

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Peter Malfertheiner

**Expressionsanalyse des Transkriptionsfaktors *CDX2*
im Rahmen der gastroösophagealen
Refluxkrankheit und in epithelialen Zellkulturen**

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

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

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

vorgelegt von Simone Völkel

aus Hutthurm

Magdeburg 2016

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Völkel, Simone:

Expressionsanalyse des Transkriptionsfaktors *CDX2* im Rahmen der gastroösophagealen Refluxkrankheit und in epithelialen Zellkulturen

2016 – 79 Bl. – 16 Abb. – 8 Tab. – 1 Anlage

Kurzreferat

Der epitheliale Transkriptionsfaktor *CDX2* reguliert die Differenzierung intestinaler Epithelzellen, den Erhalt des intestinalen Phänotyps und spielt eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der intestinalen Metaplasie. Ziel unserer Studie war die Charakterisierung der Expression des *CDX2*-Gens im Kontext der GERD ohne Barrett-Metaplasie. Eingeschlossen wurden 95 Patienten mit NERD oder ERD, denen ein Kontrollkollektiv von 27 Patienten gegenübergestellt wurde. Die Genexpression von *CDX2*, *MUC2* und *IAP* wurde in ösophagealen und gastralen Biopsien mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) analysiert, gefolgt von der Bestätigung ausgewählter Ergebnisse auf der Proteinebene. In humanen ösophagealen Plattenepithelkarzinomzellen der Linien KYSE-150 und KYSE-450 wurde die *CDX2*-Expression nach deren Stimulation mit saurem pH und/oder Gallensäuren untersucht. *CDX2* wird in der gastroösophagealen Mukosa von Patienten mit und ohne GERD exprimiert, wobei die höchsten Genexpressionsraten jeweils im Antrum nachweisbar waren. Im distalen Ösophagus und an der Cardia blieb die *CDX2*-Genexpression vom Vorliegen einer GERD unbeeinflusst. Im Antrum von Patienten mit NERD oder ERD war ein im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhtes Genexpressionsniveau von *CDX2* nachweisbar, was auf den Einfluss von duodenogastralem Refluat zurückzuführen sein könnte. Das *CDX2*-Protein konnte in entzündlich veränderter Magenschleimhaut ohne Metaplasie nachgewiesen werden. Im *in vitro*-Modell gelang es nicht, den Transkriptionsfaktor durch Simulation von Refluxepisoden in ösophagealen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien zu induzieren. Die *CDX2*-Expression spielt in der Entwicklung von Barrett-Mukosa und intestinaler Metaplasie im Magen eine Schlüsselrolle und beginnt im Stadium der Ösophagitis bzw. chronischen Gastritis.

Schlüsselwörter

CDX2, GERD, Säure, Gallensäuren

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Gastroösophageale Refluxkrankheit	2
1.1.1 Definition und Epidemiologie.....	2
1.1.2 Symptomatik und Klassifikation.....	2
1.1.3 Hauptmanifestationen	4
1.1.4 Pathogenese.....	5
1.2 CDX2	7
1.2.1 Zuordnung und Expression	7
1.2.2 Funktionelle Bedeutung	8
1.2.3 Pathophysiologische Bedeutung	9
1.2.4 Säure, Galle und CDX2 in <i>in vitro</i> - und Tiermodellen.....	10
1.3 Aufgabenstellung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Untersuchungen an klinischen Proben	14
2.1.1 Studiendesign	14
2.1.2 Probengewinnung	14
2.1.3 Histologie und <i>H. pylori</i> -Status	15
1.1.4 RNA-Isolierung.....	16
2.1.5 Reverse Transkription der Gesamt-RNA.....	17
2.1.6 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).....	18
2.1.7 Immunhistochemie.....	19
2.1.8 Statistik	20
2.2 Untersuchungen am Zellkulturmodell.....	20
3 Ergebnisse.....	23
3.1 Analyse der Genexpression von <i>CDX2</i> , <i>MUC2</i> und <i>IAP</i> in klinischen Proben	23
3.1.1 Patientencharakteristika	23
3.1.2 Genexpressionsraten in der Kontrollgruppe	23

3.1.3	Einfluss der Refluxkrankheit auf die Genexpression.....	25
3.1.4	Einfluss von <i>H. pylori</i> auf die Genexpression	29
3.1.5	Korrelation der Genexpression von <i>CDX2</i> mit den Transkriptmengen von <i>MUC2</i> und <i>IAP</i>	34
3.1.6	Immunhistochemischer Nachweis von <i>CDX2</i>	38
3.2	Expressionsanalyse von <i>CDX2</i> in epithelialen Zellkulturen.....	40
4	Diskussion	43
4.1	Genexpression von <i>CDX2</i> in klinischen Proben	43
4.1.1	Studiendesign.....	43
4.1.2	Kontrollgruppe.....	43
4.1.3	Einfluss der GERD	44
4.1.4	Einfluss von <i>H. pylori</i>	46
4.1.5	Korrelation mit der Genexpression intestinaler Differenzierungsmarker.....	47
4.1.6	Immunhistochemischer Nachweis von <i>CDX2</i>	48
4.2	Genexpression von <i>CDX2</i> in epithelialen Zellkulturen	49
4.2.1	Auswahl der Zelllinien.....	49
4.2.2	Inkubationsbedingungen.....	51
4.3	Ausblick.....	52
5	Zusammenfassung.....	54
6	Literaturverzeichnis.....	55
7	Anlage.....	62
	Erklärung.....	65
	Danksagung.....	66
	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Wissenschaftliche Veröffentlichungen.....	67

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Antrum
a.u.	arbitrary units
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AML	Akute Myeloische Leukämie
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
Aqua dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaare
BZH	Basalzellhyperplasie
C	Cardia
CA	Cholsäure
CDCA	Chenodeoxycholsäure
cDNA	complementary DNA
CDX2	Caudal Type Homeobox 2 (Bezug zum humanen Protein)
<i>CDX2</i>	Caudal Type Homeobox 2 (Bezug zum humanen Gen)
Cdx2	Caudal Type Homeobox 2 (Bezug zum Protein von Maus oder Ratte)
<i>Cdx2</i>	Caudal Type Homeobox 2 (Bezug zum Gen von Maus oder Ratte)
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	cycle threshold
DAC	5-Aza-2'-Deoxycytidine
DCA	Deoxycholsäure
DEPC	Diethylcarbonat
DGER	duodenogastroösophagealer Reflux
DHCA	Dehydrocholsäure
DIR	dilatierete Interzellularräume
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleoside triphosphate
ERD	erosive reflux disease
ESEM	endoscopically suspected endothelial metaplasia

g	Gramm
GCA	Glycocholsäure
GERD	gastroesophageal reflux disease
h	Stunde(n)
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HUT	Helicobacter-Urease-Test
IAP	Intestinale Alkalische Phosphatase
IFN- γ	Interferon- γ
IHC	Immunhistochemie
IL-10	Interleukin 10
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-4	Interleukin 4
IL-8	Interleukin 8
Ko.	Negativkontrolle
l	Liter
MALT	mucosa associated lymphoid tissue
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mol	Mol
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSP	methylation-specific polymerase chain reaction
MUC2	Mucin 2
MZBZL	Marginalzonen-B-Zell-Lymphom
NERD	nonerosive reflux disease
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B-Cells
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Ö	Ösophagus
OD	Optische Dichte
ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
p	<i>p</i> -Wert
PAR2	Protease-Activated Receptor 2
PAS	Periodic acid-Schiff
PBS	phosphate buffered saline

PCR	polymerase chain reaction
PPI	Protonenpumpeninhibitor
ProGERD	progression of gastroesophageal reflux disease
qPCR	real-time quantitative polymerase chain reaction
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
RDQ	Reflux Disease Questionnaire
RNA	ribonucleic acid
s	Sekunde(n)
S	Svedberg
SD	standard deviation
Tab.	Tabelle
T _H 1	Typ-1-T-Helferzellen
T _H 2	Typ-2-T-Helferzellen
TLESR	transient lower esophageal sphincter relaxation
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
VP	Verlängerung der Papillen
WHO	World Health Organization
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol

Tabellenverzeichnis

1	Demographische Daten und <i>H. pylori</i> -Status der Studienpatienten.....	14
2	Genexpressionsraten von <i>CDX2</i> , <i>MUC2</i> und <i>IAP</i> in den einzelnen Gruppen	26
3	<i>CDX2</i> -Genexpression in der Magenmukosa in Abhängigkeit vom Vorliegen einer GERD.....	28
4	Genexpressionsraten von <i>CDX2</i> , <i>MUC2</i> und <i>IAP</i> in der gastralen Mukosa von Patienten ohne bzw. mit <i>H. pylori</i> -Infektion.....	29
5	Raten der Genexpression von <i>CDX2</i> , <i>MUC2</i> und <i>IAP</i> an den Lokalisationen Cardia und Antrum in Abhängigkeit vom Vorliegen einer <i>H. pylori</i> -Infektion ...	30
6	Anteile von Patienten mit nachgewiesener Genexpression von <i>CDX2</i> , <i>MUC2</i> bzw. <i>IAP</i> in den drei Gruppen bei <i>H. pylori</i> -infizierten im Vergleich zu nicht-infizierten Patienten	31
7	<i>CDX2</i> -Genexpression in der Magenschleimhaut in Abhängigkeit vom Vorliegen einer <i>H. pylori</i> -Infektion	32
8	<i>CDX2</i> -Genexpression an den Lokalisationen Cardia und Antrum in Abhängigkeit vom Vorliegen einer Infektion mit <i>H. pylori</i>	33

Abbildungsverzeichnis

1	Montreal-Klassifikation der GERD	3
2	Funktionelle Bedeutung von CDX2	9
3	qPCR-Amplifikationsprodukte von β -ACTIN, CDX2, MUC2 und IAP	24
4	Genexpressionsraten von CDX2, MUC2 und IAP in der Kontrollgruppe	25
5	CDX2-Genexpression im Antrum in Abhängigkeit vom Vorliegen einer GERD	28
6	CDX2-Genexpression aller Proben der gastralen Mukosa, sortiert nach dem H. pylori-Status	32
7	Genexpression von CDX2 in Cardia- und Antrummukosa, sortiert nach H. pylori-Status	33
8	Streudiagramm der Pearson-Korrelation zwischen den Transkriptmengen von CDX2 und MUC2	34
9	Korrelation der Transkriptgehalte von CDX2 und MUC2 in der gastralen Mukosa	35
10	Korrelation zwischen den Transkriptgehalten von CDX2 und IAP	36
11	Pearson-Korrelation der Genexpression von CDX2 und IAP im Antrum	37
12	Anfärbung des CDX2-Proteins in der gastralen Mukosa mittels Immunhistochemie	39
13	Elektrophoresebanden der qPCR-Amplifikationsprodukte von β -ACTIN und CDX2	40
14	Effekt von DHCA und saurem pH auf die Genexpression von PAR-2 in ösophagealen Zellen	42

1 Einleitung

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die durch Bindung an die DNA die Transkription von Genen ermöglichen und entscheidend beeinflussen. Da sie eine wichtige Rolle bei der Kontrolle zellulärer Funktionen spielen, kann eine gestörte Funktion Krankheiten und Entwicklungsstörungen zur Folge haben. Der Homöobox-Transkriptionsfaktor Caudal Type Homeobox 2 (CDX2) gilt als Schlüsselregulator der Darmentwicklung [1]. Er steuert die Expression zahlreicher darmspezifischer Gene und spielt so eine entscheidende Rolle bei der intestinalen Differenzierung und beim Erhalt des intestinalen Phänotyps [2]. Es ist gut belegt, dass die ektope Expression von *CDX2* in Ösophagus und Magen ein zentrales Ereignis in der Pathogenese der intestinalen Metaplasie darstellt. Metaplasie wiederum tritt häufig im Kontext des lang anhaltenden Reizes einer chronischen Entzündung auf [3, 4].

Am ösophagogastralen Übergang unterscheidet man im Wesentlichen zwei ätiologische Faktoren, die zu einer chronischen Entzündung führen können. Bei der gastroösophagealen Refluxkrankheit (GERD) verursacht der übermäßige Rückfluss von Magensaft und Duodenalsekret eine chemisch induzierte Entzündung der ösophagealen Mukosa. Die GERD ist in den westlichen Industrienationen eine der häufigsten Erkrankungen des Verdauungstrakts, von der zwischen 10 und 20 % der Bevölkerung betroffen sind [5]. Die Erkrankung gilt als Risikofaktor für die Entstehung des Barrett-Ösophagus [6] und des distalen ösophagealen Adenokarzinoms [7]. Dem steht die Infektion der Magenschleimhaut mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) gegenüber, die zu einer chronisch-aktiven Gastritis führt. Mit einer geschätzten weltweiten Prävalenz von über 50 % gehört sie zu den am meisten verbreiteten chronischen bakteriellen Infektionen. Die Durchseuchungsrate ist mit teilweise über 90 % in den Entwicklungsländern am höchsten, wohingegen in den Industrienationen etwa 30 % der Bevölkerung mit dem Keim infiziert sind [8]. Das Zusammentreffen von bestimmten bakteriellen Virulenzfaktoren und einer entsprechenden genetischen Disposition des Wirts begünstigt einen schwereren Entzündungsverlauf und das Auftreten von Folgeerkrankungen. Die *H. pylori*-Infektion stellt einen Risikofaktor für die gastroduodenale Ulkuskrankheit, das distale Magenkarzinom und das gastrale Marginalzonen-B-Zell-Lymphom (MZBZL) vom Mucosa Associated Lymphoid Tissue (MALT)-Typ dar und wurde aus diesem Grund im Jahr 1994 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Karzinogen der Kategorie 1 eingestuft [9, 10].

1.1 Gastroösophageale Refluxkrankheit

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Seit dem evidenzbasierten Konsensus von Montreal im Jahr 2005 gibt es eine weltweit einheitliche Begriffsbestimmung der GERD. Sie ist definiert als eine Krankheit, die entsteht, wenn der Rückfluss von Mageninhalt belästigende Symptome und/oder Komplikationen hervorruft (Abb. 1). Demnach kann die Diagnose alleine anhand der Symptome und deren Bewertung durch den Patienten gestellt werden. Die symptomorientierte Betrachtungsweise der Montreal-Definition trägt den Beschwerden des Patienten in gleichem Maße Rechnung wie den Untersuchungsbefunden [11].

Die geschätzte Häufigkeit der GERD unterliegt beträchtlichen geographischen Unterschieden. In Europa reichen die Angaben zur Prävalenz von wenigstens einmal pro Woche auftretendem Sodbrennen und/oder Regurgitationen von 8,8 % in Schweden bis 25,8 % in Nordschweden [12, 13]. Studien aus den USA berichten von einer Krankheitshäufigkeit zwischen 18,1 % und 27,8 % [14, 15]. In Ostasien hingegen tritt die GERD mit einer geschätzten Prävalenz zwischen 2,5 % und 7,8 % deutlich seltener auf als in den westlichen Industrienationen [16, 17]. Epidemiologische Daten deuten auf eine weltweite Zunahme von Refluxbeschwerden in den letzten zwei Jahrzehnten hin [5], wobei Frauen und Männer gleich häufig betroffen sind [18, 19].

Die GERD führt aufgrund ihrer hohen Prävalenz zu einer erheblichen Belastung für Gesundheitssysteme und Volkswirtschaften. Nach Berechnungen im Rahmen der in Deutschland, Österreich und der Schweiz durchgeführten „Progression of gastroesophageal reflux disease“ (ProGERD)-Studie belaufen sich die direkten krankheitsbezogenen Kosten (Arztbesuche, Diagnostik, Therapie, Krankenhausaufenthalte) in diesen Ländern auf durchschnittlich 342 €, die indirekten Kosten (Arbeitsausfall, reduzierte Produktivität) auf 40 € pro Patient und Jahr. Der größte Anteil hiervon entfällt auf die medikamentöse Therapie (64 %), was insbesondere auf die Langzeitbehandlung mit Protonenpumpeninhibitoren (PPI) zurückzuführen ist [20].

1.1.2 Symptomatik und Klassifikation

Die Leitsymptome der Refluxkrankheit sind retrosternales Brennen, saures Aufstoßen und Regurgitation [21], wobei man von Regurgitation spricht, wenn der Patient das Zurückfließen von Mageninhalt in den Mund oder Hypopharynx wahrnimmt. Weitere weniger

spezifische Symptome können epigastrische Schmerzen, Dyspepsie, Thoraxschmerzen und Schlafstörungen sein [22-24]. In der Montreal-Konsensus-Konferenz 2005 wurde von einer internationalen Expertengruppe eine Klassifikation der GERD erarbeitet, deren Grundidee eine auf Syndromen basierende Einteilung der mit GERD assoziierten Krankheitsmanifestationen ist (Abb. 1). Das Krankheitsbild wird in ösophageale und extraösophageale Syndrome eingeteilt, wovon die ösophagealen Erscheinungsformen wiederum in Symptome und Ösophagusläsionen untergliedert werden. Bei den extraösophagealen Syndromen unterscheidet man die mit gesicherter und die mit einer vermuteten Assoziation zur GERD. Husten, Laryngitis, Asthma und Zahnerosionen wurden als gesicherte Manifestationsformen der GERD anerkannt [11].

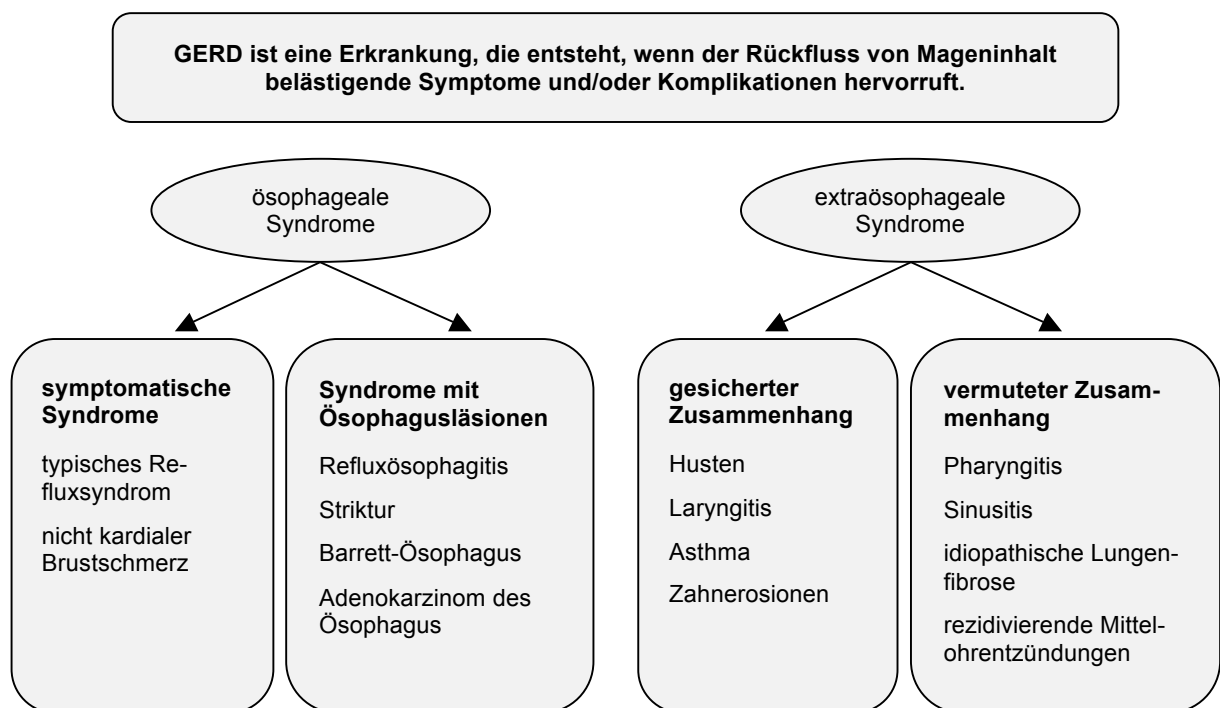


Abb. 1. Montreal-Klassifikation der GERD (modifiziert nach Vakil et al. [11])

Krankheitsdefinition und Einteilung der Manifestationsformen in ösophageale und extraösophageale Syndrome.

Patienten mit GERD haben verglichen mit der Allgemeinbevölkerung eine deutlich niedrigere gesundheitsbezogene Lebensqualität, wobei Sodbrennen, Verdauungsprobleme und Bauchschmerzen am häufigsten als störend empfunden werden. Die Beschwerden beeinträchtigen die Vitalität, das psychische Wohlbefinden und den Schlaf der Betroffenen und führen zu einer verminderten Leistungsfähigkeit. Die Berücksichtigung des Einflusses

der Symptome auf die Lebensqualität hat bei der Diagnosestellung und bei Therapieentscheidungen zunehmend an Bedeutung gewonnen [25, 26].

1.1.3 Hauptmanifestationen

Das morphologische Spektrum der ösophagealen GERD-Manifestationen umfasst die nichterosive Refluxkrankheit (NERD), die erosive Refluxkrankheit (ERD) und den Barrett-Ösophagus. Unter medizinischer Basisversorgung verläuft die Krankheit meist chronisch, aber nur selten progredient im Sinne eines Übergangs von der NERD über die unterschiedlichen Schweregrade der ERD zum Barrett-Ösophagus. Die meisten Patienten weisen über Jahre hinweg die gleiche Krankheitsentität oder einen Rückgang erosiver Veränderungen auf [6].

Die NERD ist die häufigste Erscheinungsform, von der etwa 60-70 % der Patienten betroffen sind [27]. Sie ist durch das Auftreten mit Reflux assoziierter belastigender Symptome charakterisiert, ohne dass mit der konventionellen Endoskopie Schleimhautläsionen nachgewiesen werden können. Um die Diagnose korrekt zu stellen, darf der Endoskopie nicht unmittelbar eine säuresupprimierende Therapie vorausgegangen sein. Wenn die Symptome des Patienten nicht auf die Behandlung mit einem PPI ansprechen, ist die Diagnose NERD unwahrscheinlich. Mittels Impedanz-pH-Metrie kann beurteilt werden, ob die Symptome mit Refluxepisoden korrelieren [28]. Patienten mit NERD unterscheiden sich bezüglich ihrer Beschwerden und deren Auswirkungen auf die Lebensqualität nicht von Patienten mit ERD oder Barrett-Ösophagus [25].

Etwa 30 % der GERD-Patienten lassen sich aufgrund endoskopisch sichtbarer Erosionen der ERD zuordnen. Mit der Los-Angeles-Klassifikation als einziger in Studien validierter Einteilung wird der Schweregrad der erosiven Ösophagitis anhand von vier Stadien beschrieben [29].

In der ProGERD-Studie wurde ermittelt, dass unter der üblichen Behandlungspraxis in einem Beobachtungszeitraum von 5 Jahren 6 % der NERD-Patienten, 12 % der ERD-Patienten mit Grad A/B und 20 % der ERD-Patienten mit Grad C/D nach der Los Angeles-Klassifikation einen Barrett-Ösophagus entwickeln [6]. Mit dem Terminus wird eine Zylinderepithelmetaplasie im Ösophagus bezeichnet. Während die traditionelle Definition das Vorhandensein von Becherzellen als diagnostisches Kriterium der spezialisierten intestinalen Metaplasie verlangte, gilt seit der Montreal-Konsensus-Konferenz 2005 jede Zylinderepithelmetaplasie proximal des gastroösophagealen Übergangs unabhängig von der

histologischen Spezifizierung als Barrett-Ösophagus. Neu eingeführt wurde der Begriff des „endoskopischen Befundes mit Verdacht auf eine endotheliale Metaplasie“ (endoscopically suspected endothelial metaplasia, ESEM), mit dem die makroskopisch erkennbaren Schleimhautveränderungen bezeichnet werden sollen, solange die feingewebliche Diagnose noch aussteht. Histologisch wird der Barrett-Ösophagus in den gastralen und den intestinalen Typ untergliedert [11]. Der endoskopische Aspekt der Läsion wird anhand der Prag C & M Kriterien beschrieben, die sowohl die zirkuläre als auch die maximale Ausdehnung berücksichtigen [30]. Dem Barrett-Ösophagus gilt besondere Beachtung, da er eine Präkanzerose für das ösophageale Adenokarzinom darstellt [31], dessen Inzidenz in den letzten Jahrzehnten drastisch angestiegen ist [32].

1.1.4 Pathogenese

Auch bei gesunden Individuen kann ein wiederkehrender Rückfluss von Mageninhalt in den Ösophagus nachgewiesen werden, der jedoch weder zu Beschwerden noch zu pathologischen Schleimhautveränderungen führt [33]. Wenn die Schutzmechanismen des Ösophagus den Einfluss des aggressiven Refluats nicht mehr kompensieren können, kommt es zur Ausbildung der Refluxkrankheit. An der Pathogenese der GERD sind in der Regel verschiedene Faktoren beteiligt. Am häufigsten werden Refluxepisodes im Zusammenhang mit transienten Relaxationen des unteren Ösophagussphinkters (TLESRs) beobachtet. Diese kurz andauernden Erschlaffungen treten bei Patienten mit GERD zwar nicht häufiger auf als bei Gesunden, sind aber in einem höheren Prozentsatz mit Reflux assoziiert [34]. Bei einem kleinen Anteil der Patienten mit GERD ist der Ruhedruck des unteren Ösophagussphinkters dauerhaft erniedrigt, was zumeist schwerere Schleimhautläsionen zur Folge hat [35, 36]. Je länger die ösophageale Mukosa Kontakt zu dem zurückfließenden Mageninhalt hat, desto schwerer ist das Krankheitsbild [37]. Magenentleerungsstörungen oder eine beeinträchtigte Selbstreinigungsfunktion des Ösophagus können zu einer verlängerten Kontaktzeit führen [38]. Das Vorliegen einer Hiatushernie stellt einen Risikofaktor für die Entwicklung einer erosiven Ösophagitis dar [39]. Außerdem hat auch die chemische Zusammensetzung des Refluats Einfluss auf die Entstehung und Manifestationsformen der Refluxkrankheit, wobei neben der Magensäure eine Reihe weiterer schädlicher Bestandteile wie Pepsin, Gallensäuren und Pankreasenzyme enthalten sind. Der duodenogastroösophageale Reflux (DGER) ist mit der

Entwicklung von Ösophagitis, Barrett-Ösophagus und ösophagealem Adenokarzinom assoziiert [40, 41].

