

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

Charakterisierung der miR-155 Veränderungen im Helicobacter pylori –
Magenkarzinogenese Mausmodell

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

Kathleen Pott geb. Dahnke

Aus

Ludwigslust

Magdeburg

2024

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Pott, Kathleen:

Charakterisierung der miR-155 Veränderungen im *Helicobacter pylori* – Magenkarzinogenese Mausmodell. – 2024. - 76 Bl., 16 Abb., 9 Tab., 0 Anl.

Kurzreferat

H. pylori ist ein wesentlicher Risikofaktor bei der Karzinomentstehung des Magens. In den meisten Fällen verläuft die Infektion asymptomatisch und nur ein kleiner Teil der Betroffenen entwickeln, entsprechend der Kaskade präneoplastischer Veränderungen, Magenkarzinome. Zahlreiche genetische und epigenetische Faktoren und die Interaktion des Immunsystems mit der Umwelt sind mit den unterschiedlichen Phänotypen assoziiert. MiRNAs regulieren die Expression ihrer Zielgene und können aufgrund ihrer Stabilität und Nachweisbarkeit in Körperflüssigkeiten und -geweben als molekulare Biomarker für bestimmte Erkrankungen geeignet sein. Die normale Magenschleimhaut zeigt ein einzigartiges miRNA-Expressionsmuster. Existierende Daten deuten darauf hin, dass die miR-155 eine besondere Rolle bei der *H. pylori* Infektion und der Kaskade der Magenkarzinogenese spielen könnte. In dieser Studie, wurde ein etabliertes Magenkarzinogenese INS-GAS-Mausmodell verwendet, bei dem die Tiere präkanzeröse Veränderungen und schließlich Karzinome entwickeln, um die miR-155 - *H. pylori* Achse im Mausmodell besser charakterisieren zu können. Wir führten Genexpressionsanalysen der miR-155 durch, die Rückschlüsse des Einflusses auf die T-Zellen zulassen und den Zusammenhang zur Karzinomentstehung darlegen. Mit dem Fortschreiten der Correa-Kaskade und der *H. pylori* Infektion beobachteten wir einen allmählichen Anstieg der miR-155 in Gewebeproben des Magenkorpus der INS-GAS-Maus. Mit Hilfe der miR-155 Expression evaluierten wir ein von uns entwickeltes Scoring-System zur Objektivierbarkeit des Th17/T_{reg}-Gleichgewichts. Zusammenfassend konnte ein Anstieg der Expression der miR-155 mit zunehmender *H. pylori* Infektion und dem Fortschreiten der Correa-Kaskade gezeigt werden. Weitere Studien sind notwendig um die therapeutische Relevanz der miR-155 Manipulation in Bezug auf die Erkrankungsentwicklung zu untersuchen und die Rolle in Prädiktion und Entwicklung von neoplastischen Veränderungen als potentielle Biomarker zu evaluieren.

Schlüsselwörter: microRNA, miR-155, *Helicobacter pylori*, INS-GAS, Biomarker.

INHALT

DOKUMENTATIONSBLATT	2
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
TABELLENVERZEICHNIS	7
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	8
1 EINLEITUNG	9
1.1 Helicobacter pylori	9
Bakteriologie und Virulenzfaktoren	10
1.2 Das Magenkarzinom	10
1.3 INS-GAS-Mausmodell	12
1.4 Micro-Ribonukleinsäure	13
1.4.1 Geschichte und Einleitung	13
1.4.2 Biogenese	13
1.4.3 MiRNA und das Magenkarzinom	15
1.4.4 MiRNA-155	15
1.5 Immunologische Prozesse im Magenkarzinom	16
1.5.1 Das angeborene und das erworbene Immunsystem	16
1.5.2 Immunantwort durch Helicobacter pylori	16
1.5.3 CD4 ⁺ -T-Helferzellen	17
1.6 Rolle der miRNA-155 auf die Immunreaktion	19
1.7 Fragestellung und Ziele der Arbeit	20
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Material	22
2.1.1 Versuchstiere	22
2.2 Methoden	23
2.2.1 Tierhaltung	23
2.2.2 Infektion	23
2.2.3 Probengewinnung	23
2.2.4 Präparation der RNA aus Gewebe	24
2.2.5 Konzentrationsbestimmung der RNA	25
2.2.6 Genexpressionsanalysen	25
2.2.7 Statistische Auswertung	29
2.2.8 Eigenanteil	29

3	ERGEBNISSE	30
3.1	Charakterisierung der Versuchstiere	30
3.2	MiRNA-155	31
3.2.1	Genexpressionsanalysen der miR-155	31
3.2.2	Geschlechtsspezifische Expression der miR-155	33
3.3	Th17-Zellen	33
3.3.1	Gruppenanalysen - Transkriptionsfaktor RORyt und Interleukin-17	33
3.3.2	Korrelationsanalysen - Transkriptionsfaktor RORyt und Interleukin-17	36
3.4	Regulatorische T-Zellen	39
3.4.1	Gruppenanalysen - Transkriptionsfaktor FoxP3 Interleukin-10	39
3.4.2	Korrelationsanalysen - Transkriptionsfaktor FoxP3 und Interleukin-10	42
3.5	Th17 und T_{reg}- Balance	43
3.5.1	Th17/T _{reg} - Scoring	43
3.5.2	Korrelationsanalyse - miR-155 und Th17/T _{reg} -Score	45
4	DISKUSSION	46
4.1	Charakterisierung der INS-GAS-Maus und des Mauskollektivs	46
4.2	Rolle von miR-155	47
4.3	Geschlechterabhängigkeit	49
4.4	Der Einfluss der miR-155 auf das Immunsystem	50
4.4.1	Der Einfluss der miR-155 auf Th17-Zellen	50
4.4.2	Der Einfluss der miR-155 auf regulatorische T-Zellen	52
4.5	MiR-155-Modulationsmechanismen der Th17- und T _{reg} -Balance	54
4.6	Th17/T _{reg} – Scoring	56
4.7	Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus	57
4.7	Limitationen	58
4.8	Ausblick	59
5	ZUSAMMENFASSUNG	61
6	LITERATURVERZEICHNIS	62
7	DANKSAGUNGEN	71
8	EHRENERKLÄRUNG	72
9	ERKLÄRUNG ZUR STRAFRECHTLICHEN VERURTEILUNG	73
10	DARSTELLUNG DES BILDUNGSWEGES	74
11	ANLAGEN	76

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
§	Paragraph
Abb.	Abbildung
AGO 2	<i>„Argonaute 2“</i>
ALPS	Autoimmun-Lymphoproliferatives Syndroms
AP-1	Aktivatorprotein-1-Komplex
<i>Aqua dest.</i>	Destilliertes Wasser
AT	<i>„annealing“</i> Temperatur
BIC	<i>„B-Cell-Integration-Cluster“</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Cag A	<i>„cytoxin-associated gene A“</i>
CXW	Kathepsin-X-defiziente Knockout-Mäuse
d. h.	das heißt
DNA	<i>„deoxyribonucleic acid“</i> /Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	<i>„double strand“</i> -DNA
DGCR 8	<i>„DGCR 8 microprocessor complex subunit“</i>
et al.	<i>et alii</i> /und andere
<i>FOXO 01</i>	<i>„Foxhead box protein 01“</i>
<i>FoxP3</i>	<i>„Forkhead-Box-Protein P3“</i>
g	Gramm
GATA3	<i>„GATA Binding Protein 3“</i>
<i>H. felis</i>	<i>Helicobacter felis</i>
<i>H. pylori/H. p.</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>HpSS1</i>	<i>Helicobacter pylori Sydney Stamm 1</i>
IL	Interleukin
IG-Maus	INS-GAS-Maus (<i>„insulin-gastrin transgenic mice“</i>)
IVC	<i>„individually ventilated cages“</i>
INF- γ	Interferon γ
JAK	Januskinase
KO	<i>„knockout“</i>
KO IG	nicht infizierte Kontrollgruppe für IG
l	Liter
m	Meter
m-	milli-
MAG	multifokale atrophische Gastritis
MALT	<i>„mucosa-associated lymphatic tissue“</i>
mRNA	<i>„messenger“</i> -RNA
miRNA	<i>„micro“</i> -RNA
miRISC-Komplex	<i>„micro-RNA-induced silencing complex“</i>
pri-miRNA	pri- <i>„micro“</i> -RNA
pre-miRNA	pre- <i>„micro“</i> -RNA
NF- κ B	Transkriptionsfaktor <i>„kappa-light-chain-enhancer“</i>
PCR	<i>„polymerase chain reaction“</i> /Polymerasekettenreaktion

RNA	, <i>ribonucleic acid</i> ‘/Ribonukleinsäure
RORyt	, <i>RAR-related orphan receptor gamma</i> ‘
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
snoR202	, <i>housekeeping gene snoR202</i> ‘
SOCS 1	, <i>suppressor of cytokine signaling 1</i> ‘
sog.	Sogenannt
STAT	, <i>signal transducers and activators of transcription</i> ‘
T4SS	, <i>type IV secretion system</i> ‘
Tbet	, <i>transcription factor encoded by TBX21</i> ‘
TGF- β	, <i>transforming growth factor β</i> ‘
Th1	Th1-Helferzellen
Th2	Th2-Helferzellen
Th17	Th17-Helferzellen
TierSchG	Tierschutzgesetz
T _{Fh}	Follikuläre T-Helferzellen
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
Vac A	, <i>Vacoullating cytotoxin A</i> ‘
wpi	, <i>weeks post infectionem</i> ‘
z. B.	zum Beispiel
μ	mikro
μm	Mikrometer
%	Prozent

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Material RT</i>	26
<i>Tabelle 2: Arbeitsschritte RT</i>	26
<i>Tabelle 3: Material – Quantitative Real-Time PCR</i>	28
<i>Tabelle 4: Arbeitsschritte – Quantitative Real-Time PCR</i>	28
<i>Tabelle 5: Material – Quantitative TaqMan-PCR</i>	28
<i>Tabelle 6: Arbeitsschritte – Quantitative TaqMan-PCR</i>	28
<i>Tabelle 7: Darstellung der Versuchstiere einschließlich der Alters- und Geschlechterverteilung</i>	30
<i>Tabelle 8: Übersicht erhobener Korrelationsanalysen zwischen miRNA-155 und RORyt sowie zwischen miRNA-155 und IL-17</i>	37
<i>Tabelle 9: Übersicht erhobener Korrelationsanalysen zwischen miR-155 und FoxP3 sowie zwischen mi4-155 und IL-10</i>	42

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: Schematische Darstellung der Krankheitsentstehung durch H. pylori</i>	12
<i>Abb. 2: MiRNA-Biogenese</i>	14
<i>Abb. 3: T-Zell-Differenzierung bei einer Helicobacter-Infektion</i>	19
<i>Abb. 4: miR-155 Expression im Magengewebe von IG-Mäusen</i>	32
<i>Abb. 5: Geschlechtsspezifische miR-155-Expression</i>	33
<i>Abb. 6: IL-17- und RORyt-Genexpression im Magengewebe von KO IG</i>	34
<i>Abb. 7: IL-17- und RORyt-Expression im Magengewebe von IG-Mäusen</i>	35
<i>Abb. 8: Korrelation zwischen RORyt-Expression und miR-155-Expression</i>	36
<i>Abb.9: Korrelation zwischen RORyt -Expression und miR-155-Expression</i>	37
<i>Abb. 10: Korrelation zwischen IL-17-Expression und miR-155-Expression</i>	38
<i>Abb. 11: IL-10- und FoxP3-Expression im Magengewebe von KO IG</i>	39
<i>Abb. 12: IL-10 und FoxP3-Expression im Magengewebe der IG-Maus</i>	41
<i>Abb. 13: Korrelation zwischen IL-10-/Foxp3- und der miR-155-Expression</i>	43
<i>Abb. 14: Verhältnis der (RORyt+IL-17)/(FoxP3+IL-10)-Expression</i>	44
<i>Abb. 15: Korrelation zwischen der miR-155-Expression und Th17/T_{reg}-Score</i>	45
<i>Abb. 16: Regulation der Th17- und T_{reg}- Zelldifferenzierung und -funktion durch miR-155</i>	56

1 Einleitung

1.1 *Helicobacter pylori*

Bereits um das Jahr 1900 wurden spiralförmige Bakterien in den Mägen von Hunden und Katzen sowie beim Menschen dokumentiert (1). Eine dauerhafte Besiedlung wurde jedoch aufgrund der im Magen vorherrschenden lebensfeindlichen Bedingungen, wie dem sauren pH-Wert, über einen langen Zeitraum ausgeschlossen. Die australischen Ärzte Berry Marshall und Ben Robin Warren beschrieben im Jahr 1983 ein, in der Magenmukosa von Patienten mit chronischer Gastritis und gastroduodener Ulkuskrankheit vorkommendes, spiralig gekrümmtes Bakterium. Sie konnten dieses gramnegative, mikroaerophile Stäbchen bei der Mehrzahl der Patienten nachweisen und auf unselektiven Nährböden anzüchten. Dr. Marshall unternahm 1984 einen Selbstversuch, um seine Hypothese zu verifizieren. Er führte sich die Bakterien durch das Trinken einer Suspension selbst zu, litt kurze Zeit später unter einer Gastritis und heilte sich durch die Einnahme von Antibiotika.

Zunächst wurde das Bakterium aufgrund klassischer Merkmale der Gattung ‚*Campylobacter*‘ zugeordnet und *Campylobacter pyloridis*, später *Campylobacter pylori*, genannt (2). Nach genauerer Untersuchung regten Goodwin et al. aufgrund biochemischer und struktureller Unterschiede zu *Campylobacter* an, den Keim einer eigenen Gattung zuzuordnen; es folgte die Umbenennung in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (3, 4). Im Jahr 2005 wurde Marshall und Warren (2) für diese Entdeckung der Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen. Seit der Entdeckung wurde der Zusammenhang zwischen *H. pylori* und verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen wie Magen- und Duodenalulkus, Adenokarzinom des Magens und MALT-Lymphom intensiv erforscht und 1994 wurde *H. pylori* durch die WHO als Karzinogen erster Ordnung eingestuft (5). Inzwischen gilt *H. pylori* als Hauptverursacher chronischer Gastritiden und der Ulkuskrankheit. Über 50 % der Weltbevölkerung sind mit *H. pylori* infiziert (6). Die Prävalenz unterliegt abhängig von geografischer Lokalisation und sozioökonomischem Status einer starken Schwankung. Die Infektion erfolgt häufig vertikal von der Mutter auf das Kind und persistiert, ohne Eradikation, lebenslang (7). *H. pylori* kann mit nicht invasiven (¹³C-Harnstoff-Atemtest, Stuhlantigennachweis) und invasiven Testverfahren (Histologie, Kultur, Urease-Schnelltest) nachgewiesen werden (8).

Bakteriologie und Virulenzfaktoren

H. pylori ist ein spiralig gewundenes, gramnegatives und durch vier bis sechs unipolar angeordnete Flagellen bewegliches Stäbchenbakterium mit einer Länge von 2–4 µm und einer Breite von 0,5–1 µm (9). Es wächst unter mikroaerophilen Bedingungen mit geringem Sauerstoffanteil von 2–5 %, einem Kohlendioxidanteil von 5–10 % und einer Umgebungstemperatur von 37 °C (10). Das Bakterium besitzt eine Reihe von Faktoren, die für die Invasion und die Induktion einer akuten und später chronischen Infektion zentral sind. Dabei hängt das Ausmaß der Entzündung von wirtsabhängigen Faktoren und stammspezifischen Unterschieden ab. Als erstes ist das Enzym *Urease* zu nennen. *H. pylori* produziert große Mengen des Enzyms, das den im Magen vorhandenen Harnstoff in Ammoniak und Kohlendioxid umwandelt, um sich vor dem sauren pH-Wert des Magens zu schützen (11). Die Mobilität ist für die Infektion neuer Wirtsorganismen und zusammen mit der *Urease* für die Kolonisation unabdingbar. Durch die Flagellen, die aus jeweils einem Geißelfilament und einer Flagellenhülle bestehen, ist das Bakterium in der Lage, sich im mukösen Schleim zu bewegen und die Epithelzellen zu erreichen (9). Im Tiermodell verlieren weniger bewegliche Stämme von *H. pylori* durch eine Mutation eines der für das Geißelfilament kodierenden Gene *flA* und *flB* die Fähigkeit, den Magen dauerhaft zu besiedeln (12). Zum Schutz vor der Peristaltik des Magens besitzen *H. pylori*-Stämme Oberflächenmembranproteine, die als Adhäsionsmoleküle wirken und durch Interaktion mit zellulären Rezeptoren die Haftung an den Epithelzellen vermitteln. *H. pylori* besitzt eine Vielzahl von Genen, die für Proteine der äußeren Membran kodieren, als Beispiele hierfür gelten *BabA*, *SabA*, *AlpA* und *AlpB* (13-15). Ein lokal wirkender Virulenzfaktor ist das *Vakuolating cytotoxin* das die Bildung von Vakuolen in Epithelzellen initiiert (16). Bei 50–60 % der Gastritis-Patienten und bei nahezu allen Patienten mit gastroduodenaler Ulkuskrankheit kommt ein weiteres, im engen Zusammenhang mit *VagA* stehendes Zytotoxin vor. Bei Kontakt mit der Epithelzelle wird dieses ‚*Cytotoxin-associated Gene A*‘ (*CagA*) über ein Sekretionssystem (*T4SS*) in die Zelle geschleust und reagiert mit einer Vielzahl von Molekülen, was zur Veränderung der Signaltransduktion führt (17). Durch die Adaptation an den Wirt und die lange Kolonisationszeit unterliegen *H. pylori*-Stämme einer hohen Variabilität (18).

1.2 Das Magenkarzinom

Über die Hälfte der Weltbevölkerung ist mit *H. pylori* infiziert (6). *H. pylori* kann über einige Jahrzehnte unbemerkt im Magen des Menschen leben, dort die Magenschleimhaut schädigen und die Hormonausschüttung verändern. Durch die Nutzung verschiedener Virulenzfaktoren

kann das Bakterium die Entzündungsreaktion des Wirts modulieren und eine chronische Gastritis und Magengeschwüre auslösen. Das Adenokarzinom des Magens ist die vierthäufigste durch Krebs verursachte Todesursache weltweit (19). Jedes Jahr sterben rund 700 000 Menschen an diesem Malignom. Die höchste Inzidenz herrscht in Ostasien, Osteuropa und Zentral- und Südamerika vor (19,20). Die regionalen Unterschiede werden durch bessere Kühlketten, weniger Salzaufnahme, weniger geräucherte Speisen, verbesserte Hygiene und weniger Nikotinkonsum erklärt (21). Die durch *H. pylori* ausgelöste chronische Entzündung ist eine der Hauptursachen, obwohl nur ein kleiner Teil der Infizierten im Verlauf ein Magenkarzinom entwickeln. Dies lässt auf verschiedene Interaktionen zwischen Pathogen und Wirt, wie spezielle Virulenzfaktoren unterschiedlicher *H. pylori*-Stämme, hier vor allem *CagA*, und eine individuelle Immunantwort des Patienten schließen. Des Weiteren ist die Entstehung des Magenkarzinoms abhängig vom Geschlecht, Nikotinabusus sowie der Aufnahme von geräucherten und gesalzenen Speisen (21).

