinal malignancies. *Helicobacter.* 17 Suppl 1. 30–35 (2012)
  88. Sevenich L, Schurigt U, Sachse K, Gajda M, Werner F, Müller S, Vasiljeva O, Schwinde A, Klemm N, Deussing J, Peters C, Reinheckel T: Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107. 2497–2502 (2010)
  89. Sheh A, Ge Z, Parry NMA, Muthupalani S, Rager JE, Raczynski AR, Mobley MW, McCabe AF, Fry RC, Wang TC, Fox JG: 17 $\beta$ -estradiol and tamoxifen prevent gastric cancer by modulating leukocyte recruitment and oncogenic pathways in *Helicobacter pylori*-infected INS-GAS male mice. *Cancer Prev Res (Phila).* 4. 1426–1435 (2011)
  90. Skvarc M, Stubljär D, Kopitar AN, Jeverica S, Tepes B, Kos J, Ihan A: Inhibition of cathepsin X enzyme influences the immune response of THP-1 cells and dendritic cells infected with *Helicobacter pylori*. *Radiol Oncol.* 47. 258–265 (2013)
  91. Staudt ND, Aicher WK, Kalbacher H, Stevanovic S, Carmona AK, Bogyo M, Klein G: Cathepsin X is secreted by human osteoblasts, digests CXCL-12 and impairs adhesion of hematopoietic stem and progenitor cells to osteoblasts. *Haematologica.* 95. 1452–1460 (2010)
  92. Takaishi S, Tu S, Dubeykovskaya ZA, Whary MT, Muthupalani S, Rickman BH, Rogers AB, Lertkowitz N, Varro A, Fox JG, Wang TC: Gastrin is an essential cofactor for *Helicobacter*-associated gastric corpus carcinogenesis in C57BL/6 mice. *Am J Pathol.* 175. 365–375 (2009)
  93. Taketo M, Schroeder AC, Mobraaten LE, Gunning KB, Hanten G, Fox RR, Roderick TH, Stewart CL, Lilly F, Hansen CT: FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88. 2065–2069 (1991)
  94. Tatematsu M, Yamamoto M, Iwata H, Fukami H, Yuasa H, Tezuka N, Masui T, Nakanishi H: Induction of glandular stomach cancers in C3H mice treated with N-methyl-N-nitrosourea in the drinking water. *Jpn J Cancer Res.* 84. 1258–1264 (1993)
  95. Teller A, Jechorek D, Hartig R, Adolf D, Reißig K, Roessner A, Franke S: Dysregulation of apoptotic signaling pathways by interaction of RPLP0 and cathepsin X/Z in gastric cancer. *Pathol Res Pract.* 211. 62–70 (2015)
  96. Therrien C, Lachance P, Sulea T, Purisima EO, Qi H, Ziomek E, Alvarez-Hernandez A, Roush WR, Ménard R: Cathepsins X and B can be differentiated through their respective mono- and dipeptidyl carboxypeptidase activities. *Biochemistry.* 40. 2702–2711 (2001)
  97. Treuting, P.M., Dintzis, S.M.: *Comparative Anatomy and Histology. A mouse and human atlas.* pp. 158-166. Elsevier. Oxford 2012.
  98. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, Turk D: Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta.* 1824. 68–88 (2012)
  99. Van den Brink GR, Tytgat KM, Van der Hulst RW, Van der Loos CM, Einerhand AW, Büller HA, Dekker J: *H. pylori* colocalises with MUC5AC in the human stomach. *Gut.* 46. 601–607 (2000)
  100. Varbanova M, Frauenschläger K, Malfertheiner P: Chronic gastritis - an update. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 28. 1031–1042 (2014)
  101. Vižin T, Christensen IJ, Nielsen HJ, Kos J: Cathepsin X in serum from patients with colorectal cancer: relation to prognosis. *Radiol Oncol.* 46. 207–212. (2012)