Zu den mit der GERD verbundenen histomorphologischen Veränderungen der ösophagealen Mukosa gehören eine Basalzellhyperplasie, die Verlängerung der Papillen und entzündliche Infiltrate [42], wobei die Basalzellhyperplasie und die Verlängerung der Papillen mit dem Schweregrad der GERD korrelieren [43]. Ein neueres histologisches Kriterium stellt die Erweiterung der Interzellularräume dar [44], die auf molekularer Ebene mit Veränderungen im Bereich der Zellkontakte einhergeht. So konnte bei Patienten mit GERD eine vermehrte Expression desmosomaler Proteine nachgewiesen werden [45].

Im letzten Jahrzehnt ist die molekulare Pathogenese der refluxbedingten chronischen mukosalen Entzündung zunehmend ins Zentrum des Interesses gerückt. Insbesondere wurde die Rolle von Entzündungsmediatoren an der Entstehung der GERD näher untersucht, wobei den verschiedenen Entitäten der Refluxerkrankung unterschiedliche mukosale Entzündungsantworten zugeordnet werden können. Das proinflammatorische Zytokin Interleukin 8 (IL-8), das chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkt, scheint in der Pathogenese der Refluxerkrankung eine Schlüsselrolle innezuhaben und wird ebenso wie Interleukin 1 β (IL-1 β) sowohl bei Patienten mit NERD, als auch bei Patienten mit erosiver Ösophagitis verstärkt exprimiert [46, 47]. Die ERD geht zudem mit der Freisetzung von Interferon- γ (IFN- γ) einher [48], womit beide Entitäten ein für Typ-1-T-Helferzellen (T_H1) typisches Zytokinmuster aufweisen. Im Gegensatz dazu ist die immunregulatorische Umgebung der Barrett-Mukosa durch eine erhöhte Expression der mit Typ-2-T-Helferzellen (T_H2) assoziierten Zytokine Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 10 (IL-10) charakterisiert [48].

In den letzten Jahren findet ein Umdenken bezüglich der initialen Ereignisse in der Pathogenese der GERD statt. Ursprünglich ging man davon aus, dass eine direkte chemische Schädigung der oberen Epithelschichten durch Säure und Enzyme den Ausgangspunkt der Entzündung darstellt, woraufhin Immunzellen in die Mukosa einwandern und Zytokine sezernieren. Souza *et al.* beobachteten im Tierversuch, dass die für die GERD charakteristischen histologischen Veränderungen Basalzellhyperplasie und Papillen-Elongation der Entstehung von Oberflächenerosionen vorausgehen. Sie konnten auch zeigen, dass die Infiltration durch Lymphozyten in der Submukosa beginnt und von dort zur Oberfläche des Epithels fortschreitet. Außerdem wiesen sie in der Zellkultur nach, dass ösophageale Epithelzellen nach Stimulation mit Säure und Gallensäuren proinflammatorische Zytokine freisetzen. Auf der Grundlage dieser Forschungsergebnisse postulierten sie ein alternatives

pathogenetisches Modell der GERD, welches besagt, dass ösophageale Epithelzellen durch den Kontakt mit dem zurückfließenden Mageninhalt zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine stimuliert werden. Letztere vermitteln die Infiltration von Entzündungszellen, die schließlich den Gewebeschaden hervorrufen [49]. Im Einklang mit diesem Modell scheint die Signaltransduktion über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor Protease-Activated Receptor 2 (PAR2) entscheidend an der durch Reflux ausgelösten Immunantwort beteiligt zu sein. *PAR2* wird in der Mukosa von Patienten mit GERD vermehrt exprimiert [50]. In Ösophaguszelllinien konnte die *PAR2*-Expression sowohl durch Trypsin, als auch durch einen leicht sauren pH-Wert hochreguliert werden, und die Aktivierung von *PAR2* führte zur Expression und Sekretion von IL-8 [50, 51].

1.2 CDX2

1.2.1 Zuordnung und Expression

Homöobox-Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die während der Embryogenese die regionale Zuordnung und Funktion von Zellgruppen steuern. Sie sind bei allen Eukaryoten vorhanden und enthalten ein als Homöobox bezeichnetes phylogenetisch hoch konserviertes Sequenzmotiv, das für eine aus 60 Aminosäuren bestehende DNA-Bindungsdomäne kodiert. Mit dieser Homöodomäne genannten Proteindomäne binden die Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Sequenzen ihrer Zielgene, um deren Expression zu regulieren [52]. Man unterscheidet die Klasse der in Gruppen angeordneten Homöobox-Gene (Hox-Gene) von den über das gesamte Genom verteilten Homöobox-Genen (non-Hox-Gene). Letztere beinhalten die Untergruppe der ParaHox-Gene, zu denen auch die Familie der Caudal-related Homöobox(*CDX*-)Transkriptionsfaktoren mit ihren 3 Vertretern *CDX1*, *CDX2* und *CDX4* gehört. Namensgebend für die *CDX*-Gene des Menschen ist die Homologie zum Gen Caudal von *Drosophila melanogaster*, da seine Struktur und Funktion erstmals an der Fruchtfliege entdeckt und analysiert wurden [53].

CDX2 liegt beim Menschen auf Chromosom 13, besteht aus drei Exonen und zwei Intronen und kodiert für ein 313 Aminosäuren enthaltendes Protein [54]. Murines *Cdx2* wird während der Blastogenese im Trophectoderm exprimiert. In der Embryonalperiode kann eine Expression des Transkriptionsfaktors im posterioren Endoderm mit Ausbreitung in anteriorer Richtung nachgewiesen werden. Die höchste Expression zeigt sich um die Tage 14 – 17 post coitum, wenn sich das viszerale Endoderm in ein einschichtiges Zylinderepithel umwandelt. Die Expression von *Cdx2* bleibt von nun an bis ins Erwachsenenal-

ter fast ausschließlich auf das Epithel von Dünndarm und Dickdarm beschränkt mit einem maximalen Expressionsniveau im Zökum, wobei der Transkriptionsfaktor in den Zellkernen aller epithelialer Zelltypen des reifen Darms einschließlich der Becherzellen nachgewiesen werden kann [1, 55-57].

1.2.2 Funktionelle Bedeutung

Die funktionelle Bedeutung von *Cdx2* in frühen Entwicklungsstadien wurde an transgenen Mäusen untersucht. Homozygotie für das *Cdx2*-Nullallel (*Cdx2*^{-/-}) verursacht eine frühe embryonale Letalität aufgrund einer fehlgesteuerten Entwicklung des Trophoblasten, die zu einem Scheitern der Nidation führt. Heterozygote *Cdx2*-Knockout-Mäuse überleben, sind fertil und entwickeln einen Phänotyp mit einer anterioren homöotischen Transformation, von der das Achsenskelett und die intestinale Mukosa betroffen sind. Ileum und Kolon weisen polypoide Läsionen auf, die durch einen Verlust der *Cdx2*-Expression charakterisiert sind und sowohl Plattenepithel als auch magentypische Zellen enthalten [58, 59]. *Cdx2* steuert neben der Reifung des Trophoblasten die Gliederung des kaudalen Bereichs des Embryos entlang der Körperlängsachse und die Differenzierung des Endoderms zu intestinalem Epithel [1, 56, 60].

Im adulten Organismus regelt CDX2 durch die Kontrolle darmspezifischer Gene die Differenzierung intestinaler Epithelzellen und die Aufrechterhaltung des intestinalen Phänotyps. Der Transkriptionsfaktor stimmt die komplexen Prozesse Proliferation, Apoptose, Zelladhäsion und -migration aufeinander ab und induziert die typische intestinale Morphologie mit zylindrischen polarisierten Epithelzellen und Zellverbindungen. Eine CDX2-vermittelte Expression konnte für die Gene der Zelladhäsionsproteine E-Cadherin und Claudin-2 gezeigt werden [2, 61-63]. Zu den von CDX2 regulierten Enzymen, die für die Funktionen von Enterozyten wie die Verdauung und Absorption charakteristisch sind, gehören Sucrase-Isomaltase [2], Lactase-Phlorizin Hydrolase [64] und Calbindin-D9K [65]. Das Enzym Intestinale Alkalische Phosphatase (IAP) kann in der intestinalen Metaplasie des menschlichen Magens nachgewiesen werden [66]. Mutoh *et al.* beschrieben, dass die intestinale metaplastische Mukosa von *Cdx2* transgenen Mäusen Alkalische Phosphatase exprimiert [67]. Ein weiteres Zielgen des Transkriptionsfaktors kodiert für das von Becherzellen vorwiegend produzierte sekretorische Mucin 2 (MUC2) [68]. Es bildet die Hauptproteinkomponente der schützenden Schleimschicht und charakterisiert den differenzierten intestinalen Phänotyp [69]. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass CDX2

durch positive transkriptionelle Regulation des Farnesoid-X-Rezeptors (FXR) an der Homöostase der Gallensäuren beteiligt sein könnte. FXR ist ein im enterohepatischen System exprimierter Rezeptor, dessen Aktivierung durch Gallensäuren im Sinne einer negativen Rückkopplung zu deren verstärktem Abbau und verminderter Synthese führt [70]. In der pathologischen Diagnostik dient CDX2 als Marker für die gastrointestinale Differenzierung von Adenokarzinomen und Karzinoiden [71, 72]. Die wichtigsten Funktionen des Homöobox-Transkriptionsfaktors sind in Abb. 2 zusammengefasst.

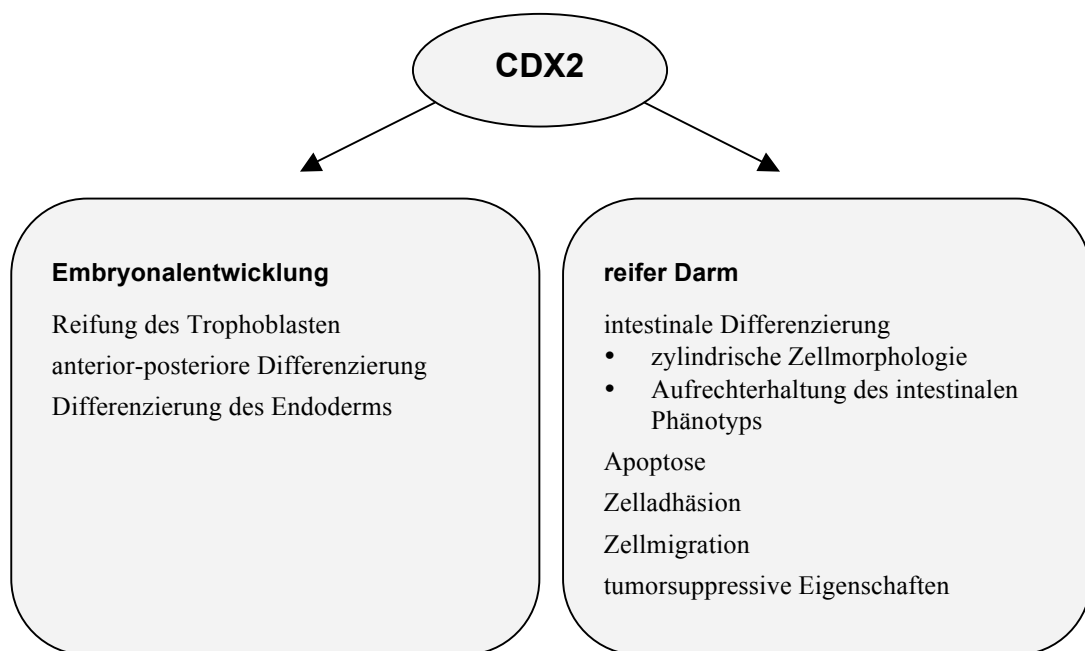


Abb. 2. Funktionelle Bedeutung von CDX2

CDX2 steuert während der Embryonalentwicklung und im reifen Darm eine Vielzahl von Prozessen, die zur Ausbildung und Aufrechterhaltung des intestinalen epithelialen Phänotyps führen.

1.2.3 Pathophysiologische Bedeutung

Eine ektope Expression von *CDX2* konnte in der intestinalen Metaplasie der Magenschleimhaut [73], in der Barrett-Mukosa [74] und in Bereichen intestinaler Metaplasie einer Reihe anderer Gewebe nachgewiesen werden [75, 76]. Silberg *et al.* und Mutoh *et al.* entwickelten transgene Mausmodelle, bei denen die ektope *Cdx2*-Expression in der Magenschleimhaut zur Entwicklung einer intestinalen Metaplasie führte [4, 77]. Sie erbrachten damit den Nachweis für einen kausalen Zusammenhang zwischen *Cdx2*-Expression und Intestinalisierung im Magen.

Die Rolle von CDX2 in der Kanzerogenese ist weniger klar, da sowohl tumorsuppressive als auch onkogene Eigenschaften beobachtet wurden. Im Kolon ist die Expression des Transkriptionsfaktors in Adenomen und Adenokarzinomen erniedrigt oder fehlt komplett, so dass er hier als Tumorsuppressor zu fungieren scheint [78, 79]. Im Magen nimmt die CDX2-Expression stufenweise entlang der Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz ab, wobei beim Adenokarzinom des Magens eine CDX2-Expression am häufigsten bei Tumoren vom intestinalen Typ nachgewiesen werden kann und mit weniger Invasivität verbunden ist [80]. Auch im Laufe der Progression vom Barrett-Ösophagus zum Barrett-Karzinom verringert sich die Expression des Transkriptionsfaktors. Demgegenüber findet sich eine aberrante Expression von CDX2 häufig bei Akuter Myeloischer Leukämie (AML) und war im Mausmodell der Auslöser für eine Form der AML [81].

Der Zusammenhang zwischen einer chronischen Ösophagitis als Folge von Säure- und Gallereflux, der Entwicklung der Barrett-Metaplasie und der Progression zum ösophagealen Adenokarzinom ist anhand epidemiologischer Daten gut belegt [6, 7]. Die molekularen Mechanismen hingegen, die die Entzündungskaskade mit der Entstehung von Metaplasie verbinden, sind noch unvollständig verstanden und Gegenstand intensiver Forschung. Die Induktion der ösophagealen CDX2-Expression scheint hierbei eine Schlüsselrolle zu spielen. Im Zellkulturmodell führte bei immortalisierten ösophagealen Keratinozyten die stabile CDX2-Transfektion zur Ausbildung kryptenähnlicher Strukturen und zur Hochregulierung intestinaler Differenzierungsmarker [82]. Bisher liegen wenige Daten über die CDX2-Genexpression in chronisch entzündeter gastraler und ösophagealer Mukosa vor. Bei Patienten mit *H. pylori*-Gastritis konnte in der Mukosa des Magens schon vor dem Auftreten von intestinaler Metaplasie eine CDX2-Expression nachgewiesen werden [83]. Eda *et al.* zeigten, dass in der entzündlichen ösophagealen Mukosa von Patienten mit GERD CDX2 exprimiert wird, bevor eine Expression anderer intestinaler Markergene nachweisbar ist. Sie postulierten daher, dass die CDX2-Expression ein frühes Ereignis in der Entwicklung des Barrett-Ösophagus darstellt [74, 84]. Im Einklang mit dieser Theorie fanden Moons *et al.* bei einem Drittel der Patienten mit Barrett-Ösophagus CDX2-mRNA im ösophagealen Plattenepithel oberhalb des Barrett-Segments [85].

1.2.4 Säure, Galle und CDX2 in *in vitro*- und Tiermodellen

Es gibt in zunehmendem Maße Belege für die Bedeutung des DGER in der Pathogenese der GERD, wobei der Reflux von Gallensäuren mit schwereren Schäden an der ösopha-

gealen Mukosa [86] und mit der Entwicklung eines Barrett-Ösophagus assoziiert ist [87]. Sun *et al.* zeigten im Rattenmodell, dass sowohl Gallensäuren im Refluat nach ösophagoduodener bzw. ösophagogastroduodener Anastomose, als auch dem Futter beigesezte Gallensäuren (DCA) ausreichen, um Ösophagitis und Barrett-Metaplasie im Ösophagus zu induzieren [88]. Das Refluat von Patienten mit Barrett-Ösophagus hat im Vergleich zu anderen GERD-Patienten einen niedrigeren pH-Wert und enthält höhere Konzentrationen von Gallensalzen [89]. Möglicherweise trägt der durch Mischreflux aus saurem und DGER induzierte oxidative Stress, der zu DNA-Schäden führt, zur Progression der Erkrankung bei [90]. Patienten mit GERD weisen im Ösophagus höhere Konzentrationen von Stickstoffmonoxid auf, das im Zellversuch zur Induktion von *CDX2* und zur Verminderung des plattenepithelialen Differenzierungsmarkers *SOX2* führte [91]. In Rattenmodellen mit ösophagoduodener [92] bzw. ösophagogastroduodener [93] Anastomose konnte sowohl für duodenalen Reflux alleine, als auch für kombinierten Reflux ein karzinogener Effekt nachgewiesen werden.

Um die den histologischen Veränderungen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen untersuchen zu können, entwickelten Marchetti *et al.* ein *in vitro*-Modell, wobei ihnen die Langzeitkultur normaler ösophagealer Keratinozyten der Maus gelang. Sie zeigten, dass eine chronische Säureexposition in diesen Zellen zur Aktivierung und Expression des Transkriptionsfaktors *Cdx2* führt [94]. Die Arbeitsgruppe um Kazumori untersuchte erstmalig anhand von *in vitro*-Modellen die Effekte von Gallensäuren auf die *CDX2*-Expression [95]. In den Zelllinien TT (humanes ösophageales Plattenepithelkarzinom), HT-29 (humanes Kolonkarzinom) und CV-1 (Nierenzellen von Affen) wurde der *CDX2*-Promoter von den Gallensäuren Dehydrocholsäure (DHCA) und Cholsäure (CA) dosisabhängig aktiviert. Nach Inkubation der endogen *CDX2* exprimierenden Zelllinien Caco-2 (humanes Kolonkarzinom) und HT-29 mit der Gallensäure DHCA wurde eine Erhöhung der Bildung von *CDX2*-Proteinen nachgewiesen. Außerdem zeigte die Arbeitsgruppe, dass sich in primär kultivierten ösophagealen Keratinozyten der Ratte durch die Exposition gegenüber DHCA und CA die Genexpression von *Cdx2* erhöht, wobei dieser Effekt auf der Proteinebene bestätigt werden konnte. Nachdem die gleichen Zellen mit *Cdx2* transfiziert wurden, exprimierten sie den intestinalen Differenzierungsmarker *Muc2*. Weitere Arbeitsgruppen beschäftigten sich daraufhin mit der Entwicklung von Zellkulturmodellen, anhand derer der Effekt von Säure und Gallensäuren auf die *CDX2*-Expression unter verschiedenen Inkubationsbedingungen untersucht wurde. Debruyne *et al.* verwendeten für ihre Versuche die endogen *CDX2* exprimierenden humanen ösophagealen Adenokarzi-

nom-Zellen OE19 [96]. Die Stimulation mit Deoxycholsäure (DCA) und saurem pH führte in diesen Zellen zu einem Anstieg der *CDX2*-mRNA und der *CDX2*-Proteinproduktion, wobei beide Substanzen einen additiven Effekt aufwiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die durch DCA induzierte *CDX2*-Expression transkriptionell durch Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells (NF- κ B) aktiviert wird. Die Erhöhung der *CDX2*-Expression ging mit einer Erhöhung der Genexpression von Guanylatzyklase C einher, einem Marker differenzierten intestinalen Epithels, dessen intestinal-spezifische Expression durch *CDX2* vermittelt wird. Die Arbeitsgruppe um Hu untersuchte den Effekt von Gallensäuren auf die *CDX2*-mRNA-Expression in unterschiedlichen humanen ösophagealen Zellen ohne endogene *CDX2*-Expression. Hierzu wurden Zellen der Linien Het-1A (durch SV40 immortalisierte Plattenepithelzellen), SEG-1 (ösophageales Adenokarzinom), HKESC-1 und HKESC-2 (beide von ösophagealen Plattenepithelkarzinomen abstammend) zwischen einer und 24 Stunden mit DCA, Chenodeoxycholsäure (CDCA) und Glycocholsäure (GCA) in Kontakt gebracht. Die Inkubation mit den sekundären Gallensäuren DCA und CDCA führte in allen vier Zelllinien zu einem dosis- und zeitabhängigen Anstieg der mRNA-Level von *CDX2*, wobei der Effekt bei den Adenokarzinomzellen SEG-1 am ausgeprägtesten war [97]. Auch Liu *et al.* beschreiben in den humanen ösophagealen Epithelzellen Het-1A und SEG-1 eine Aktivierung von *CDX2* durch Säure, Gallensäuren und deren Kombination [82]. Sie konnten zudem zeigen, dass dieser Effekt über die Demethylierung des *CDX2*-Promoters vermittelt wird. Sie wiesen mittels methylierungsspezifischer Polymerase-Kettenreaktion (MSP) nach, dass die Inkubation der Zellen mit der hypomethylierenden Substanz 5-Aza-2'-Deoxycytidine (DAC) zu einer partiellen Demethylierung des *CDX2*-Promoters führt. Dazu korrelierend wurde in diesen Zellen durch DAC die Expression von *CDX2* induziert. Die Behandlung der gleichen Zellen mit Säure und/oder Gallensäuren resultierte ebenfalls in der Demethylierung des *CDX2*-Promoters.

1.3 Aufgabenstellung

Die initialen molekularen Ereignisse, die zur Entwicklung der Barrett-Metaplasie führen, sind noch wenig verstanden. Die ektope Expression von *CDX2* scheint für die Entwicklung von Metaplasie in Ösophagus und Magen unabdingbar zu sein [3], aber die Rolle des Transkriptionsfaktors bei der NERD und ERD wurde bisher kaum untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Charakterisierung der Genexpression von *CDX2* bei der GERD ohne Barrett-Metaplasie.

Folgende Arbeitshypothesen wurden überprüft:

- Bei Patienten mit GERD existiert in der Mukosa von Ösophagus und Magen eine Assoziation zwischen der *CDX2*-Genexpression und der Expression *CDX2*-regulierter bzw. mit intestinaler Metaplasie assoziierter Gene.
- In ösophagealen Keratinozyten kann durch Säure und/oder Gallensäuren die Expression von *CDX2* induziert werden.

Folgende Teilaspekte wurden analysiert:

(1) Untersuchungen an klinischen Proben

- Analyse der Genexpression von *CDX2* und *CDX2*-regulierten (*MUC2*) bzw. mit intestinaler Metaplasie assoziierten (*IAP*) Genen in Biopsien von Patienten mit GERD mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) sowie Bestätigung ausgewählter Ergebnisse auf der Proteinebene mittels Immunhistochemie.
- Analyse der Genexpressionsdaten in Abhängigkeit von der Entität der Refluxerkrankung (NERD, ERD), der Lokalisation im oberen Verdauungstrakt (distaler Ösophagus, Cardia, Antrum) und dem Vorliegen einer *H. pylori*-Infektion.

(2) Untersuchungen am Zellkulturmodell

- Analyse der *CDX2*-Genexpression nach Stimulation der humanen ösophagealen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien KYSE-150 und KYSE-450 mit saurem pH und/oder Gallensäuren.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungen an klinischen Proben

2.1.1 Studiendesign

Ziel der Studie war die Analyse der Expression von *CDX2*, *MUC2* und *IAP* in ösophagealen und gastralen Mukosaproben. Für die Durchführung der Untersuchungen lag die Zustimmung der örtlichen Ethikkommission vor (132/01). Eingeschlossen wurden 95 Patienten beider Geschlechter zwischen 18 und 80 Jahren mit GERD, wobei Symptome anhand des standardisierten Fragebogens „Reflux Disease Questionnaire“ (RDQ) dokumentiert wurden. 27 Patienten, die aus anderen Gründen gastroskopiert wurden (Vorsorgeuntersuchungen, nicht durch Reflux verursachte Dyspepsie), bildeten die Kontrollgruppe. Der Nachweis eines Barrett-Ösophagus oder einer atrophischen Korpusgastritis waren Ausschlusskriterien. Eine eventuelle Therapie mit einem PPI wurde mindestens 14 Tage vor der Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) pausiert. Von den 95 Patienten mit GERD wurde bei 44 eine NERD und bei 51 eine ERD diagnostiziert. Die demographischen Daten und der *H. pylori*-Status der Patienten sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1. Demographische Daten und *H. pylori*-Status der Studienpatienten

Angegeben sind das Geschlechterverhältnis, die Altersverteilung und der Anteil *H. pylori*-positiver Patienten in den einzelnen Patientengruppen.

	Kontrolle (n=27)	NERD (n=44)	ERD (n=51)
Geschlecht (männlich/weiblich)	6/21	8/36	32/19
Alter (Median ± SD, Altersspanne)	50.0 ± 17.5 (20-79)	47.0 ± 13.8 (18-72)	48.0 ± 15.0 (20-79)
positiver <i>H. pylori</i> - Status	6/27 (22,2 %)	8/44 (18,2 %)	16/51 (31,4 %)

2.1.2 Probengewinnung

Alle Mukosaproben wurden im Rahmen endoskopischer Untersuchungen in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg gewonnen. Die Patienten wurden über den Ablauf der Untersuchung und deren

Risiken aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme einschließlich der Entnahme von zusätzlichen Biopsien zu Forschungszwecken. Die ÖGDs wurden durch Herrn Prof. Dr. Klaus Mönkemüller mit einem Gastroskop vom Typ GIF Q-160 der Firma Olympus Optical Europe (Hamburg) durchgeführt. Hierbei erfolgte entsprechend den bei der Endoskopie sichtbaren Schleimhautveränderungen die Zuteilung der Patienten zu den Gruppen NERD, ERD oder Barrett-Ösophagus. Die Gewebeentnahme erfolgte mittels Zangenbiopsie, wobei aus dem distalen Ösophagus, der Cardia und dem Antrum je drei Mukosaproben für histologische und molekulargenetische Untersuchungen entnommen wurden. Für den Helicobacter-Urease-Test (HUT[®], Astra-Zeneca, Wedel) wurden aus Korpus und Antrum je eine weitere Probe gewonnen. Die Entnahme der ösophagealen Biopsien erfolgte bei makroskopisch unauffälliger Schleimhaut 2 cm oberhalb des ösophagogastralen Übergangs, im Falle von Erosionen wurde 2 cm proximal der Läsion biopsiert. Die für die molekulargenetischen Untersuchungen bestimmte Probe wurde unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren, mit 0,5 ml TRIzol[®] (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) versetzt und bei -80 °C eingelagert. Für histologische und immunhistochemische Untersuchungen wurde je eine weitere Probe in 4 % gepuffertem Formalin fixiert.