Histomorphologisch können nach Lauren drei Typen des Magenkarzinoms unterschieden werden: diffuses Wachstum, intestinales Wachstum und der Mischtyp. Der diffuse Typ besteht aus infiltrativ wachsenden neoplastischen Zellen, die wenige oder keine glandulären Strukturen ausbilden. Der intestinale Typ liegt vor, wenn die Zellen kohäsiv wachsen, drüsige Formationen ausbilden und dabei eine typische histologische Schrittfolge durchlaufen – von der normalen Magenschleimhaut zur chronischen Gastritis, zur atrophischen Gastritis, über intestinale Metaplasie, Dysplasie bis zum Adenokarzinom (22,23). Diese Abfolge präkanzeröser Veränderungen wird Correa-Kaskade genannt (Abb. 1). Die erste histologische Veränderung ist die aktive chronische Gastritis, die als nicht-atrophische chronische Gastritis persistiert, oder sich zu einer multifokalen atrophischen Gastritis (MAG) entwickeln kann. Die MAG ist der erste Schritt der präkanzerösen Kaskade, gefolgt von der Metaplasie, der Dysplasie als `Carcinoma in situ` und schließlich dem invasivem Karzinom des Magens (24).

Makroskopisch kann das Wachstum in polypoid, fungiform, ulzerierend und infiltrativ unterschieden werden. Diese Einteilung wurde nach Borrmann benannt (22). Eine weitere Klassifikation der WHO in die histologischen Typen differenziert wie folgt: tubuläres, papilläres und muzinöses Adenokarzinom, gering kohäsives Karzinom, Siegelringkarzinom und gemischtes Karzinom (22).

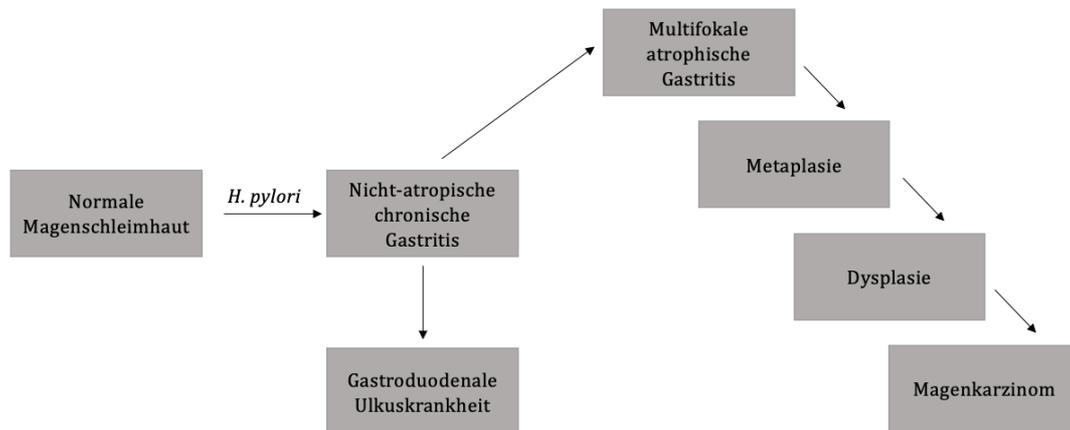


Abb. 1: Schematische Darstellung der Krankheitsentstehung durch *H. pylori*.

Die rechte Seite der Abbildung stellt die präkanzerösen Veränderungen dar (24).

1.3 INS-GAS-Mausmodell

Die zugrundeliegenden pathologischen und molekularen Mechanismen zur Entstehung des Magenkarzinoms sind noch nicht abschließend geklärt. Zur Beschreibung der Karzinogenese wurde ein authentisches Tiermodell benötigt. Da die Haltung von Mäusen kosteneffektiv ist, die Reproduktion schnell erfolgt, eine zum menschlichen Organismus ähnliche genetische Ausstattung gegeben ist und die Möglichkeit zur Genmanipulation besteht, haben sich diese Modelle gegen solche mit Ratten, Katzen und Schweinen zum Verständnis der Krankheitsentstehung durchgesetzt (25). Es konnten zwei *H. pylori*-Stämme identifiziert werden, die eine dauerhafte Kolonisation in Mausmägen verursachen. Der *H. pylori*-Sydney-Strain 1 (HpSS1) und *Helicobacter felis* (*H. felis*) besitzen die Fähigkeit, in der infizierten Maus eine chronische Gastritis und präkanzeröse Läsionen, ähnlich der Correa-Kaskade, zu verursachen (26). Wildtyp-Mäuse können jedoch kein Magenkarzinom entwickeln (26). Die INS-GAS-Maus wurde erstmals im Jahr 2000 beschrieben (27). Sie ist in der Lage, spontan atrophische Gastritis, Metaplasie und im Alter von 20 Monaten Adenokarzinome des Magens auszubilden. Das Modell, auf Basis *FVB/N transgen* veränderter Tiere, beruht auf einem zugeführten Fusionsgen aus dem humanen Gastringen sowie einem Insulinpromotor und weist permanent hohe Mengen Gastrin auf (28). Gastrin ist ein Peptidhormon des Magen-Darm-Traktes, wird in den G-Zellen im Antrum des Magens gebildet und über die Blutbahn zu den entsprechenden Rezeptoren der Belegzellen der Magenschleimhaut transportiert. Dort

wird die Protonenabgabe stimuliert und der pH-Wert des Magens durch Sekretion von Salzsäure gesenkt. In frühen Stadien zeigen INS-GAS-Mäuse eine erhöhte Salzsäuresekretion sowie eine erhöhte Anzahl an Parietalzellen. Im Alter von fünf Monaten sinkt die Anzahl der Parietalzellen und die Säuresekretion nimmt ab. Sobald die Mäuse 20 Monate alt sind, entwickeln sie metaplastische und dysplastische Veränderungen und schließlich Karzinome (27). Eine *H. pylori* Infektion kann die Ausbildung kanzeröser Veränderungen auf weniger als acht Monate reduzieren. Männliche Mäuse entwickeln dabei aufgrund fehlender ovarieller Östrogenproduktion schneller Adenokarzinome (29).

1.4 Micro-Ribonukleinsäure

1.4.1 Geschichte und Einleitung

Das Magenkarzinom bleibt lange symptomlos und wird dadurch häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert und behandelt. Seit geraumer Zeit wird für ein besseres Verständnis der Karzinogenese, und entsprechenden präventiven Maßnahmen, nach tumorspezifischen Biomarkern gesucht, die eine nicht invasive Frühdiagnostik ermöglichen und in verschiedenen Körperflüssigkeiten sowie im Tumor selbst nachweisbar sind (30). Im Jahr 1993 wurde von Lee et al. (31) und Wightman et al. (32) eine Gruppe kleiner, nicht kodierender RNA-Moleküle entdeckt (33). Diese wurde 2001 aufgrund ihrer Größe von 22 Nukleotiden Micro-Ribonukleinsäure (miRNA/miR) genannt. Diese Moleküle sind in sämtlichen Körperflüssigkeit wie Blut, Stuhl, Urin und in den Zellen selbst nachweisbar. Die miRNA bindet an das 3'-UTR der mRNA und beeinflusst abhängig von der Kompatibilität der Basen die Hemmung der Genexpression. Dabei regulieren mehrere miRNAs eine mRNA. Dadurch ergibt sich ein komplexes Netzwerk auf posttranskriptionaler Ebene. Abhängig von der Komplementarität kommt es bei partieller Bindung zur Translationshemmung und bei perfekter Basenpaarung zur Spaltung der Ziel-mRNA (34,35).

1.4.2 Biogenese

Die Promotorregionen der miRNA können genau wie die der mRNA durch Methylierung und Veränderung der Histone beeinflusst werden (36). Die Gene der miRNA sind im Genom gespeichert und werden im Nukleus durch die *RNA-Polymerase-II* in *pri-miRNA* transkribiert (Abb. 2), die sich zu einer Schleife zusammenlagert. Ein Mikroprozessorkomplex – bestehend aus einer *RNase III Droscha* und dem RNA-Bindungsprotein *DGCR8* – formt die *pri-miRNA* in eine 70–80 bp große *pre-miRNA* um, die eine charakteristische Haarnadelstruktur annimmt

(34-38). Durch *Exportin 5 (XPO5/ranGTP)* wird die *pre-miRNA* aktiv aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert, wo es durch einen anderen Komplex aus einer *RNase III Dicer* und dem *TAR-RNA-Bindungsprotein TRBP* in die 22 bp große doppelsträngige miRNA umgewandelt wird (34,37). Sobald sie entwunden und einzelsträngig vorliegt, verbindet sich einer der beiden Stränge mit dem *miRISC-Komplex* (39). Dieser Komplex besteht aus der miRNA und einem Protein der Argonauten-Familie. Er kann die Aktivität der Zielgene durch zwei Methoden herunterregulieren. Enthält der *miRISC-Komplex AGO 2*, kommt es zur zytoplasmatischen Spaltung. Sobald *AGO 1, 3 und 4* im Komplex enthalten sind, wird die Translation gehemmt und die Deadenylation induziert (34, 40). Der *miRISC-Komplex* reguliert eine Vielzahl zellulärer Mechanismen wie Zelldifferenzierung, Embryogenese, Proliferation und die Entstehung von neoplastischen Zellen (41).

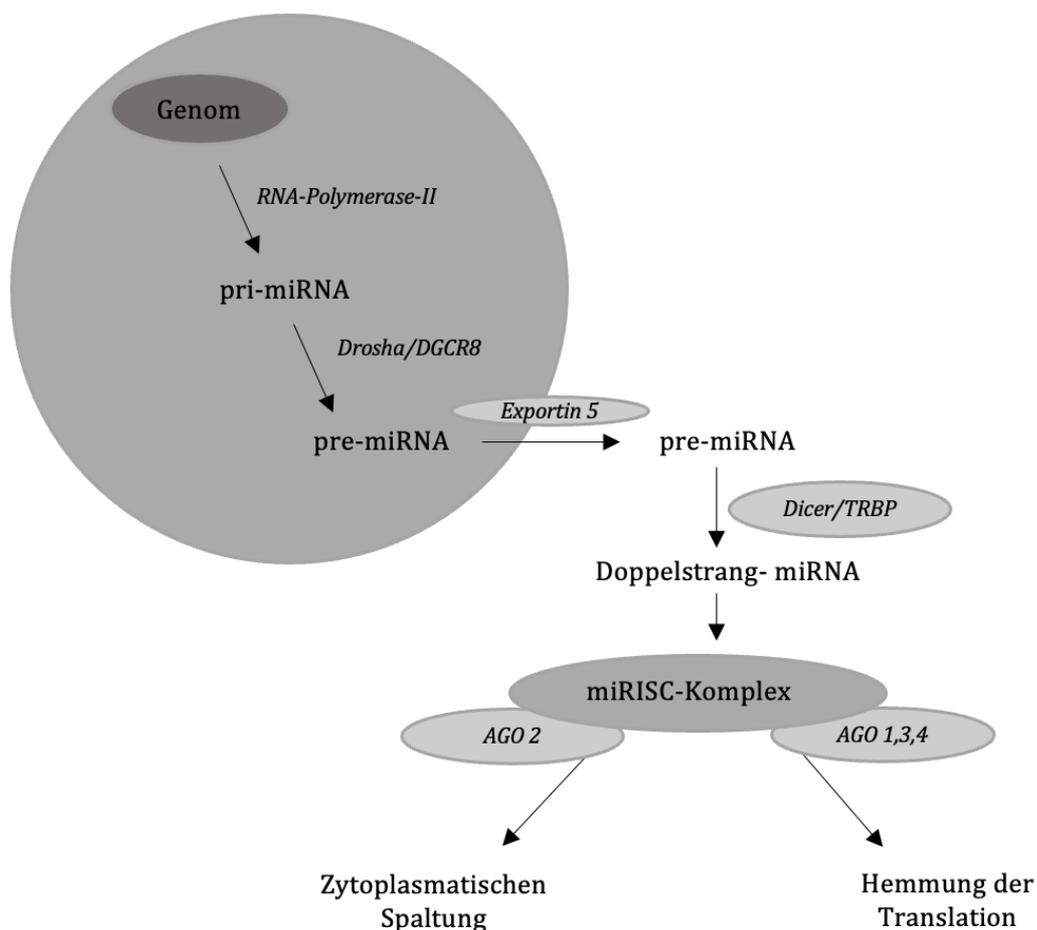


Abb. 2: *MiRNA-Biogenese* (42)

1.4.3 MiRNA und das Magenkarzinom

Das Magenkarzinom ist eine der häufigsten durch Krebs verursachten Todesursachen weltweit (19). MiRNAs spielen eine zentrale Rolle in biologischen Prozessen, einschließlich Zellproliferation, Metastasierung, Differenzierung und Apoptose. Eine fehlerhafte Expression der miRNAs kennzeichnen Krebserkrankungen (43). Aufgrund der Tatsache, dass miRNAs spezifisch für verschiedene Gewebe und Zelllinien sind, wurden bereits verschiedene miRNA-Muster in verschiedenen Krebsarten nachgewiesen. Dies ist sowohl für den diagnostischen, als auch für den prognostischen Wert von besonderer Bedeutung. Die gezielte Behandlung spezifischer miRNAs könnte eine Alternative bei der Therapie von Krebserkrankungen sein. Zahlreiche miRNAs wurden als Marker bei der Entzündung des Magens und bei der Karzinogenese beschrieben, darunter miR-21, miR-143, miR-145, miR-201 und miR-335. Diesen miRNAs ist das verminderte Vorkommen beim Magenkarzinom gemeinsam (44). Unter den vielen miRNAs, die bei einer chronischen Gastritis und dem Magenkarzinom vorkommen, nimmt die miR-155 durch ihre Hochregulation eine Schlüsselrolle ein. Die erhöhten miR-155-Spiegel können somit von klinisch-translationaler Bedeutung sein (45).

1.4.4 MiRNA-155

Die miR-155 wird unter physiologischen Bedingungen im Thymus und in der Milz exprimiert. In geringen Mengen ist sie auch in anderen Geweben nachweisbar. Die Transkription wird durch den *AP-1-Komplex* (46) und durch den Transkriptionsfaktor *NF-κB* (47) reguliert. Bisher wurden 140 Zielgene identifiziert, die durch die *miR-155* gesteuert werden. Dabei handelt es sich vor allem um Tumorsuppressorgene, aber auch Proteine der Immunmodulation und der Entzündungsreaktion (48). Eine Erhöhung konnte in verschiedenen Tumoren wie dem Pankreaskarzinom (49), dem Zervixkarzinom (50), dem Bronchialkarzinom und dem kolorektalen Karzinom (51), aber auch bei *H. pylori*-positiven Patienten nachgewiesen werden (48). Bei einer Infektion mit *H. pylori* können erhöhte Werte in T-Zellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und in den Epithelzellen des Magens – selbst bei Mäusen – nachgewiesen werden (52). Die miR-155 spielt eine zentrale Rolle bei der Expression von Th1- und Th17-Zellen und somit bei der Kontrolle der Infektion. Es wurde bereits gezeigt, dass *miRNA-155*^{-/-} Mäuse durch fehlende Immunantwort der oben genannten T-Zellen und die damit verbundene fehlende IFN- α - und Interleukin(IL)-17-Produktion nicht in der Lage waren, eine *H. pylori*-Infektion zu kontrollieren (53). Eine Überexpression der miRNA führt im Gegensatz dazu zu einem verminderten Überleben des Bakteriums (54). Die miR-155 reguliert das angeborene

und das erworbene Immunsystem und kontrolliert die Zytokinausschüttung sowie die Antikörperproduktion (48).

1.5 Immunologische Prozesse im Magenkarzinom

Im Kampf gegen Tumorerkrankungen spielt das Immunsystem eine der wichtigsten Rollen. Einerseits schützt das Immunsystem vor Tumorentstehung und Metastasierung, andererseits fördert es durch Einflussnahme auf die Tumorumgebung auch die Tumorbildung (55). Das Immunsystem des Wirts beeinflusst den Infektionsverlauf (56). Die Persistenz des Erregers lässt auf die ineffektive Immunantwort schließen. Auch wenn die meisten mit *H. pylori* infizierten Individuen asymptomatisch bleiben, prädisponiert die Infektion zur Entwicklung verschiedener präkanzeröser Veränderungen (24).

1.5.1 Das angeborene und das erworbene Immunsystem

Das Immunsystem wird in einen angeborenen und einen erworbenen Teil gegliedert. Das angeborene Immunsystem umfasst als zentrale antigenpräsentierende Zellen die dendritischen Zellen sowie die Makrophagen und die neutrophilen Granulozyten. Ihnen gemeinsam ist, dass sie potenzielle Gefahren anhand molekularer Muster erkennen können. Anders als beim angeborenen Immunsystem bildet sich das spezifische, also erworbene Immunsystem erst im Laufe des Lebens durch direkten Kontakt mit Krankheitserregern. Das erworbene Immunsystem besteht aus zwei großen Gruppen von Lymphozyten, den B- und den T-Lymphozyten (57). Die B-Lymphozyten gehören zur humoralen Abwehr. Sie verwandeln sich bei Antigenkontakt in Plasmazellen und produzieren Antikörper (58). Die T-Zellen sind Teil der zellulären Abwehr, werden im Thymus gebildet und über die Blutbahn zu den sekundären lymphatischen Organen transportiert. Solange diese Zellen ihr spezifisches Antigen noch nicht getroffen haben, werden sie naive T-Zellen genannt und zirkulieren zwischen Blut und lymphatischen Organen. Bei Kontakt mit dem Antigen differenzieren sie zu Effektorzellen. Diese können wiederum in CD4⁺-T-Helferzellen und CD8⁺-zytotoxische T-Zellen eingeteilt werden (59,60).