102. Vižin T, Christensen IJ, Wilhelmsen M, Nielsen HJ, Kos J: Prognostic and predictive value of cathepsin X in serum from colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 14. 207-212 (2014)
103. Votapek J.: Die Rolle des Kathepsin X beim kolorektalen Karzinom, unv. Diss., Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg 2013.
104. Wang J, Chen L, Li Y, Guan X: Overexpression of cathepsin Z contributes to tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 6. e24967 (2011)
105. Wang TC, Bonner-Weir S, Oates PS, Chulak M, Simon B, Merlino GT, Schmidt EV, Brand SJ: Pancreatic gastrin stimulates islet differentiation of transforming growth factor  $\alpha$ -induced ductular precursor cells. *J Clin Invest*. 3. 1349-1356 (1993)
106. Wang TC, Brand SJ: Function and regulation of gastrin in transgenic mice: a review. *Yale J Biol Med*. 6. 705-713 (1992)
107. Wang TC, Dangler CA, Chen D, Goldenring JR, Koh T, Raychowdhury R, Coffey RJ, Ito S, Varro A, Dockray GJ, Fox JG: Synergistic interaction between hypergastrinemia and *Helicobacter* infection in a mouse model of gastric cancer. *Gastroenterology*. 118. 36-47 (2000)
108. Wang, T.C., Fox, J.G., Giraud, A.S.: *The Biology of Gastric Cancers. Future Prospects for Helicobacter pylori*. pp. 601-614. Springer. New York 2009.
109. Wang TC, Goldenring JR, Dangler C, Ito S, Mueller A, Jeon WK, Koh TJ, Fox JG: Mice lacking secretory phospholipase A2 show altered apoptosis and differentiation with *Helicobacter felis* infection. *Gastroenterology*. 114. 675-689 (1998)
110. Wang TC, Koh TJ, Varro A, Cahill RJ, Dangler CA, Fox JG, Dockray GJ: Processing and proliferative effects of human progastrin in transgenic mice. *J Clin Invest*. 98. 1918-1929 (1996)
111. Wang X, Willén R, Svensson M, Ljungh A, Wadström T: Two-year follow-up of *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 and Balb/cA mice. *APMIS*. 111. 514-522 (2003)
112. Warren JR: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1. 1273-1275 (1983)
113. Weis VG, Sousa JF, LaFleur BJ, Nam KT, Weis JA, Finke PE, Ameen NA, Fox JG, Goldenring JR: Heterogeneity in mouse spasmodic polypeptide-expressing metaplasia lineages identifies markers of metaplastic progression. *Gut*. 62. 1270-1279 (2013)
114. Yamachika T, Nakanishi H, Inada K, Tsukamoto T, Shimizu N, Kobayashi K, Fukushima S, Tatematsu M: The role of gastric *Helicobacter* and N-methyl-N'-nitro- N-nitrosoguanidine in carcinogenesis of mice. *Jpn J Cancer Res*. 89. 385-391 (1998)
115. Yamamoto M, Tsukamoto T, Sakai H, Shirai N, Ohgaki H, Furihata C, Donehower LA, Yoshida K, Tatematsu M: p53 knockout mice (-/-) are more susceptible than (+/-) or (+/+) mice to N-methyl-N-nitrosourea stomach carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 21. 1891-1897 (2000)
116. Yu S, Yang M, Nam KT: Mouse models of gastric carcinogenesis. *J Gastric Cancer*. 14. 67-86 (2014)
117. Zhang S, Moss SF: Rodent models of *Helicobacter* infection, inflammation, and disease. *Methods Mol Biol*. 921. 89-98 (2012)
118. Zhang X, Hou Y, Niu Z, Li W, Meng X, Zhang N, Yang S: Clinical significance of detection of cathepsin X and cystatin C in the sera of patients with lung cancer. *Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer*. 16. 411-416. (2013)

## 8 Danksagungen

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Roessner für die Bereitstellung des Themas, sowie seine fachkundige Unterstützung in schwierigen Fragestellungen und sein kontinuierliches Interesse am Fortgang und dem erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit bedanken.