2.1.3 Histologie und *H. pylori*-Status

Die Biopsien wurden in Paraffin eingebettet, geschnitten, auf Objektträger übertragen und mit der Hämatoxylin-Eosin-, der modifizierten Giemsa-Färbung und durch die Perjodsäure-Schiff(PAS)-Reaktion angefärbt. Die Schnitte wurden von Frau Prof. Dr. Dörthe Jechorek aus dem Institut für Pathologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg ausgewertet. Die histologische Charakterisierung der mukosalen Entzündung und der morphologischen Veränderungen des ösophagealen Plattenepithels war Gegenstand vorangegangener Studien [47, 98].

Zur Bestimmung des *H. pylori*-Status der Patienten wurden der im Rahmen der Endoskopie durchgeführte Urease-Schnelltest und die Histologie herangezogen, wobei gegebenenfalls ergänzend eine Warthin-Starry-Färbung durchgeführt wurde. Gelang mit mindestens einem der Verfahren ein Erregernachweis, so wurde der Patient als *H. pylori*-positiv eingestuft.

1.1.4 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach einer in unserem Labor entwickelten zwei-stufigen Methode zur RNA-Extraktion aus endoskopischen Biopsien, bei der sowohl das TRIzol[®]-Reagenz als auch das RNeasy[®] Mini Kit verwendet werden [99].

Die mit TRIzol[®] versetzten Biopsien wurden langsam auf Eis aufgetaut und in RNase-freie Eppendorfgefäße überführt. Das Gewebe wurde daraufhin im TRIzol[®]-Reagenz mit dem Plastikrührstäbchen DSTROY-S durch manuelle Drehbewegungen homogenisiert. Während dieser Prozedur wurde die Probe drei- bis fünfmal erneut auf flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde das Lysat mit dem Vortexmischer gründlich durchmischt, anschließend zentrifugiert, und der klare Überstand wurde in ein Eppendorfgefäß überführt. Um die RNA zu präzipitieren, wurde im nächsten Schritt der Überstand mit dem gleichen Volumenanteil Isopropanol versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, und die im Pellet befindliche RNA in 100 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

Zur Reinigung der isolierten RNA wurde das RNeasy[®] Mini Kit verwendet. Der RNA-Suspension wurden 350 µl mit Mercaptoethanol versetzter RLT-Puffer (Mercaptoethanol-Anteil 1 %) zugegeben, um noch vorhandene RNasen zu inaktivieren. Im nächsten Schritt wurde die Probe mit 250 µl Ethanol vermischt und auf eine die RNA spezifisch bindende RNeasy[®]-Säule aufgetragen. Die Säule wurde über den QIAvac24[®]-Adapter mit einer Vakuumpumpe verbunden, und nach Anlegen des Vakuums durchlief die Lösung die Silicagel-Membran der Säule. Ebenfalls unter Verwendung der Vakuumpumpe wurde die gebundene RNA mit 250 µl RW1-Puffer gereinigt. Anschließend wurde die Membran 15 Minuten mit einem Gemisch aus 5 µl DNase und 35 µl RDD-Puffer inkubiert. Es folgten ein erneuter Waschzyklus mit 250 µl RW1-Puffer, und zwei Durchläufe mit je 500 µl RPE-Puffer. Die Säule wurde schließlich zentrifugiert und in ein RNase-freies Eppendorf-Gefäß transferiert, in dem die gebundene RNA in zwei Durchgängen nach Zugabe von je 35 µl RNase-freiem Wasser mittels Zentrifugation eluiert wurde. Bevor die Probe bei minus 80 °C eingelagert wurde, wurden von der Lösung je 5 µl zur Konzentrationsbestimmung und zur Überprüfung der RNA-Integrität entnommen.

Die Konzentration der RNA-Lösung wurde photospektrometrisch bestimmt. Sie wurde nach Messung der Extinktion bei 260 nm (OD_{260}) anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zur Kontrolle der RNA-Integrität nach der Präparation wurden die 28S- und 18S-Banden der ribosomalen RNA mittels Gelelektrophorese dargestellt. Die 1 %-igen Agarosegele

(1 g Agarose in 100 ml 1xTBE-Puffer) wurden je Geltasche mit den zuvor aliquotierten 5 µl der RNA-Lösung und mit 3 µl Ladepuffer beschickt. Die Auftrennung der RNA erfolgte über etwa eine Stunde in 1xTBE-Puffer bei 98 V, wobei die Gele nach einer Anlaufzeit von 10 Minuten mit Ethidiumbromid gefärbt wurden (400 ml TBE-Puffer und 66 µl Ethidiumbromid-Lösung 1 %). Anschließend wurden die RNA-Banden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert.

Materialien: TRIzol[®]-Reagenz (GIBCO BRL, Life Technologies, USA), Plastikrührstäbchen DSTROY-S (BIOzym Diagnostik GmbH, Oldendorf), Chloroform, Isopropanol, RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen), β-Mercaptoethanol, 100 % Ethanol, GENESYS[™]-Spektrometer 10UV (ThermoSpectronic, USA), UV-Transilluminator (Herolab, Biometra, Göttingen).

2.1.5 Reverse Transkription der Gesamt-RNA

Unter Verwendung eines Random-Primers wurden je Probe 500 ng der isolierten Gesamt-RNA mit der Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transkriptase (AMV Reverse Transkriptase) in cDNA umgeschrieben. Das Reaktionsvolumen betrug 40 µl und enthielt in Abhängigkeit von der in der Probe enthaltenen RNA-Konzentration ein entsprechendes Volumen der RNA-Lösung, destilliertes und mit DEPC behandeltes Wasser und 14,6 µl des folgenden Reaktionsgemisches:

- 8,0 µl AMV-RT 5x Reaktionspuffer
- 1,6 µl dNTP-Mix
- 2,0 µl Random-Primer (0,04 A₂₆₀ U/µl)
- 2,0 µl AMV-Reverse Transkriptase
- 1,0 µl Recombinant-RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor

Die Reverse Transkription erfolgte während der Inkubation auf einem Thermomixer (45 Minuten bei 42 °C). Durch eine 5-minütige Inkubation bei 95 °C wurde die Reaktion gestoppt, die cDNA-Lösung wurde abgekühlt und bei -20 °C eingelagert.

Materialien: AMV Reverse Transkriptase 10 U/µl (Promega, Mannheim), Primer „random“ p(dN)₆ (Roche, Australia), AMV-RT 5x Reaction Buffer (Promega, Mannheim), Recombinant-RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor 40 U/µl (Promega, Mannheim), peqGold dNTP-Set 10mM je Nukleotid (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen), DEPC-behandeltes Aqua dest.

2.1.6 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte mittels qPCR mit dem iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System (BioRad, München). Die PCR-Ansätze wurden in einem Volumen von 30 µl durchgeführt, in dem folgende Komponenten enthalten waren:

- 15 µl HotStarTaq - Sybr Green (Qiagen, Hilden)
- 0,2 µl genspezifischer Primer („forward“, 50 µmol/l)
- 0,2 µl genspezifischer Primer („reverse“, 50 µmol/l)
- 12,6 µl Aqua dest.
- 2 µl cDNA

Die qPCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

<i>Anzahl der Zyklen</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zyklusdauer</i>	<i>Vorgang</i>
1	95,0 °C	15 min	Denaturierung, Aktivierung der Polymerase
40	94,0 °C	30 s	Denaturierung
	60,0 °C	30 s	„Annealing“
	72,0 °C	30 s	Elongation
1	72,0 °C	5 min	Verlängerungsphase

Das PCR-Protokoll war für die vier untersuchten Gene abgesehen von der für die jeweiligen Primer spezifischen Temperatur beim „Annealing“ identisch. Bei jedem Lauf der qPCR wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Nach jedem PCR-Zyklus wurde die vom Farbstoff SYBR Green I (BioRad, München) nach Bindung an die doppelsträngige DNA ausgehende Fluoreszenz gemessen. Es wurde jeweils der Zyklus registriert, an dem die exponentielle Phase der Amplifikation begann (Threshold Cycle, Ct-Wert). Auf jeder Platte wurde eine Verdünnungsreihe aus Plasmid-DNA mit dem jeweiligen Targetgen mitgeführt, das zuvor in das Plasmid pDIREKT (Qiagen, Hilden) kloniert worden war. Aus den Ct-Werten der bekannten DNA-Konzentrationen der Reihenverdünnung wurde eine Standardkurve erstellt, die der Berechnung der initialen cDNA-Mengen in den klinischen Proben zugrunde lag. Jede Probe wurde schließlich normiert, indem die Transkriptmenge des Zielgens durch die Transkriptmenge des internen Referenzgens *β-ACTIN* geteilt wurde. Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung wurden in willkürlichen Einheiten (arbitrary units, a.u.) angegeben.

Es wurden Intron-überspannende Primer ausgewählt, um die Vervielfältigung eventuell in der Probe vorhandener genomischer DNA zu vermeiden. Nachfolgende Primer kamen bei der qPCR zum Einsatz:

<i>CDX2</i>	forward:	5'-CTG-GGC-TGC-TGC-AAA-CGC-TCA-AC-3'
	reverse:	5'-TGT-GGT-GGC-TGC-TGC-TGC-TGT-TG-3'
<i>MUC2</i>	forward:	5'-GGC-ATC-CAC-TCC-AAC-ATC-TCC-G-3'
	reverse:	5'-GAC-GGG-CGT-GTC-GTA-ATG-GAA-C-3'
<i>IAP</i>	forward:	5'-GTG-ATG-AAC-CGG-GCC-AAG-CAA-G-3'
	reverse:	5'-GGT-GCT-TTG-CCA-GCC-ATT-CCT-G-3'
<i>β-ACTIN</i>	forward:	5'-CAT-GCC-ATC-CTG-CGT-CTG-GAC-C-3'
	reverse:	5'-ACA-TGG-TGG-TGC-CGC-CAG-ACA-G-3'

Die Länge der amplifizierten DNA-Fragmente betrug für *CDX2* 376 bp, für *MUC2* 341 bp, für *IAP* 331 bp und für *β-ACTIN* 400 bp. Es erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte (1,8 %-iges Agarosegel) unter Mitführung einer 100 bp DNA-Leiter. Durch den Vergleich der DNA-Banden mit dem Längenstandard wurde überprüft, ob die PCR-Produkte die erwartete Länge hatten, und eventuell amplifizierte genomische DNA oder unspezifische Produkte wurden so erkannt.

2.1.7 Immunhistochemie

Um die funktionelle Relevanz der Ergebnisse der qPCR zu überprüfen, schlossen sich immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis des CDX2-Proteins an. Für eine statistische Analyse stand nicht mehr genügend Material zur Verfügung, so dass die Immunfärbungen exemplarischen Charakter hatten. In Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Dörthe Jechorek aus dem Institut für Pathologie wurden sie in deskriptiver Form ausgewertet.

Die Färbungen wurden nach der Avidin-Biotin-Komplex-(ABC-)Methode durchgeführt, bei der der sekundäre Antikörper durch Biotin markiert ist. Hierzu wurden die in Paraffin eingebetteten Biopsien in 3 µm dünne Scheiben geschnitten. Diese wurden über Nacht getrocknet, in Xylol deparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte zwanzig Minuten in EDTA-Puffer (0,01 mol/l) in der Mikrowelle bei 450 Watt erhitzt. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler

Mausantikörper in einer Verdünnung von 1:200 (CDX2-88, BioGenex Laboratories Inc., San Ramon, CA, USA), mit dem die Schnitte zwölf Stunden bei 4 °C inkubiert wurden. Für die nachfolgenden Schritte (Inkubation mit dem biotinylierten Sekundär-Antikörper, Inkubation mit AP-konjugiertem Streptavidin, Inkubation mit dem Chromogen) stand das Vectastain[®] ABC-AP Kit der Firma Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) zur Verfügung. Nach Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Rehydrierung wurden die Gewebeschnitte mit DePeX eingedeckt. Bei den mitgeführten Negativkontrollen wurde der Erstantikörper durch Normalserum ersetzt, als Positivkontrolle dienten Biopsien aus dem Duodenum.

2.1.8 Statistik

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mit den Programmen Microcal Origin[®] 7.0 (OriginLab Corp., Northhampton, MA, USA) und KaleidaGraph[®] 4.0 (Synergy Software, Reading, PA, USA). Es kamen zweiseitige Signifikanztests zur Anwendung, denen eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % zugrunde gelegt wurde.

2.2 Untersuchungen am Zellkulturmodell

In einem *in vitro*-Modell wurde unter Verwendung der humanen ösophagealen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien KYSE-150 und KYSE-450 die Genexpression von *CDX2* nach Stimulation der Zellen mit Gallensäuren und saurem pH-Wert analysiert. Hierzu wurden die Zellen jeweils mit 50 µmol/l DHCA, CA oder DCA bei pH 7.0, pH 6.0 oder pH 5.0 für 6 h bzw. für 24 h inkubiert. Im Anschluss wurde mit der qPCR die Menge der *CDX2*-mRNA gemessen. Alle Zellversuche wurden unabhängig voneinander zu verschiedenen Zeitpunkten mindestens dreimal durchgeführt. Die Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert der jeweiligen Versuchsreihe. Beide Zelllinien entstammen humanen ösophagealen Plattenepithelkarzinomen, wobei die KYSE-150-Zellen aus einem schlecht differenzierten, und die KYSE-450-Zellen aus einem gut differenzierten Tumor etabliert wurden. Die Zellen wurden von „American Type Culture Collection“ (Manassas, VA, USA) bezogen.

Sämtliche Manipulationen an den Zellen wurden an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Kultivierung der Karzinomzellen erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂

in dem jeweils entsprechenden Medium, das alle drei bis vier Tage ausgetauscht wurde. Das Medium der KYSE-150-Zellen setzte sich aus 49 % RPMI-1640, 49 % Ham's F12 und 2 % fetalem Kälberserum zusammen, wohingegen die KYSE-450-Zellen in 45 % RPMI-1640, 45 % Ham's F12 und 10 % fetalem Kälberserum kultiviert wurden. Beiden Zellkulturmedien wurden die Antibiotika Penicillin und Gentamicin zugesetzt. Alle Reagenzien wurden von der PAA Laboratories GmbH (Cölbe) bezogen.

Am Tag 1 erfolgte die Aussaat der Zellen. Hierfür wurde das Medium abgegossen, die Zellen wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und durch Inkubation mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst. Restliches Trypsin wurde mit Medium neutralisiert, die Zellsuspension wurde zentrifugiert und nach Abgießen des Überstands wurde erneut Medium hinzugegeben. Nachdem die Zellen mit Trypanblau angefärbt wurden, erfolgte deren Zählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, wobei der Mittelwert aus mindestens vier ausgezählten Quadranten gebildet wurde. Schließlich wurden auf 24-Well-Platten pro Vertiefung 300000 Zellen in 2 ml Medium ausgesäht. Um die Adhärenz der Zellen zu ermöglichen, erfolgte eine Vorkultivierung über 48 Stunden.

Für die Inkubationsstudien wurde der pH-Wert des jeweiligen Kulturmediums durch Zugabe von HCl, 1 mol/l auf die Werte 7.0, 6.0 und 5.0 eingestellt. Die Gallensäuren wurden von Sigma (Taufkirchen) bezogen. Durch deren Lösung in DMSO (DHCA) bzw. 75 % DMF (CA und DCA) wurde jeweils eine Stammlösung in der Stoffmengenkonzentration 1 mol/l hergestellt, die sterilfiltriert und schließlich auf 50 µmol/l verdünnt wurde. Den Negativkontrollen wurden die entsprechenden Mengen an Lösungsmittel zugegeben. Am Tag 3 wurde den Zellen nach Abnahme des Kulturmediums angesäuertes Medium und/oder eine der Gallensäuren zugegeben, und 6 bzw. 24 Stunden später erfolgte die Ernte der Zellen. Nach Abnahme des Mediums wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen, und die Zellen jedes Wells wurden in 300 µl mit β-Mercaptoethanol versetztem RLT-Puffer aufgenommen.

Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte mit dem AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die lysierten Zellen wurden zur Homogenisierung durch „QIAshredder“-Säulen und zur DNA-Adsorption durch „All-PrepDNA“-Säulen zentrifugiert. Der Durchfluss wurde für die RNA-Präparation verwendet. Hierfür wurden 300 µl 70 % Ethanol zugegeben, und das Gemisch wurde durch die RNA bindenden „RNeasy“-Säulen zentrifugiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die RNA in 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C

gelagert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration und die Kontrolle der RNA-Integrität mittels Gelelektrophorese erfolgten wie unter 2.1.4 beschrieben.

Die Reverse Transkription der Gesamt-RNA erfolgte analog dem unter 2.1.5 erläuterten Protokoll, wobei der Reaktionsansatz jetzt je Probe ein Gesamtvolumen von 25 µl aufwies, in dem 15,88 µl RNA-Lösung mit Wasser, 5 µl AMV-RT 5x Reaktionspuffer, 1 µl dNTP-Mix, 1,25 µl Random-Primer, 1,25 µl AMV-Reverse Transkriptase und 0,63 µl Recombinant-RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor enthalten waren.

Die qPCR wurde wie unter 2.1.6 beschrieben durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Genexpression von *CDX2*, *MUC2* und *IAP* in klinischen Proben

3.1.1 Patientencharakteristika

Tab. 1 (siehe Abschnitt 2.1.1) zeigt die demographischen Daten und den *H. pylori*-Status der Patienten des Studienkollektivs. Von den insgesamt 122 eingeschlossenen Patienten lagen bei 95 die Symptome einer GERD vor, wobei endoskopisch bei 44 Patienten eine nichterosive (NERD) und bei 51 Patienten eine erosive Refluxkrankheit (ERD) nachgewiesen wurde. 27 Patienten ohne refluxtypische Beschwerden bildeten das Kontrollkollektiv. Die drei Patientengruppen (Kontrolle, NERD, ERD) waren hinsichtlich ihrer Altersverteilung vergleichbar (Kruskal-Wallis-Test). Bei etwa einem Drittel bis einem Fünftel der Patienten wurde eine *H. pylori*-Infektion nachgewiesen, wobei sich die drei Untergruppen hierin nicht signifikant voneinander unterschieden (Chi²-Test). Aus diesem Grund konnte das Vorliegen einer *H. pylori*-Infektion als Variable weitgehend ausgeschlossen werden und wurde für die Auswertung zunächst nicht als eigener Parameter stratifiziert. In der Gruppe „ERD“ war der Anteil männlicher Patienten mit 63 % signifikant höher als in den anderen zwei Gruppen (Kontrolle 22 %, NERD 18 %; $p < 0,001$; Chi²-Test).

3.1.2 Genexpressionsraten in der Kontrollgruppe

Die Genexpression von *CDX2*, *MUC2* und *IAP* wurde unter Verwendung der gewonnenen Biopsien aus der Magen- und Ösophagusschleimhaut der eingeschlossenen Patienten mittels qPCR analysiert. Es wurden die Transkriptgehalte von Proben aus dem distalen Ösophagus, der Cardia und dem Antrum gemessen. Abb. 3 zeigt exemplarisch die gelelektrophoretische Auftrennung der Standardverdünnungsreihen und der amplifizierten cDNA von, *CDX2*, *MUC2*, *IAP* und β -*ACTIN*.

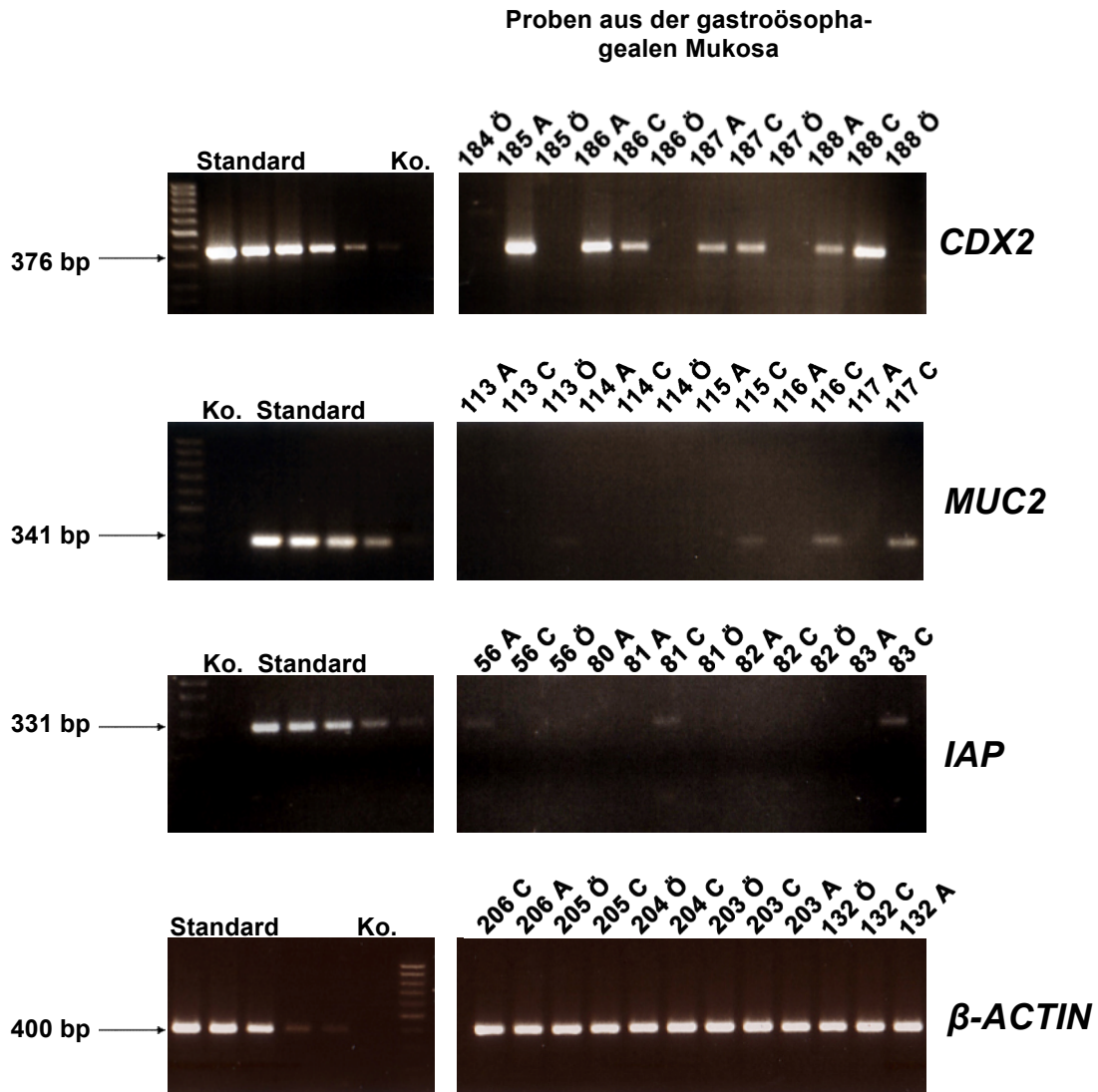


Abb. 3. qPCR-Amplifikationsprodukte von β -ACTIN (400 bp), CDX2 (376 bp), MUC2 (341 bp) und IAP (331 bp)

Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten cDNA der 4 Gene. Die Proben stellen eine exemplarische Auswahl von Schleimhautbiopsien aus Ösophagus (Ö), Cardia (C) und Antrum (A) dar. Für jedes Gen wurden außerdem die zugehörige Standardverdünnungsreihe in absteigender Konzentration und die Negativkontrolle (Ko.) aufgetragen.

Da der Anteil an Proben, in denen das jeweilige Transkript nicht nachgewiesen werden konnte, bei allen drei Genen hoch war (*CDX2* 53 %, *MUC2* 73 %, *IAP* 86 %), wurden die Ergebnisse zunächst nicht quantitativ ausgewertet, sondern nur der Anteil der Proben mit einer nachgewiesenen Genexpression verglichen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte nach den qualitativen Merkmalen „positiv“ und „negativ“ mit dem χ^2 -Test. Für einzelne Parameter schloss sich dann eine quantitative Subanalyse an, bei der die Transkriptmengen unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests analysiert wurden.

Die Patienten wurden in Abhängigkeit von Klinik und endoskopischem Befund in die drei Gruppen „Kontrolle“, „NERD“ und „ERD“ unterteilt, wobei die Daten des Kontrollkollektivs Informationen über die „basalen“ Genexpressionsmuster gaben. Alle drei Gene wurden in der gastroösophagealen Schleimhaut Reflux-negativer Patienten exprimiert, wobei sich die Raten ihrer nachgewiesenen Genexpression deutlich voneinander unterschieden. *CDX2* und *MUC2* konnten in 44 % bzw. 31 % der Biopsien nachgewiesen werden, *IAP* wurde mit 13 % in geringerem Umfang exprimiert. Abb. 4 illustriert die Expressionsraten der untersuchten Gene in der Kontrollgruppe an unterschiedlichen Lokalisationen der gastroösophagealen Schleimhaut.

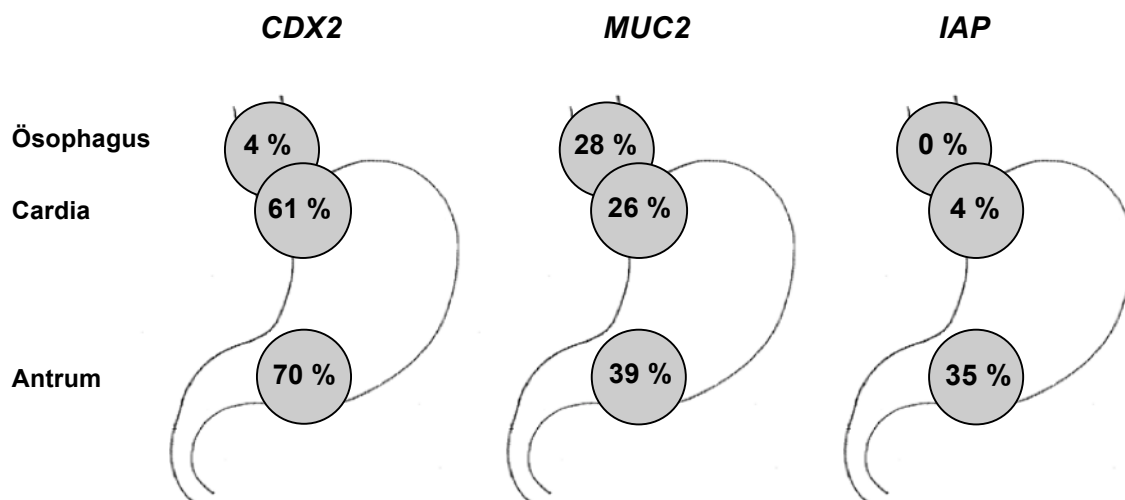


Abb. 4. Genexpressionsraten von *CDX2*, *MUC2* und *IAP* in der Kontrollgruppe

Dargestellt sind die prozentualen Anteile der für *CDX2*, *MUC2* bzw. *IAP* positiven Proben an den Lokalisationen Ösophagus, Cardia und Antrum.