1.5.2 Immunantwort durch *Helicobacter pylori*

Im Rahmen der Infektion des Menschen mit *H. pylori* ist die immunologische Reaktion auf das Pathogen schnell, wenn auch unspezifisch durch das angeborene Immunsystem. Die Erkennung des Bakteriums erfolgt über Makrophagen und dendritische Zellen. Daraufhin wird eine Vielzahl an proinflammatorischen Zytokinen (IL-6, IFN- γ) ausgeschüttet, die wiederum

die Haupteffektorzellen zum Ort der Entzündung rekrutieren (61). Die Hauptaufgabe dieser Makrophagen und Neutrophilen liegt in der Abtötung dieser Bakterien, dabei schütten sie zusätzlich weitere Zytokine aus. Dies führt zur Verstärkung der Entzündungsreaktion. Bei zahlreichen Erkrankungen reicht diese Immunreaktion zur Beseitigung der Bakterien aus. Bei einem *H. pylori*-Befall bleibt eine effektive Abwehr des Bakteriums jedoch aus (56). Das erworbene Immunsystem reagiert zeitlich versetzt durch Stimulation mittels antigenpräsentierender Zellen und Aktivierung von Lymphozyten mit der Produktion *H. pylori*-spezifischer T-Zellen (62). Die CD4⁺-Helferzellen, wie Th1, Th17 und regulatorische T-Zellen (T_{reg}), übernehmen die wesentliche Rolle der erworbenen Immunabwehr. Es kommt eher zu einer Zellschädigung als zur Eliminierung des Bakteriums (63). Möglicherweise induziert *H. pylori* eine milde chronische Entzündung zur Sicherung des Überlebens durch eine Th1- und Th17-vermittelte Immunantwort. Ein Anstieg der T_{reg}-Zellen wurde bei der Infektion mit *H. pylori* ebenfalls beschrieben (64). Diese Zellreihe ist jedoch eher für eine verminderte Immunreaktion und möglicherweise für die lebenslange Persistenz des Erregers verantwortlich (65).

1.5.3 CD4⁺-T-Helferzellen

CD4⁺-T-Helferzellen spielen eine wichtige Rolle in der immunologischen Reaktion und deshalb wird in diesem Kapitel auf die Charakterisierung eingegangen. Die T-Helferzellen sind durch das spezifische Oberflächenantigen CD4⁺ charakterisiert und können aufgrund der von ihnen ausgeschütteten Zytokine in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden. Bei Kontakt mit einem entsprechenden Antigen entwickelt sich aus Vorläuferzellen eine der fünf Hauptgruppen – Th1-, Th2-, Th17-, T_{FH}- oder T_{reg}-Zellen (Abb. 3), die jeweils unterschiedliche Aufgaben im Immunsystem erfüllen (66). Die Entwicklung von Th1-Zellen wird durch die Zytokine IL-12 und IFN- γ verursacht. Die Zellreihen zeichnen sich durch die Produktion von IFN- γ aus, aktivieren Makrophagen und sind dadurch in der Lage, intrazelluläre Erreger zu beseitigen. Zur Differenzierung der Th2-Zellen wird IL-4 benötigt. Zentrale Funktionen der Th2-Zellen sind die B-Zellaktivierung und die Antikörpersynthese. Zusätzlich aktivieren sie durch die eigene Produktion von IL-4 und IL-5 eosinophile und basophile Granulozyten. Eine *H. pylori*-Infektion verursacht eine gemischte Th1- und Th2-Immunantwort mit entsprechendem Zytokinmilieu (67, 68). Die spezifischen B- und T-Zellen sind jedoch nicht in der Lage, die *H. pylori*-Infektion effektiv, nach aktuellem Wissenstand unter üblichen Bedingungen, zu beseitigen (69).

1.5.3.1 Th17-Zellen

Durch den Einfluss von TGF- β und IL-6 differenzieren naive T-Zellen in proinflammatorische Th17-Zellen (70). Diese Untergruppe exprimiert den für diese Zellreihe charakteristischen Transkriptionsfaktor ROR γ t (71-73). Zur Entwicklung der Th17-Zellen wird STAT3 benötigt, der durch IL-6 direkt aktiviert wird. Die Th17-Zellen produzieren verschiedene Zytokine, wie IL-17A, IL-17F und IL-22. IL-17 nimmt eine zentrale Position in der Abwehr extrazellulärer Bakterien und Pilze ein und produziert antimikrobielle Peptide für die Barrierefunktion gastrointestinaler Epithelzellen.

1.5.3.2 Regulatorische T-Zellen

T_{reg}-Zellen stellen eine bedeutende Untergruppe der T-Zellen dar und nehmen eine zentrale Stellung in der Toleranzentwicklung und der Entstehung von Autoimmunerkrankungen ein. Sie entwickeln sich bei Vorhandensein von TGF- β bei gleichzeitig fehlendem Einfluss von IL-6 oder anderen proinflammatorischen Zytokinen. IL-6 wird durch Zellen des angeborenen Immunsystems hergestellt, wenn fremde Erreger auftauchen. Bei deren Absenz ist die IL-6-Produktion gering und es kommt zur Produktion von regulatorischen T-Zellen, die eine überschießende Immunantwort verhindern. Die T_{reg}-Zellen machen 5–10 % der CD4⁺-T-Zellen aus und ist durch eine im Vergleich zu anderen CD4-Zellen höhere Expression von CD25 charakterisiert. Der Transkriptionsfaktor FoxP3 wird speziell von den CD4⁺-CD25^{high}-T_{reg}-Zellen exprimiert und stellt somit einen molekularen Marker für diese Zellreihe dar (74, 75). Ausgehend von den CD4⁺-CD25^{high}-T_{reg}-Zellen können die natürlich vorkommenden und die peripher induzierten T_{reg}-Zellen unterschieden werden. Die peripher induzierten T_{reg}-Zellen entwickeln sich erst bei Antigenkontakt in sekundär lymphatischen Organen, nicht im Thymus wie die natürlich vorkommenden T_{reg}-Zellen. Beide Untergruppen sind in der Lage, TGF- β und IL-10 zu produzieren. Die regulatorischen T-Zellen supprimieren die Aktivierung und Proliferation der Effektorzellen und unterdrücken so die Immunantwort bei einer *H. pylori*-Infektion (76).

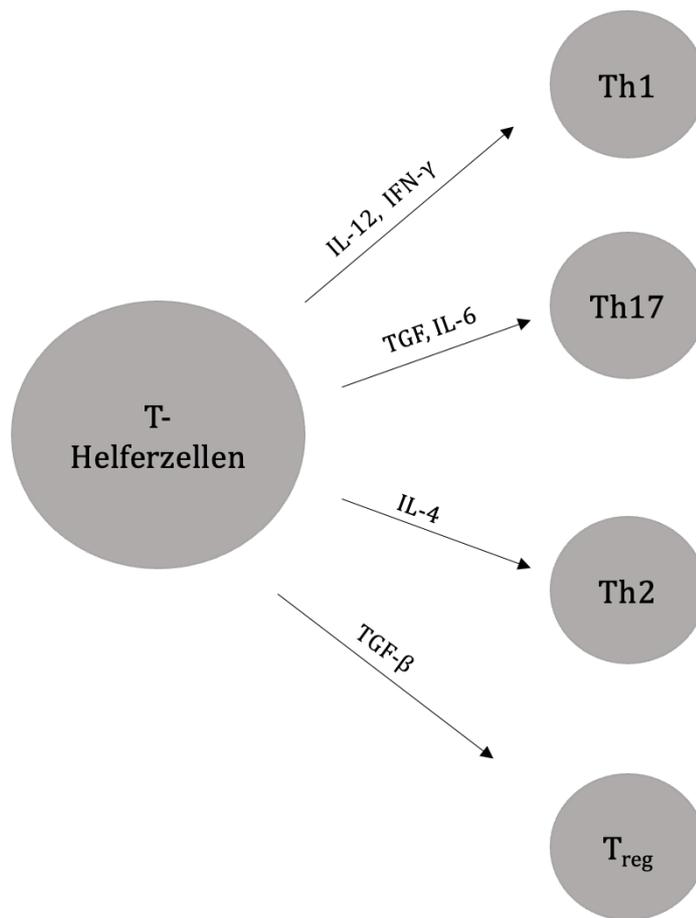


Abb. 3: T-Zell-Differenzierung bei einer *H. pylori* Infektion (63)

1.6 Rolle der miRNA-155 auf die Immunreaktion

Th17-Zellen und T_{reg}-Zellen sind zwei Untergruppen der T-Zellen, die entgegengesetzte Effekte auf die Funktion des Immunsystems haben (66). Während Th17-Zellen sich proinflammatorisch auswirken, beeinflussen T_{reg}-Zellen das Immunsystem antiinflammatorisch. Das Gleichgewicht dieser beiden Zellreihen ist von entscheidender Bedeutung bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und entzündlichen Erkrankungen (63, 77). Für die Abgrenzung zu Th17-Zellen werden verschiedene Zytokine wie TGF-β, kombiniert mit IL-6 oder IL-21 benötigt (53), ebenso wie der spezifische Transkriptionsfaktor RORγt (54). IL-17A wird, neben IL-17F, IL-21 und IL-22, als charakteristisches Zytokin von den Th17-Zellen exprimiert und aktiviert Neutrophile und Makrophagen um feindliche Organismen zu bekämpfen (78). Regulatorische T-Zellen entwickeln sich in Anwesenheit von TGF-β und dem Transkriptionsfaktor FoxP3 (79).

Zusätzlich ist IL-2 für das Wachstum dieser Zellen entscheidend (80). Die T_{reg}-Zellen kommen in einer natürlichen und einer induzierbaren Form vor. Sie üben den hemmenden Effekt auf das Immunsystem entweder im direkten Kontakt, durch hemmende Zytokine wie IL-10 oder durch TGF- β aus, um sich selbst zu stimulieren. Regulatorische T-Zellen nehmen eine wesentliche Rolle in der Prävention von Autoimmunerkrankungen sowie der Abwehr gegen Infektionen und Tumorerkrankungen ein (81). TGF- β kann also abhängig von der Zytokinumgebung sowohl die Entwicklung von Th17-Zellen als auch T_{reg}-Zellen stimulieren. Bei der Entstehung von Autoimmun-, Infektions- und Krebserkrankungen ist das Gleichgewicht dieser beiden Zellreihen häufig gestört (82,83). Die miR-155 ist sowohl Bestandteil von B-Zellen, T-Zellen und dendritischen Zellen, als auch an ihrer Entwicklung und an der Entstehung von über 60 Krankheiten beteiligt (84,85). Vigorito et al. beschrieben die Notwendigkeit der miR-155 für die Entwicklung der regulatorischen T-Zellen (86,87). Die miR-155 ist ebenfalls für die Differenzierung der Th17-Zellen notwendig (88). Eine Vielzahl von Regulationsmechanismen der positiven oder negativen Verstärkung der Th17-Zellen und der regulatorischen T-Zellen ist bereits bekannt. Zentrale Transkriptionsfaktoren zur Differenzierung der verschiedenen Zellreihen sind ROR γ t und FoxP3, die direkt durch die miR-155 beeinflusst werden (89). Das Zusammenspiel ist jedoch äußerst komplex und von zahlreichen Faktoren wie dem *Foxhead box protein O1 (FOXO1)* Zytokinen und verschiedenen Signalwegen abhängig (90-92).

1.7 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Die Expression von miRNAs im Hinblick auf die präneoplastischen Veränderungen, entsprechend der Correa-Kaskade und die Auswirkungen auf das Immunsystem wurden bisher nur ungenügend untersucht. In den Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe wurde über einen stufenweisen Anstieg der miR-155 in Gewebeproben des Magenkorpus und des -antrums bei Patienten mit Fortschreiten der präkanzerösen Veränderungen (chronischer nicht-atrophische Gastritis, atrophische Gastritis, Magenkarzinom) berichtet (93). Das Ziel der Arbeit ist die Veränderungen der miR-155 in der Mukosa in Gewebeproben des Magenkorpus im Zusammenhang mit T-Zellen und der damit verbundenen Balance des Immunsystems zu untersuchen. Daraus könnten sich Therapieansätze entwickeln, die direkt die T-Zellen modulieren und so Einfluss auf die Karzinogenese haben.

- Charakterisierung der Expression der miR-155 in Gewebeproben des Magenkorpus in Abhängigkeit vom Fortschreiten der Correa-Kaskade im INS-GAS Mausmodell

- Vergleich der miR-155 Expression in männlichen und weiblichen INS-GAS Mäusen
- Evaluation der Th17 und T_{reg}- Zellreihen in dem Model
- Korrelation der Th17/T_{reg}-Zellenmarkern und der Expression der miR-155
- Scoring-Systems der Th17/T_{reg}-Balance des Immunsystems

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Zum Verständnis der Magenkarzinogenese ist ein authentisches Tiermodell notwendig, das der Karzinomentstehung im menschlichen Körper ähnlich ist. In dieser Arbeit wurde ein INS-GAS-Mausmodell verwendet, bei dem die Tiere präkanzeröse Veränderungen und schließlich Karzinome entwickelten. Der INS-GAS-Mausstamm und die Extraktion der Gewebeprobe wurde freundlicherweise von Frau Dr. Sabine Franke und Frau Dr. Kathrin Frauenschläger aus dem Institut für Pathologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zur Verfügung gestellt. Die Bestimmungen der Deutschen Tierschutzverordnung wurden bei allen tierexperimentellen Arbeiten eingehalten. Die Haltung der Mäuse und die Tierversuchsvorhaben erfolgten entsprechend der Genehmigung nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) durch das Landesverwaltungsamt Halle/Saale (AZ 42502 – 2 – 702 UniMD).

Die Etablierung des Mausmodells und die histopathologische Untersuchung des Magengewebes waren Bestandteil einer anderen Promotion und werden an dieser Stelle nur in kurzer Form aus Verständnisgründen erläutert. INS-GAS-Mäuse, erstmalig durch Wang et al. 1993 beschrieben, exprimieren menschlich zugefügtes Gastrin unter einem Insulinpromotor (94). Durch ein Fusionsgen aus humanem Gastrin-Gen und einem Ratteninsulinfragment produzieren die Tiere nahrungstriggert permanent hohe Dosen humanen Gastrins. Ohne eine *H. pylori* Infektion entwickeln INS-GAS-Mäuse im Alter von ein bis drei Monaten eine milde Hypergastrinämie in Verbindung mit einer erhöhten Magensäuresekretion und einer erhöhten Anzahl an Belegzellen. Mit zunehmendem Alter zeigen die Tiere einen fortschreitenden Verlust an Belegzellen und signifikante Veränderungen wie Atrophie, Metaplasie und Dysplasie. Im Alter von 20 Monaten entwickeln INS-GAS-Mäuse invasive Magenkarzinome (95). Durch eine *H. pylori* Infektion wird diese Entwicklung deutlich beschleunigt.

Das Kollektiv umfasste insgesamt 61 Mäuse ($n = 61$), davon waren 19 weiblich und 42 männlich. Die *H. pylori*-negative Kontrollgruppe bestand aus 24 Mäusen, die Gruppe der infizierten Tiere aus 37 Mäusen. Das gesamte Kollektiv wurde in vier Gruppen der Altersstufen 12, 24, 36 und 50 Wochen unterteilt. Um die Zahl der benötigten Tiere möglichst klein zu

halten und damit die weitere Tötung von Mäusen zu vermeiden, wurde die Kontrollgruppe nicht um weitere Tiere ergänzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Tierhaltung

Der *H. pylori*-Status der Tiere wurde durch regelmäßige Polymerasekettenreaktionen (PCR)-Kontrollen und Screenings erhoben. Im Falle einer vorliegenden Infektion erfolgte die Übergabe der Jungtiere an eine *H. pylori*-freie Amme 24 Stunden nach der Geburt. Die Haltung und Aufzucht erfolgte unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPB) in einzelbelüfteten Käfigen (IVC; ‚individually ventilated cages‘) mit den Maßen 25 x 40 x 20 cm. Es wurden bis zu fünf Tiere gleichen Geschlechts gemeinsam gehalten. Der Boden wurde mit Sägespänen befüllt, die regelmäßig durch die Tierpfleger und Mitarbeiter gewechselt wurden. Jeglicher Umgang mit den Mäusen erfolgte unter sterilen Bedingungen ohne Verwirbelungen. Ein regelmäßiger Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden wurde eingehalten. Die Tiere hatten jederzeit Zugang zu Trinkwasser aus sterilen Flaschen und zu keimfreier oder bestrahlter, für Nagetiere vorgesehener Nahrung. Es herrschte eine kontinuierliche Temperatur von 22 °C und eine Luftfeuchtigkeit von 50 %. Die Haltung und der Umgang mit den Tieren erfolgte unter den Bestimmungen der deutschen Tierschutzverordnung (96).

2.2.2 Infektion

Den Mäusen wurden im Alter von acht bis zwölf Wochen an drei aufeinander folgenden Tagen 10^8 CFU *H. pylori* in 0,2 ml Lösung intragastral appliziert. Die Tiere wurden mit der Hand fixiert und der Nacken überstreckt, so dass eine gerade Linie zwischen Mund und Magen entstand. Die Spitze eines gekürzten Uretherkatheters wurde durch die Mundhöhle und den Pharynx bis in den Oesophagus vorgeschoben. Die Verabreichung der HpSS1-Suspension erfolgte langsam und unter Beobachtung der Maus. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten in analoger Weise ein keimfreies Flüssigkeitsmedium (96). Der *H. pylori* Sydney Stamm 1 (HpSS1) wurde von Lee et al. 1997 isoliert. Es wurde festgestellt, dass HpSS1 mehrere Mausstämme konsistent besiedeln und eine über mehrere Monate andauernde Infektion hervorrufen kann (97).

2.2.3 Probengewinnung

Zur Kontrolle des *H. pylori*-Status wurden zwölf Wochen nach der Infektion Blut- und Stuhlproben von den Tieren der infizierten Gruppen auf das Bakterium überprüft. Die Mäuse

wurden im jeweiligen Alter von 12, 24, 36 und 50 Wochen *post infectionem* (wpi) mit CO₂ narkotisiert und durch zervikale Luxation gemäß Tierschutzgesetz getötet; im Anschluss wurde die Organentnahme durchgeführt. Es erfolgte eine gründliche Desinfizierung mit 70%igem Ethanol, ein longitudinaler Schnitt zur Eröffnung des Bauch- und Brustraums und eine gleichzeitige Entnahme der gesamten inneren Organe. Während der Fixierung des proximalen Duodenums und distalen Oesophagus konnte der Magen abgetrennt und anschließend mit 0,9%iger NaCl-Lösung gespült werden. Der Magen wurde entlang der großen Kurvatur eröffnet und mit sterilem Puffer ausgiebig gewaschen. Die Gewebeprobe (20–50 mg) von Antrum und Korpus wurden seziert und sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren (96).