Ebenso danke ich von Herzen Frau Dr. Sabine Franke für ihre engagierte Betreuung und die vielen Stunden, die sie (teils auch nach Dienstschluss) geduldig geopfert hat, um mir zuverlässig mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Durch ihre Herzlichkeit ist die Arbeit mit ihr zu einem Erlebnis geworden, das ich auf keinen Fall missen möchte.

Großer Dank gilt auch Frau PD Dr. Dörthe Jechorek, die mir nach ihrer Rückkehr aus der Elternzeit durch zahlreiche konstruktive Gespräche neue Perspektiven eröffnet hat, und durch stetige Motivationen ihren Teil am zügigen Fertigstellen dieser Arbeit trägt.

Weiterhin danke ich den Teams des immunhistochemischen und molekulargenetischen Labors sowie des Forschungslabors Frau C. Kügler, C. Miethke, J. Zajontz, N. Wiest, S. Staeck, D. Medau, H. Wolf und H. Scharfenort für ihre hervorragende Arbeit. Kirsten Herrmanns danke ich darüber hinaus dafür, dass sie auch im größten Stress immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie immer da sind, wenn ich sie brauche. Von ihnen habe ich gelernt, mir Ziele zu setzen und nicht vor den Hindernissen zurückzuschrecken, die davor liegen, sondern diese als Herausforderungen zu verstehen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Lebensgefährten Thomas. Dafür, dass er geduldig so viel zurückgesteckt hat, nur um mich zu unterstützen. Ich danke ihm für all das zum Lachen bringen, Kaffee kochen, Computer retten, Ablenken aber auch konzentriert arbeiten lassen, Termine nicht vergessen, seine Koch-Versuche, seine liebevollen Bemühungen mir die spröden Tage am PC zu versüßen, die Albernheiten und all die anderen kleinen Dinge, die doch in der Summe so viel ausmachen.

## 9 Ehrenerklärung

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

### **Untersuchungen am Mausmodell zur Bedeutung von Kathepsin X in der gastralen Karzinogenese**

am Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit Unterstützung durch Prof. Roessner und Dr. Franke ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

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

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

Magdeburg, den 12.08.2015

Unterschrift

## 10 Anhang

**Tabelle 2: Name und Anschrift des Züchters**

Tierspezies	Stämme	Züchter
Maus	CTSX <sup>-/-</sup> /FVB/N	Prof. Dr. Christoph Peters Institut für Molekulare Medizin und Zellforschung Stefan-Meier Strasse 17, 79104 Freiburg
	INS-GAS/FVB/N	Prof. Dr. Timothy Cragin Wang Division of Digestive and Liver Diseases University Medical Center Irving Cancer Research Center 1130 St. Nicholas Avenue, Room 925, 9th Floor New York, NY 10032
	CTSX <sup>-/-</sup> /INS-GAS <sup>+/+</sup>	Dr. Franke/ PD Dr. Jechorek Insitut für Pathologie Otto von Guericke Universität Magdeburg Leipziger Str. 44, Haus 28 39120 Magdeburg

**Tabelle 3: Geräte**

Gerätebezeichnung	Name	Hersteller	Firmensitz
Eismaschine	AF80	Scotsman	Frimont, Italien
Zentrifuge	5417R	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge	Minispin	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge	MCF-2360	LMS Consult	Brigachtal
Thermomixer	comfort	Eppendorf	Hamburg
PCR-Maschine	DNA-Machine Gradient Cycler	Bio-Rad	Hercules, USA