3.1.3 Einfluss der Refluxkrankheit auf die Genexpression

Qualitative Analyse

Die Genexpression von *CDX2* wurde in 47 % aller gastroösophagealer Schleimhautbiopsien mittels qPCR nachgewiesen, *MUC2* und *IAP* waren mit 27 % bzw. 14 % deutlich seltener nachweisbar. Die Ergebnisse wurden zunächst qualitativ unter Verwendung des χ^2 -Tests ausgewertet. Tab. 2 dokumentiert die prozentualen Anteile der positiv getesteten Proben, wobei signifikante Unterschiede zwischen den Expressionsraten der untersuchten Gene markiert sind.

Der Anteil an Biopsien mit nachgewiesener Genexpression variierte deutlich in Abhängigkeit von der Lokalisation. *CDX2* wurde in allen Patientengruppen signifikant häufiger in der gastralen als in der ösophagealen Schleimhaut exprimiert, wobei die höchsten Genexpressionsraten jeweils im Antrum nachgewiesen wurden.

Das Vorhandensein einer GERD hatte unabhängig von der endoskopischen Ausprägung (NERD, ERD) in keiner der drei Regionen (Ösophagus, Cardia, Antrum) einen signifikanten Einfluss auf den Nachweis einer positiven Genexpression. *CDX2* wurde im Antrum tendenziell häufiger bei Patienten mit Refluxerkrankung als bei Patienten der Kontrollgruppe exprimiert, eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht.

Tab. 2. Genexpressionsraten von *CDX2*, *MUC2* und *IAP* in den einzelnen Gruppen

Angegeben sind die Expressionsraten der Gene *CDX2*, *MUC2* und *IAP*, jeweils sortiert nach endoskopischem Befund und Lokalisation. Die Expression der untersuchten Gene war bezüglich der Existenz einer GERD unbeeinflusst, variierte aber innerhalb der Gruppen zwischen den Lokalisationen. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Chi²-Test, wobei die p-Werte wegen der multiplen Paarvergleiche innerhalb einer Gruppe mit der Methode nach Bonferroni korrigiert wurden. Signifikante Unterschiede in der Genexpression wurden für p<0,05 mit (#), für p<0,01 mit (##) und für p<0,001 mit (*) markiert.

		<i>CDX2</i>	<i>MUC2</i>	<i>IAP</i>
Kontrolle	Ösophagus	* $\left[\begin{array}{c} 4 \% \\ 61 \% \\ 70 \% \end{array} \right]$ *	28 %	0 %
	Cardia		26 %	4 %
	Antrum		39 %	35 %
NERD	Ösophagus	* $\left[\begin{array}{c} 14 \% \\ 41 \% \\ 83 \% \end{array} \right]$ #	14 %	3 %
	Cardia		28 %	21 %
	Antrum		31 %	20 %
ERD	Ösophagus	* $\left[\begin{array}{c} 10 \% \\ 58 \% \\ 86 \% \end{array} \right]$ *	20 %	20 %
	Cardia		26 %	8 %
	Antrum		33 %	19 %

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass *CDX2* in stärkerem Maße in der gastralen als in der ösophagealen Schleimhaut exprimiert wird. In der qualitativen Analyse hatte das Vorliegen einer Refluxerkrankung keinen Einfluss auf die Genexpression von *CDX2*, *MUC2* und *IAP*.

Quantitative Analyse

Für *CDX2*, *MUC2* und *IAP* folgte eine quantitative Subanalyse für diejenigen Lokalisationen, an denen ein verhältnismäßig hoher Anteil an positiven Proben nachgewiesen werden konnte. Die Transkriptmengen wurden in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation und dem Vorliegen einer Refluxerkrankung (NERD, ERD) analysiert. Da die Messdaten nicht normalverteilt waren, wurde die statistische Auswertung mit den nicht-parametrischen Tests nach Kruskal-Wallis und Mann-Whitney durchgeführt.

CDX2 war im Ösophagus nur in einem geringen Teil der Proben nachweisbar (Tab. 2), weshalb sich die quantitative Auswertung für dieses Gen auf die Lokalisationen Cardia und Antrum beschränkte (Tab. 3 und Abb. 3). Der übergeordnete Kruskal-Wallis-Test war mit $p < 0,001$ signifikant. In den anschließenden Paarvergleichen mittels Mann-Whitney-U-Test waren analog zur qualitativen Analyse der *CDX2*-Expressionsraten auch in der quantitativen Untersuchung in allen drei Patientengruppen im Antrum höhere Transkriptgehalte als an der Cardia nachweisbar. Für Patienten mit NERD und ERD war der Unterschied signifikant (NERD: $p = 0,001$; ERD: $p < 0,001$), während sich in der Kontrollgruppe mit $p = 0,06$ lediglich eine Tendenz zu höheren Werten zeigte.

Beim Vergleich der *CDX2*-Transkriptmengen zwischen Patienten mit Refluxerkrankung (NERD, ERD) und Patienten der Kontrollgruppe konnten in der Mukosa der Cardia keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Im Antrum war das Genexpressionsniveau von *CDX2* bei Patienten mit Refluxerkrankung in Abhängigkeit von der endoskopischen Ausprägung im Median um das 2,76-fache (NERD, $p = 0,03$) bzw. 5,19-fache (ERD, $p = 0,007$) erhöht (Mann-Whitney-U-Test). Die in der qualitativen Analyse gesehene Tendenz, dass an GERD erkrankte Patienten im Antrum höhere *CDX2*-Expressionsraten aufweisen als Kontrollpatienten (siehe Tab. 2), bestätigte sich somit auf der Ebene der quantitativen Auswertung. Tab. 3 und Abb. 5 ergänzen sich thematisch, indem die Werte des Antrums sowohl in tabellarischer Form, als auch als Boxplot dargestellt sind. Wie man Tab. 3 entnehmen kann, war an der Cardia der Wert der 25er-Perzentile in allen drei Gruppen „0“, in der Gruppe „NERD“ betrug auch der Median „0“. Da der Wert „0“ auf der logarithmischen Skala nicht angezeigt werden kann, schien hier eine Darstellung als Boxplot-Diagramm nicht sinnvoll.

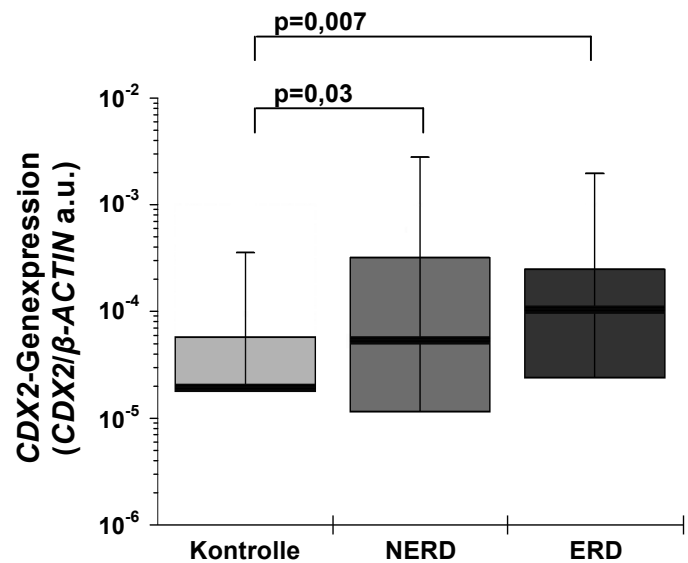
Tab. 3. *CDX2*-Genexpression in der Magenmukosa in Abhängigkeit vom Vorliegen einer GERD

Für jede Patientengruppe sind der Median, die 25er-, die 75er- und die 95er-Perzentile der *CDX2*-Transkriptmengen angegeben. Der übergeordnete Kruskal-Wallis-Test war für die Gruppenvergleiche mit $p < 0,001$ signifikant. Paarvergleiche mittels Mann-Whitney-U-Test ergaben für die Antrum-Mukosa eine im Median um das 2,8-fache erhöhte Genexpression von *CDX2* bei Patienten mit NERD im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,03$). Patienten mit ERD wiesen hier verglichen mit der Kontrollgruppe 5,2-fach höhere *CDX2*-Transkriptgehalte auf ($p=0,007$). An der Cardia hatte das Vorliegen einer Refluxerkrankung unabhängig von der endoskopischen Ausprägung (NERD, ERD) keinen Einfluss auf die Genexpression von *CDX2*.

Perzentile	Cardia			Antrum		
	Kontrolle	NERD	ERD	Kontrolle	NERD	ERD
P95	6,7E-5	9,9E-5	1,2E-4	3,6E-4	4,7E-3	2,4E-3
P75	5,4E-5	2,4E-5	4,7E-5	5,8E-5	3,2E-4	2,5E-4
Median	3,3E-6	0	1,4E-5	1,9E-5	5,3E-5	9,9E-5
P25	0	0	0	0	1,2E-5	2,4E-5

Abb. 5. *CDX2*-Genexpression im Antrum in Abhängigkeit vom Vorliegen einer GERD

Die *CDX2*-Transkriptmengen sind nach Patientengruppen sortiert als Boxplot-Diagramme aufgetragen. Es sind jeweils die 25er-, die 50er- (Median), die 75er-Perzentile und die Extremwerte dargestellt. Der Median ist als dicke Linie hervorgehoben. Da der Wert „0“ auf der logarithmischen Skala nicht angezeigt werden kann, sind die Boxen unvollständig. Bei der Box der Kontrollpatienten fehlt aus diesem Grund die 25er-Perzentile (vgl. Tab. 3). Bei Patienten mit Refluxerkrankung war die *CDX2*-Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (NERD: 2,8-fach, $p=0,03$; ERD: 5,2-fach, $p=0,007$; Mann-Whitney-U-Test).



Für die Analyse der *MUC2*-Transkriptgehalte aller Patientengruppen an allen drei Lokalisationen mittels Kruskal-Wallis-Test galt mit $p=0,47$ keine Signifikanz (Daten nicht gezeigt), was sich mit dem Ergebnis der qualitativen Analyse deckt (vgl. Tab. 2). Deshalb folgten für dieses Gen keine Paarvergleiche. Da das Transkript von *IAP* in der Schleimhaut von distalem Ösophagus und Cardia nur in wenigen Proben nachgewiesen werden konnte, war hier eine quantitative Auswertung nicht sinnvoll. Im Antrum unterschieden sich die *IAP*-Transkriptmengen zwischen den Gruppen (Kontrolle, NERD, ERD) nicht signifikant

voneinander ($p=0,53$; Kruskal-Wallis-Test, Daten nicht gezeigt), was ebenfalls im Einklang mit dem Ergebnis der quantitativen Analyse steht.

In der quantitativen Analyse der Transkriptgehalte konnte mit Ausnahme von *CDX2* (Antrum) keine Assoziation der untersuchten Gene mit dem Auftreten einer GERD gezeigt werden.

3.1.4 Einfluss von *H. pylori* auf die Genexpression

Qualitative Analyse

Um den Einfluss einer Infektion mit *H. pylori* auf die Genexpressionsraten von *CDX2*, *MUC2* und *IAP* zu analysieren, wurden die jeweiligen Proben aus der gastralen Mukosa (Cardia, Antrum) *H. pylori*-negativer mit denen *H. pylori*-positiver Patienten verglichen. Die Ergebnisse wurden zunächst qualitativ unter Verwendung von Kontingenztafeln ausgewertet. Waren alle erwarteten Häufigkeiten einer Vierfeldertafel ≥ 5 , so erfolgte die statistische Analyse mit dem Chi²-Test, bei einer geringeren Anzahl wurde der Exakte Test auf Unabhängigkeit nach Fisher angewendet. Zunächst blieben die Lokalisation der Biopsie (Cardia, Antrum) und die Patientengruppe (Kontrolle, NERD, ERD) unberücksichtigt. Das Vorliegen einer *H. pylori*-Infektion hatte bei keinem der untersuchten Gene einen signifikanten Einfluss auf dessen Expression (Tab. 4).

Tab. 4. Genexpressionsraten von *CDX2*, *MUC2* und *IAP* in der gastralen Mukosa (Cardia und Antrum) von Patienten ohne bzw. mit *H. pylori*-Infektion

Das Vorliegen einer Infektion mit *H. pylori* hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expressionsraten der untersuchten Gene. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Chi²-Test.

	n	<i>CDX2</i>	<i>MUC2</i>	<i>IAP</i>
<i>H. pylori</i> neg.	137	66 %	28 %	18 %
<i>H. pylori</i> pos.	47	72 %	36 %	17 %
p-Wert		0,40	0,32	0,94

Die Anzahl der Proben war zu gering, um in einer Subanalyse den Einfluss einer *H. pylori*-Infektion separat für die Lokalisationen Cardia und Antrum und gleichzeitig für die Gruppen Kontrolle, NERD und ERD durchführen zu können. Deshalb erfolgte eine schrittweise Auswertung dieser Kriterien, bei der zunächst ausschließlich die Lokalisation, und später

ausschließlich das Vorliegen einer GERD (NERD, ERD) berücksichtigt wurden. Für die Lokalisationen Cardia und Antrum zeigt Tab. 5 die Raten der Genexpression von *CDX2*, *MUC2* und *IAP* in Abhängigkeit vom Vorliegen einer *H. pylori*-Infektion. Letztere beeinflusste die Expression der drei Gene an keiner der Lokalisationen mit statistischer Signifikanz, jedoch zeigte sich für *CDX2* im Antrum und für *MUC2* an der Cardia eine Tendenz zu erhöhten Expressionsraten bei Patienten mit *H. pylori*-Infektion.

Tab. 5. Raten der Genexpression von *CDX2*, *MUC2* und *IAP* an den Lokalisationen Cardia und Antrum in Abhängigkeit vom Vorliegen einer *H. pylori*-Infektion

H. pylori-negative Patienten unterschieden sich bezüglich der Genexpressionsraten von *CDX2*, *MUC2* und *IAP* nicht signifikant von den Patienten mit *H. pylori*-Infektion. Die statistische Analyse wurde für Kontingenztafeln, bei denen alle erwarteten Häufigkeiten ≥ 5 waren, mit dem χ^2 -Test durchgeführt. War diese Voraussetzung nicht erfüllt, kam der Exakte Test nach Fisher zur Anwendung, wobei die so berechneten p-Werte mit * markiert sind.

		n	<i>CDX2</i>	<i>MUC2</i>	<i>IAP</i>
Cardia	<i>H. pylori</i> neg.	65	52 %	22 %	11 %
	<i>H. pylori</i> pos.	25	56 %	40 %	12 %
	p-Wert		0,75	0,08	1,00 *
Antrum	<i>H. pylori</i> neg.	72	78 %	35 %	24 %
	<i>H. pylori</i> pos.	22	91 %	32 %	23 %
	p-Wert		0,23 *	0,80	0,93

Für die einzelnen Patientengruppen (Kontrolle, NERD, ERD) sind die prozentualen Anteile der für *CDX2*, *MUC2* bzw. *IAP* positiv getesteten Proben bei *H. pylori*-negativen und *H. pylori*-positiven Patienten in Tab. 6 dokumentiert. Auffallend waren tendenziell erhöhte Expressionsraten der Gene *CDX2* und *MUC2* in der Kontrollgruppe bei *H. pylori*-positiven im Vergleich zu *H. pylori*-negativen Patienten, jedoch erreichte keine dieser Beobachtungen das Signifikanzniveau.

Tab. 6. Anteile von Patienten mit nachgewiesener Genexpression von *CDX2*, *MUC2* bzw. *IAP* in den drei Gruppen bei *H. pylori*-infizierten im Vergleich zu nicht-infizierten Patienten

Die Infektion mit *H. pylori* beeinflusste die Expressionsraten der untersuchten Gene nicht signifikant. Die statistische Auswertung erfolgte je nach Anzahl der erwarteten Häufigkeiten unter Verwendung des Chi²-Tests bzw. des Exakten Fisher-Tests, wobei die nach letzterem berechneten p-Werte mit * markiert sind.

		n	<i>CDX2</i>	<i>MUC2</i>	<i>IAP</i>
Kontrolle	<i>H. pylori</i> neg.	34	59 %	26 %	24 %
	<i>H. pylori</i> pos.	12	83 %	50 %	8 %
	p-Wert		0,17 *	0,17 *	0,41 *
NERD	<i>H. pylori</i> neg.	51	63 %	31 %	22 %
	<i>H. pylori</i> pos.	13	69 %	23 %	15 %
	p-Wert		0,76 *	0,74 *	1,00 *
ERD	<i>H. pylori</i> neg.	52	73 %	27 %	10 %
	<i>H. pylori</i> pos.	22	68 %	36 %	23 %
	p-Wert		0,67	0,42	0,15 *

Das Vorliegen einer *H. pylori*-Infektion hatte nach qualitativer Analyse der Daten keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene in der gastralen Mukosa.

Quantitative Analyse

Der Einfluss einer *H. pylori*-Infektion auf die Genexpression von *CDX2* wurde ergänzend auch quantitativ durch einen Vergleich der Transkriptmengen zwischen *H. pylori*-positiven und *H. pylori*-negativen Patienten mit dem Paartest nach Mann-Whitney analysiert. Die ösophagealen Proben wurden dabei nicht berücksichtigt. Da die Genexpressionsraten von *MUC2* und *IAP* in der gastralen Mukosa niedrig waren, erschien für diese Gene eine quantitative Auswertung nicht sinnvoll.

Zunächst wurden alle Proben aus dem Magen (Cardia und Antrum) nach ihrem *H. pylori*-Status sortiert. Tab. 7 und Abb. 6 zeigen die Ergebnisse, wobei sich *H. pylori*-positive und *H. pylori*-negative Patienten bezüglich der gastralen *CDX2*-Genexpression nicht voneinander unterschieden. Diese Beobachtung stimmt mit dem Ergebnis aus der qualitativen Analyse überein (vgl. Tab. 4). Die 25er-Perzentile mit dem Wert „0“ fehlt auf der logarithmischen Skala des Boxplot-Diagrammes.

Gesamtheit der Proben aus der gastralen Mukosa		
Perzentile	<i>H. pylori</i> neg.	<i>H. pylori</i> pos.
P95	6,3E-4	2,4E-3
P75	7,5E-5	1,0E-4
Median	2,3E-5	2,1E-5
P25	0	0

Tab. 7. CDX2-Genexpression in der Magenschleimhaut in Abhängigkeit vom Vorliegen einer *H. pylori*-Infektion

Dargestellt sind 25er-, 50er- (Median), 75er- und 95er-Perzentile der *CDX2*-Transkriptgehalte aller gastraler Proben. Eine Infektion mit *H. pylori* hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression von *CDX2* (Mann-Whitney-U-Test).

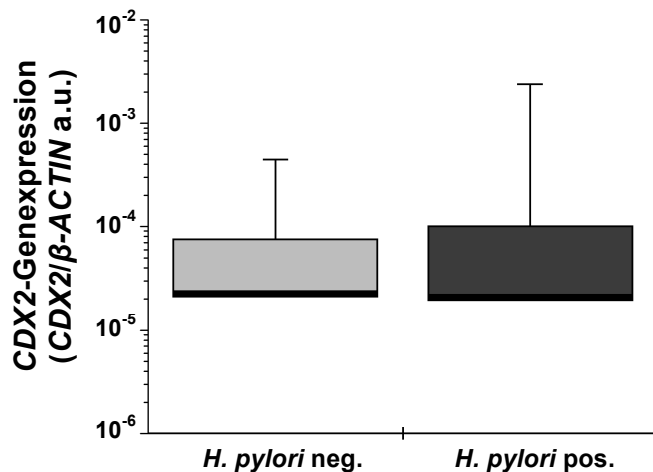


Abb. 6. CDX2-Genexpression aller Proben der gastralen Mukosa, sortiert nach dem *H. pylori*-Status

Die *CDX2*-Transkriptmengen aller Proben aus der Magenschleimhaut sind als Boxplot-Diagramme aufgetragen. Negative Proben und die 25er-Perzentile konnten nicht dargestellt werden, da eine logarithmische Skala gewählt wurde. Der Median ist fett hervorgehoben, außerdem sieht man die 75er-Perzentile und den Extremwert. Das Vorliegen einer *H. pylori*-Infektion beeinflusste die Transkriptgehalte von *CDX2* nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test).

Auch Tab. 8 und Abb. 7 gehören thematisch zusammen. Sie zeigen den Vergleich zwischen *H. pylori*-positiven und *H. pylori*-negativen Patienten separat für die Lokalisationen Cardia und Antrum. An der Cardia waren die Transkriptmengen von *CDX2* vom Vorliegen einer Infektion mit *H. pylori* unbeeinflusst. Im Antrum fiel mit $p=0,15$ eine Tendenz zu höheren *CDX2*-Transkriptgehalten bei Patienten mit positivem *H. pylori*-Status auf, was im Einklang mit dem Ergebnis aus der qualitativen Auswertung steht (vgl. Tab. 5).

Tab. 8. CDX2-Genexpression an den Lokalisationen Cardia und Antrum in Abhängigkeit vom Vorliegen einer Infektion mit *H. pylori*

Die Tabelle zeigt die 25er-, die 50er- (Median), die 75er und die 95er-Perzentile der *CDX2*-Genexpression. An der Cardia hatte das Vorliegen einer *H. pylori*-Infektion keinen Einfluss auf die Genexpression von *CDX2*. Für die Antrum-Mukosa zeigte sich eine Tendenz zu einer erhöhten *CDX2*-Genexpression bei Patienten, die mit *H. pylori* infiziert waren. Die Paarvergleiche mittels Mann-Whitney-U-Test ergaben bei *H. pylori*-Infektion eine im Median um das 1,9-fache erhöhte Genexpression von *CDX2* ($p=0,15$; keine Signifikanz).

Perzentile	Cardia		Antrum	
	<i>H. pylori</i> neg.	<i>H. pylori</i> pos.	<i>H. pylori</i> neg.	<i>H. pylori</i> pos.
P95	1,1E-4	7,5E-5	1,5E-3	2,5E-3
P75	3,7E-5	2,1E-5	1,3E-4	3,4E-4
Median	2,6E-6	3,4E-6	4,5E-5	8,4E-5
P25	0	0	1,0E-5	3,0E-5

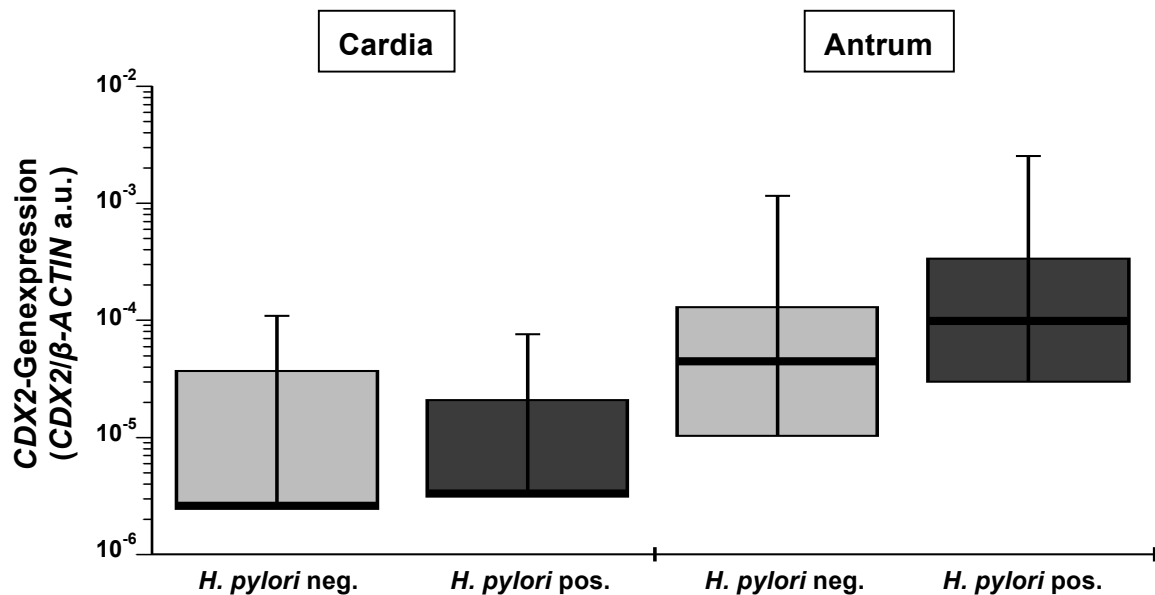


Abb. 7. Genexpression von *CDX2* in Cardia- und Antrum mukosa, sortiert nach *H. pylori*-Status

Die *CDX2*-Transkriptmengen sind nach Lokalisation und *H. pylori*-Status sortiert als Boxplot-Diagramme aufgetragen. Die negativen Proben sind in der Abb. nicht berücksichtigt, da sich der Wert „0“ auf der logarithmischen Skala nicht darstellen lässt. Bei den Proben aus der Cardia hatte die 25er-Perzentile jeweils den Wert „0“, weshalb hier lediglich Median und 75er-Perzentile abgebildet sind. Der Median ist bei allen Boxen fett markiert. Bei den Antrum-Proben konnte aufgrund eines höheren Anteils positiv gemessener Proben die 25er-Perzentile dargestellt werden. An der Cardia hatte das Vorhandensein einer *H. pylori*-Infektion keinen Einfluss auf die Genexpression von *CDX2*. Im Antrum zeigte sich mit $p=0,15$ eine Tendenz zu einer höheren Genexpression bei Patienten mit positivem *H. pylori*-Status (Mann-Whitney-U-Test).

Eine Infektion mit *H. pylori* hatte bei der separaten Betrachtung der einzelnen Patientengruppen (Kontrolle, NERD, ERD) keinen Einfluss auf die Genexpression von *CDX2* (Daten nicht gezeigt).

Die Genexpression von *CDX2* in der Magenschleimhaut blieb vom Vorliegen einer Infektion mit *H. pylori* unbeeinflusst.

3.1.5 Korrelation der Genexpression von *CDX2* mit den Transkriptmengen von *MUC2* und *IAP*

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Genexpression des Transkriptionsfaktors *CDX2* und der Expression der intestinal-spezifischen Gene *MUC2* und *IAP* zu erkennen, wurden die jeweiligen Transkriptgehalte nach Pearson korreliert. Eingang in die statistische Auswertung fanden ausschließlich Wertepaare mit nachgewiesener Expression beider Gene.