2.2.4 Präparation der RNA aus Gewebe

Zur Isolation der totalen RNA aus dem tiefgefrorenen Magengewebe wurde das *RNeasy Plus Universal Mini Kit* (Quiagen, Hilden, Deutschland), basierend auf der von Chomczynski und Sacchi beschriebenen *Single-Step*-Methode, verwendet. Für das Durchmischen der Proben wurde ein Vortex-Mischer verwendet. Zu Beginn der Laborarbeit musste eine Zentrifuge auf 4°C vorgekühlt werden. Zum Pipettieren wurden Eppendorf Pipetten und sterile RNase-freie Pipettenspitzen (SafeSeal Tips Professional, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) verwendet. Die Verarbeitung des Gewebes erfolgte nach dem internen Protokoll wie im Weiteren dargestellt. Pro Extraktion wurden bis zu 50 mg einer Probe eingesetzt, die mit 900 µl *QIAzol Lysis Reagenz* versetzt und durch einen Homogenisator homogenisiert wurden. Die genannte Phenol- und Guanidinisothiocyanatlösung denaturiert Proteine und inhibiert die vorhandenen RNasen, die für die Hydrolyse der Phosphordiesterbindungen und damit für die Spaltung der RNA verantwortlich sind. Nach Zusatz von Chloroform erfolgte die Phasentrennung und die Proben wurden bei 12 000 x g und 4 °C über 15 Minuten zentrifugiert (Haraeus Biofuge Fresco, Haraeus Holding GmbH). Die homogene Lösung trennt sich in drei Phasen. Eine obere, RNA enthaltende, wässrige Phase und eine untere organische Phase, in der sich die Proteine befinden. Die mittlere Schicht beinhaltet die DNA und trennt die beiden genannten Phasen voneinander. Die RNA wird in ein Eppendorf-Gefäß übertragen, mit 100%iger Ethanollösung versetzt, durch langsames Pipettieren gemischt und in eine Säule gegeben. Anschließend wird 15 Sekunden lang bei 13 000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert (Hettich Zentrifuge, Hettich Ag) und der Überstand verworfen. Durch drei aufeinander folgende Waschvorgänge mit RWT- und RPE-Puffer und darauf folgende Zentrifugierungen bindet die gesamte RNA an die Membran der Säulen. Die Elution der RNA

erfolgt schließlich mit 2 x 35 µl RNase-freiem Wasser und zwei letzten Zentrifugationsschritten über jeweils eine Minute bei 13 000 x g.

Material: RNeasy Plus Universal Mini Kit™ (QIAGEN, Hilden, Deutschland), 900 µl QIAzol Lysis Reagenz (QIAGEN, Hilden, Deutschland), 180 µl Chloroform (Karl Roth GmbH), 100%iger Ethanol (entwässert, unvergällt), 700 µl RWR-Puffer (QIAGEN, Hilden, Deutschland), 2 x 500 µl RPE-Puffer (QIAGEN, Hilden, Deutschland)

2.2.5 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der RNA in der Probe erfolgte im Anschluss an die Isolation mittels eines UV-Photometers (Eppendorf BioPhotometer, Eppendorf). Das Gerät besteht aus einer Lichtquelle und einer Vorrichtung, die nur monochromatisches Licht passieren lässt. Die Messung der absorbierten Lichtintensität wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm vorgenommen. Die Probe wurde mit RNase-freiem Wasser in einem Verhältnis von 5:65 verdünnt. Die Konzentration wurde mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ($x = OD_{260nm} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$) aus der optischen Dichte, wobei eine Einheit 40 µg/ml RNA entspricht, und einem spezifischen Multiplikationsfaktor errechnet. Aus dem Quotienten OD_{260}/OD_{280} konnte die Proteinkontamination und damit der Reinheitsgrad der Probe bestimmt werden. Dieses Verhältnis sollte Werte zwischen 1,8 und 2,2 ausweisen.

2.2.6 Genexpressionsanalysen

Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) besteht aus einem Denaturierungs-, einem Annealing- und einem Elongationsschritt. Zunächst wird die doppelsträngige Template-DNA durch Erhitzung mit der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz aufgespalten (Denaturierung). Durch eine Temperaturabsenkung kommt es zur Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotide (Primer) an die 3'-Enden der beiden Einzelstränge (Annealing). Weiterhin wird eine temperaturstabile DNA-Polymerase benötigt. Die häufig für die PCR verwendete Taq-Polymerase stammt vom Bakterium *Thermus aquaticus* und hat ein Temperaturoptimum von 72 °C. Durch den Zusatz wird der Primer in 5'-3'-Richtung verlängert und der DNA-Strang so lange komplementiert, bis ein exaktes Abbild der Template-DNA vorliegt (Elongation). Zur Vervielfältigung einer mRNA und zur Bestimmung der Menge eines Genprodukts muss der gewünschte Abschnitt mittels Reverser Transkription (RT) in *complementary DNA* (cDNA)

umgeschrieben werden. Anschließend wird er als Ausgangsstoff für die quantitative PCR verwendet.

Reverse Transkription

Die isolierte mRNA wird zunächst durch das Enzym ‚Reverse Transkriptase‘ (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in eine einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Durch die zusätzliche DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität entsteht der komplementäre Strang. Die Reverse Transkriptase wurde erstmals in Retroviren (Humanes Immundefizienz-Virus) beschrieben. Für diese Untersuchung wurden das *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit*, in dem 100M Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs; molekulare Bausteine der DNA), Reverse Transkriptase, 10 x RT-Buffer und RNase-Inhibitoren enthalten sind, und der *TaqMan*-Primer 5 x (Primer mit Haarnadelstruktur) genutzt (Tabelle 1 und 2). Zur Herstellung des Mastermixes für die Reverse Transkriptase-Reaktion wurden die benötigten Komponenten auf Eis aufgetaut und kurz per Vortex-Gerät durchmischt, damit kein Bodenabsatz bestehen blieb.

Tabelle 1: Material RT

Reagenz	Volumen
Aqua dest.	5,66 µl
10 x Reverse-Transkriptase-Puffer	1,5 µl
Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1 µl
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	0,19 µl
100 M dNTPs	0,15 µl
Primer (5fach konzentriert)	1,5 µl
RNA-Probe	5 µl
Total	15 µl

Tabelle 2: Arbeitsschritte RT

	Temperatur	Zeit
Inkubation	16 °C	30 min
Reaktion	42 °C	45 min
Denaturierung	85 °C	5 min
Kühlung	4 °C	∞

Material: Standardprotokoll für AMV-RT (Promega, Mannheim, Deutschland), Thermocycler

Real-Time Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die Quantifizierung der entstandenen Reaktionsprodukte erfolgt mittels Fluoreszenzmessung nach jedem Zyklus der Kettenreaktion am Ende der Elongation in Echtzeit, wobei die Fluoreszenzintensität mit der gebildeten Menge an DNA korreliert. Der Fluoreszenzfarbstoff ‚SYBR Green‘ interkaliert in die doppelsträngige DNA und emittiert Licht der Wellenlänge 521 nm, wenn es mit Licht der Wellenlänge 494 nm angeregt wird. Bei dem *TaqMan*-Prinzip (wird ein weiteres Oligonukleotid zu den beiden bereits vorhandenen Primern hinzugefügt, dessen 3'-Ende blockiert ist, damit es selbst nicht als Primer fungiert. Fluorchrom 1 (Reporter) und Fluorchrom 2 (Quencher) sitzen an den Enden des Oligonukleotids in ausreichender Nähe zueinander, wobei jedes ein spezifisches Anregungs- und Emissionsspektrum besitzt. Die Energie wird nun vom Reporter nicht als spezifische Wellenlänge abgegeben, sondern direkt an den Quencher weitergeleitet, der daraufhin Licht seiner charakteristischen Wellenlänge abgibt. Durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird die *TaqMan*-Sonde am 5'-Ende abgebaut – es kommt zur Entfernung von Reporter und Quencher und eine steigende Fluoreszenz kann gemessen werden. Bei den beiden oben genannten Prinzipien wurden zusätzlich Housekeeping-Gene (β -Actin und snoR202) als Standard bestimmt, die in den untersuchten Gewebeproben konstant exprimiert werden (Tabelle 3-6). Die Vermehrung der DNA erfolgt anfangs exponentiell und verlangsamt sich schließlich zu einem linearen Wachstum. Der deutliche Anstieg und gleichzeitige Durchbruch der Basislinie ist als C_t -Wert definiert. Er gibt die relative Konzentration des gesuchten Genproduktes an. Die Auswertung wurde mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode durchgeführt, indem zuerst der ΔC_t aus der Differenz des Housekeeping- C_t -Wertes und des C_t -Wertes der Probe errechnet wird und anschließend der $2^{\Delta C_t}$ -Wert.

Die Amplifikationen der spezifischen Genprodukte erfolgten durch die Two-Step-RT-PCR am *iCycler* (Biorad, Deutschland). Die One-Step-RT-PCR unterscheidet sich durch die direkt vorgeschaltete RT. Da auch Primerdimere den ‚SYBR Green‘-Farbstoff einlagern können, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durch langsame Temperatursteigerung (von 50 °C bis 95 °C) zur Überprüfung der PCR-Produkte vorgenommen. Das Amplifikat besitzt eine charakteristische Schmelztemperatur, bei der es zur Aufspaltung des DNA-Doppelstranges in zwei Einzelstränge kommt. Eine Unterscheidung ist durch den erniedrigten Schmelzpunkt unspezifischer Produkte möglich.

Tabelle 3: Material – Quantitative Real-Time PCR

Reagenz	Volumen
Aqua dest.	10,9 µl
<i>QuantiTect SYBRGreen PCR MasterMix</i> (Qiagen, Hilden, Deutschland)	12,5 µl
Primer forw.	0,2 µl
Primer rev.	0,2 µl
cDNA, 1:3 verdünnt	1,2 µl
Total	25 µl

Tabelle 4: Arbeitsschritte – Quantitative Real-Time PCR

Programm	Temperatur	Zeit
Aktivierung der Taq-Polymerase	95 °C	15 min
Denaturierung der Nukleinsäuren	94 °C	15 sec
Annealing (Bindung der Primer)	59 °C	30 sec
Elongation des DNA-Stranges	72 °C	30 sec
45 Wiederholungen der genannten Schritte		
Schmelzkurve	50–95 °C	10 min

Tabelle 5: Material – Quantitative TaqMan-PCR

Reagenz	Volumen
Aqua dest.	0,5 µl
TaqMan MasterMix	5 µl
Primer TaqMan (siehe Tabelle 1)	0,5 µl
cDNA-Probe	4 µl
Total	10 µl

Tabelle 6: Arbeitsschritte – Quantitative TaqMan-PCR

Programm	Temperatur	Zeit
RT	50 °C	2 min
Aktivierung der Taq-Polymerase	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	15 sec
Annealing	60 °C	60 sec
40 Wiederholungen der genannten Schritte		

2.2.7 Statistische Auswertung

Zur Auswertung wurden alle Daten in eine Microsoft-Excel-Tabelle übertragen und anschließend mit *Graph Pad Prism 9* (GraphPad Software. Inc, San Diego, California, USA) statistisch analysiert. Normalverteilte Daten wurden parametrisch mittels ANOVA und t-Test für gepaarte und ungepaarte Stichproben ausgewertet. Bei Unterschieden nicht normalverteilter Daten kam der nicht parametrische Kruskal-Wallis- bzw. Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung, der durch den post-hoc Dunn's-Test (als Test auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen) ergänzt wurde. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Boxplots mit Maximal- und Minimalwert, den 25. und 75. Perzentilen sowie dem 50. Perzentil (Median). Für alle Testverfahren galt eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant. Für die quantitative Beurteilung der Genexpression (x-fache Änderung) wurde für Gewebeproben die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode verwendet. Aufgrund der nicht parametrischen Daten erfolgte die Berechnung anhand des Medians. Für Serumproben und die Kontrollen wurde jeweils eine Differenz aus dem C_t -Wert der miRNA und der Referenz-miRNA bestimmt. Die Differenz dieser beiden Ergebnisse wurde dann mit negativem Vorzeichen mit der Basis 2 in den Exponenten gesetzt ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Das folgende Ergebnis entspricht der Expressionsänderung. Zur Testung einer Abhängigkeit zwischen zwei Stichproben wurde die nicht parametrische Spearman-Korrelationsanalyse angewandt und die Regressionsgerade mittels Berechnung grafisch dargestellt. Zur Erstellung von Abbildungen wurde Adobe Photoshop verwendet. Die Datenbankrecherche erfolgte mit PubMed.

2.2.8 Eigenanteil

Im Rahmen der Promotion wurden folgende Versuchsschritte in Eigenleistung durchgeführt:

- Extraktion der RNA aus Gewebeproben der INS-GAS-Maus sowie der CXG-Maus (nicht Bestandteil dieser Arbeit)
- Bestimmung der *miRNA-155*, RORyt, IL-17, FoxP3 und IL-10 mittels RT und qRT-PCR
- Statistische Auswertung der Ergebnisse unter Betreuung durch Dr. rer. nat. Wiebke Schirrmeister und Prof. Dr. Alexander Link

3 Ergebnisse

Die Auswertung der Dissertation umfasst die Untersuchung der miR-155-Expression in Gewebeproben des Korpus der INS-GAS-Maus in Abhängigkeit des *H. pylori*-Status. Es werden zunächst eine Charakterisierung der Studienkohorte sowie eine Darstellung der normalisierten miRNA-Messwerte vorgenommen. Des Weiteren wird die miR-155 durch Genexpressions- und Korrelationsanalysen als wesentlicher Einflussfaktor der Entzündungsreaktion untersucht.

3.1 Charakterisierung der Versuchstiere

Die Kohorte umfasste insgesamt 61 Mäuse (n = 61), davon waren 19 weiblich und 42 männlich. Die *H. pylori*-negative Kontrollgruppe (KO IG) bestand aus 24 Mäusen, die Gruppe der infizierten Tiere (IG) aus 37 Mäusen. Das gesamte Kollektiv wurde in vier Gruppen der Altersstufen 12, 24, 36 und 50 Wochen unterteilt. Die Mindestgruppengröße lag bei 4 Tieren, die durchschnittliche Größe lag bei 7,6 Mäusen pro Gruppe, von denen durchschnittlich 5,3 Männchen und 2,4 Weibchen waren. Die Alters- und Geschlechterverteilung ist in Tabelle 7 dargestellt. Hier wird eine Dominanz des männlichen Geschlechts und der Gruppe mit höherem Alter deutlich.

Tabelle 7: Darstellung der Versuchstiere einschließlich der Alters- und Geschlechterverteilung

	Alter (Wochen)	Anzahl n	Anteil in Prozent	weiblich	männlich
KO IG	12	4	16,6	0 (0 %)	4 (100 %)
	24	4	16,6	1 (25 %)	3 (75 %)
	36	7	29,2	2 (28,6 %)	5 (91,4 %)
	50	9	37,5	3 (33,3 %)	6 (66,6 %)
H.p.+	12	5	13,5	0 (0 %)	5 (100 %)
	24	10	27,0	3 (30 %)	7 (70 %)
	36	9	24,3	5 (55,6 %)	4 (44,4 %)
	50	13	35,1	5 (38,5 %)	8 (61,5 %)

KO IG: *H. pylori*-negative INS-GAS Mäuse der Kontrollegruppe. H.p.+ : *H. pylori* infizierte INS-GAS Mäuse.

3.2 MiRNA-155

3.2.1 Genexpressionsanalysen der miR-155

Um eine Charakterisierung der miR-155 Veränderungen zu ermöglichen, fiel unter der Beachtung der Magenphysiologie die Entscheidung in einem ersten Schritt auf die Untersuchung der miR-155 im Korpus des Magens der INS-GAS-Maus einzugehen. Da die *H. pylori*-Infektion in diesem Mausmodell wesentlich zur Entwicklung eines Adenokarzinoms des Magens beitrug, war es sinnvoll, zunächst einen möglichen Zusammenhang zwischen der miR-155, dem *H. pylori*-Status und dem Alter der Mäuse zu untersuchen. Es wurden Genexpressionsanalysen mittels qPCR durchgeführt. Die Bestimmung der miR-155 erfolgte bei infizierten und nicht infizierten Tieren aus dem Magenkorpus der INS-GAS-Mäuse im Alter von 12, 24, 36 und 50 Wochen am Ende des Experiments. Unabhängig vom Alter der *H. pylori*-negativen INS-GAS-Maus konnte kein Unterschied der miR-155 Expression festgestellt werden. Die Kontrollgruppen im Alter von 12, 24, 36 und 50 Wochen wiesen eine homogene Expression mit lediglich geringem Anstieg bei zunehmendem Alter auf, jedoch ohne Änderung der Signifikanz (Abb. 4A). Bei Betrachtung der *H. pylori*-negativen Kontrollgruppen, bestehend aus allen Tieren unterschiedlichen Alters, und den *H. pylori* infizierten INS-GAS-Mäusen konnten wir signifikante Unterschiede feststellen. Es konnte bei *H. pylori* infizierten Mäusen mit zunehmendem Alter eine deutliche Erhöhung der miR-155 gezeigt werden ($p = 0,0002$) (Abb. 4B). Bei der detaillierten Betrachtung im Alter von 12 ($p = 0,0159$), 36 ($p = 0,0115$) und 50 ($p = 0,0170$) Wochen zeigte sich ein stetiger Anstieg und signifikant höhere Werte der miRNA-155 bei *H.pylori*-infizierten Tieren im Vergleich zur gleichaltrigen Kontrollgruppe. Die Expression bei 24 Wochen alten, *H. pylori*-positiven Tieren war nicht signifikant erhöht (Abb. 4C).