Magnetrührer		Neolab	Heidelberg
Schlittenmikrotom	HM335	Microm	Walldorf
Paraffinstreckbad		Medax Nagel GmbH	Kiel
Einbettautomat	HyperCenter	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH	Wetzlar
Kühlschrank (4°C)	comfort nofrost	Liebherr	Biberach an der Riss
Gefrierschrank (-80°C)		Fryka	Esslingen
37°C Schränke		Memmert	Schwabach
Vortexer	MS3 basic	IKA	Staufen
Vortexer	MS1 minishaker	IKA	Staufen
Elektrophoresekammer	Mupid-One	Advance	Tokio, Japan
Mikrowellenofen	MWS 2819	Bauknecht	Stuttgart
Präzisionswaage	BP121 S	Sartorius	Göttingen
Geldokumentationssystem	Gene Genius	Syngene	Cambridge, England
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf	Hamburg
Färbeautomat		Leica Microsystems GmbH	Wetzlar
Pascal Druckkammer		Dako Denmark A/S	Glostrup, Dänemark
Mikroplaterereader	Glomax Multidetektion System	Promega GmbH	Mannheim
Brutschrank (Inkubator)		Binder GmbH	Tuttlingen

**Tabelle 4: Labormaterialien**

Labormaterial	Hersteller	Firmensitz
Anaerobiertöpfe	Oxoid	Wesel
Campygen	Oxoid	Wesel
Deckgläschen	Lagerartikel	
Einbettkassetten	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe

Handschuhe	Hartmann	Heidenheim
Kanülen und Spritzen	B. Braun AG	Melsungen
Objektträger SuperFrostPlus	Thermo Scientific	München
Petrischalen	Greiner	Solingen
Pinzetten	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Pipetten	Eppendorf	Hamburg
Präparatekasten	Zeiss	München
Präparationsschere	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Rotilabo Objektträgerhalter	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Selectip Uretherkatheter	Bard Portsysteme	Karlsruhe
Tuberkulinspritze 1 ml	B. Braun	Melsungen
Einweg-Impfösen	Greiner	Solingen
Uvette 200-1600 nm	Eppendorf	Hamburg

**Tabelle 5: Reagenzien**

Reagenz	Hersteller	Firmensitz
LE Agarose	Biozym	Hess. Oldendorf
Tris-Base (Tris-(hydroximethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
0,5M EDTA (pH 8,0)	Sigma Aldrich	Deisenhofen
GelRaid	Biotium Inc.	Hayward, California, USA
5xDNA-Loading Buffer, Blue	Bioline	London, England
HyperLadder I	Bioline	London, England
Ethanol 100%	MERCK	Darmstadt
Formalin 4%	MERCK	Darmstadt
Eosin	MERCK	Darmstadt
Hämatoxylin	MERCK	Darmstadt
Hämalaun nach Meyer		
Paraffin	Thermo Scientific	München
GC-Agar-Base	BD	Maryland, USA
Bakto Proteose Pepton	BD	Maryland, USA

<i>brain heart infusion</i> (BHI)	Fluka	Schweiz
Fetales Kälber Serum (FCS)	PAA	Parsching
Pferdeserum 10%	Biochrom	Berlin
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Xylol	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Natrium-Citrat 0,01 M	MERCK	Darmstadt
PBS	Gibco Life Technologies	Darmstadt
DAPI (Diamidinphenylindol)	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Mcllvain-Puffer (Citrat + Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O)	MERCK	Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Hausapotheke	
Antikörperverdünnungspuffer	DCS Innovative Diagnostik-Systeme	Hamburg
Corbit-Balsam	Hecht-Mertens	Kiel
DAB Substratpuffer	Dako Denmark A/S	Glostrup, Dänemark
DAB+-Chromogen	Dako Denmark A/S	Glostrup, Dänemark
Fluorescent mounting medium	Dako Denmark A/S	Glostrup, Dänemark
Triton	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg
BSA ( <i>bovine serum albumin</i> )	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg

**Tabelle 6: Antibiotika**

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

**Tabelle 7: Antikörper**

Antikörper	Hersteller
Fluorescine anti-Rabbit IgG (grün)	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH
Polyclonal Goat anti-Rabbit HRP	Dako Denmark A/S

**Tabelle 8: Kits**

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