Abb. 8 gibt einen Überblick über die Beziehung der *CDX2*- zu den *MUC2*-Transkriptmengen, wobei die positiv gemessenen Wertepaare des gesamten Studienkollektivs dargestellt sind. Da keine der Biopsien aus dem Ösophagus für beide genannten Gene positiv war, bezieht sich die Grafik ausschließlich auf Proben aus der gastralen Mukosa. Die Expression der Gene *CDX2* und *MUC2* korrelierte mit $r=0,10$ und $p=0,52$ nicht signifikant miteinander.

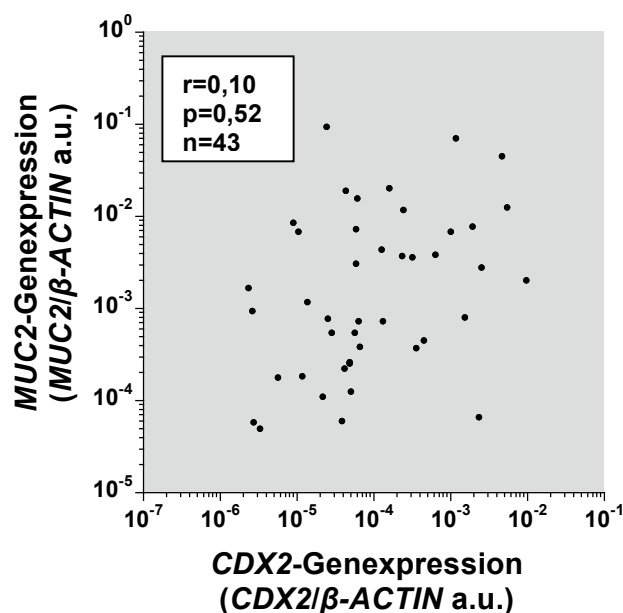
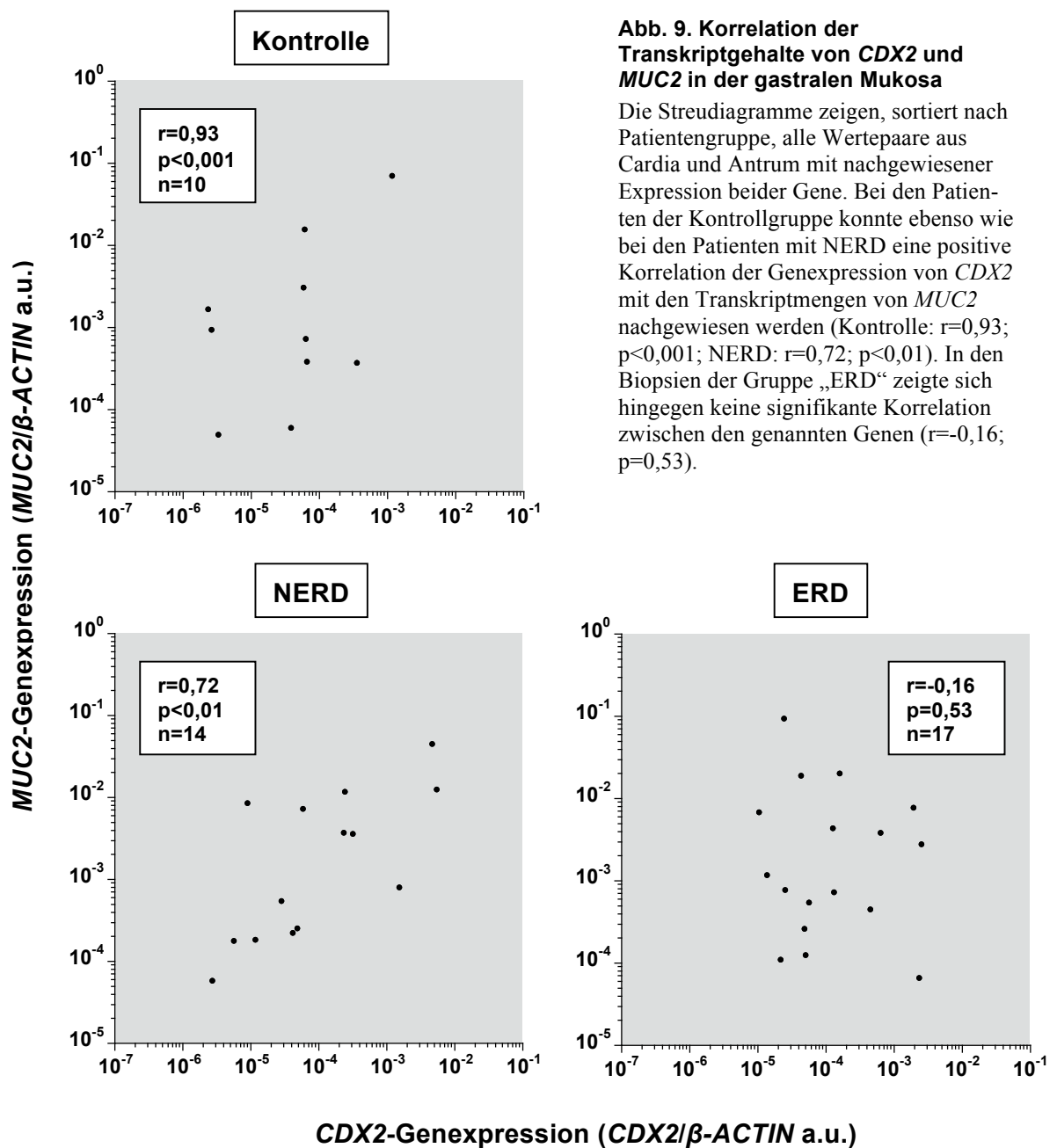


Abb. 8. Streudiagramm der Pearson-Korrelation zwischen den Transkriptmengen von *CDX2* und *MUC2*

Dargestellt sind alle positiv gemessenen Wertepaare aus Cardia und Antrum. Es konnte keine signifikante positive Korrelation zwischen den Transkriptgehalten der zwei Gene nachgewiesen werden ($r=0,10$; $p=0,52$).

Es schloss sich eine differenziertere Analyse der Korrelation von *CDX2* und *MUC2* an, in die ebenfalls ausschließlich Biopsien aus der Mukosa des Magens (Cardia, Antrum) einbezogen wurden. Die Ergebnisse wurden nach Klinik bzw. endoskopischem Befund sortiert (Abb. 9). In den Proben von Kontrollpatienten und Patienten mit NERD zeigte sich eine signifikant positive Korrelation der *CDX2*- zur *MUC2*-Genexpression (Kontrolle: $r=0,93$; $p<0,001$; $n=10$; NERD: $r=0,72$; $p<0,01$), bei Patienten mit ERD hingegen korrelierten die Transkriptmengen nicht signifikant miteinander ($r=-0,16$; $p=0,53$).



In Abb. 10 wurden die Transkriptgehalte von *CDX2* und *IAP* gegeneinander aufgetragen, wobei die für beide Gene positiv gemessenen Proben des gesamten Studienkollektivs berücksichtigt wurden. Die Genexpression von *CDX2* war mit $r=0,45$ und $p<0,05$ signifikant positiv zu den Transkriptmengen von *IAP* korreliert.

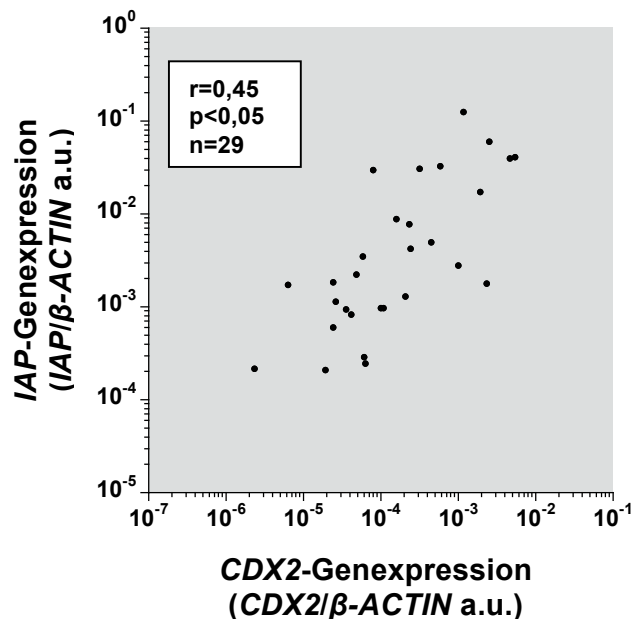
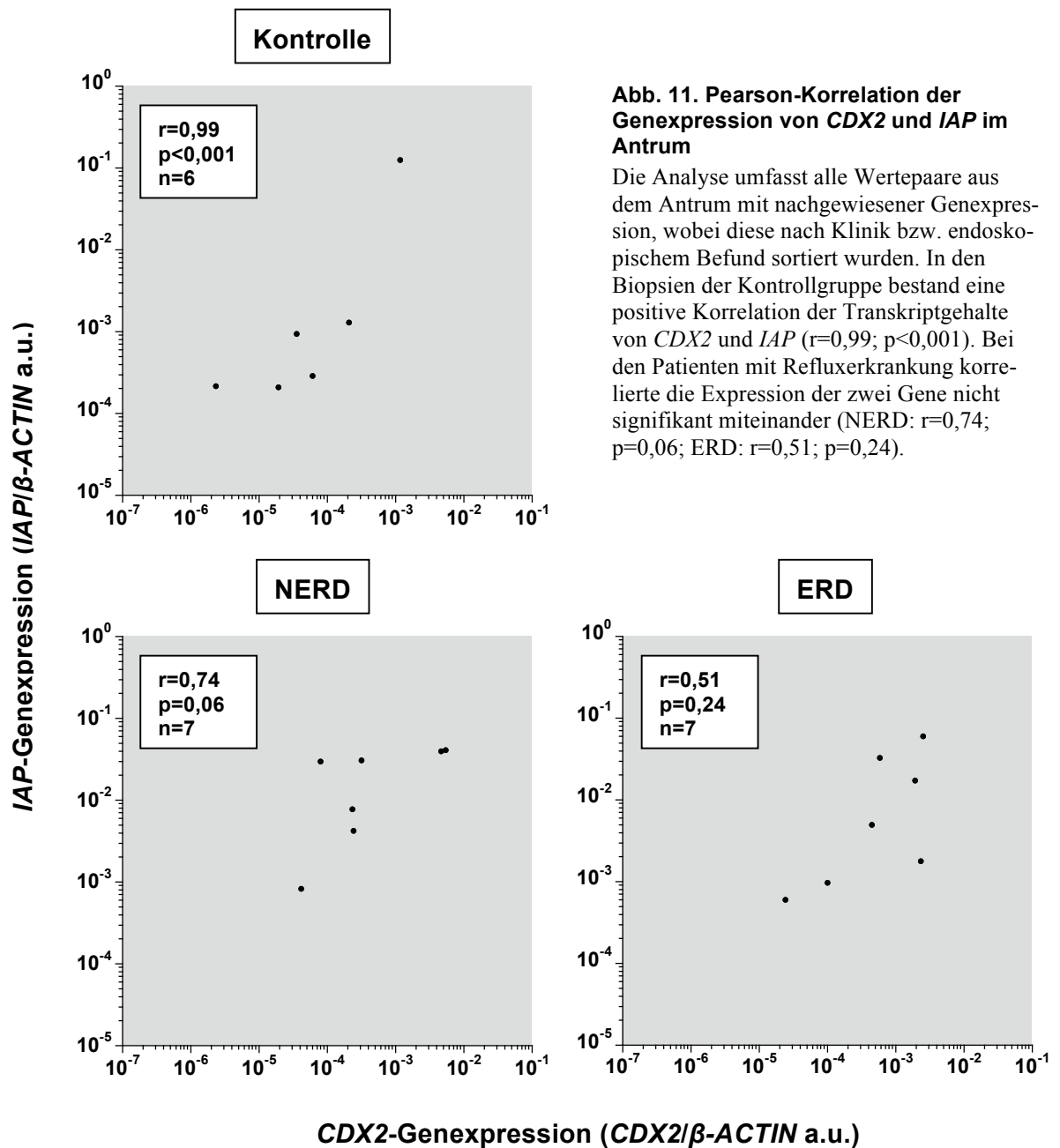


Abb. 10. Korrelation zwischen den Transkriptgehalten von *CDX2* und *IAP*

Der Scatterplot zeigt alle positiv gemessenen Wertepaare aus Antrum, Cardia und Ösophagus. Es bestand eine signifikante positive Korrelation zwischen den Transkriptmengen von *CDX2* und *IAP* ($r=0,45$; $p<0,05$).

Für *CDX2* und *IAP* konnten die höchsten Genexpressionsraten jeweils im Antrum nachgewiesen werden (siehe Tab. 2). Deshalb wurde eine Subanalyse der Biopsien aus dem Antrum durchgeführt, in der die Transkriptgehalte von *CDX2* und *IAP* korreliert wurden. Die Ergebnisse wurden nach Patientengruppe sortiert und sind in Abb. 11 dokumentiert. In den Proben der Kontrollgruppe zeigte sich mit $r=0,99$ und $p<0,001$ eine statistisch signifikante und sehr hohe positive Korrelation zwischen *CDX2* und *IAP*. Bei Patienten mit NERD konnte ebenso wie bei Patienten mit ERD keine signifikante Korrelation der Expression der genannten Gene nachgewiesen werden (NERD: $r=0,74$; $p=0,06$; ERD: $r=0,51$; $p=0,24$).



Die Expression des intestinal-spezifischen Gens *MUC2* im Magen korreliert bei Refluxnegativen Patienten und bei Patienten mit NERD positiv mit der Genexpression des Transkriptionsfaktors *CDX2*.

Die Transkriptmengen der Gene *IAP* und *CDX2* korrelieren positiv miteinander, wenn alle Patienten gemeinsam betrachtet werden. In der Subanalyse zeigen diese Gene eine positive Korrelation im Antrum der Patienten der Kontrollgruppe.

3.1.6 Immunhistochemischer Nachweis von CDX2

Um die funktionelle Relevanz der Ergebnisse auf der Transkriptionsebene zu überprüfen, schlossen sich Untersuchungen zum Nachweis des CDX2-Proteins an. Hierfür wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt, die es ermöglichten, die Verteilung von CDX2 im Gewebe zu visualisieren. Die Menge des von den Patienten des Studienkollektivs gewonnenen Gewebematerials reichte für eine statistische Analyse der Ergebnisse nicht aus. Die Immunfärbungen beschränkten sich deshalb auf ausgewählte Gewebeproben der Lokalisationen Antrum und Cardia und wurden ausschließlich in deskriptiver Form ausgewertet.

CDX2 konnte in Zylinderepithel- und in Becherzellen nachgewiesen werden, wobei die Immunreaktion in den Zellkernen intensiv, im Zytoplasma hingegen gering ausgeprägt war. Abb. 12 dokumentiert die Anfärbung des Transkriptionsfaktors in der gastralen Mukosa von drei ausgewählten Patienten. In entzündlich veränderter, nicht metaplastischer Kardiaschleimhaut zeigten einzelne verstreute Zellen und Zellgruppen eine positive Färbereaktion (Abb. 12A). Im Antrum eines *H. pylori*-positiven Patienten konnte CDX2 in vereinzelt Drüsen nachgewiesen werden (Abb. 12B). In einem Schnitt aus der Kardiamukosa eines Patienten mit NERD zeigte eine einzelne metaplastische Drüse eine positive Immunreaktion für CDX2 (Abb. 12C).

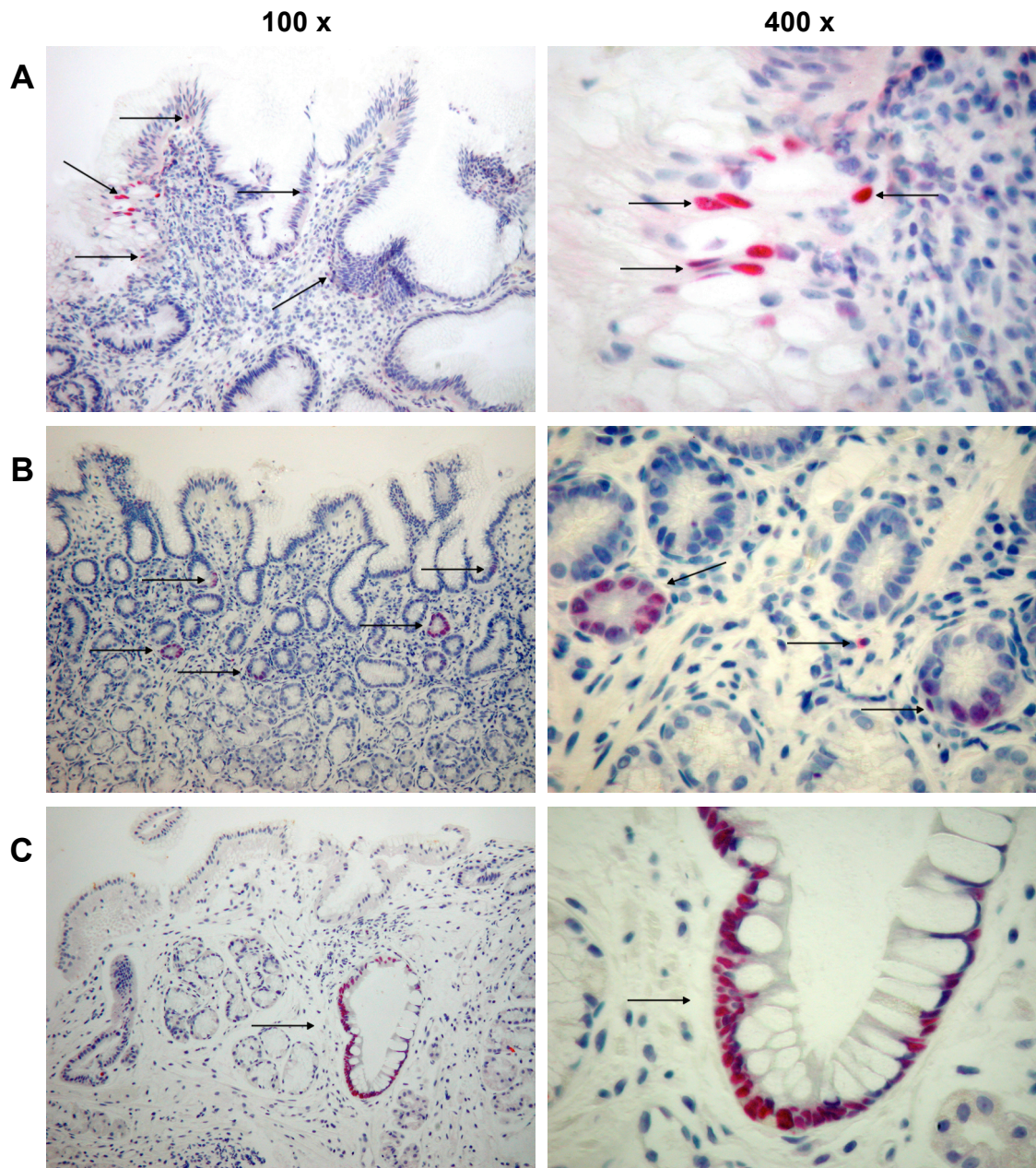


Abb. 12. Anfärbung des CDX2-Proteins in der gastralen Mukosa mittels Immunhistochemie

Darstellung des CDX2-Proteins in drei ausgewählten Proben in jeweils 100- und 400-facher optischer Vergrößerung. Die für das CDX2-Protein positive Immunreaktion zeigt sich in einer pinkroten Färbung, die Zellkerne sind durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau gefärbt. (A) Einzelne Zellen in entzündlich veränderter Kardiaschleimhaut eines *H. pylori*-negativen Patienten ohne GERD. (B) Vereinzelt Drüsen in entzündeter Antrumukosa eines *H. pylori*-positiven Patienten. (C) Einzelne metaplastische Drüse an der Cardia eines Patienten mit NERD.

3.2 Expressionsanalyse von *CDX2* in epithelialen Zellkulturen

Als Ergänzung zu den aus den klinischen Proben gewonnenen Daten wurde die Genexpression von *CDX2* in einem *in vitro*-Modell untersucht. Der Einfluss von Gallensäuren und saurem pH auf die Transkriptmengen von *CDX2* wurde in zwei Zelllinien humaner ösophagealer Plattenepithelkarzinome (KYSE-150, KYSE-450) analysiert. Um gastro- bzw. duodenogastroösophagealen Reflux zu imitieren, wurden die Zellen mit 3 verschiedenen Gallensäuren und bei unterschiedlichen pH-Werten im sauren Bereich für 6 h bzw. für 24 h inkubiert. Die Genexpression von *CDX2* wurde mittels qPCR gemessen. Die Details der Kultivierungsbedingungen sind in Kapitel 2.2 beschrieben.

In den beiden Tumorzelllinien konnte basal kaum *CDX2*-mRNA nachgewiesen werden, lediglich 17 % der KYSE-150-Proben und 14 % der KYSE-450-Proben waren positiv für *CDX2*. Die Menge des *CDX2*-Transkripts änderte sich weder durch die Stimulation mit Gallensäuren, noch durch die Inkubation bei saurem pH, noch durch die Kombination aus beidem wesentlich. In Abb. 13 sind ausgewählte Ergebnisse der qPCR-Analyse dargestellt. Die Simulation von Refluxepisoden führte in diesem *in vitro*-Modell unter Verwendung von ösophagealen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien nicht zu einer Induktion des Transkriptionsfaktors *CDX2*.

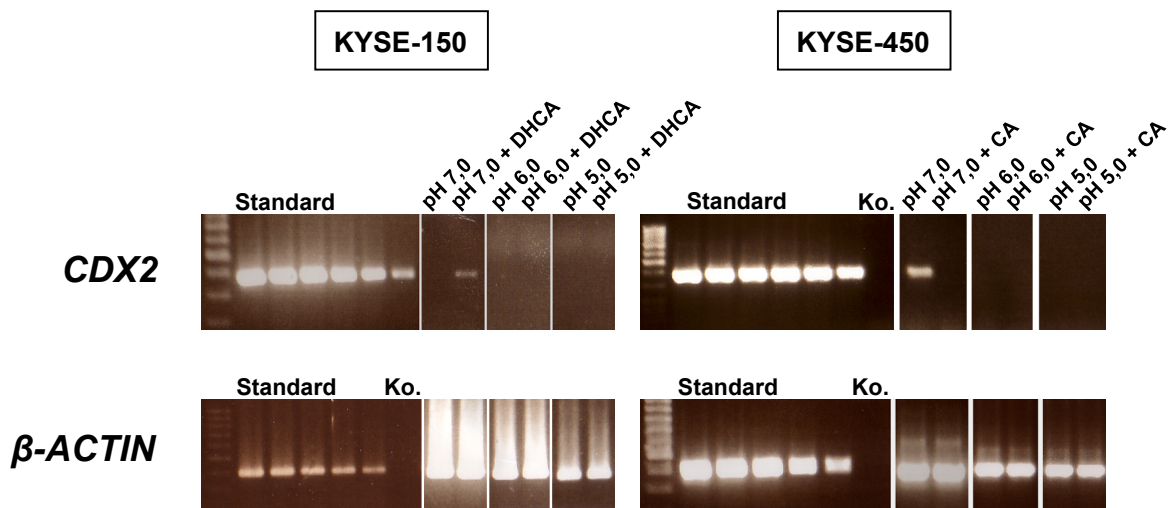


Abb. 13. Elektrophoresebanden der qPCR-Amplifikationsprodukte von β -ACTIN und *CDX2*

Dargestellt ist die amplifizierte cDNA von β -ACTIN (400 bp) und *CDX2* (376 bp) aus Zellen der Linien KYSE-150 und KYSE-450, die für die Dauer von 24 h mit saurem pH oder mit der Kombination aus saurem pH und Dehydrocholsäure (DHCA) bzw. Cholsäure (CA) behandelt wurden.

Um die Reaktionsfähigkeit der Zellen gegenüber sauren pH-Werten und Gallensäuren zu prüfen, wurden diese auch auf die Expression anderer Gene hin untersucht. Diese Untersuchungen wurden durch andere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Wex durchgeführt und separat analysiert [50]. PAR-2 (proteinase-activated receptor 2) ist ein Rezeptor, der von der Serinprotease Trypsin aktiviert wird. Ihm werden eine schleimhautprotektive Rolle und die Beteiligung an Entzündungsprozessen zugeschrieben. Die Inkubation von KYSE-150-Zellen bei pH 5,0 führte zu 15,1-fach höheren *PAR-2*-Transkriptgehalten, als die Kultivierung der Zellen bei pH 7,0 ($p=0,001$). Die gleichzeitige Stimulation der Zellen mit saurem pH und DHA führte bei pH 5,0 ebenfalls zu einer Induktion des Rezeptors, wobei diese mit 3,4-fach erhöhten Transkriptmengen ($p=0,03$) geringer ausgeprägt war, als bei der alleinigen Inkubation mit saurem pH. Abb. 14 dokumentiert die Ergebnisse der qPCR-Analyse.