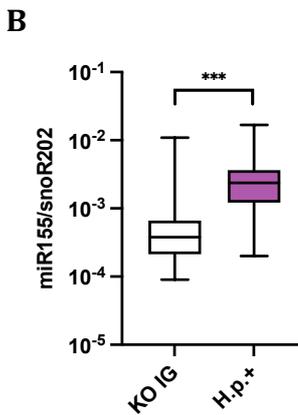
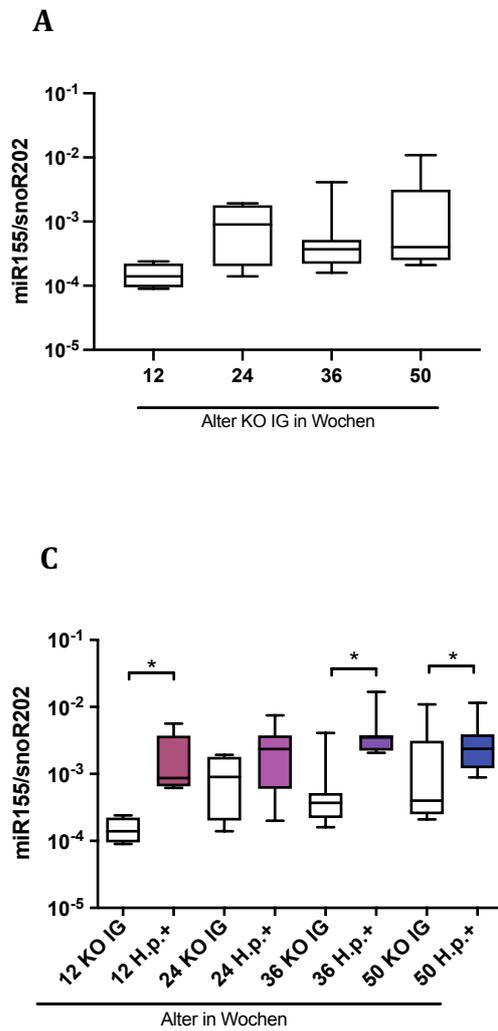


Abb. 4: miR-155 Expression im Magengewebe von IG-Mäusen

A: *miR-155* Expression in der IG-Kontrollgruppe. Gewebeentnahme erfolgte im Alter von 12-50 Wochen.

B: *miR-155*-Expression in Gewebeproben des Magenkorpus bei *H. pylori*-positiven IG-Mäusen verglichen mit einer Kontrollgruppe

C: *miR-155*-Expression in Gewebeproben des Magenkorpus bei *H. pylori*-positiven IG-Mäusen sowie in Kontrollen

Die Werte sind als relative miRNA-Expression dargestellt, jeweils normalisiert auf snoR202 mithilfe der $2\Delta\Delta CT$ -Methode. Die Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis-Test (A)/ Mann-Whitney-U-Test (B und C) durchgeführt und die Signifikanz (*) als * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ dargestellt.

3.2.2 Geschlechtsspezifische Expression der miR-155

Eine signifikante geschlechtsspezifische Expression der miR-155 der INS-GAS-Mäuse im Rahmen einer *H. pylori*-Infektion konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Abb. 5). Das Kollektiv umfasste im Alter von 12 Wochen bei den *H. pylori*-infizierten INS-GAS-Mäusen keine weiblichen Tiere. Bei der Betrachtung der Versuchstiere im Alter von 24, 36 und 50 Wochen war jedoch ein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied der Expression der miR-155 erkennbar. Die miR-155-Expression der männlichen Versuchstiere stieg im Vergleich zur KO IG stark an ($p = 0,0001$). Auch bei den weiblichen Tieren war ein Anstieg der *H. pylori*-positiven INS-GAS-Mäuse erkennbar ($p=0,0126$).

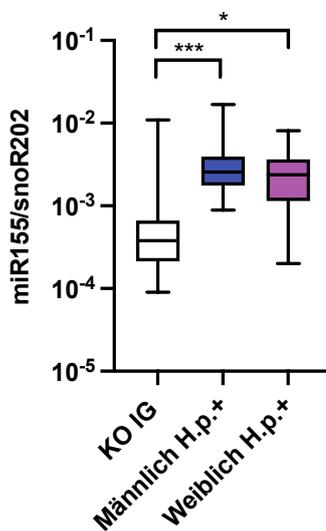


Abb. 5: Geschlechtsspezifische miR-155-Expression in Gewebeproben des Magenkorpus bei *H. pylori*-positiven IG-Mäusen verglichen mit einer Kontrollgruppe.

Männlich H.p.+ (blau) umfasst die 24, 36 und 50 Wochen alten Tiere (n=19 blau). Weiblich H.p.+ (lila) umfasst die 24, 36 und 50 Wochen alten Tiere (n=13).

Die Werte sind als relative miRNA-Expression dargestellt, jeweils normalisiert auf snoR202 mithilfe der 2CT-Methode. Die Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt und die Signifikanz (*) als $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ dargestellt.

3.3 Th17-Zellen

3.3.1 Gruppenanalysen - Transkriptionsfaktor RORyt und Interleukin-17

Die Th17-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Abwehr extrazellulärer Bakterien. Als charakteristischer Transkriptionsfaktor kann RORyt für die Th17-Zellen nachgewiesen werden. Diese proinflammatorischen Zellen produzieren verschiedene Zytokine wie IL-17A, IL-17F und IL-22, die die Immunantwort modulieren. In den durchgeführten Experimenten lag der Fokus auf IL-17A. Durch die quantitative Real-Time PCR wurden sowohl RORyt als auch IL-17A aus Proben des Magens von INS-GAS-Mäusen untersucht. Es konnten wesentliche

Unterschiede in der Expression zwischen infizierten Mäusen und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Während die *H. pylori*-negativen Tiere unabhängig vom Alter keine Änderung der Expression von RORyt und IL-17A zeigten (Abb. 6 A und B), konnte ein wesentlicher Unterschied in der Expression von RORyt bei infizierten Tieren nachgewiesen werden.

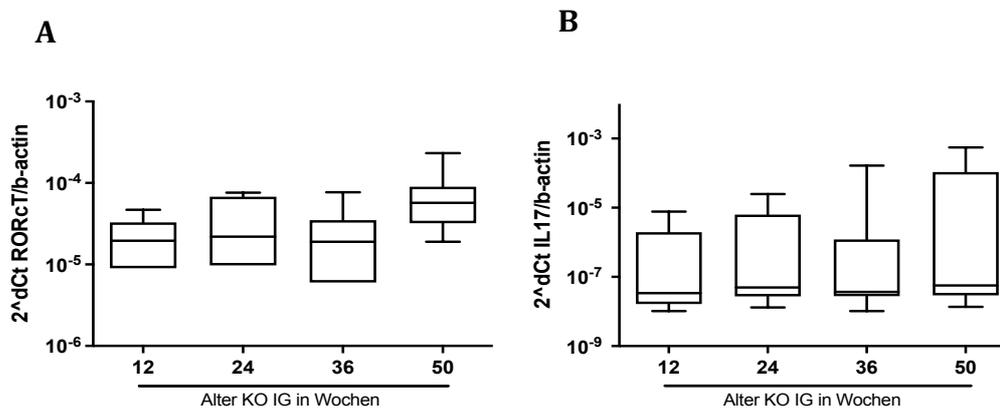


Abb.6: Genexpression im Magengewebe von *H. pylori*-negativen IG-Mäusen

A.: RORyt-Expression in der KO IG. Gewebeentnahme erfolgte im Alter von 12-50 Wochen.

B: IL-17-Expression in der KO IG. Gewebeentnahme erfolgte im Alter von 12-50 Wochen.

Die Werte sind als relative Expression dargestellt, jeweils normalisiert auf b-Actin mithilfe der $2^{\Delta Ct}$ -Methode. Die Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

Die hochsignifikanten Unterschiede der RORyt-Expression bei den 24 ($p = 0,0097$), 36 ($p < 0,001$) und 50 Wochen ($p < 0,001$) alten Tieren wurden dargestellt (Abb. 7A). Bereits im Alter von 12 Wochen stieg der Transkriptionsfaktor für Th17-Zellen deutlich an. Im Vergleich zur *H. pylori*-negativen Kontrollgruppe stiegen die RORyt-Werte mit zunehmendem Alter und somit fortschreitender Karzinogenese kontinuierlich an. Obwohl IL-17 von Th17-Zellen produziert wird, kann die IL-17-Expression nicht mit der RORyt-Expression gleichgesetzt werden. Abbildung 7 visualisiert die signifikanten Unterschiede zwischen den nicht infizierten und den *H. pylori*-positiven Tieren. Bei Gegenüberstellung der gesamten Kohorte der Kontrollgruppe und der *H. pylori*-positiven, altersentsprechend aufgeteilten Tiere ist eine deutliche Tendenz erkennbar. Auch die Expression von IL-17 stieg mit zunehmendem Alter an. Genau wie bei der Expression von RORyt war im Alter von 12 Wochen zwar eine Erhöhung erkennbar, jedoch ebenfalls ohne signifikante Unterschiede. Im Alter von 24 Wochen stieg die Expression der infizierten Tiere bereits deutlich an ($p < 0,01$), um im Alter von 36 und 50 Wochen Maximalwerte zu erreichen ($p < 0,001$).

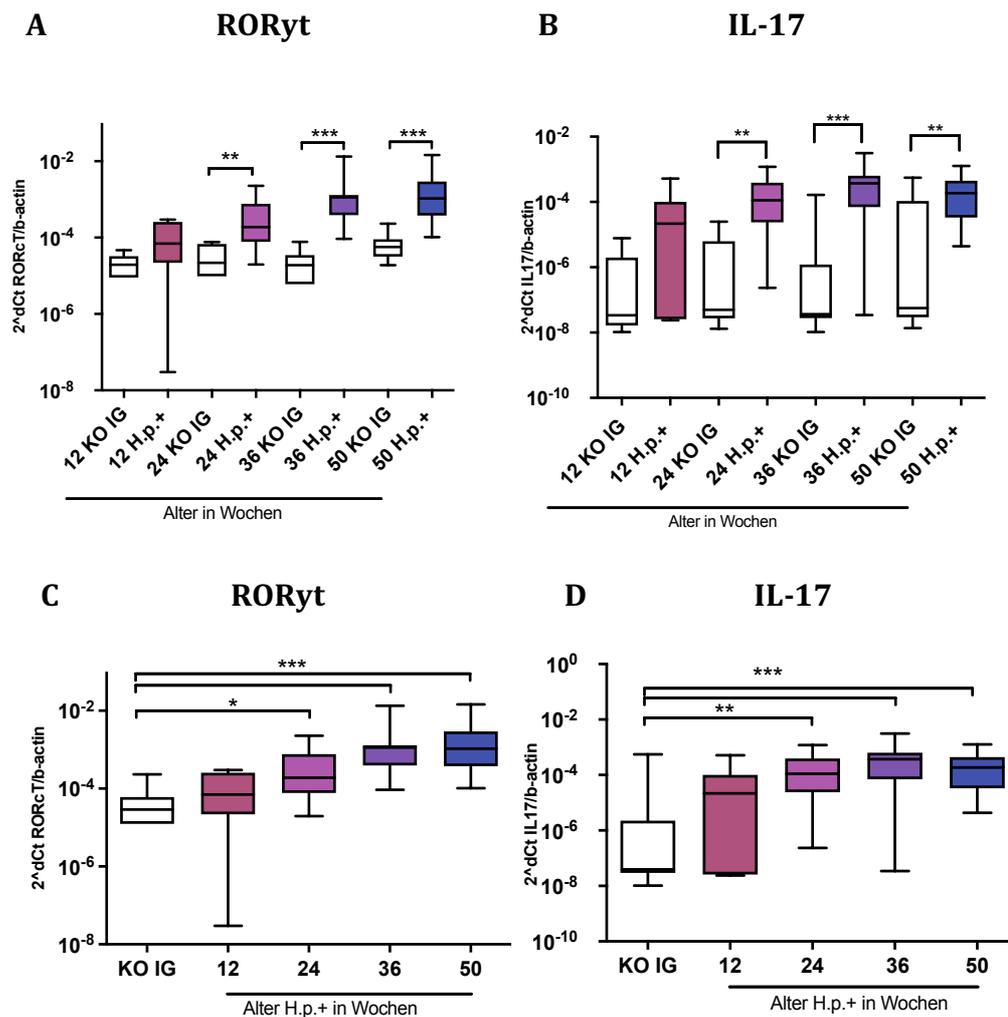


Abb.7: Genexpression im Magengewebe von *H. pylori*-positiven und negativen IG-Mäusen

A und C: RORyt-Expression in Gewebeproben des Magenkorpus bei *H. pylori*-positiven IG-Mäusen verglichen mit einer Kontrollgruppe

B und D: IL-17-Expression in Gewebeproben des Magenkorpus bei *H. pylori*-positiven IG-Mäusen verglichen mit einer Kontrollgruppe

Die Werte sind als relative Expression dargestellt, jeweils normalisiert auf b-Actin mithilfe der $2^{\Delta\text{Ct}}$ -Methode. Die Analyse wurde mittels Mann-Whitney-U-Test (A und B) bzw. Kruskal-Wallis-Test (C und D) durchgeführt und die Signifikanz (*) als $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ dargestellt.

3.3.2 Korrelationsanalysen - Transkriptionsfaktor RORyt und Interleukin-17

Die zentralen Risikofaktoren der Karzinogenese der INS-GAS-Maus sind die Infektion mit *H. pylori* und das zunehmende Alter. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der miR-155-Expression und proinflammatorischen Th17-Zellen zu untersuchen, erfolgten Korrelationsanalysen der miR-155 sowohl mit RORyt – als wesentlichem Transkriptionsfaktor dieser Zelllinie – als auch mit dem von Th17-Zellen produzierten IL-17. Es zeigten sich positive Korrelationen zwischen der miR-155-Expression und der Expression von RORyt ($r = 0,1072$; $p = 0,0479$) (Abb. 8). Im jungen Alter von 12 Wochen ($r = 0,9778$; $p = 0,0014$) (Abb. 9 A) sowie im Alter von 50 Wochen ($r = 0,3773$; $p = 0,0255$) (Abb. 9 D) konnte ein signifikanter Zusammenhang dargestellt werden. In den Einzelkorrelationsanalysen der 24 und 36 Wochen alten Tiere war kein Zusammenhang zu erkennen.

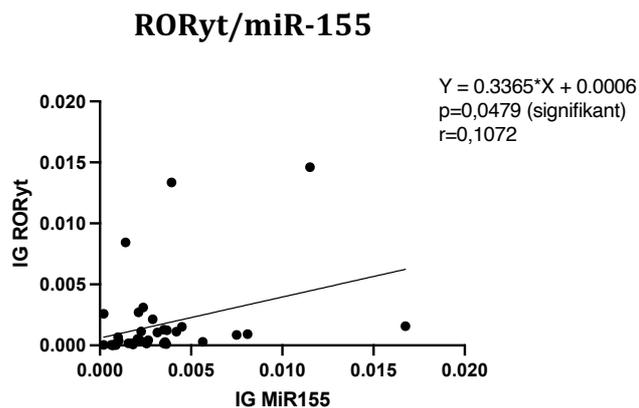


Abb.8: Korrelation zwischen RORyt-Expression und miR-155-Expression im Magenkorpus der IG-Maus.

Die Analyse wurde mittels Spearman-Korrelationsanalyse durchgeführt, $n = 37$. Es wurde jeweils die relative Expression verwendet, für *miRNA-155* normalisiert auf snoR202 und für RORyt normalisiert auf b-Actin – beides mithilfe der $2^{\Delta\text{CT}}$ -Methode.

RORyt/miR-155

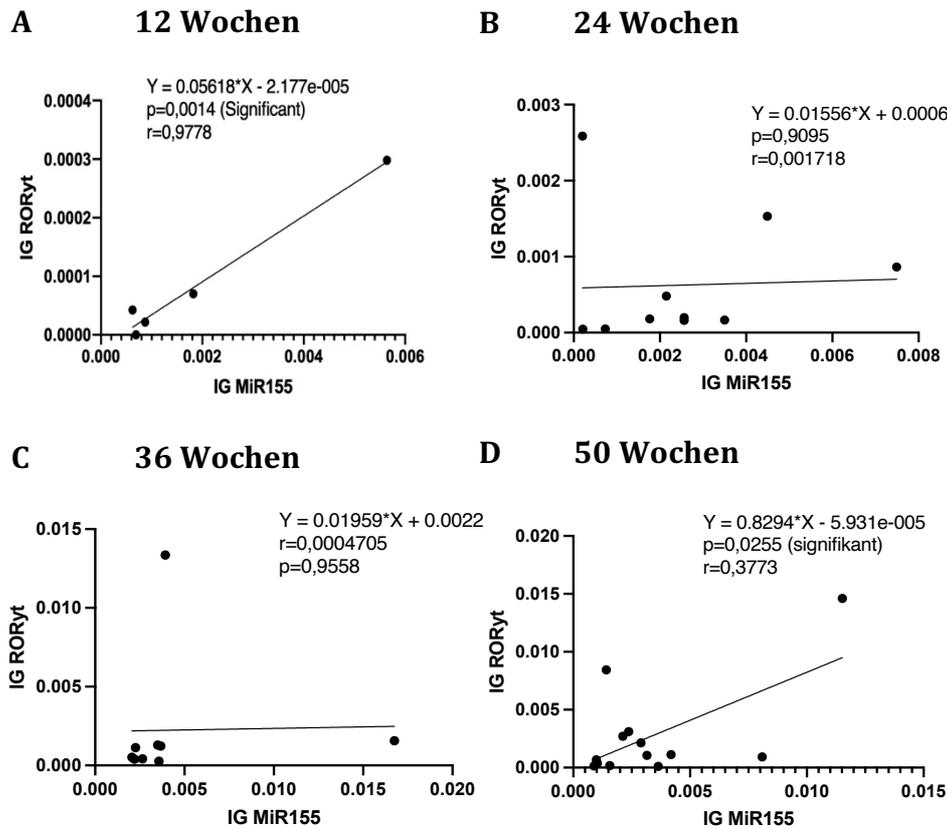


Abb.9: Korrelation zwischen RORyt -Expression und miR-155-Expression im Magenkorpus der IG-Maus.

A: Korrelation zwischen RORyt und miR-155-Expression im Magenkorpus der IG-Maus im Alter von 12 Wochen, zusätzliche Einzeichnung einer Regressionsgeraden, $n = 5$. B: Korrelation zwischen RORyt und miR-155-Expression im Magenkorpus der IG-Maus im Alter von 24 Wochen, zusätzliche Einzeichnung einer Regressionsgeraden, $n = 10$. C: Korrelation zwischen RORyt und miR-155-Expression im Magenkorpus der IG-Maus im Alter von 36 Wochen, zusätzliche Einzeichnung einer Regressionsgeraden, $n = 9$. D: Korrelation zwischen RORyt und miR-155-Expression im Magenkorpus der IG-Maus im Alter von 50 Wochen, zusätzliche Einzeichnung einer Regressionsgeraden, $n = 13$.