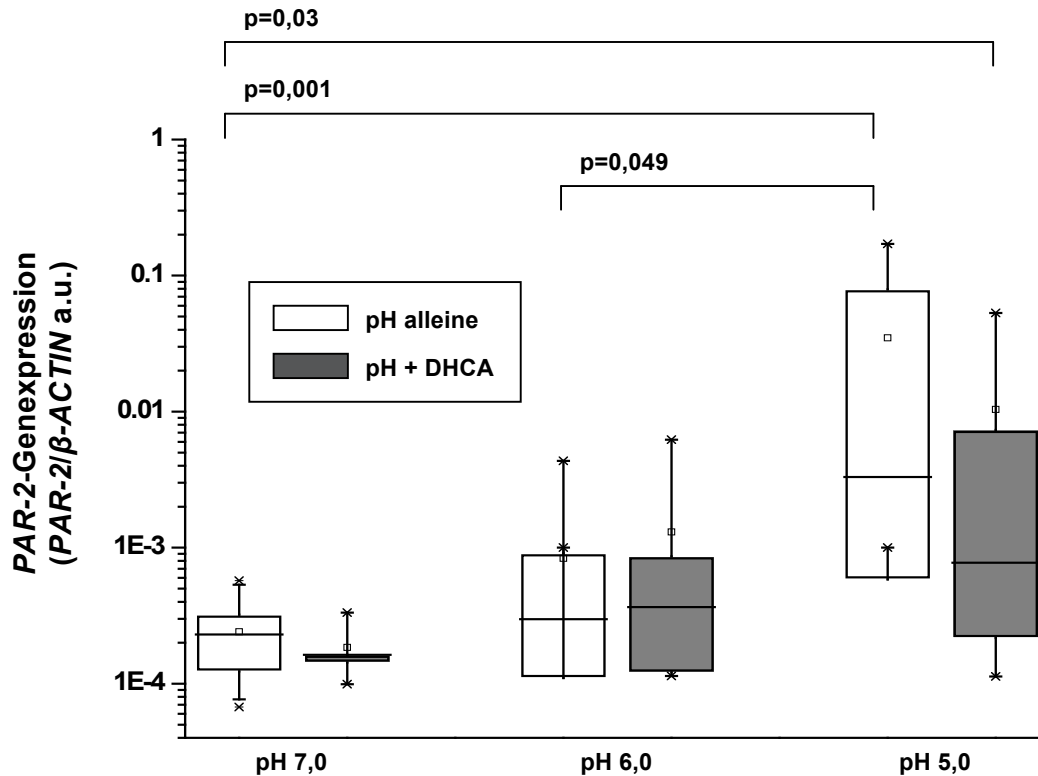


Abb. 14. Effekt von DHCA und saurem pH auf die Genexpression von *PAR-2* in ösophagealen Zellen

Humane ösophageale Plattenepithelkarzinom-Zellen der Linie KYSE-150 wurden bei pH-Werten von 7,0 bis 5,0 alleine und unter Zugabe von 50 μM DHCA für 24 h kultiviert. Die *PAR-2*-Transkriptmengen sind als Boxplot-Diagramm aufgetragen. Jede Box umfasst 50 % der Daten, und es sind jeweils der Median, die 25er-, die 75er-Perzentile und die beiden Extremwerte dargestellt. Da der Wert „0“ auf der logarithmischen Skala nicht angezeigt werden kann, sind einige Boxen unvollständig. Der übergeordnete Kruskal-Wallis-Test war mit $p=0,01$ signifikant. Die anschließenden Paarvergleiche mittels Mann-Whitney-U-Test zeigten, dass die Genexpression von *PAR-2* in den mit pH 5,0 stimulierten Zellen 15,1-fach höher war als in den bei pH 7,0 kultivierten Zellen ($p=0,001$). Eine Koinkubation der Zellen mit saurem pH und DHCA erhöhte die *PAR-2*-Transkriptgehalte im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit saurem pH nicht. Bei pH 5,0 und gleichzeitiger Stimulation mit DHCA war der Effekt auf die Induktion von *PAR-2* geringer ausgeprägt, als bei der alleinigen Inkubation bei saurem pH (3,4-fache versus 15,1-fache Erhöhung der Transkriptmengen). DHCA, Dehydrocholsäure.

Die Abb. und die Daten wurden im Rahmen eines parallel verlaufenden Projektes der Arbeitsgruppe Wex erstellt [50].

4 Diskussion

Der Transkriptionsfaktor CDX2 spielt als Regulator zahlreicher darmspezifischer Gene sowohl während der Embryonalperiode als auch im reifen Darm eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und beim Erhalt intestinaler Epithelzellen [1, 2]. Die genaue Funktion und Bedeutung des Transkriptionsfaktors waren in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Ziel der Promotionsarbeit war die Charakterisierung der Genexpression von *CDX2* im Kontext der Refluxerkrankung.

4.1 Genexpression von *CDX2* in klinischen Proben

4.1.1 Studiendesign

Ein herausragendes Merkmal unserer Studie ist, dass wir den Patienten mit Refluxerkrankung ein Kontrollkollektiv gegenüberstellen konnten und so Informationen über die basale *CDX2*-Expression bei Reflux-negativen Individuen erhielten. Die Referenzgruppe wurde aus Patienten gebildet, die aufgrund dyspeptischer Beschwerden eine ÖGD erhielten, aber klinisch wie endoskopisch keine Merkmale einer GERD aufwiesen. Es handelt sich somit nicht um gesunde, beschwerdefreie Probanden. Mögliche mit der Dyspepsie der Patienten zusammenhängende Einflüsse auf die Genexpression von *CDX2* können nicht ausgeschlossen werden.

Da die Analyse der *CDX2*-Expression bei NERD und ERD im Zentrum dieser Arbeit steht, wurden Patienten mit makroskopisch sichtbarem Zylinderepithel im distalen Ösophagus von vornherein aus der Studie ausgeschlossen. Schließlich wurde aber bei einzelnen Patienten aus den Gruppen NERD und ERD im Nachhinein noch histologisch die Diagnose eines Barrett-Ösophagus gestellt. Diese Patienten verblieben in der Studie, so dass sich schließlich in den Gruppen NERD und ERD auch vereinzelt Patienten mit Barrett-Ösophagus befinden. Aufgrund der geringen Anzahl (weniger als 5 % der Patienten) gehen wir von keinem studienrelevanten Einfluss aus.

4.1.2 Kontrollgruppe

In der vorliegenden Studie untersuchten wir in ösophagealen und gastralen Schleimhautbiopsien von Patienten mit und ohne Refluxerkrankung die Expression des *CDX2*-Gens auf der mRNA-Ebene. Die Daten der Reflux-negativen Patienten gaben Informationen über

die normalen Gewebeexpressionsmuster von *CDX2*. Das *CDX2*-Transkript konnte bei Patienten ohne Refluxerkrankung nachgewiesen werden, wobei die Expressionsraten im Magen mit 61 % an der Cardia und 70 % im Antrum deutlich höher lagen als im distalen Ösophagus (4 %).

Zu Beginn der experimentellen Arbeiten lag uns keine repräsentative klinische Studie über die Expression von *CDX2* in gesunder Ösophagusschleimhaut vor. Eda *et al.* untersuchten an einer Gruppe von 5 Patienten die Genexpression von *CDX2* in endoskopisch und histologisch unveränderter Schleimhaut des distalen Ösophagus auf mRNA- und Proteinebene, wobei der Transkriptionsfaktor nicht nachgewiesen werden konnte. Unbeachtet blieb jedoch, ob die Patienten Symptome einer Refluxerkrankung aufwiesen [74].

Zu den *CDX2*-Expressionsmustern im Magen lagen hingegen mehrere Studien vor. Mizoshita *et al.* konnten mittels qPCR in Magenschleimhaut, die frei von intestinaler Metaplasie war, keine *CDX2*-mRNA nachweisen [100]. Untersuchungen an Rattenembryos haben gezeigt, dass diese während der gesamten Embryonalperiode im Magen kein *Cdx2* exprimieren [55]. Demgegenüber stehen die Ergebnisse einer großen klinischen Studie aus unserer Klinik von Bornschein *et al.*, die mittels qPCR das *CDX2*-Transkript bei Reflux-negativen Patienten in 96 % der Proben (Antrum 95,5 %, Cardia 86,4 %) und somit häufiger als wir nachwiesen. Möglicherweise liegt dies daran, dass ein sehr sensitives qPCR-Protokoll verwendet wurde, so dass auch geringe Transkriptmengen nachgewiesen werden konnten. Außerdem ist erwähnenswert, dass keine Intron-überspannenden Primer zum Einsatz kamen [101].

4.1.3 Einfluss der GERD

Bei der Analyse unserer Genexpressionsdaten in Abhängigkeit vom Vorliegen einer Refluxerkrankung (NERD, ERD) ergänzten sich eine qualitative und eine quantitative Auswertungsmethode. In der qualitativen Analyse zeigte sich die Genexpression von *CDX2* vom Vorliegen einer Refluxerkrankung unbeeinflusst, wobei eine Tendenz zu einem häufigeren Nachweis von *CDX2* im Antrum von Patienten mit GERD verglichen mit der Kontrollgruppe erwähnenswert ist. Anhand der quantitativen Analyse wiesen wir im Antrum, nicht jedoch an der Cardia von Patienten mit Refluxerkrankung ein im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhtes Genexpressionsniveau von *CDX2* nach.

Erstmalig wiesen Eda *et al.* in der ösophagealen Mukosa von Patienten mit ERD *CDX2*-mRNA nach. Immunhistochemisch zeigte die entzündliche Ösophagusschleimhaut eine

feine granuläre zytoplasmatische Anfärbung von Plattenepithel und submukosalen Drüsen, die im Gegensatz zum kräftigen nukleären Färbemuster der Barrett-Schleimhaut stand [74]. Wir hatten daher in unserer Studie einen Einfluss der Refluxkrankheit auf die *CDX2*-Genexpression vor allem im distalen Ösophagus erwartet. Überraschenderweise konnten wir das *CDX2*-Transkript hier bei lediglich 10 % der ERD-Patienten nachweisen, wohingegen der Arbeitsgruppe von Eda der Nachweis in zwei Drittel der Fälle gelungen war. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass in der Studie von Eda *et al.* die Schleimhautproben gezielt aus Erosionen entnommen wurden, wohingegen in unserer Arbeit im Falle von Erosionen 2 cm proximal der Läsion biopsiert wurde. Auch Vallböhmer *et al.* konnten mittels qPCR im ösophagealen Plattenepithel von Patienten mit Symptomen einer GERD *CDX2*-mRNA nachweisen, wobei das Expressionsniveau des Transkriptionsfaktors hier verglichen mit der Barrett-Mukosa 400 Mal niedriger war [102]. In einem Rattenmodell untersuchten Ingravallo *et al.* die Barrett-Karzinogenese. Der experimentelle Reflux nach Ösophagojejunostomie führte im distalen Ösophagus in der den Reflux-Ulcera benachbarten Proliferationszone zur *de novo*-Expression von *CDX2* auf der Proteinebene.

Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse einer Genexpressionsstudie von Moons *et al.*, die das *CDX2*-Protein im ösophagealen Plattenepithel von Patienten mit Refluxerkrankung nicht nachweisen konnten. In derselben Studie wurden auch Biopsien von Patienten mit Barrett-Ösophagus aus dem Plattenepithel 5 cm oberhalb der Barrett-Schleimhaut untersucht, wobei hier in einem Drittel der Fälle niedrige *CDX2*-mRNA-Level dokumentiert wurden [85]. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist zu beachten, dass jeweils eine andere Nachweismethode zum Einsatz kam. Die Unterschiede in der Genexpression wären auch durch eine höhere Sensitivität der qPCR im Vergleich zur immunhistochemischen Färbung erklärbar. Van Baal *et al.* konnten in einer großen immunhistochemischen Studie im ösophagealen Plattenepithel von Patienten mit Barrett-Ösophagus *CDX2* nicht nachweisen [103].

Unerwartet hoch war bei unseren Patienten die *CDX2*-Expression in der Magenschleimhaut, wobei im Antrum der GERD-Patienten (NERD 83 %, ERD 86 %) die höchsten Genexpressionsraten nachgewiesen wurden. Das Antrum ist die Prädilektionsstelle einer durch duodenogastralen Reflux hervorgerufenen Typ-C-Gastritis. Möglicherweise wird die Expression des Transkriptionsfaktors hier durch den wiederkehrenden Kontakt der Magenschleimhaut mit duodenogastralem Refluat induziert. Interessant ist der Vergleich zur Studie von Bornschein *et al.* über die *CDX2*-Expression bei Patienten mit *H. pylori*-Infektion und GERD [101]. In der qPCR-Analyse konnte der Transkriptionsfak-

tor in 94,2 % aller Antrum- und 84,1 % aller Cardia-Proben, und somit deutlich häufiger als erwartet nachgewiesen werden. Die Autoren gehen daher davon aus, dass *CDX2* auch in der gesunden Magenmukosa in geringen Mengen exprimiert wird. Im Einklang mit unseren Ergebnissen zeigte sich bei Patienten mit Refluxerkrankung im Antrum eine Tendenz zu erhöhten *CDX2*-Transkriptmengen. Das gleichzeitige Vorliegen einer Refluxerkrankung und einer *H. pylori*-Infektion führte an der Cardia und im Antrum zu einer Hochregulierung der *CDX2*-Genexpression. Erwähnenswert ist, dass in dieser Studie durch ein entsprechendes qPCR-Protokoll eine hohe Sensitivität erzielt wurde, so dass auch der Nachweis geringer Transkriptmengen möglich war. Wie schon oben diskutiert, kamen in der Studie [101] keine Intron-überspannenden Primer zum Einsatz. Dennoch ist von einer hohen Spezifität auszugehen, da die Ausgangsproben stichprobenartig auf DNA-Verunreinigungen untersucht wurden, und die qPCR-Reaktion durch die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte kontrolliert wurde. Die verhältnismäßig hohe Anzahl an *CDX2*-positiven Proben in der Studie von Bornschein *et al.* ließe sich auch durch die hohe Rate einer nachgewiesenen intestinalen Metaplasie an der Cardia erklären. Hier war der Anteil an Proben mit intestinaler Metaplasie mit 27,1 % deutlich höher als in unserem Patientenkollektiv (4 %), wobei die Gründe hierfür unklar bleiben. Im Antrum hingegen waren die Raten an intestinaler Metaplasie zwischen beiden Studien vergleichbar hoch (11,5 % versus 13 %).

4.1.4 Einfluss von *H. pylori*

Die chronische Infektion mit *H. pylori* gilt als Risikofaktor für die Entwicklung einer intestinalen Metaplasie im Magen und geht mit einem erhöhten Krebsrisiko einher [104]. Wider Erwarten hatte bei unseren Patienten das Vorliegen einer *H. pylori*-Infektion keinen Einfluss auf die Genexpression von *CDX2* in der gastralen Mukosa. Auch andere Studien berichten diesbezüglich über einen fehlenden Zusammenhang [105], in der Mehrzahl der Arbeiten wurde jedoch eine Assoziation zwischen einem positiven *H. pylori*-Status und einer erhöhten *CDX2*-Expression im Magen beschrieben. Anhand einer immunhistochemischen Studie legten Vauhkonen *et al.* dar, dass die *CDX2*-Expression im Antrum beim Vorliegen einer *H. pylori*-Gastritis signifikant hochreguliert ist [83]. Peleteiro *et al.* wiesen den Transkriptionsfaktor häufiger in der gastralen Mukosa *H. pylori*-infizierter Patienten nach und zeigten außerdem, dass eine Infektion mit einem hochvirulenten Bakterienstamm mit einem häufigeren *CDX2*-Nachweis verbunden ist [106]. In der schon mehr-

fach zitierten Studie aus unserer Klinik von Bornschein *et al.* wurden die Auswirkungen sowohl der GERD als auch der *H. pylori*-Infektion auf die *CDX2*-Expression im Magen untersucht. Erst beim gemeinsamen Vorliegen beider Erkrankungen konnte in Cardia und Antrum eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte *CDX2*-Expression nachgewiesen werden. Die Autoren postulierten daher ein additives Zusammenwirken beider Faktoren.

Es sei darauf hingewiesen, dass die Untersuchung des Einflusses der *H. pylori*-Infektion auf die Genexpression von *CDX2* in der gastralen Mukosa nicht im Zentrum dieser Arbeit stand, und das Studiendesign daher nicht explizit auf diese Fragestellung hin konzipiert war. Im Einklang mit den Ergebnissen von Vauhkonen *et al.* fiel in unserer Studie im Antrum eine Tendenz zu höheren *CDX2*-Transkriptgehalten bei Patienten mit positivem *H. pylori*-Status auf [106]. Außerdem konnte in der Kontrollgruppe ein Trend zu erhöhten *CDX2*-Expressionsraten bei *H. pylori*-positiven im Vergleich zu *H. pylori*-negativen Patienten beobachtet werden. Diese Beobachtungen erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau.

4.1.5 Korrelation mit der Genexpression intestinaler Differenzierungsmarker

Vergleichend zu *CDX2* untersuchten wir die Genexpression der intestinalen Differenzierungsmarker *MUC2* und *IAP*. Da *MUC2* durch *CDX2* reguliert wird [68], hätten wir durch alle Patientengruppen hindurch eine positive Korrelation der beiden Gene erwartet. Schließlich konnten wir für *MUC2* im Magen von Reflux-negativen Patienten und Patienten mit NERD, nicht aber in der Gruppe mit ERD eine positive Korrelation zur Genexpression des Transkriptionsfaktors nachweisen. Möglicherweise liegt dies daran, dass für die quantitativ durchgeführte Korrelationsanalyse ausschließlich Proben mit nachgewiesener Expression jeweils beider Gene (*MUC2* und *CDX2* bzw. *IAP* und *CDX2*) berücksichtigt werden konnten. So fand insgesamt nur ein kleiner Teil aller Proben Eingang in die Auswertung, was die statistische Analyse erschwerte. Die Expression von *IAP* korrelierte positiv mit der Genexpression von *CDX2*.

Wir konnten nachweisen, dass in der gastralen Mukosa von Patienten mit GERD eine Assoziation zwischen der *CDX2*-Genexpression und intestinalen Differenzierungsmarkern existiert. Dies deutet auf eine funktionelle Relevanz der nachgewiesenen *CDX2*-mRNA hin und stützt die Ergebnisse der mRNA-Untersuchungen.

4.1.6 Immunhistochemischer Nachweis von CDX2

Um die Ergebnisse der qPCR zu untermauern, führten wir immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis des CDX2-Proteins durch. Da hierfür nur von einem Teil der Patienten des Studienkollektivs Material aus Cardia und Antrum zur Verfügung stand, war eine statistische Analyse nicht sinnvoll. Die Auswertung erfolgte rein deskriptiv, so dass die Ergebnisse exemplarischen Charakter haben.

Wir wiesen das CDX2-Protein in Epithelzellen von Cardia und Antrum nach. Hervorzuheben ist, dass sich bei Patienten mit GERD oder *H. pylori*-Infektion auch in entzündlich veränderter, nicht metaplastischer Mukosa eine positive Immunreaktion zeigte. Diese war in einzeln verstreuten Zellen, Zellgruppen oder auch kompletten Drüsenanschnitten zu beobachten, wobei sich teilweise nur das Zytoplasma, manchmal auch die Zellkerne anfärbten. In Schleimhautarealen mit intestinaler Metaplasie hingegen wiesen die Zellkerne eine intensive Immunreaktion auf. Durch Satoh *et al.* wurde bei Patienten mit chronischer Gastritis ein vergleichbares CDX2-Verteilungsmuster mit einer zarten granulären zytoplasmatischen Färbung im Magenepithel vorbeschrieben [107], das von derselben Arbeitsgruppe später auch in entzündeter ösophagealer Mukosa nachgewiesen wurde [74]. Die Autoren vermuteten, dass sich im Rahmen der Transdifferenzierung zu intestinaler Metaplasie bzw. Barrett-Schleimhaut die Lokalisation des CDX2-Proteins vom Zytoplasma in den Zellkern verschiebt. Vauhkonen *et al.* beschrieben bei 57 % ihrer magengesunden Probanden eine leichte CDX2-Immunfärbung in den Kernen einzelner nicht-metaplastischer Zellen im Antrum, die sie als „positive staining of single cells“ (PSSC) bezeichneten. Dieses Färbemuster zeigte sich in derselben Studie bei allen Patienten mit *H. pylori*-Infektion [83]. Auch Bornschein *et al.* konnten das CDX2-Protein immunhistochemisch in entzündlich veränderten Magenschleimhautarealen ohne Metaplasie nachweisen [101]. Chen *et al.* untersuchten die Genexpression von Transkriptionsfaktoren und Differenzierungsmarkern in Arealen mehrschichtigen Epithels im Ösophagus von Patienten mit nachgewiesener Barrett-Metaplasie. Dieses stellt vermutlich einen Zwischenschritt in der Entwicklung des Plattenepithels hin zu Zylinderepithel und Barrett-Schleimhaut dar und ist ein histologischer Marker der GERD [108]. In mehrschichtigem Epithel konnte in einigen Fällen CDX2 im Zytoplasma bei jeweils fehlender nukleärer Expression nachgewiesen werden [109].

Durch die immunhistochemischen Untersuchungen mit dem Nachweis des CDX2-Proteins in entzündlich veränderter Magenschleimhaut ohne Metaplasie konnten wir die auf der mRNA-Ebene gewonnen Genexpressionsdaten bestätigen. Die *CDX2*-Expression beginnt

im Stadium der Ösophagitis bzw. chronischen Gastritis und scheint ein frühes Ereignis in der Entwicklung von Barrett-Mukosa und intestinaler Metaplasie darzustellen, dem eine Schlüsselrolle zukommt. Die funktionelle Bedeutung der Lokalisation von CDX2 im Zytoplasma ist noch unvollständig verstanden. Möglicherweise geht sie der Lokalisation im Nukleus voraus, wobei sich im Verlauf der Transdifferenzierung die Lokalisation des CDX2-Proteins vom Zytoplasma in den Zellkern verschiebt.

4.2 Genexpression von CDX2 in epithelialen Zellkulturen

In unserem *in vitro*-Modell führte die Stimulation ösophagealer Plattenepithelkarzinomzellen der Linien KYSE-150 und KYSE-450 mit Gallensäuren, saurem pH oder der Kombination beider Faktoren nicht zu einer Induktion der Genexpression von CDX2. Durch andere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Wex wurde in dem gleichen Zellkulturmodell die Genexpression von PAR-2 untersucht [50], wobei anhand dieser Experimente die grundsätzliche Reaktionsfähigkeit der Zellen gegenüber sauren pH-Werten und Gallensäuren bestätigt wurde.

4.2.1 Auswahl der Zelllinien

Um die Entwicklung des Barrett-Ösophagus zu untersuchen, stehen grundsätzlich immortalisierte normale ösophageale Plattenepithelzellen, Plattenepithelkarzinom-, Barrettepithel- und Adenokarzinom-Zelllinien zur Verfügung. Am häufigsten sind Experimente mit Zelllinien vorbeschrieben, die von Patienten mit Barrett-Schleimhaut oder ösophagealem Adenokarzinom gewonnen wurden [110]. Die Auswahl der verwendeten Zellen beeinflusst das Ergebnis eines Experiments entscheidend. Ziel unserer Studie war es, Veränderungen der Genexpression von CDX2 im Rahmen der Refluxerkrankung zu erfassen, die den Beginn des Prozesses der Metaplasie vom ösophagealen Plattenepithel zur Barrett-Mukosa markieren. Unter dieser Fragestellung schienen uns ösophageale Plattenepithel-Zelllinien für den Einsatz im *in vitro*-Modell am geeignetsten.

CDX2 wird in den meisten humanen Adenokarzinom-Zelllinien, kaum aber in Plattenepithel-Zelllinien exprimiert [82]. Die Induktion bzw. Hochregulierung von CDX2 durch Gallensäuren und sauren pH gelingt in Barrett- oder Adenokarzinomzellen leichter als in Plattenepithelzellen [97]. Einige Arbeitsgruppen konnten den Transkriptionsfaktor aber auch in Plattenepithelzellen induzieren. Bisher wurde dies in einer Langzeitkultur normaler

ösophagealer Keratinozyten der Maus [94] und in primär kultivierten ösophagealen Keratinozyten der Ratte [95] demonstriert. Hu *et al.* analysierten außerdem die *CDX2*-Expression vor und nach Inkubation mit Gallensäuren vergleichend in immortalisierten normalen Plattenepithelzellen (Het-1A), Adenokarzinomzellen (SEG-1) und Plattenepithelkarzinomzellen (HKESC-1 und HKESC-2) des Ösophagus. In allen vier Zelllinien konnte der Transkriptionsfaktor dosis- und zeitabhängig induziert werden, wobei die maximale Induktion in den Adenokarzinom-Zellen beobachtet wurde [97].

Die Gründe dafür, dass sich in unserem *in vitro*-System *CDX2* nicht induzieren ließ, sind wahrscheinlich vielschichtig. Neben der Auswahl der Zelllinien müssen bei der Interpretation der Ergebnisse auch die allgemeinen Einschränkungen von Kulturmodellen mit Tumorzelllinien berücksichtigt werden. Zum einen fehlt im *in vitro*-Modell der Kontakt zu Stroma- und Entzündungszellen. Andererseits tragen die Tumorzellen zufällige Mutationen, um unaufhörlich wachsen zu können. Durch die veränderte genetische Regulation weisen sie im Vergleich zu den *in vivo*-Zellen ein anderes Verhalten auf.

Unser *in vitro*-System beruht auf der geläufigsten Theorie der Entstehung der Barrett-Mukosa, die besagt, dass sich differenziertes ösophageales Plattenepithel nach wiederholtem Kontakt mit Magensäure und Gallensäuren in Zylinderepithel umwandelt [111, 112]. Es ist aber zu beachten, dass die Ursprungszelle des Barrett-Epithels zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt ist. Zunehmend findet die Hypothese Zuspruch, dass sich die Barrett-Schleimhaut aus Stammzellen entwickelt, die ihr Differenzierungsverhalten hin zu einem intestinalen Phänotyp verändern. Es wird intensiv diskutiert, in welchem Gewebe diese Stammzellen lokalisiert sein könnten. Manche Autoren gehen von der Basalzone des ösophagealen Plattenepithels [113] oder dem Zylinderepithel submukosaler ösophagealer Drüsen [114, 115] aus. Daneben gibt es Hinweise darauf, dass Barrett-Epithel aus an der Plattenepithel-Zylinderepithel-Grenze verbliebenen embryonalen Zellen entstehen könnte [116]. Auch zylindrische Vorläuferzellen der Cardia werden als Barrett-Vorläuferzellen diskutiert [117]. Die Frage nach der Ursprungszelle der Barrett-Mukosa ist entscheidend. Möglicherweise gelang in unserem Modell die Induktion von *CDX2* in den ösophagealen Plattenepithelkarzinomzellen nicht, weil sich entscheidende frühe Ereignisse in der Entstehung des Barrett-Ösophagus in anderen Zellen abspielen.

Einen interessanten Aspekt erforschten Hu *et al.* aufbauend auf der Beobachtung, dass nur ein Teil der Patienten mit GERD eine Barrett-Metaplasie entwickelt. Sie untersuchten den Einfluss von saurem Milieu und Gallensäuren auf ösophageale Plattenepithelzelllinien, die von GERD-Patienten mit und ohne Barrett-Ösophagus abstammten. *CDX2* ließ sich in den

Plattenepithelzellen der Patienten mit Barrett-Metaplasie induzieren, nicht aber in den Zellen von GERD-Patienten ohne Barrett-Ösophagus. Die Autoren postulierten, dass der Entwicklung des Barrett-Epithels angeborene oder erworbene Unterschiede in den durch Reflux aktivierten Signalwegen zugrunde liegen [118]. Möglicherweise waren die Patienten, denen die von uns verwendeten Zelllinien KYSE-150 und KYSE-450 entstammen, nicht zur Entwicklung einer Barrett-Metaplasie prädisponiert, mit der Folge, dass sich *CDX2* durch Säure und Gallensäuren nicht induzieren ließ.