Die Analyse wurde mittels Spearman-Korrelationsanalyse durchgeführt. Es wurde jeweils die relative Expression verwendet, für miR-155 normalisiert auf snoR202 und für RORyt normalisiert auf b-Actin, beides mithilfe der $2^{\Delta\text{CT}}$ -Methode.

In ähnlicher Weise wurde der Zusammenhang zwischen miR-155 und IL-17 untersucht. Hier konnte unabhängig vom Alter der *H. pylori*-infizierten Tiere keine Korrelation der Expression beschrieben werden ($r = 0,03478$, $p = 0,2691$) (Abb. 10 A). Bei der Betrachtung der 12 Wochen alten INS-GAS-Mäuse mit einer *H. pylori*-Infektion war jedoch eine signifikante positive Korrelation der beiden Parameter vorhanden ($r = 0,8746$, $p = 0,0196$) (Abb. 10 B). Die Korrelationsanalysen von miR-155 und IL-17 bei 24 ($r = 0,2620$; $p = 0,1305$), 36 ($r = 0,007927$;

p = 0,8198) und 50 (r = 0,01724; p=0,6690) Wochen alten Mäusen zeigte keine signifikante Assoziation.

Tabelle 8: Übersicht erhobener Korrelationsanalysen zwischen miR-155 und RORyt sowie zwischen miR-155 und IL-17

	miRNA-155 im Alter von (Wochen)	PValue	Spearman r	Signifikanz *
RORyt	12	0,0014	0,9778	**
	24	0,9095	0,0017	ns
	36	0,9558	0,0005	ns
	50	0,0255	0,3773	*
IL-17	12	0,0196	0,8746	*
	24	0,1305	0,2620	ns
	36	0,8198	0,0080	ns
	50	0,6690	0,0172	ns

(Signifikanz (*) als * p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001 dargestellt, ns entspricht nicht signifikant)

IL-17/miR-155

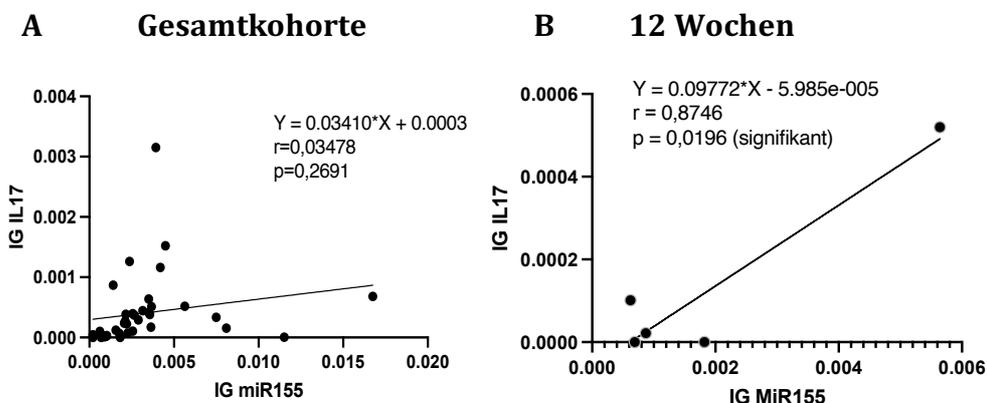


Abb. 10: Korrelation zwischen IL-17-Expression und miR-155-Expression im Magenkorpus der IG-Maus.

A: Korrelation zwischen IL-17- und miR-155-Expression im Magenkorpus der IG-Maus unabhängig vom Alter, zusätzliche Einzeichnung einer Regressionsgeraden, n = 37.

B: Korrelation zwischen IL-17- und miRNA-155-Expression im Magenkorpus der IG-Maus im Alter von 12 Wochen, zusätzliche Einzeichnung einer Regressionsgeraden, n = 5. Die Analyse wurde mittels Spearman-Korrelationsanalyse durchgeführt. Es wurde jeweils die relative Expression verwendet, für miRNA-155 normalisiert auf snoR202 und für IL-17 normalisiert auf b-Actin, beides mithilfe der $2^{\Delta\text{CT}}$ -Methode.

3.4 Regulatorische T-Zellen

3.4.1 Gruppenanalysen - Transkriptionsfaktor FoxP3 Interleukin-10

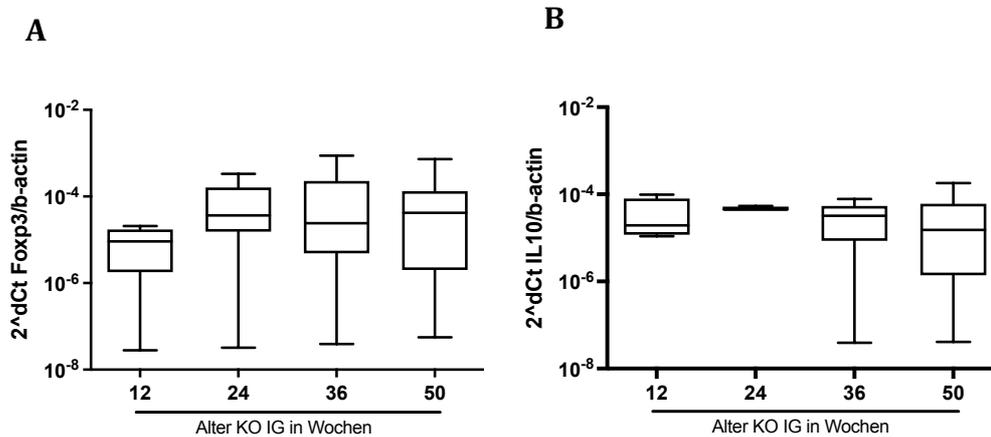


Abb. 11: Genexpression im Magengewebe von *H. pylori*-negativen IG-Mäusen

A: FoxP3-Expression in der KO IG. Gewebeentnahme erfolgte im Alter von 12-50 Wochen.

B: IL-10-Expression in der KO IG. Gewebeentnahme erfolgte im Alter von 12-50 Wochen.

Die Werte sind als relative Expression dargestellt, jeweils normalisiert auf b-Actin mithilfe der $2^{\Delta Ct}$ -Methode. Die Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

Die regulatorischen T-Zellen haben durch die Hemmung von Effektorzellen einen antiinflammatorischen Effekt und nehmen eine zentrale Rolle in der Persistenz der *H. pylori*-Infektion ein. Der Transkriptionsfaktor FoxP3 wird speziell von den $CD4^{+}$ - $CD25^{\text{high}}$ - T_{reg} -Zellen exprimiert und stellt somit einen molekularen Marker für diese Zelllinie dar. TGF- β sorgt für die Differenzierung von naiven T-Zellen und regulatorischen T-Zellen und wird auch durch diese zusammen mit dem IL-10 sezerniert. In diesem Experiment wurde die Expression von FoxP3 und IL-10 unter dem Einfluss einer *H. pylori*-Infektion im INS-GAS-Mausmodell untersucht. In der Kontrollgruppe konnten unabhängig vom Alter keine Änderungen im Expressionsniveau von IL-10 und FoxP3 festgestellt werden (Abb. 11 A und B).

Wie in Abbildung 12 A dargestellt wird, fielen die deutlichsten Unterschiede der Expression von FoxP3 beim direkten Vergleich infizierter und negativer Tiere im Alter von 12 Wochen auf ($p = 0,0012$). Während die 24 Wochen alten Mäuse keine signifikante Erhöhung von FoxP3 zeigten ($p = 0,0831$), konnten in den 36 ($p = 0,0197$) und 50 Wochen ($p = 0,0316$) alten Tieren signifikante Unterschiede festgestellt werden. Beim Vergleich aller Kontrollgruppen

unterschiedlichen Alters mit den entsprechenden *H. pylori*-positiven IG-Gruppen wurde die Erhöhung von FoxP3 zwar bei allen Altersgruppen sichtbar, jedoch nur bei 36 und 50 Wochen alten Mäusen deutlich ($p < 0,05$) (Abb. 12 C). Das IL-10 wird von antiinflammatorischen regulatorischen T-Zellen exprimiert und spielt eine zentrale Rolle in der Persistenz der *H. pylori*-Infektion. Zuvor (Abb. 12 B) konnte bereits eine Erhöhung des Transkriptionsfaktors FoxP3 im Alter von 12 Wochen mit persistierendem Anstieg entsprechend des Alters gezeigt werden. Bei der Betrachtung der Expression von IL-10 zeigte sich eine Erhöhung jedoch nur im Alter von 50 Wochen ($p = 0,0111$) (Abb. 12 B). Beim Vergleich aller nicht infizierten Mäuse unterschiedlichen Alters mit der Expression des antiinflammatorischen IL-10 infizierter Mäuse kam ein ähnliches Ergebnis zustande ($p < 0,01$) (Abb. 12 D).

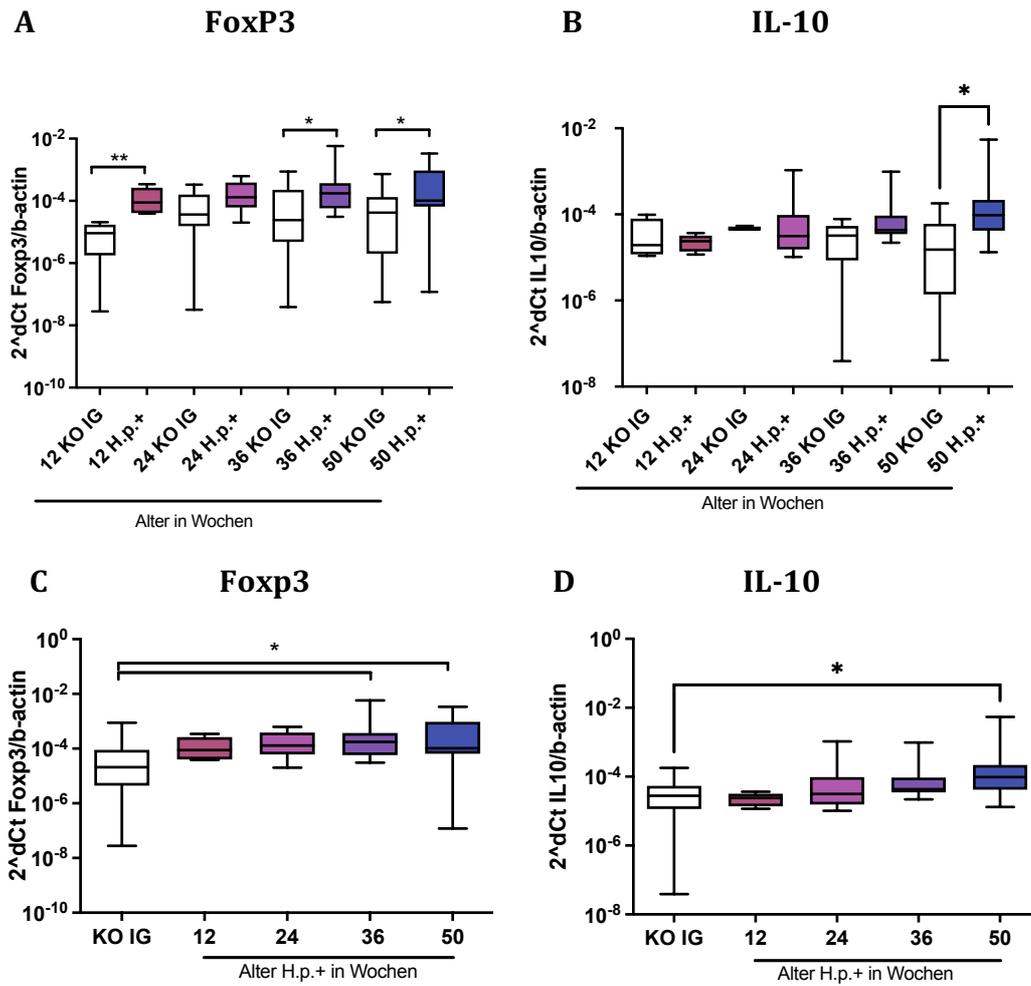


Abb. 12: Genexpression im Magengewebe von *H. pylori*-positiven und negativen IG-Mäusen

A und C: FoxP3-Expression in Gewebeproben des Magenkorpus bei *H. pylori*-positiven IG-Mäusen verglichen mit einer Kontrollgruppe

B und D: IL-10-Expression in Gewebeproben des Magenkorpus bei *H. pylori*-positiven IG-Mäusen verglichen mit einer Kontrollgruppe

Die Werte sind als relative Expression dargestellt, jeweils normalisiert auf b-Actin mithilfe der 2^{ΔCt}-Methode. Die Analyse wurde mittels Mann-Whitney-U-Test (A und B) bzw. Kruskal-Wallis-Test (C und D) durchgeführt und die Signifikanz (*) als * p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001 dargestellt.

3.4.2 Korrelationsanalysen - Transkriptionsfaktor FoxP3 und Interleukin-10

FoxP3 und IL-10 wurden auf einen Zusammenhang mit der Expression von miR-155 geprüft. In ausgewählten Altersklassen zeigte sich eine positive Korrelation der geprüften Parameter (Abb. 13). Für eine positive Korrelation von IL-10 und FoxP3 wurden nachfolgend beispielhaft Abbildungen erstellt.

Tabelle 9: Übersicht erhobener Korrelationsanalysen zwischen miR-155 und FoxP3 sowie zwischen miR-155 und IL-10

	miRNA-155 im Alter von (Wochen)	P _{Value}	Spearman r	Signifikanz *
FoxP3	12	0,0496	0,7730	*
	24	0,0621	0,3699	ns
	36	0,6967	0,0230	ns
	50	0,4136	0,0616	ns
IL-10	12	0,2508	0,4018	ns
	24	0,3177	0,1243	ns
	36	0,9205	0,0015	ns
	50	0,0012	0,6308	**

(Signifikanz (*) als * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ dargestellt, ns entspricht nicht signifikant)

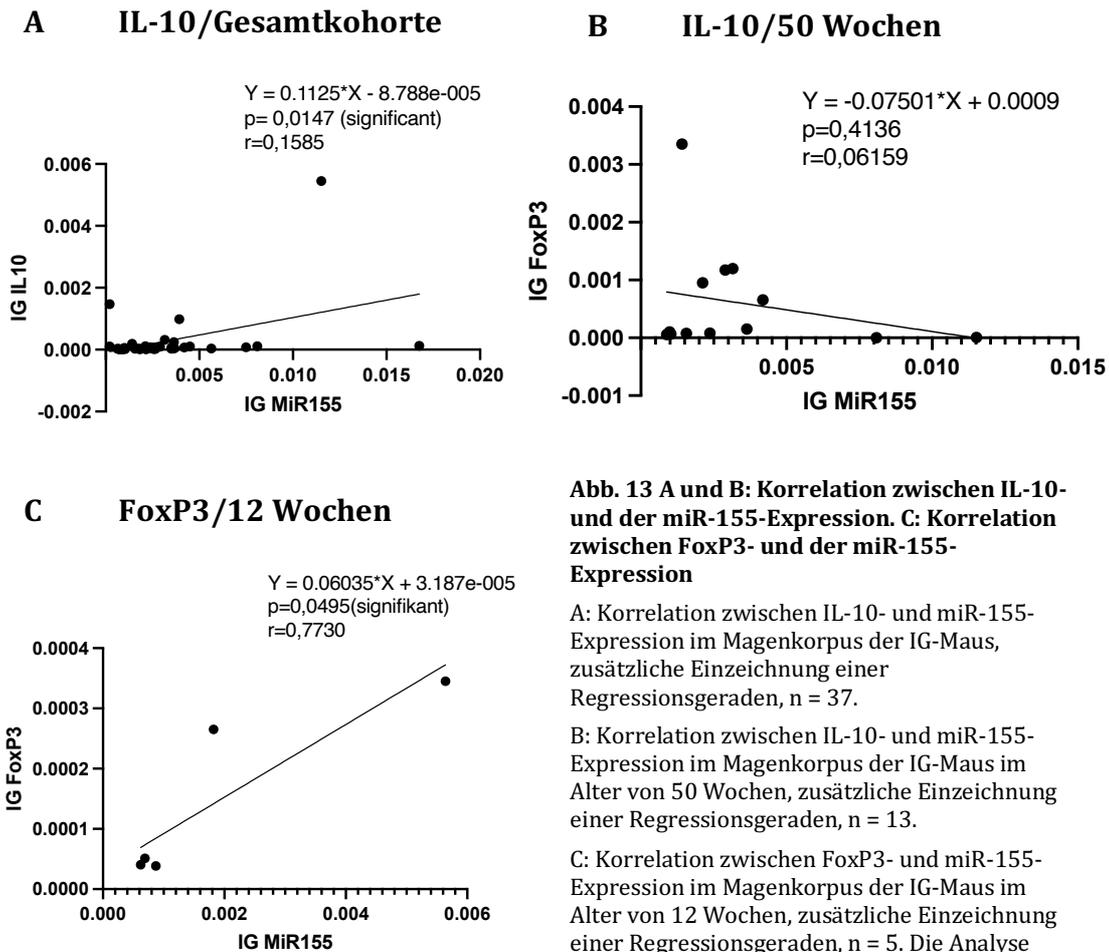


Abb. 13 A und B: Korrelation zwischen IL-10- und der miR-155-Expression. C: Korrelation zwischen FoxP3- und der miR-155-Expression

A: Korrelation zwischen IL-10- und miR-155-Expression im Magenkorpus der IG-Maus, zusätzliche Einzeichnung einer Regressionsgeraden, $n = 37$.

B: Korrelation zwischen IL-10- und miR-155-Expression im Magenkorpus der IG-Maus im Alter von 50 Wochen, zusätzliche Einzeichnung einer Regressionsgeraden, $n = 13$.

C: Korrelation zwischen FoxP3- und miR-155-Expression im Magenkorpus der IG-Maus im Alter von 12 Wochen, zusätzliche Einzeichnung einer Regressionsgeraden, $n = 5$. Die Analyse wurde mittels Spearman-Korrelationsanalyse durchgeführt. Es wurde jeweils die relative Expression verwendet, für miRNA-155 normalisiert auf snoR202 und für FoxP3 und IL-10 normalisiert auf b-Actin, alles mithilfe der $2^{\Delta\text{CT}}$ -Methode.