4.2.2 Inkubationsbedingungen

Duodenogastroösophageale Refluxepisoden gehen mehrheitlich mit neutralen bis sauren pH-Werten im Ösophagus einher [89]. Da sich die toxischen Effekte der Gallensäuren in Abhängigkeit vom vorliegenden pH-Wert und dem damit einhergehenden Grad der Ionisation verändern [119], untersuchten wir im *in vitro*-Modell die Effekte der Gallensäuren bei neutralen bis sauren pH-Werten.

Zum Einsatz kamen die primäre Gallensäure Cholsäure (CA) und die sekundären Gallensäuren Desoxycholsäure (DCA) und Dehydrocholsäure (DHCA) in jeweils unkonjugierter Form. Cholsäure und Desoxycholsäure machen bei Patienten mit GERD den größten Teil der Gallensäuren im Refluat aus [120]. Kazumori *et al.* testeten elf verschiedene Gallensäuren (darunter auch DCA), wobei nur CA und DHCA in den Kolonepithel-Zelllinien Caco-2 und HT-29 zu einem dosisabhängigen Anstieg der Promoteraktivität und *CDX2*-Proteinproduktion führten. Auch in kultivierten ösophagealen Keratinozyten der Ratte konnte nach Stimulation mit CA und DHCA ein Anstieg der *CDX2*-Proteinproduktion nachgewiesen werden [95]. Mit der Gallensäure DCA gelang Debruyne *et al.* die Hochregulierung von *CDX2* in der humanen ösophagealen Adenokarzinom-Zelllinie OE19 [96]. Pardon *et al.* untersuchten in einem *in vivo*-Modell den Effekt einer sauren Lösung alleine und in Kombination mit DCA auf das ösophageale Epithel von Kaninchen. Der Ösophagus der narkotisierten Tiere wurde 30 Minuten lang mit den entsprechenden Lösungen durchströmt, wobei nur durch die auch DCA enthaltenden Lösungen Apoptose induziert und die epitheliale Integrität lang anhaltend beeinträchtigt wurde [121]. Ein hoher Anteil sekundärer Gallensäuren wurde im Zusammenhang mit starken Schleimhautschäden beobachtet [89], wobei die Lipophilie der Gallensäuren als wichtige Determinante für deren Toxizität gilt. Unkonjugierte sekundäre Gallensäuren sind lipophiler und können leichter Zellmembranschäden verursachen [122].

Wir verwendeten die Gallensäuren in einer Stoffmengenkonzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$. Hierbei orientierten wir uns zum einen an Daten aus Messungen der Gallensäurekonzentration im aspirierten Refluat von Patienten mit GERD [89]. Außerdem verwendeten andere Arbeitsgruppen vergleichbare Konzentrationen in Versuchen mit anderen Zelltypen [95, 96]. In den Plattenepithelkarzinom-Zelllinien KYSE-150 und KYSE-450 konnten wir mit dieser Gallensäurekonzentration in Kombination mit neutralem und saurem pH *CDX2* nicht induzieren. Andere Arbeiten, die nach Abschluss unserer Experimente veröffentlicht wurden, lassen darauf schließen, dass bei der Verwendung von Plattenepithelzellen höhere Konzentrationen erforderlich sind, um den Transkriptionsfaktor zu induzieren. So beobachteten Hu *et al.* in immortalisierten normalen Plattenepithelzellen (Het-1A) und Plattenepithelkarzinomzellen (HKESC-1 und HKESC-2) erst bei einer Stoffmengenkonzentration von 1000 $\mu\text{mol/l}$ eine Induktion von *CDX2* [97, 123]. Der Arbeitsgruppe um Vaninetti gelang unter Verwendung von Het-1A-Zellen mit 500 $\mu\text{mol/l}$ CA bzw. 1000 $\mu\text{mol/l}$ DCA die Induktion von *CDX2* [124].

4.3 Ausblick

Unsere Untersuchungen an klinischen Proben geben Aufschluss über die Genexpression von *CDX2* bei Patienten mit und ohne Refluxerkrankung. Wir konnten zeigen, dass *CDX2* auch in entzündlich veränderter Schleimhaut ohne Metaplasie exprimiert wird. Weitere Studien sind erforderlich, um herauszufinden, ob anhand der *CDX2*-Expression bei Patienten mit Ösophagitis die Entwicklung einer Barrett-Metaplasie prognostiziert werden kann. Es wäre denkbar, dass der Transkriptionsfaktor in Zukunft einen Stellenwert als Biomarker erlangt, mit dem besonders gefährdete Patienten identifiziert und dann entsprechenden endoskopischen Kontrollen zugeführt werden können. Neuere, auf der Microarray-Technologie basierende, Studien fokussierten bisher auf die Unterschiede in den Genexpressionsmustern zwischen gesunder und Barrett-Schleimhaut mit einem besonderen Augenmerk auf der Analyse von Signalwegen [125]. Es wird von großem Interesse sein, solche Untersuchungen in Zukunft auch an Patienten mit NERD oder ERD ohne Barrett-Ösophagus durchzuführen.

Der Entwicklung von *in vitro*-Modellen, in denen die Effekte von gastroösophagealem und DGÖR simuliert werden können, kommt ein hoher Stellenwert zu. Um die an der Entstehung des Barrett-Ösophagus beteiligten molekularen Mechanismen zu erforschen, sollten

bevorzugt ösophageale Plattenepithelzellen verwendet werden. Außerdem sind Studien erforderlich, die die Identifikation der Ursprungszelle des Barrett-Epithels zum Ziel haben. Die entscheidende Rolle von CDX2 in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der intestinalen Metaplasie ist gut erforscht. In der Zukunft wird das Hauptaugenmerk darauf liegen, die dem Transkriptionsfaktor vorgeschalteten molekularen Signalwege zu charakterisieren. Ein tieferes Verständnis der Rolle der chronischen Entzündung in der Entwicklung des Barrett-Ösophagus birgt das Potential für neue Therapieansätze.

5 Zusammenfassung

Der epitheliale Transkriptionsfaktor *CDX2* gilt als Schlüsselregulator der Darmentwicklung. Im reifen Darm steuert er die Differenzierung des Epithels und die Aufrechterhaltung des intestinalen Phänotyps. Die Induktion der *CDX2*-Expression spielt bei der Entstehung der intestinalen Metaplasie in Ösophagus und Magen eine kausale Rolle. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Genexpression von *CDX2* im Kontext der GERD ohne Barrett-Metaplasie.

Eingeschlossen wurden 95 Patienten mit NERD oder ERD, denen ein Kontrollkollektiv von 27 aus anderen Gründen gastrokopierte Patienten gegenübergestellt wurde. Die Expression des Transkriptionsfaktors und der durch ihn kontrollierten bzw. mit intestinaler Metaplasie assoziierten Gene *MUC2* und *IAP* wurde in Mukosaproben aus distalem Ösophagus und Magen mit der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) analysiert. Ausgewählte Ergebnisse wurden mittels Immunhistochemie auf der Proteinebene bestätigt. In den humanen ösophagealen Plattenepithelkarzinomzelllinien KYSE-150 und KYSE-450 wurde die *CDX2*-Expression nach deren Stimulation mit saurem pH und/oder den Gallensäuren Dehydrocholsäure (DHCA), Cholsäure (CA) oder Deoxycholsäure (DCA) untersucht.

CDX2 wird in der gastroösophagealen Mukosa von Patienten mit und ohne Refluxerkrankung exprimiert, wenn auch in deutlich geringerem Maße als im Darm. Der Transkriptionsfaktor wird häufiger in der gastralen als in der ösophagealen Schleimhaut exprimiert, wobei die höchsten Genexpressionsraten jeweils im Antrum nachgewiesen wurden. Bei Patienten mit NERD und ERD war im Antrum ein im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhtes Genexpressionsniveau von *CDX2* nachweisbar, wohingegen die Genexpression in Ösophagus und Cardia vom Vorliegen einer GERD unbeeinflusst blieb. Die *CDX2*-Expression ist mit der Expression der intestinalen Differenzierungsmarker *MUC2* und *IAP* assoziiert. Das *CDX2*-Protein konnte in entzündlich veränderter Magenschleimhaut ohne Metaplasie nachgewiesen werden. Im *in vitro*-Modell gelang es nicht, den Transkriptionsfaktor durch Simulation von Refluxepisoden in ösophagealen Plattenepithelkarzinomzelllinien zu induzieren.

Die *CDX2*-Expression spielt in der Entwicklung von Barrett-Mukosa und intestinaler Metaplasie im Magen eine Schlüsselrolle und beginnt im Stadium der Ösophagitis bzw. chronischen Gastritis. Die erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors im Antrum von Patienten mit GERD könnte auf duodenogastralen Reflux zurückzuführen sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Silberg, D.G., et al., *Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development*. Gastroenterology, 2000. **119**(4): p. 961-71.
2. Suh, E. and P.G. Traber, *An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(2): p. 619-25.
3. Kong, J., et al., *Induction of intestinalization in human esophageal keratinocytes is a multistep process*. Carcinogenesis, 2009. **30**(1): p. 122-30.
4. Silberg, D.G., et al., *Cdx2 ectopic expression induces gastric intestinal metaplasia in transgenic mice*. Gastroenterology, 2002. **122**(3): p. 689-96.
5. El-Serag, H.B., et al., *Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review*. Gut, 2013.
6. Malfertheiner, P., et al., *Evolution of gastro-oesophageal reflux disease over 5 years under routine medical care--the ProGERD study*. Aliment Pharmacol Ther, 2012. **35**(1): p. 154-64.
7. Shaheen, N.J., et al., *Is there publication bias in the reporting of cancer risk in Barrett's esophagus?* Gastroenterology, 2000. **119**(2): p. 333-8.
8. Brown, L.M., *Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission*. Epidemiol Rev, 2000. **22**(2): p. 283-97.
9. Malfertheiner, P., *The intriguing relationship of Helicobacter pylori infection and acid secretion in peptic ulcer disease and gastric cancer*. Dig Dis, 2011. **29**(5): p. 459-64.
10. Kim, S.S., et al., *Helicobacter pylori in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma*. Cancer Lett, 2011. **305**(2): p. 228-38.
11. Vakil, N., et al., *The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus*. Am J Gastroenterol, 2006. **101**(8): p. 1900-20; quiz 1943.
12. Lofdahl, H.E., et al., *Increased population prevalence of reflux and obesity in the United Kingdom compared with Sweden: a potential explanation for the difference in incidence of esophageal adenocarcinoma*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2011. **23**(2): p. 128-32.
13. Ronkainen, J., et al., *High prevalence of gastroesophageal reflux symptoms and esophagitis with or without symptoms in the general adult Swedish population: a Kalixanda study report*. Scand J Gastroenterol, 2005. **40**(3): p. 275-85.
14. Jung, H.K., et al., *Overlap of gastro-oesophageal reflux disease and irritable bowel syndrome: prevalence and risk factors in the general population*. Aliment Pharmacol Ther, 2007. **26**(3): p. 453-61.
15. El-Serag, H.B., et al., *Gastroesophageal reflux among different racial groups in the United States*. Gastroenterology, 2004. **126**(7): p. 1692-9.
16. Wong, W.M., et al., *Prevalence, clinical spectrum and health care utilization of gastro-oesophageal reflux disease in a Chinese population: a population-based study*. Aliment Pharmacol Ther, 2003. **18**(6): p. 595-604.
17. Chen, M., et al., *Prevalence, risk factors and impact of gastroesophageal reflux disease symptoms: a population-based study in South China*. Scand J Gastroenterol, 2005. **40**(7): p. 759-67.
18. Ruth, M., I. Mansson, and N. Sandberg, *The prevalence of symptoms suggestive of esophageal disorders*. Scand J Gastroenterol, 1991. **26**(1): p. 73-81.
19. Kennedy, T. and R. Jones, *The prevalence of gastro-oesophageal reflux symptoms in a UK population and the consultation behaviour of patients with these symptoms*. Aliment Pharmacol Ther, 2000. **14**(12): p. 1589-94.

20. Willich, S.N., et al., *Cost-of-disease analysis in patients with gastro-oesophageal reflux disease and Barrett's mucosa*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006. **23**(3): p. 371-6.
21. Klauser, A.G., N.E. Schindlbeck, and S.A. Muller-Lissner, *Symptoms in gastro-oesophageal reflux disease*. *Lancet*, 1990. **335**(8683): p. 205-8.
22. Tack, J., et al., *Prevalence of acid reflux in functional dyspepsia and its association with symptom profile*. *Gut*, 2005. **54**(10): p. 1370-6.
23. Eslick, G.D., M.P. Jones, and N.J. Talley, *Non-cardiac chest pain: prevalence, risk factors, impact and consulting--a population-based study*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003. **17**(9): p. 1115-24.
24. Shaker, R., et al., *Nighttime heartburn is an under-appreciated clinical problem that impacts sleep and daytime function: the results of a Gallup survey conducted on behalf of the American Gastroenterological Association*. *Am J Gastroenterol*, 2003. **98**(7): p. 1487-93.
25. Kulig, M., et al., *Quality of life in relation to symptoms in patients with gastro-oesophageal reflux disease-- an analysis based on the ProGERD initiative*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003. **18**(8): p. 767-76.
26. Madisch, A., et al., *Impact of reflux disease on general and disease-related quality of life - evidence from a recent comparative methodological study in Germany*. *Z Gastroenterol*, 2003. **41**(12): p. 1137-43.
27. Fass, R. and J.J. Ofman, *Gastroesophageal reflux disease--should we adopt a new conceptual framework?* *Am J Gastroenterol*, 2002. **97**(8): p. 1901-9.
28. Modlin, I.M., et al., *Diagnosis and management of non-erosive reflux disease--the Vevey NERD Consensus Group*. *Digestion*, 2009. **80**(2): p. 74-88.
29. Lundell, L.R., et al., *Endoscopic assessment of oesophagitis: clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification*. *Gut*, 1999. **45**(2): p. 172-80.
30. Sharma, P., et al., *The development and validation of an endoscopic grading system for Barrett's esophagus: the Prague C & M criteria*. *Gastroenterology*, 2006. **131**(5): p. 1392-9.
31. Rugge, M., et al., *Barrett's esophagus and adenocarcinoma risk: the experience of the North-Eastern Italian Registry (EBRA)*. *Ann Surg*, 2012. **256**(5): p. 788-94; discussion 794-5.
32. Pohl, H. and H.G. Welch, *The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence*. *J Natl Cancer Inst*, 2005. **97**(2): p. 142-6.
33. Baldi, F., et al., *Ambulatory 24-hour oesophageal pH monitoring in normal subjects: a multicentre study in Italy*. *G.I.S.M.A.D. GOR Study Group*. *Ital J Gastroenterol*, 1991. **23**(8): p. 477-80.
34. Mittal, R.K. and R.W. McCallum, *Characteristics and frequency of transient relaxations of the lower esophageal sphincter in patients with reflux esophagitis*. *Gastroenterology*, 1988. **95**(3): p. 593-9.
35. Richter, J., *Do we know the cause of reflux disease?* *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1999. **11 Suppl 1**: p. S3-9.
36. Dent, J., et al., *Mechanisms of lower oesophageal sphincter incompetence in patients with symptomatic gastrooesophageal reflux*. *Gut*, 1988. **29**(8): p. 1020-8.
37. Vaezi, M.F. and J.E. Richter, *Role of acid and duodenogastroesophageal reflux in gastroesophageal reflux disease*. *Gastroenterology*, 1996. **111**(5): p. 1192-9.
38. Kahrilas, P.J., *GERD pathogenesis, pathophysiology, and clinical manifestations*. *Cleve Clin J Med*, 2003. **70 Suppl 5**: p. S4-19.

39. Avidan, B., et al., *Risk factors for erosive reflux esophagitis: a case-control study*. Am J Gastroenterol, 2001. **96**(1): p. 41-6.
40. Stein, H.J., et al., *Bile reflux in benign and malignant Barrett's esophagus: effect of medical acid suppression and nissen fundoplication*. J Gastrointest Surg, 1998. **2**(4): p. 333-41.
41. Tack, J., et al., *Gastroesophageal reflux disease poorly responsive to single-dose proton pump inhibitors in patients without Barrett's esophagus: acid reflux, bile reflux, or both?* Am J Gastroenterol, 2004. **99**(6): p. 981-8.
42. Vieth, M., et al., *What parameters are relevant for the histological diagnosis of gastroesophageal reflux disease without Barrett's mucosa?* Dig Dis, 2004. **22**(2): p. 196-201.
43. Vieth, M., et al., *Histological effects of esomeprazole therapy on the squamous epithelium of the distal oesophagus*. Aliment Pharmacol Ther, 2006. **23**(2): p. 313-9.
44. Tobey, N.A., et al., *Dilated intercellular spaces: a morphological feature of acid reflux--damaged human esophageal epithelium*. Gastroenterology, 1996. **111**(5): p. 1200-5.
45. Wex, T., et al., *Gastro-oesophageal reflux disease is associated with up-regulation of desmosomal components in oesophageal mucosa*. Histopathology, 2012. **60**(3): p. 405-15.
46. Isomoto, H., et al., *Enhanced expression of interleukin-8 and activation of nuclear factor kappa-B in endoscopy-negative gastroesophageal reflux disease*. Am J Gastroenterol, 2004. **99**(4): p. 589-97.
47. Monkemuller, K., et al., *Interleukin-1beta and interleukin-8 expression correlate with the histomorphological changes in esophageal mucosa of patients with erosive and non-erosive reflux disease*. Digestion, 2009. **79**(3): p. 186-95.
48. Fitzgerald, R.C., et al., *Diversity in the oesophageal phenotypic response to gastro-oesophageal reflux: immunological determinants*. Gut, 2002. **50**(4): p. 451-9.
49. Souza, R.F., et al., *Gastroesophageal reflux might cause esophagitis through a cytokine-mediated mechanism rather than caustic acid injury*. Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1776-84.
50. Kandulski, A., et al., *Proteinase-activated receptor-2 in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease*. Am J Gastroenterol, 2010. **105**(9): p. 1934-43.
51. Yoshida, N., et al., *Interleukin-8 production via protease-activated receptor 2 in human esophageal epithelial cells*. Int J Mol Med, 2007. **19**(2): p. 335-40.
52. Gehring, W.J., *Homeo boxes in the study of development*. Science, 1987. **236**(4806): p. 1245-52.
53. Brooke, N.M., J. Garcia-Fernandez, and P.W. Holland, *The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster*. Nature, 1998. **392**(6679): p. 920-2.
54. Drummond, F., et al., *Cloning and chromosome assignment of the human CDX2 gene*. Ann Hum Genet, 1997. **61**(Pt 5): p. 393-400.
55. James, R., T. Erler, and J. Kazenwadel, *Structure of the murine homeobox gene cdx-2. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium*. J Biol Chem, 1994. **269**(21): p. 15229-37.
56. Strumpf, D., et al., *Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoblast in the mouse blastocyst*. Development, 2005. **132**(9): p. 2093-102.
57. Beck, F., et al., *Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes*. Dev Dyn, 1995. **204**(3): p. 219-27.

58. Chawengsaksophak, K., et al., *Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice*. Nature, 1997. **386**(6620): p. 84-7.
59. Beck, F., et al., *Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7318-23.
60. Chawengsaksophak, K., et al., *Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(20): p. 7641-5.
61. Keller, M.S., et al., *Cdx1 or Cdx2 expression activates E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and compaction in human COLO 205 cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **287**(1): p. G104-14.
62. Sakaguchi, T., et al., *Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1alpha*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21361-70.
63. Zheng, J.B., et al., *Effects of homeodomain protein CDX2 expression on the proliferation and migration of lovo colon cancer cells*. Pathol Oncol Res, 2011. **17**(3): p. 743-51.
64. Troelsen, J.T., et al., *Regulation of lactase-phlorizin hydrolase gene expression by the caudal-related homeodomain protein Cdx-2*. Biochem J, 1997. **322 (Pt 3)**: p. 833-8.
65. Colnot, S., et al., *Intestinal expression of the calbindin-D9K gene in transgenic mice. Requirement for a Cdx2-binding site in a distal activator region*. J Biol Chem, 1998. **273**(48): p. 31939-46.
66. Miki, K., et al., *Alkaline phosphatase isoenzyme in intestinal metaplasia of the stomach*. Clin Chim Acta, 1977. **76**(1): p. 79-88.
67. Mutoh, H., et al., *Cdx2 specifies the differentiation of morphological as well as functional absorptive enterocytes of the small intestine*. Int J Dev Biol, 2005. **49**(7): p. 867-71.
68. Yamamoto, H., Y.Q. Bai, and Y. Yuasa, *Homeodomain protein CDX2 regulates goblet-specific MUC2 gene expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **300**(4): p. 813-8.
69. Johansson, M.E. and G.C. Hansson, *Mucus and the goblet cell*. Dig Dis, 2013. **31**(3-4): p. 305-9.
70. Modica, S., et al., *Transcriptional regulation of the intestinal nuclear bile acid farnesoid X receptor (FXR) by the caudal-related homeobox 2 (CDX2)*. J Biol Chem, 2014. **289**(41): p. 28421-32.
71. Kaimaktchiev, V., et al., *The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas*. Mod Pathol, 2004. **17**(11): p. 1392-9.
72. Jaffee, I.M., et al., *Expression of the intestinal transcription factor CDX2 in carcinoid tumors is a marker of midgut origin*. Arch Pathol Lab Med, 2006. **130**(10): p. 1522-6.
73. Bai, Y.Q., et al., *Ectopic expression of homeodomain protein CDX2 in intestinal metaplasia and carcinomas of the stomach*. Cancer Lett, 2002. **176**(1): p. 47-55.
74. Eda, A., et al., *Aberrant expression of CDX2 in Barrett's epithelium and inflammatory esophageal mucosa*. J Gastroenterol, 2003. **38**(1): p. 14-22.
75. Osawa, H., et al., *Aberrant expression of CDX2 in the metaplastic epithelium and inflammatory mucosa of the gallbladder*. Am J Surg Pathol, 2004. **28**(9): p. 1253-4.
76. Steininger, H., H. Mueller, and L. Marquardt, *Aberrant expression of CDX2 in metaplastic and inflammatory epithelium of the urinary bladder*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(9): p. 1252.

77. Mutoh, H., et al., *Development of gastric carcinoma from intestinal metaplasia in Cdx2-transgenic mice*. *Cancer Res*, 2004. **64**(21): p. 7740-7.
78. Bonhomme, C., et al., *The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development*. *Gut*, 2003. **52**(10): p. 1465-71.
79. Bakaris, S., et al., *Expression of homeodomain protein CDX2 in colorectal adenoma and adenocarcinoma*. *Histol Histopathol*, 2008. **23**(9): p. 1043-7.
80. Qin, R., et al., *Expression and significance of homeodomain protein Cdx2 in gastric carcinoma and precancerous lesions*. *World J Gastroenterol*, 2012. **18**(25): p. 3296-302.
81. Rawat, V.P., et al., *Ectopic expression of the homeobox gene Cdx2 is the transforming event in a mouse model of t(12;13)(p13;q12) acute myeloid leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(3): p. 817-22.
82. Liu, T., et al., *Regulation of Cdx2 expression by promoter methylation, and effects of Cdx2 transfection on morphology and gene expression of human esophageal epithelial cells*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(2): p. 488-96.
83. Vauhkonen, M., H. Vauhkonen, and P. Sipponen, *Helicobacter pylori infection induces a reversible expression of the CDX2 transcription factor protein in human gastric epithelium*. *Scand J Gastroenterol*, 2008. **43**(8): p. 915-21.
84. Eda, A., et al., *Expression of homeobox gene CDX2 precedes that of CDX1 during the progression of intestinal metaplasia*. *J Gastroenterol*, 2002. **37**(2): p. 94-100.
85. Moons, L.M., et al., *The homeodomain protein CDX2 is an early marker of Barrett's oesophagus*. *J Clin Pathol*, 2004. **57**(10): p. 1063-8.
86. Nakos, A., et al., *The histological and immunohistochemical aspects of bile reflux in patients with gastroesophageal reflux disease*. *Gastroenterol Res Pract*, 2011. **2011**: p. 905872.
87. Iftikhar, S.Y., et al., *Bile reflux in columnar-lined Barrett's oesophagus*. *Ann R Coll Surg Engl*, 1993. **75**(6): p. 411-6.
88. Sun, D., et al., *Bile acids but not acidic acids induce Barrett's esophagus*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. **8**(2): p. 1384-92.
89. Nehra, D., et al., *Toxic bile acids in gastro-oesophageal reflux disease: influence of gastric acidity*. *Gut*, 1999. **44**(5): p. 598-602.
90. Dvorak, K., et al., *Bile acids in combination with low pH induce oxidative stress and oxidative DNA damage: relevance to the pathogenesis of Barrett's oesophagus*. *Gut*, 2007. **56**(6): p. 763-71.
91. Asanuma, K., et al., *In oesophageal squamous cells, nitric oxide causes S-nitrosylation of Akt and blocks SOX2 (sex determining region Y-box 2) expression*. *Gut*, 2015.
92. Goldstein, S.R., et al., *Development of esophageal metaplasia and adenocarcinoma in a rat surgical model without the use of a carcinogen*. *Carcinogenesis*, 1997. **18**(11): p. 2265-70.
93. Chen, X., et al., *An esophagogastrroduodenal anastomosis model for esophageal adenocarcinogenesis in rats and enhancement by iron overload*. *Carcinogenesis*, 1999. **20**(9): p. 1801-8.
94. Marchetti, M., E. Caliot, and E. Pringault, *Chronic acid exposure leads to activation of the cdx2 intestinal homeobox gene in a long-term culture of mouse esophageal keratinocytes*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 8): p. 1429-36.
95. Kazumori, H., et al., *Bile acids directly augment caudal related homeobox gene Cdx2 expression in oesophageal keratinocytes in Barrett's epithelium*. *Gut*, 2006. **55**(1): p. 16-25.