3.5 Th17 und T_{reg} - Balance

3.5.1 Th17/ T_{reg} - Scoring

Sowohl Th17-Zellen, als auch regulatorische T-Zellen nehmen eine wichtige Rolle in der Immunreaktion nach einer *H.pylori*-Infektion ein. Um eine mögliche Objektivierbarkeit des Th17/ T_{reg} -Gleichgewichts im INS-GAS-Mausmodell zu untersuchen, entwickelten wir ein Scoring-System. Dazu erfolgte eine Addition der $2^{\Delta\text{Ct}}$ -Werte der Th17-spezifischen ROR γ t- und IL-17-Expression und der T_{reg} -spezifischen FoxP3- und IL-10-Expression. Die beiden Werte wurden in ein Verhältnis gesetzt.

$$Score = \frac{(2^{\Delta Ct} RORyt + 2^{\Delta Ct} IL - 17)}{(2^{\Delta Ct} FoxP3 + 2^{\Delta Ct} IL - 10)}$$

Mit zunehmendem Alter der *H. pylori*-positiven INS-GAS-Mäuse konnte eine Dysbalance mit einer Dominanz von RORyt und IL-17 gegenüber Foxp3 und IL-10 nachgewiesen werden. Verglichen mit der Kontrollgruppe der Gesamtkohorte (KO IG) zeigte sich bei *H. pylori*-infizierten Tieren im Alter von 36 (p = 0,001) und 50 Wochen (p = 0,007) ein signifikanter Anstieg und entspricht damit einer, im Vergleich zur FoxP3- und IL-10-Expression, vermehrten RORyt- und IL-17-Expression (Abb. 14).

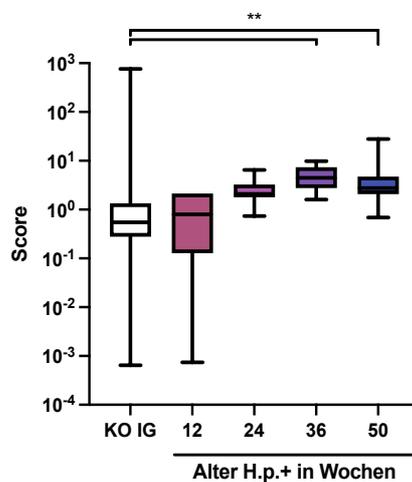


Abb. 14: Verhältnis der (RORyt+IL-17)/(FoxP3+IL-10)

Expression im Magenkorpus der INS-GAS-Maus, Gewebeentnahme erfolgte im Alter von 12-50 Wochen, Vergleich mit einer *H. pylori*-negativen Kontrollgruppe im Alter von 12-50 Wochen.

Die Werte sind als relative miRNA-Expression dargestellt, jeweils normalisiert auf b-Actin mithilfe der $2^{\Delta Ct}$ -Methode. Die Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt und die Signifikanz (*) als * p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001 dargestellt.

3.5.2 Korrelationsanalyse - miR-155 und Th17/T_{reg}-Score

Das entwickelte Scoring-System wurde auf einen Zusammenhang mit der Expression von miR-155 geprüft. Insgesamt zeigte sich eine positive Korrelation der geprüften Parameter ($r = 0,3434$; $p = 0,0063$ (Abb. 15)). Die Korrelation veranschaulicht den Zusammenhang der miR-155 Expression und, durch einen Score > 1 , der Dysbalance der Immunreaktion mit einer Dominanz von ROR γ t und IL-17 gegenüber Foxp3 und IL-10.

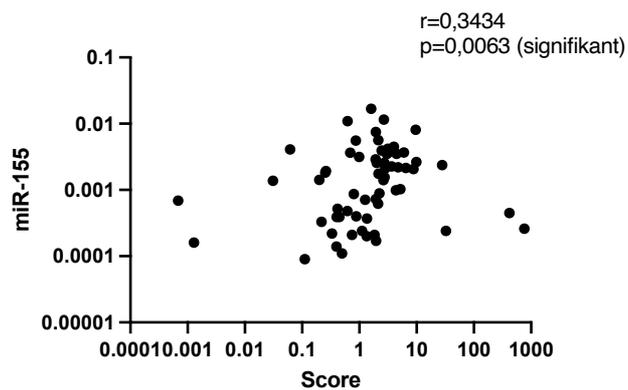


Abb. 15: Korrelation zwischen der miR-155-Expression im Magenkorpus der IG-Maus und dem Th17/Treg-Score.

Die Analyse wurde mittels Spearman-Korrelationsanalyse durchgeführt. Es wurde die relative Expression, für miRNA-155 normalisiert auf snoR202, verwendet, mithilfe der $2^{\Delta\text{CT}}$ -Methode.

4 Diskussion

Der Zusammenhang zwischen der chronisch entzündlichen Gastritis, die häufig mit einer *H. pylori* Infektion einhergeht und dem Adenokarzinoms des Magens ist wissenschaftlich sehr gut belegt. Dennoch sind die molekularen Mechanismen der *H. pylori* Onkogenität in Anbetracht dessen, dass nur ein Teil der Patienten von neoplastischen Veränderungen betroffen ist, bisher nicht vollständig verstanden. In der vorliegenden Studie haben wir die Expression der miR-155, die im Rahmen einer *H. pylori* Infektion häufig dereguliert und mit einer chronischen Entzündung verknüpft ist, in einem in vivo Mausmodell untersucht. Für die Studie wurde ein INS-GAS-Mausmodell verwendet, bei dem die Tiere präkanzeröse Veränderungen und schließlich invasive Karzinome entwickelten. Diese Arbeit zielt spezifisch auf die Frage nach der miR-155 Interaktion in der T-Zell-Immunantwort durch proinflammatorische Th17- und antiinflammatorische T_{reg}-Zellen und der dazugehörigen Zytokine im Rahmen einer *H. pylori*-Infektion ab. Neben diesen Kernaspekten werden in den folgenden Abschnitten auch die Auswahl der Versuchstiere, beeinflussende Faktoren der miR-155-Expression sowie präanalytische Gedankengänge und Limitationen präsentiert.

4.1 Charakterisierung der INS-GAS-Maus und des Mauskollektivs

Das Adenokarzinom des Magens ist die vierthäufigste durch Krebs verursachte Todesursache weltweit (19). Zum Verständnis der Entstehung dieser Krebserkrankung ist ein authentisches Tiermodell notwendig, welches der Karzinomentstehung im menschlichen Körper ähnlich ist. In den letzten Dekaden wurde nach einem Mausmodell, welches der menschlichen Physiologie und Krankheitsentstehung entspricht, gesucht (98). Wildtyp-Mäuse insgesamt entwickeln jedoch nur selten spontan Magenkarzinome (99), so dass die Tiere entweder mit *H. pylori* oder anderen chemischen Karzinogenen getriggert werden müssen (100). Alternativ kann die spontane Karzinomentstehung durch transgen veränderte Tiere herbeigeführt werden (101). In den beschriebenen Experimenten wurde das INS-GAS-Mausmodell genutzt, um die von *H. pylori* veränderte Genexpression zu untersuchen. Durch INS-GAS (FVB/N) transgen veränderte Mäuse wurde bereits die Rolle von Gastrin auf die Karzinomentstehung untersucht (102). Gastrin wird von G-Zellen der Magenmukosa produziert und ist durch den Einfluss auf die Parietalzellen für die Säureproduktion des Magens verantwortlich. Die INS-GAS-Mäuse zeigten anfangs eine deutlich erhöhte Säureproduktion und eine erhöhte Anzahl von Parietalzellen. Im Alter von 20 Wochen änderte sich dies jedoch zu einer verminderten Säureproduktion und einer verminderten Anzahl an Parietalzellen. Im Alter von 20 Monaten

entwickelten die INS-GAS-Mäuse spontan Metaplasien, Dysplasien und schließlich Magenkarzinome (27). Durch eine *Helicobacter*-Infektion wurde der Zeitraum auf < 40 Wochen verkürzt. Umgekehrt konnte durch eine frühe Eradikationstherapie der bereits infizierten INS-GAS-Mäuse eine verminderte epitheliale Proliferation und somit eine verzögerte Entwicklung von Karzinomen beobachtet werden (103).

Die histologische Aufarbeitung des Modells erfolgte bereits in den vorgehenden Arbeiten und daher wurde in dem vorliegenden Teil dieser Arbeit darauf verzichtet. Weiterhin haben sich bereits diverse Publikationen mit der Karzinogenese und den histologischen Unterschieden abhängig vom Alter und vom *H. pylori*-Einfluss im INS-GAS-Mausmodell beschäftigt (27,101,103). Die zur Verfügung stehende Anzahl der Versuchstiere entspricht den üblichen Normen, da diese Zahl für die Erfassung eines relevanten Unterschieds in Abhängigkeit des Alters ausreichend ist. Diese Aussage wird auf die Ergebnisse von Fox et al. (29) bei Fallzahlen in ähnlicher Größenordnung gestützt. Um das Leid der Tiere zu verringern wurden keine zusätzlichen Tiere für dieses Experiment verwendet.

4.2 Rolle von miR-155

Mehrere Studien haben bereits die unterschiedliche miRNA-Expression in karzinogen veränderten Gewebeproben des Magens beschrieben und die Rolle bei der Karzinomentstehung diskutiert (104,105). Es wird von frühzeitigen Veränderungen der miRNAs im Verlauf der Krankheitsentstehung des Magenkarzinoms ausgegangen (93). Auch Ergebnisse aus unserer eigenen Klinik haben bereits einen allmählichen Anstieg der Expression der miR-155 in Korrelation mit der Correa-Kaskade gezeigt (93). Für verschiedene molekulare Subtypen des Magenkarzinoms wurden einzigartige miRNA-Expressionsmuster beschrieben (105).

In den letzten Jahren wurden wesentliche Erkenntnisse gewonnen, die die bedeutende Rolle der miRNA bei Erkrankungen des Magens untersuchten. Aufgrund ihrer hohen Stabilität und der Nachweisbarkeit in verschiedensten Geweben sind diese Moleküle als Biomarker geeignet. Für die klinische Diagnostik wird aufgrund der Kosten- sowie Ressourceneinsparung und der Patientensicherheit nach einem im Kreislauf zirkulierendem Biomarker gesucht. Die Arbeitsgruppe um Mahboobi et al. (106) konnte eine fünffach erhöhte Expression der miR-155 im Serum von *H. pylori* infizierten Patienten im Vergleich zur *H. pylori* negativen Kontrollgruppe zeigen. In invasiv gewonnenen Gewebeproben des Magens wurde eine 10-fach erhöhte miR-155-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. Die Veränderungen im Gewebe bieten also präzisere Informationen. Um Ergebnisse auf höchstem Niveau zu

erhalten haben wir uns in dieser Arbeit auf Gewebeanalysen fokussiert. Neben epidemiologischen und genetischen Faktoren beeinflussen miRNAs durch posttranskriptionale Regulation von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen die Entstehung gastrointestinaler Tumore (107). Für verschiedene Tumorentitäten wurden bereits verschiedene MiRNA-Expressionsmuster beschrieben (108,109). In einer der ersten Studien zur miRNA-155 haben Petrocca et al. die Veränderung bei der chronischen Entzündung der Magenschleimhaut gezeigt (110). MiR-155 nimmt auch eine Schlüsselrolle im angeborenen und erworbenen Immunsystem ein und ist ein entscheidender Regulationsfaktor in der B- und T-Zelldifferenzierung und -funktion. Die miRNA-155 spielt neben anderen miRNAs eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Entzündungen und malignen Magenerkrankungen und kann daher ein Prognosemarker für Magenkrebs und das Stadium der chronischen Gastritis sein. Es existieren bereits einige Studien, die sich intensiv mit der miR-155 und deren Anstieg durch eine *H. pylori*-Infektion beschäftigen (111,112).

In einem ersten Schritt untersuchten wir in dieser Studie die Expression der miR-155 im Korpus des Magens der INS-GAS-Maus von *H. pylori* infizierten Tiere verglichen mit einer *H. pylori* negativen INS-GAS-Kontrollgruppe. Die Gewebeentnahme erfolgte im Alter von 12 bis 50 Wochen. Wir konnten die bereits veröffentlichten Ergebnisse zur miR-155 Expression bestätigen. Bei der *H. pylori* negativen Kontrollgruppe zeigte sich keine signifikante Änderung der Expression mit zunehmendem Alter. In der vorliegenden Arbeit konnte die miR-155 Expression in Gewebeproben sehr gut zwischen den *H. pylori* infizierten Tieren und der Kontrollgruppe unterscheiden (Abb. 4C). Die Übertragbarkeit auf menschliche Zellen wurde bereits von Wan et al. untersucht und zeigte in verschiedenen Zellen menschlicher Gewebeproben ebenfalls ein hohes Expressionslevel der miR-155 während einer *H. pylori* Infektion (49,55).

Die durch das Bakterium ausgelöste Immunreaktion ist komplex. Sowohl die Entzündungsreaktion als auch die Immunantwort sind unfähig, das *H. pylori* vollständig zu eliminieren, was zu einer lebenslangen Persistenz im Organismus führt. Bereits aus unserer Klinik wurde ein Anstieg der Expression der miR-155 in Korrelation mit dem Fortschreiten der Correa-Kaskade im menschlichen Organismus beschrieben (93). Die eigenen Daten zur Expression der miR-155 in Gewebeproben sind mit den o. g. Resultaten vereinbar, wenngleich wir uns ausschließlich auf Proben des Corpus bezogen haben. Die Abläufe der Inflammation und der Karzinogenese im Corpus sind für weiterführende Erläuterungen ausreichend, daher verzichteten wir in dieser Studie auf erneute Untersuchungen des Antrums. Ein Unterschied der miR155-Expression verschiedener Regionen im Magen wurde ebenfalls bereits durch

unsere Arbeitsgruppe beschrieben. Das Antrum zeigte in diesen Untersuchungen im Vergleich zum Corpus signifikant geringere Expressionen der miR-155 (93).

Nachdem wir einen schrittweisen Anstieg der miRNA-Expression entsprechend den Stadien der Correa-Kaskade gezeigt haben, wollten wir auch einen möglichen Zusammenhang der vermehrten Expression mit dem *H. pylori*-Status prüfen. Tatsächlich war die Expression der miR-155 bei den *H. pylori* infizierten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe stark erhöht (Abb. 4B). Obwohl die miRNA-Expression auch in der Kontrollgruppe leicht erhöht war, erreichten die Unterschiede keine statistische Signifikanz. Dieses Ergebnis kann für den klinischen Einsatz von großer Bedeutung sein. Eine Reduktion des Expressionsniveaus der miR-155 während einer *H. pylori* Infektion könnte die Entwicklung einer chronischen Gastritis bis zum Magenkarzinom verhindern (111).

Bei einer anderen miRNA, der miR-223, wurde bereits eine höhere Expression beim Magenkarzinom mit *H.pylori*-Infektion – im Vergleich zu Magenkarzinomen ohne Infektion – und eine signifikant höhere Expression bei gesunden Probanden mit *H. pylori* – verglichen mit solchen ohne Infektion – festgestellt (113). Auch die hier verwendeten INS-GAS-Mäuse weisen hohe zirkulierende Gastrinspiegel auf und entwickeln ausnahmslos eine atrophische Gastritis und eine Achlorhydrie. Aufgrund der bereits veröffentlichten Studien zum INS-GAS-Mausmodell (96,100,114) kann von einer Karzinomentstehung der *H. pylori*-positiven Mäuse im Alter von 50 Wochen ausgegangen werden. Die bereits im Alter von 12 und 24 Wochen signifikante Erhöhung der Expression unterstreicht den Einfluss von *H. pylori*. Die Tiere der Kontrollgruppe entwickeln auch im Alter von 50 Wochen – dem Modell entsprechend – bereits Dysplasien. Dies erklärt den geringen, nicht signifikanten Anstieg der Expression der miR-155 in der Kontrollgruppe.

4.3 Geschlechterabhängigkeit

Die Tumorentstehung bei der INS-GAS-Maus unterscheidet sich im Allgemeinen abhängig vom Geschlecht. In unseren Analysen konnte ein ausgeprägter Anstieg der Expression der miR-155 der männlichen Versuchstiere im Alter von 24, 36 und 50 Wochen nachgewiesen werden. Jedoch war auch bei den weiblichen Tieren ein geringerer Anstieg der miR-155-Expression erkennbar. In der *H. pylori* negativen Kontrollgruppe war kein Unterschied der miR-155 Expression zwischen männlichen und weiblichen Tieren erkennbar. Die männlichen Mäuse reagieren schneller und stärker auf *H. pylori* und haben im Vergleich zu den weiblichen Mäusen ein erhöhtes Karzinomrisiko (29). Diese Unterschiede liegen vor allem an der Hormonsekretion. Die durch weibliche Tiere produzierte Östrogene haben einen protektiven

Effekt, zusätzlich können Androgene die Karzinomentwicklung in männlichen Mäusen verstärken (29). Ähnliche Effekte wurden bereits im menschlichen Organismus beschrieben (115).

Wegen der Verfügbarkeit der Proben konnten nur wenige Proben, beispielsweise der weiblichen Tiere im Alter von 12 Wochen zur systematischen Beurteilung zu diesem Zeitpunkt, verwendet werden. Bei Betrachtung der Dynamik über die Zeit lässt sich ein valider Einblick in die geschlechtsspezifischen Veränderungen der miR-155 erkennen. Bei der Betrachtung der älteren Versuchstiere im Alter von 24, 36 und 50 Wochen war ein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied der Expression der miRNA-155 erkennbar.

4.4 Der Einfluss der miR-155 auf das Immunsystem

Eine *H. pylori* Infektion löst im Organismus eine Vielzahl von Reaktionen aus und das Immunsystem nimmt eine wichtige Rolle bei der Regulierung und Persistenz der Infektion ein. Ergebnisse aus unserer eigenen Klinik und aus dieser Studie haben bereits einen allmählichen Anstieg der Expression der miR-155 in Korrelation mit der Correa-Kaskade gezeigt (93). Die anhaltende chronische Entzündung löst verschiedene molekulare Mechanismen aus (116). Die individuelle Immunantwort ist eine der Hauptursachen für die Persistenz des Bakteriums. In dieser Studie wollten wir nun die Balance des Immunsystems im Rahmen der chronischen Infektion und dem Fortschreiten der Karzinogenese durch Expressionsanalysen von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren in Verbindung mit Th17- und T_{reg}-Zellen im Zusammenhang mit der miR-155 untersuchen.

4.4.1 Der Einfluss der miR-155 auf Th17-Zellen

Th17-Zellen sind für die Abwehr des Wirts gegen Krankheitserreger von entscheidender Bedeutung, wurden aber auch mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Karzinogenese in Verbindung gebracht (117).