96. Debruyne, P.R., et al., *Bile acids induce ectopic expression of intestinal guanylyl cyclase C Through nuclear factor-kappaB and Cdx2 in human esophageal cells.* Gastroenterology, 2006. **130**(4): p. 1191-206.
97. Hu, Y., et al., *The pathogenesis of Barrett's esophagus: secondary bile acids upregulate intestinal differentiation factor CDX2 expression in esophageal cells.* J Gastrointest Surg, 2007. **11**(7): p. 827-34.
98. Wex, T., et al., *Gastroesophageal reflux disease does not lead to changes in the secretory leukocyte protease inhibitor expression in esophageal mucosa.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2009. **21**(2): p. 150-8.
99. Wex, T., et al., *A two-step method for the extraction of high-quality RNA from endoscopic biopsies.* Clin Chem Lab Med, 2003. **41**(8): p. 1033-7.
100. Mizoshita, T., et al., *Expression of Cdx1 and Cdx2 mRNAs and relevance of this expression to differentiation in human gastrointestinal mucosa--with special emphasis on participation in intestinal metaplasia of the human stomach.* Gastric Cancer, 2001. **4**(4): p. 185-91.
101. Bornschein, J., et al., *The combined presence of H pylori infection and gastro-oesophageal reflux disease leads to an up-regulation of CDX2 gene expression in antrum and cardia.* J Clin Pathol, 2009. **62**(3): p. 254-9.
102. Vallbohmer, D., et al., *Cdx-2 expression in squamous and metaplastic columnar epithelia of the esophagus.* Dis Esophagus, 2006. **19**(4): p. 260-6.
103. van Baal, J.W., et al., *Cytokeratin and CDX-2 expression in Barrett's esophagus.* Scand J Gastroenterol, 2008. **43**(2): p. 132-40.
104. Zhang, C., et al., *Helicobacter pylori infection, glandular atrophy and intestinal metaplasia in superficial gastritis, gastric erosion, erosive gastritis, gastric ulcer and early gastric cancer.* World J Gastroenterol, 2005. **11**(6): p. 791-6.
105. Lee, B.H., et al., *The Role of CDX2 in Intestinal Metaplasia Evaluated Using Immunohistochemistry.* Gut Liver, 2012. **6**(1): p. 71-7.
106. Peleteiro, B., et al., *Determinants of gastric CDX2 expression: a study in Mozambique.* Eur J Cancer Prev, 2012. **21**(6): p. 532-40.
107. Satoh, K., et al., *Aberrant expression of CDX2 in the gastric mucosa with and without intestinal metaplasia: effect of eradication of Helicobacter pylori.* Helicobacter, 2002. **7**(3): p. 192-8.
108. Langner, C., et al., *Multilayered epithelium at the gastroesophageal junction is a marker of gastroesophageal reflux disease: data from a prospective Central European multicenter study (histoGERD trial).* Virchows Arch, 2014. **464**(4): p. 409-17.
109. Chen, X., et al., *Multilayered epithelium in a rat model and human Barrett's esophagus: similar expression patterns of transcription factors and differentiation markers.* BMC Gastroenterol, 2008. **8**: p. 1.
110. Bus, P., P.D. Siersema, and J.W. van Baal, *Cell culture models for studying the development of Barrett's esophagus: a systematic review.* Cell Oncol (Dordr), 2012. **35**(3): p. 149-61.
111. Barbera, M. and R.C. Fitzgerald, *Cellular origin of Barrett's metaplasia and oesophageal stem cells.* Biochem Soc Trans, 2010. **38**(2): p. 370-3.
112. Goldman, A., et al., *Characterization of squamous esophageal cells resistant to bile acids at acidic pH: implication for Barrett's esophagus pathogenesis.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **300**(2): p. G292-302.
113. Kalabis, J., et al., *A subpopulation of mouse esophageal basal cells has properties of stem cells with the capacity for self-renewal and lineage specification.* J Clin Invest, 2008. **118**(12): p. 3860-9.
114. Jankowski, J.A., et al., *Barrett's metaplasia.* Lancet, 2000. **356**(9247): p. 2079-85.

115. Leedham, S.J., et al., *Individual crypt genetic heterogeneity and the origin of metaplastic glandular epithelium in human Barrett's oesophagus*. Gut, 2008. **57**(8): p. 1041-8.
116. Wang, X., et al., *Residual embryonic cells as precursors of a Barrett's-like metaplasia*. Cell, 2011. **145**(7): p. 1023-35.
117. Quante, M., et al., *Bile acid and inflammation activate gastric cardia stem cells in a mouse model of Barrett-like metaplasia*. Cancer Cell, 2012. **21**(1): p. 36-51.
118. Huo, X., et al., *Acid and bile salt-induced CDX2 expression differs in esophageal squamous cells from patients with and without Barrett's esophagus*. Gastroenterology, 2010. **139**(1): p. 194-203 e1.
119. Kivilaakso, E., D. Fromm, and W. Silen, *Effect of bile salts and related compounds on isolated esophageal mucosa*. Surgery, 1980. **87**(3): p. 280-5.
120. Kauer, W.K., et al., *Composition and concentration of bile acid reflux into the esophagus of patients with gastroesophageal reflux disease*. Surgery, 1997. **122**(5): p. 874-81.
121. Pardon, N.A., et al., *A weakly acidic solution containing deoxycholic acid induces esophageal epithelial apoptosis and impairs integrity in an in vivo perfusion rabbit model*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2016. **310**(7): p. G487-96.
122. Takahashi, Y., et al., *Impact of the composition of gastric reflux bile acids on Barrett's oesophagus*. Dig Liver Dis, 2011. **43**(9): p. 692-7.
123. Shen, C., et al., *Deoxycholic acid (DCA) confers an intestinal phenotype on esophageal squamous epithelium via induction of the stemness-associated reprogramming factors OCT4 and SOX2*. Cell Cycle, 2016. **15**(11): p. 1439-49.
124. Vaninetti, N., et al., *Regulation of CDX2 expression in esophageal adenocarcinoma*. Mol Carcinog, 2009. **48**(10): p. 965-74.
125. Hyland, P.L., et al., *Global changes in gene expression of Barrett's esophagus compared to normal squamous esophagus and gastric cardia tissues*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e93219.

7 Anlage

Primäres *CDX2*-Transkript

Dargestellt ist die Basenfolge des primären *CDX2*-Transkripts (heterogene nukleäre RNA). Die Exone 1 bis 3 sind grau unterlegt. Die spezifischen Primersequenzen sind unterstrichen und fett hervorgehoben (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>, NCBI Reference Sequence: NC_000013.11).

```
1      ctccaacccat tgggtgtctgt gtcattacta atagagtctt gtaaactctc gttaatcacg
61     gaaggccgcc ggcctggggc tccgcacgcc agcctgtggc gggctctccc cgcctctgca
121    gcctagtggg aaggaggtgg gaggaaagaa ggaagaaagg gagggagga ggaggcaggc
181    cagagggagg gaccgcctcg gaggcagaag agccgcgagg agccagcga gcaccgcggg
241    ctggggcgca gccaccgcc gctcctcgag tcccctcgcc cctttccctt cgtgcccccc
301    ggcagcctcc agcgtcggtc cccaggcagc atggtgaggt ctgctcccgg accctgccca
361    ccatgtacgt gagctacctc ctggacaagg acgtgagcat gtaccctagc tccgtgcgcc
421    actctggcgg cctcaacctg gcgccgcaga acttcgtcag cccccgcag taccggact
481    acggcgggta ccacgtggcg gccgcagctg cagcggcagc gaacttgga agcgcgcagt
541    ccccggggcc atcctggccg gcagcgtatg gcgccccact ccgggaggac tggaatggct
601    acgcgccggg aggcgcgcg gccgcgccca acgcctggc tcacggcctc aacggtggtt
661    ccccgccgcg agccatggc tacagcagcc ccgcagacta ccatccgcac caccaccgc
721    atcaccaccg gcaccaccg gccgcgcgcg cttcctgcgc ttctgggctg ctgcaaacgc
781    tcaacccccg cctcctggg cccgcgccca ccgctgccg cgagcagctg tctcccggcg
841    gccagcggcg gaacctgtg gagtggatg ggaagccggc gcagcagctc ctcggcagcc
901    aaggtaaaga gaggtgcgc cccttcggag ggtgcttggg aaggcgcggg tcgagccagt
961    ggtgctgcg cgctgcgcgt ccagtgcga caggggcgtc ccgggctgtc tgggagctcg
1021   gcgccaggag gggcacggc cggagacaaa ttcgggggcc tctggcccgt cggggcttct
1081   ctgacctact gagcctggga gtgaatattc tgagtctcaa caccgtgttc aggcgtcctc
1141   tttccaagag ctctcattc gcaaccccgg gacaccttcg ggaagctccg ggaatgtcg
1201   gcgtgagcac tgctggacgc cggcagaatc gcgtcctccg gcacttgctg cggcatgcat
1261   tccttgctg gctcctggcc gccgaggaga gagggaggct cgaaccttct tgggctaggt
1321   ctaggccatt tatctccgct ctctcttcc ccatctgagc catctaagaa gagaagtgac
1381   ctgggggggt cggaggatgg ctaggctgtg tgtgggaccg ggtttggcca ctcgggcca
1441   ttcaaggtac agcagcagg cagaccagg agagctgctg tcgctgggaa gaaggtgcta
1501   gccccagctg ctaaggcagc gggggcgcgc cccgtctctg aacctctgac ctgtgaaggg
1561   gtcatttcaa gcaaaagctg gaaggctagg ggcaagaagc ctaggggagc gcgtctcgg
1621   agagagcagg gagacgggga ggaaccctg gtgggaatta agccgccgt ccaggtaggg
1681   gctattctc ccaaagctc cttcaaggg tgtcagggat gctctgagt gctgtgtg
1741   aactgaaaaa gatcctaggt ttgccggact gtggggctca ttgactctgg gctctgctc
1801   tctggtgttc gagtgtgcct agaggtggca aggaagtgcg gtggggagag tcctagttga
1861   gtgcccctt taaagtctt ccccagcct cagcgtctc gcttttctg cttcgtcct
1921   tgatgcccc aattggcagg cacgctggtt atgggactt tgcaagatt tatagccaat
1981   tacaactgta taaatcaaag cgccctttg gggctgtctc tgggcatcgg tttctgcgtc
2041   actgtgcaca tgctaggag agtcctgtg ggaatgccc gaccgggga gaaggccaca
2101   gatcagcctc ggggtgacct cagagcttg gcttggtccc ttctcctaga ggaggcctc
2161   ttctcctagc aggggtccc agatcctggc tcccaaagac ccactttcta cagcccctgt
2221   ctggggcgcg gttggcggg gtggcgcac ccctaaggaa gaccttgcg tgtcccggga
2281   gagcggccgc ggggtgagg ccgggaagg ggcgggagg aagccgcag agcccagcc
2341   gcggggtcag cagatgagag gccgctgta agtcctgcg cgaggtggca agccgcagt
2401   cggcggggg tgccctgtg atgttaatgt ggggtggccg cagcccgcg gccggagccg
2461   ggctcctctg cggagcgtca tctgtcaagg tgtgggggtg gaggggggga cgcggcctg
2521   cttgctttga tataacctt cccagcctg ccattgtctc ttttagggcc cggaaagagg
2581   gtggtgactt tcgcagtaa taatgaatc tgacaagtcc ctctcatccc tcccctccat
2641   agccccgctc ctaggttccc aggggtgtg gggcgctcc aaggccctg gggcatgggt
2701   cgaagagcgc tcaggtctg gtcacgcgt tgcccggcag gtcgggaca ctgaaggggc
2761   agcaccgag caagggtcgc tccgagacac ttccaggcga gtctcccctc cggggtgtc
2821   ggctgaggga actgccctgc gcctcagctc cggaggtgtc ctctgtggct ccagccaggc
2881   tccgggtcca accccgctg atactatctg cgtgaccgg tctgattctc catttctca
2941   tctgtaaaaa ggggcgagta ccaatggcag cctggagtgg gtttgaggcg gtcacgcgtg
3001   tccgagcgtc caccgcggag aaagtccgt tagttccctt tactttcata gcaggcgcg
3061   ggtcggggc gcagcccac tcaaatgccc ctgcagggtc gttttatgt taatgcctc
3121   ggcggggagg gggatgaaag cccggggcgc catttgctca gtagtggtaa ttcaaacaga
3181   atgtggtgtg tattaaggca ttgaaagggc ttttctttga taagatcgcc ttgtcctgca
3241   ttgtttgcg ctgtgttggc ctttcagcgc ctcgggggag ctcccctgta tcaggcctgt
3301   atcttcccag gacgctttt ttgtggtttg caaagggtt tacctgaaca aagtcagcct
```

3361 gcggggcatt aaacacctcc aggcaactcc caggcccttc agatctttct gtgggattgg
3421 gcactgggcg attgaacctg ttcagctgca agaagaccca aaagtgggac ggagccagag
3481 agaacagctt ctggccaggg ctctgccaag ggctgagcca agacagacct ggtggagacg
3541 ccaggctcgg gacctgctca acattgtgga cactatttgt caaggccctt cagtaaaaca
3601 atcaatctgg gatttaatat gttgactcaa tccaatgagc atagatcact ggtcaggata
3661 actctggccg gatttgacgc aggaataaat ggaggatcaa aaaagaaaaa gtaccaaacg
3721 ccaaacctgg tctgggcagg tataaagtgt ccccagcagg aggggttttc tgcctgttcc
3781 ctcgcccaga gccagctca gaattccacc tgatgggctt ggtgtgtctg ggggatgatt
3841 ctggcgactt gtcagctcct gagccccgtt tccacttgt agtaaagcaa agtagtaacc
3901 cccacacccc ctctacaaca tgtgccaca atgacagctg ttttcggggt gggcttccat
3961 ctctggtagg cctggaaatc tggatgcttc caggatcccg gccacttcac cctgccccct
4021 ttccttgggt gtcaaatata tgccagtact gtatttgggt taccgaaagg gtggttacat
4081 tctgctgtct tctgtgtgaa tgaggttttc actttcctta atttttaaaa accacttaat
4141 accaaggtta gtttagttgc ctccactagc ctcatacctt cccccacag gacctctgg
4201 ggggtcttgt cagacttggc aggaaccagc caaaccggg cccccaggg tgggtgagga
4261 agagaaatgt ccctgggta gggaggtttg tcattaccca tgactgatgg gctgcttgc
4321 agttctcagc cctcacttct ccttctcca cagtgaaac caggacgaaa gacaaatc
4381 gagtgggtga cacggaccac cagcggctgg agctggagaa ggagtctcac tacagtcgt
4441 acatcaccat ccggaggaaa gccgagctag ccgccacgct ggggctctct gagaggcagg
4501 tggggaccgc ctagctccct ccgggggggc cactgcttgg cagaggacca tgagagttag
4561 aaaatctggc tgcaggggcc atctaactct gtggagagac tgaagcagga ggggtcaagc
4621 attgctcttt ggagtccttt tttttttttt tttttttttt aaacagagat ggggtcttgc
4681 tttgtggccc aggctggagt gtagtggcac aatcatagct cactgcagcc ctgacttctt
4741 gagctgaagg gatcctcctg cctcagtcac ctgagtagct tggactacag gctcagacca
4801 ccatgactgg ctaatgttta aattttttgc agagatggtc tctactgtctt acccaggtt
4861 gtctcaaac ccaaagtctc ctctgtctt ggactcctaa agtgetgaga ttaccggtgt
4921 gaaccaccat gcctggcctg gaagtacaac cccccaccc gccaccgtcg aaacgcagtt
4981 tctactctgt tgtgcaggct gaagtcaat ggcgcggtct cagctcactg caacctctgc
5041 ctcccgggtt caagcgattc tctgtctca gcctcccaa tagctgggac tacaggcatg
5101 tgccaccacg cccggctaat tttgtatttt tagtagaaat gcggtttctc catgttagtc
5161 aggctagtct cgaactcctg gcctcaggtg atccaccgc ctcggcctcc caaagtctt
5221 agattacagg tgtgagccac tgtgctggc cctggagtac ttttttaaaa agcctcttcc
5281 tacctttagt cctctttttt tgatgtgttt gattttttct gtctctctct tttgaggtat
5341 ataagaagtg tgaaaaacag ccaagggtat tagtttaatc cagaattcca tttgggtcta
5401 taaagacata ttaaagacct attctctttg tttccagcac tgtacctaaag aaaataaact
5461 gaataaagta ctcagctctc cacaaaaact agagggacaa gacttggttc atgaacattt
5521 tatatatata gtctagaaaa acaggccaac ttcacagcca ggaagccaca aaattaatc
5581 tcattttcag ctctaaggtg aggaataa cgttttagtt tagccttgag gggccaaagg
5641 ttgccatttg aagtatacca cccagcactg gcctcccttt gctgtgtaga aaggccttg
5701 cagtttcagt tttccttggg tctgagactt taaactttg cagtaaatac gtagataaaa
5761 gttgctttga aaagaaactc agggagcaag gaaggaggaa gactcttccc catgaggctg
5821 aattgggctt aagaatggat ccagggttgg gctgttatgg ggatgccga ggaagcttcc
5881 tagaaggact tggagtctg tagctggagc agaagatgtt gatgatactg ctgggtactg
5941 ttctctttt cctcacatc ttcaccacaa tgtgctttt tccaccttc cacttctagg
6001 ttaaaatctg gtttcagaac cgcagagcaa aggagaggaa aatcaacaag aagaagtgc
6061 agcagcaaca **gcagcagcag ccaccacagc** cgcctccgcc gccaccacag cctccccagc
6121 ctcagccagg tcctctgaga agtgtcccag agcccttgag tccgggtgtct tccctgcaag
6181 cctcagtgcc tggctctgtc cctggggttc tggggccaac tgggggggtg ctaaacccca
6241 ccgtcaccca gtgaccacc gggttctgca gggcagagc aattccagc tgagccatga
6301 ggagcctgga ctctgctaga ctctcagga gagaccctc ccctcccacc cacagcata
6361 gacctacaga cctggctctc agaggaaaaa tgggagccag gagtaagaca agtgggattt
6421 ggggctcaa gaaatatact ctcccagatt tttactttt cccatctggc ttttctgcc
6481 actgaggaga cagaaagcct ccgctgggct tcattccgga ctggcagaag cattgctgg
6541 actgaccaca ccaaccaggc cttcatcctc ctccccagct cttctcttcc tagatctgca
6601 ggctgacact ctggctagag ccgaggggag agagggactc aagggaaggg caagcttgag
6661 gccaagatgg ctgctgctg ctcatggccc tccgaggtcc agctgggctt cctgctccg
6721 ggcaggcaag gtttactctg cggaaagcaa aggcagctaa gatagaaagc tggactgacc
6781 aaagactgca gaacccccag gtggcctgct tcttttttct cttcccttcc cagaccagga
6841 aaggcttggc tgggtgatgc acagggtgtg gtatgagggg gtggttattg gactccagc
6901 ctgaccaggg ggcccgaaca gggacttgtt tagagagcct gtcaccagag cttctctggg
6961 ctgaatgtat gtcagtgcta taaatgccag agccaacctg gacttctgt catttca
7021 atcttggggc tgatgaagaa gggggtgggg ggagtgtgtg ttgttgttgc tgtgtttgg
7081 gttgttggtc tgtgtaacat ccaagccaga gtttttaaa cttcttggat ccatgggggg
7141 agaagtgata tgggtgaagg aagtggggag tatttgaaca cagttgaatt ttttcaaaa
7201 agaaaaagag ataaatgagc tttccagatt tcagattctg tatttatctt cagattttgt
7261 ctgcaactat tttttatttt ttaaagaaat gaaatatctt ctctgcttgc aagctgattt
7321 ggaaattca gagagggagt ggagattatc tggacagcct cattttacc cagacatca
7381 gaagcctgaa agagcaggtt ctgagacctt ccctgcccc aagcctgagc ccagccttgg
7441 aatgcgtggc tctcctgggg gtgcctttgg gcaaaatgca catctgaatg gccaggtgct
7501 tcccagcagt cagaaattat ggggggtggg ggtgagaggg cccctcata gcatctacc
7561 aatccacat ggaggctttt tgcaaacagc aggcagtcc cttctgcagt gactccctcc

7621 taaggacgcc ccacaacca gctagttaa cgtgagcatt aaatTTTTT taaaaaaaaat
7681 cccctagtt tcccaagaca gcatttccat gaatttagtc ttctgtaaT cactgggcat
7741 ttccgtgagc ctttctgcc tccactctct tctctgtctt tgcagtttcc ttatccccga
7801 ccgcgcccc cttccaacc caatcacccc acaacaaga tttctagacc cagtataaaa
7861 tgatcctttt agtgacagtt tcttgttatc tggccgatcc actggggacc gggctgcagc
7921 ctttaaaatt ttgatcctg gaggccgcc agctgaactt tccggcagga cccgggcgag
7981 gggggcttag cccttcgtt cgatcttccc accaacatcc gagagcctaa tcagcgcgcc
8041 cacggaggcg ccttaagggc agttggggaa gatgagcaga gccgggaaac agcaagaggt
8101 atagaccctc tgcagcacct ctccaattcc gcggccctc cgggtggcgt atacagctcc
8161 aggattggga aaggggtcc ggtggcccgg cccgcggcg cctggcctcg aagccagagg
8221 gaggagtgcg gggcgtgggg tcggggggtg ccgggcagag gaggaagccg tgtccgggtc
8281 cgctgggcga ggggtcctgg gtcaggggtc ctgggtcagg gccggtctga gccccggtgc
8341 cccgcaggtc tccccgcgcc ccggccgcgc ccacaggccc gccccctagc cgccggggtt
8401 gctatgcggt gccgtgaaac gcctgtcaat aaacctggt tggacagtgg a

Erklärung

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

„Expressionsanalyse des Transkriptionsfaktors *CDX2* im Rahmen der gastroösophagealen Refluxkrankheit und in epithelialen Zellkulturen“

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

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

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

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

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

Traunstein, 25. Juli 2016

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Peter Malfertheiner für die Möglichkeit, diese Promotion an seiner Klinik durchzuführen. Ihm bin ich sehr dankbar für die vermittelte Begeisterung für die Gastroenterologie, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die freundliche Unterstützung der Arbeit.

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wex für die fachliche Betreuung der Arbeit aussprechen. Für seine Unterstützung während aller Phasen der Arbeit, seine Geduld, seine Zuverlässigkeit und sein allzeit offenes Ohr bin ich unglaublich dankbar.

Für die klinische Betreuung der Studie und die Entnahme und Bereitstellung der Mukosaproben danke ich dem Team der Endoskopie, im Besonderen Herrn Prof. Dr. Klaus Mönkemüller. Außerdem danke ich Frau Prof. Dr. Dörthe Jechorek für die Betreuung und Auswertung der immunhistochemischen Färbungen. Allen Mitarbeiterinnen des Forschungslabors sei herzlichst für ihre Unterstützung gedankt: Liebe Nadine Schüler, Simone Philipsen, Marion Holley und Ursula Stolz, die Zusammenarbeit mit Euch hat mir viel Freude bereitet!

Meinen wunderbaren Eltern und meinem wunderbaren Mann danke ich von ganzem Herzen für den großen Rückhalt!

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Originalartikel

T. Wex, K. Mönkemüller, D. Kuester, S. Weise, S. Kropf, L. Fry, A. Stahr, S. Völkel, A. Roessner, P. Malfertheiner
Gastroesophageal reflux disease does not lead to changes in the secretory leukocyte protease inhibitor expression in esophageal mucosa.
Eur J Gastroenterol Hepatol, 2009. 21(2): p. 150-8.

T. Wex, K. Mönkemüller, A. Stahr, D. Kuester, L. Fry, S. Völkel, A. Kandulski, A. Roessner, P. Malfertheiner
Gastro-oesophageal reflux disease is associated with up-regulation of desmosomal components in oesophageal mucosa.
Histopathology, 2012. 60(3): p. 405-15

Abstracts, Poster und Vorträge

S. Völkel, T. Wex, K. Mönkemüller, A. Stahr, D. Kuester, L. Fry, P. Malfertheiner
Die Genexpression des Transkriptionsfaktors Cdx2 ist im Antrum von Patienten mit gastroösophagealer Refluxkrankheit unabhängig von der endoskopischen Ausprägung (nicht-erosiv/erosiv) erhöht.
16. Jahrestagung der Mitteldeutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, 10. - 12.05.2007, Dessau

A. Stahr, T. Wex, K. Mönkemüller, L. Fry, S. Völkel, S. Kolfenbach, P. Malfertheiner
Die Genexpression desmosomaler Komponenten ist unabhängig von der endoskopischen Ausprägung der gastroösophagealen Refluxerkrankung im Plattenepithel erhöht.
16. Jahrestagung der Mitteldeutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, 10. - 12.05.2007, Dessau

T. Wex, D. Küster, K. Mönkemüller, L. Fry, S. Kolfenbach, A. Stahr, S. Völkel, A. Roessner, P. Malfertheiner
Claudin-1 expression in squamous epithelium - a molecular marker for the differentiation between erosive and non-erosive reflux disease?
Digestive Disease Week, AGA, May 19 - 24, 2007, Washington DC, USA

A. Stahr, T. Wex, K. Mönkemüller, L. Fry, S. Völkel, S. Kolfenbach, D. Küster, A. Roessner, P. Malfertheiner
The gastroesophageal reflux disease is associated with increased gene expression of desmosomal components in squamous epithelium independent of endoscopic grading.
European Bridging Meeting in Gastroenterology & EAGE Postgraduate Course, November 22 - 24, 2007, Magdeburg, Germany

K. Mönkemüller, T. Wex, D. Kuester, A. Stahr, S. Völkel, L. Fry, P. Malfertheiner
Die desmosomalen Proteine Desmoglein und Plakoglobin sind bei Patienten mit nicht-erosiver und erosiver Refluxerkrankung unabhängig von der endoskopischen Ausprägung der gastroösophagealen Refluxerkrankung erhöht.
63. Jahrestagung der DGVS, 30.09. - 04.10.2008, Berlin, Deutschland

K. Mönkemüller, T. Wex, D. Kuester, S. Weise, S. Kropf, L. Fry, A. Stahr, S. Völkel,
A. Roessner, P. Malfertheiner
Gastroesophageal reflux disease does not lead to changes of the SLPI expression in cardiac and esophageal mucosa.
16th United European Gastroenterology Week, October 18 - 22, 2008, Vienna, Austria

T. Wex, A. Stahr, K. Mönkemüller, D. Küster, S. Völkel, L. Fry, A. Roessner,
P. Malfertheiner
Gastroesophageal reflux disease is associated with molecular changes in the architecture of desmosomes in the esophageal mucosa.
Digestive Disease Week, AGA, May 29 - June 04, 2009, Chicago, USA

T. Wex, D. Kuester, K. Mönkemüller, A. Stahr, S. Völkel, L. Fry, A. Roessner,
P. Malfertheiner
Die Gastroösophageale Refluxerkrankung ist mit Genexpressionsveränderungen desmosomaler Protein in der Ösophagusschleimhaut assoziiert.
93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V., 04. - 08.06.2009, Freiburg, Deutschland (Vortrag)

Preise

S. Völkel, J.-U. Jetschmann, M. Plauth
Erfolgreiche Therapie einer Colitis Crohn mit Cyclophosphamid nach Sekundärversagen von Infliximab und Adalimumab
Posterpreis der Gesellschaft für Innere Medizin Sachsen-Anhalt,
Jahrestagung 02. - 03.12.2011, Magdeburg