Wir haben uns in dieser Studie auf ROR γ t als wesentlichen Transkriptionsfaktor für die proinflammatorischen Th17-Zellen und das von ihnen produzierte Zytokin IL-17 fokussiert. Da es sich um eine Explorationsstudie handelt, stand zunächst die Beurteilung der miRNA-Expression im Mittelpunkt und die Anzahl an T-Zellen wurde nicht detailliert dargestellt.

Von besonderer Bedeutung war hier der signifikante Anstieg der Expression von ROR γ t und auch von IL-17, sowohl zu Beginn der *H. pylori*-Infektion als auch mit zunehmendem Alter der INS-GAS-Mäuse. Es zeigten sich positive Korrelationen im Alter von 12 und 50 Wochen

zwischen der miR-155-Expression und der Expression von ROR γ t als wesentlicher Transkriptionsfaktor der Th17-Zellen.

Entsprechend der aktuellen Studienlage sind Th1- und Th17-Zellen an der Reaktion auf *H. pylori* beteiligt (67,118). Durch die antigenpräsentierenden Zellen und die damit verbundene Zytokinausschüttung von IL-1 β , IL-23 und IL-6 werden Th17-Zellen aktiviert (119). ROR γ t wird direkt durch die miR-155 beeinflusst, unterstützt dadurch die Differenzierung der Th17-Zellen und nimmt so Einfluss auf die Immunantwort (63). Die Befunde der hier vorliegenden Studie stimmen mit den Beschreibungen von Yao et al. im Wesentlichen überein (120). Shi et al. zeigten an Ratten, denen die Fähigkeit zur IL-17-Produktion fehlte, eine verminderte *H. pylori*-Kolonisation und eine verminderte Entzündungsreaktion (118). IL-17 spielt eine wesentliche Rolle in der weiterführenden Zytokinausschüttung und der Rekrutierung von Neutrophilen. Shiomi et al. stellten in einem Mausmodell den von IL-17 abhängigen Anstieg der Neutrophilen in der Submukosa und der Lamina propria des Magens dar (78). Muzino et al. schilderten ebenfalls die Erhöhung von IL-17 bei Patienten mit durch *H. pylori* verursachten Ulcera (121). Diese Erkenntnisse wurden von Luzzza et al. auch in menschlichen Gewebeproben des Magens geschildert. Die Genexpression von IL-17 war bei *H. pylori*-positiven Patienten im Vergleich zur negativen Kontrollgruppe deutlich erhöht (80).

Auch wir konnten in der vorliegenden Studie einen Anstieg der IL-17-Expression im Rahmen der *H. pylori*-Infektion feststellen. Bei den 12 Wochen alten Tieren sahen wir jedoch trotz der kürzlich erfolgten *H. pylori*-Besiedlung keinen Unterschied zur negativen Kontrollgruppe. Die INS-GAS-Mäuse des Experiments wurden im Alter von acht bis zwölf Wochen mit *H. pylori* infiziert, woraufhin Proben des Magens mittels PCR untersucht wurden. Dies kann mit der erst kurz zurückliegenden Infektion in Zusammenhang gebracht werden. Das Immunsystem reagiert innerhalb der ersten zwei bis drei Tage auf eine *H. pylori*-Infektion – zuerst unspezifisch durch die angeborene Immunabwehr. Die Ausschüttung von Zytokinen und die Aktivierung der T-Zellen als Teil des erworbenen Immunsystems nimmt einige Wochen in Anspruch. Die früheste T-Zell-Antwort wurde nach zwei Wochen detektiert (77). Zusammenfassend lässt sich eine Korrelation der Expression der miR-155 und der Th17-Zellen mit zunehmendem Alter der *H. pylori* infizierten INS-GAS-Mäuse nachweisen.

Die Rolle von IL-17 bei der Entzündungsreaktion unterscheidet sich von derjenigen bei der Tumorentstehung im Magen. Die entarteten, sich unkontrolliert vermehrenden Zellen des Organismus sind in Zellverbände bestehend aus Fibroblasten, Fettzellen, Muskelzellen, aber auch Immunzellen eingebettet. Dieses unmittelbare Umfeld des Tumors kann immunsuppressiv wirken und so die erhöhte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine

begünstigen. Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde immunhistochemisch ein erhöhtes IL-17-Level mit einem verminderten Überleben assoziiert (78). Eine wiederum andere Studie untersuchte den Zusammenhang zwischen der IL-17-Expression und dem erhöhten invasiven Wachstum des Karzinoms selbst oder dem verstärkten Gefäßwachstum des Adenokarzinoms des Magens (79).

4.4.2 Der Einfluss der miR-155 auf regulatorische T-Zellen

In unserer Studie wurde die Expression von FoxP3 und IL-10 unter dem Einfluss einer *H. pylori*-Infektion im INS-GAS-Mausmodell untersucht. Bei der *H. pylori*-induzierten Entzündungsreaktion und der Persistenz des Erregers nehmen regulatorische T-Zellen eine zentrale Rolle ein. Der Transkriptionsfaktor FoxP3 wird speziell von den CD4⁺-CD25^{high}-T_{reg}-Zellen exprimiert und stellt somit einen molekularen Marker für diese Zelllinie dar. IL-10 wird von regulatorischen T-Zellen exprimiert. Im Rahmen unserer Untersuchungen war die Erhöhung von FoxP3 zwar bei allen Altersgruppen sichtbar, jedoch nur im Alter von 36 und 50 Wochen signifikant ($p < 0,05$). Bei der Betrachtung der Expression von IL-10 zeigte sich eine Erhöhung jedoch nur im Alter von 50 Wochen ($p = 0,0111$).

T_{reg}-Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz und sind sowohl an der *H. pylori* vermittelten Entzündungsreaktion als auch an der Persistenz des Erregers beteiligt. Die regulatorischen T-Zellen wirken entweder direkt im Zell-Zell-Kontakt oder begünstigen die Zytokinausschüttung von TGF- β und IL-10 (63). Vier Untergruppen dieser Zellart sind bekannt: die natürlich vorkommenden FoxP3-CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen, die peripher induzierten FoxP3-T_{reg}-Zellen, die historisch vorkommenden IL-10 produzierenden Tr1-Zellen sowie die TGF- β produzierenden Th3-Zellen (68). Die ersten beiden Zellarten exprimieren den spezifischen Transkriptionsfaktor FoxP3. Der Verlust dieser Zellen führt zu schweren Autoimmunerkrankungen (85). Die Depletion dieser Zellen bei gesunden erwachsenen Mäusen führte zur Entwicklung eines Autoimmun-Lymphoproliferativen Syndroms (ALPS), welches innerhalb von 3 Wochen den Tod der Tiere herbeiführte (122). Die natürlich vorkommenden FoxP3-CD4⁺CD25^{high}-T_{reg}-Zellen kontrollieren die durch Th1 produzierten Effektorzellen, wohingegen Th17-Zellen vor allem von peripher induzierten T_{reg}-Zellen kontrolliert werden (84).

In nahezu allen bisher vorliegenden Studien wurde eine erhöhte Expression von T_{reg}-Zellen im Fall einer *H. pylori*-Infektion beschrieben (63,85,123). Die Infektion mit *H. pylori* findet beim Menschen häufig im Kindesalter statt. Harris et al. haben die Unterschiede der T_{reg}-Zellen bei Kindern und Erwachsenen untersucht. Es zeigte sich eine weniger ausgeprägte

Entzündungsreaktion bei Kindern und eine erhöhte Expression der T_{reg}-Zellen und der von ihnen produzierten Zytokine IL-10 und IGF- β (124). Es kann also angenommen werden, dass regulatorische T-Zellen die Entzündung im Magen verringern, jedoch die Persistenz des Erregers ermöglichen. Die Aktivität der T_{reg}-Zellen scheint eine plausible Erklärung für eine moderate Akutphase der Infektion zu sein, die in eine chronische Entzündung und Persistenz übergeht.

Dazu passend konnten bei dieser Untersuchung in der *H. pylori*-negativen Kontrollgruppe sowohl für FoxP3 als auch für IL-10 keine Veränderungen der jeweiligen Expression festgestellt werden (Abb. 11). Bei Betrachtung der mit *H. pylori* besiedelten Mäuse fiel eine vermehrte, teilweise auch signifikante Expression auf. Auch aus der eigenen Klinik sind bereits Daten dazu publiziert (63,75). Kandulski et al. haben ein starkes Abhängigkeitsverhältnis von T_{reg}-Zellen und IL-10 bereits postuliert (63). Übereinstimmend dazu konnten wir eine erhöhte Expression von FoxP3 als Transkriptionsfaktor der T_{reg}-Zellen feststellen. Zu diesem Zeitpunkt war auch eine IL-10-Erhöhung bei den INS-GAS-Mäusen im Alter von 50 Wochen erkennbar. Mit zunehmendem Alter der INS-GAS-Mäuse tritt eine zunehmende Zellschädigung und schließlich ein invasives Karzinom auf. Die eigenen Ergebnisse bekräftigen die bereits im Jahr 2006 von Enarsson et al. vertretene Ansicht über die erhöhte Expression der T_{reg}-Zellen beim Magenkarzinom (125). Dies wurde 2007 durch Wang et al. noch einmal bestätigt (51). Durch die Gruppe um Perrone wurde eine erhöhte Expression der regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit Magenkarzinom abhängig vom TNM-Stadium im Tumorgewebe festgestellt (55). Diese Analysen versprechen eine mögliche Prognoseabschätzung durch regulatorische T-Zellen.

Es wurde auch bereits ein Zusammenhang zwischen miR-155-Expression und FoxP3 beschrieben, wobei die miR-155 an der Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen beteiligt sein könnte (126). Lu et al. fanden heraus, dass eine erhöhte Expression der miR-155 für eine steigende Anzahl von FoxP3 und die Bildung von T_{reg}-Zellen erforderlich ist (127). FoxP3 bindet an eine DNA-Sequenz, die für die Kodierung der Vorstufe BIC der miR-155 verantwortlich ist (128). Daraus resultiert ein direkter Einfluss von FoxP3 auf die miR-155.

Ein relevanter Zusammenhang zwischen der Expression der miRNA-155 und FoxP3 konnte in unserer Studie nur für Tiere im Alter von 12 Wochen dargestellt werden. Eine positive Korrelation zwischen miR-155- und IL-10-Expression in *H. pylori*-infizierten Tieren bestand hingegen unabhängig vom Alter der INS-GAS-Mäuse.

4.5 MiR-155-Modulationsmechanismen der Th17- und T_{reg}-Balance

Th17-Zellen und regulatorische T-Zellen sind zwei Untergruppen der T-Zellen, die, soweit angenommen, entgegengesetzte Effekte auf die Funktion des Immunsystems haben (73). Während Th17-Zellen sich proinflammatorisch auswirken, beeinflussen T_{reg}-Zellen das Immunsystem antiinflammatorisch (76,77). Der Anstieg des Anteils der Th17-Zellen zusammen mit der Abnahme der regulatorischen T-Zellen sind möglicherweise entscheidende Faktoren der Pathophysiologie der *H. pylori* Infektion assoziierten Erkrankungen wie beispielsweise Neoplasien. In dieser Arbeit postulieren wir, dass das Gleichgewicht der Immunzellen und das damit verbundene miRNA-Profil sowohl als prädiktiver beziehungsweise prognostischer Biomarker als auch als potenziell therapeutischer Ansatz in der Behandlung von Patienten mit einer *H. pylori* Infektion dienen könnte. Das hypothetische Ziel könnte sein die Th17/T_{reg}-Balance gezielt so auszugleichen, dass der Entwicklung von Erkrankungen wie peptischen Ulkuserkrankungen, Autoimmunerkrankungen und der Karzinogenese entgegengewirkt wird.

Durch Yao et al. (120) wurde bereits gezeigt, dass die miR-155 einen positiven Einfluss auf die Differenzierung regulatorischer T-Zellen und Th17-Zellen sowie die spezifischen Expressionsfaktoren dieser Zelllinien, FoxP3 und ROR γ t, hat. Das Zusammenspiel ist jedoch komplex und von zahlreichen Faktoren wie *Forkhead-Box-Protein 01*, Zytokinen und verschiedenen Signalwegen abhängig (86-88). Durch die Arbeitsgruppe wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine vermehrte Expression von FoxP3 abhängig von der miR-155 gezeigt (126). Eine signifikante Erhöhung der IL-10-mRNA und ein Anstieg von IL-10 in Zellkulturen konnte nicht dargestellt werden. Auch wir konnten eine Erhöhung von IL-10 nur im Alter von 50 Wochen nachweisen. Es lag hier, zum einen eine Erhöhung der miR-155 sowie der regulatorischen Zellen vor, zum anderen jedoch auch eine zunehmende Zellschädigung. Die verminderte Expression von IL-10 beim invasiven Karzinom des Magens wurde bereits diskutiert (s. o.). Die Gruppe um Lu beschrieb den Einfluss von miR-155 auf die Differenzierung der T_{reg}-Zellen ebenfalls (127). Auch wir konnten eine signifikante Verringerung der Expressionsniveaus von IL-10 und FoxP3-mRNA beobachten.

Der Anteil an Th17-Zellen war in unserer Studie deutlich erhöht. Dies schlussfolgerten wir aus einer vermehrten Expression des spezifischen Transkriptionsfaktors ROR γ t und des Zytokins IL-17 (Abb. 7 A-D), als auch aus erhöhten Werten der miR-155, die sich mit zunehmendem Alter der *H. pylori*-infizierten INS-GAS-Mäuse zeigten. Eine positive Korrelation konnte zwischen ROR γ t und miR-155 gefunden werden. Ein kausaler Zusammenhang wurde durch

die verschiedenen Genexpressionsanalysen in den beschriebenen Experimenten jedoch nicht bewiesen. Der Anstieg der miR-155, des Transkriptionsfaktors der Th17-Zellen und des dazugehörigen Zytokins IL-17 sprechen jedoch dafür. Hier bedarf es weiterführender Untersuchungen.

Die miR-155 hemmt direkt den ‚*suppressor of cytokine signaling 1*‘ (SOCS1), der wiederum den ‚*signal transducer and activator of transcription*(p-STAT) 5 in T_{reg}- und p-STAT3 in Th-17-Zellen supprimiert (120,129). Durch die wegfallende Hemmung von SOCS1 kommt es zur übermäßigen Aktivierung von STAT5 und STAT3, zur Differenzierung von T_{reg} und Th17 sowie zur vermehrten Expression von FoxP3 und ROR γ t (Abb. 16). Bei Abwesenheit der miR-155 entsteht hingegen eine übermäßige Aktivierung von SOCS1 und damit fehlende Hemmung von STAT3 und STAT5. Damit wurde durch Yao et al. ein verminderter Anteil von Th17- und T_{reg}-Zellen bei T-Zellen gezeigt (120). Foxhead Fox O1 (Foxo 1) bindet an ROR γ t und supprimiert die IL-17-Produktion (86). Auf der anderen Seite wird Foxo 1 zur FoxP3-Expression in T_{reg}-Zellen benötigt (130). Durch Aktivierung von IL-21 und IL-6 differenzieren sich Th17-Zellen. Das IL-6 gilt wiederum als starker Suppressor von FoxP3 und führt zur Negativverstärkung der T_{reg}-Zellen (131). Zusammenfassend übt die miR-155 also einen negativen Einfluss auf den *Januskinase-Signal-Transduction-and-Activator-of-Transcription* (JAK/STAT)-Signalweg aus. Alterationen in diesem Signalweg können für eine Vielzahl von Pathomechanismen verantwortlich sein. Eine Hemmung der Januskinase zeigte kürzlich große Erfolge bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis (132).

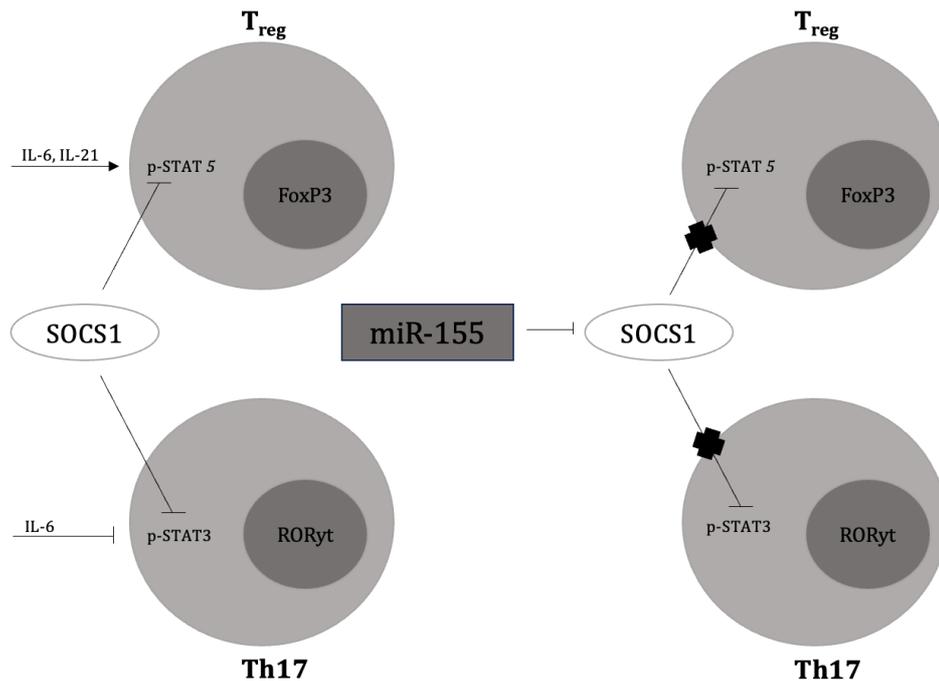


Abb.16: Regulation der Th17- und T_{reg}-Zelldifferenzierung und -funktion durch miR-155 (120)

4.6 Th17/T_{reg} – Scoring

Die Immunantwort auf eine *H.pylori* Infektion ist komplex und unterliegt verschiedenen Einflussfaktoren. Wir haben mit der Idee des „Molekularen Steady State“ eine gewisse Dominanz von Th17-Zellen gegenüber T_{reg}-Zellen festgestellt, welches auf eine aktivere Entwicklung von Th17-Zellen und eine Unterdrückung von Treg-Zellen hindeutet. Basierend auf diesen Beobachtungen fragten wir uns, ob ein leicht anwendbares Scoring-System weiteres diagnostisches Potential haben könnte, auch wenn es nicht einen direkten Bestandteil dieser Arbeit darstellt.

Das Alter des menschlichen Organismus ist einer der wichtigsten Risikofaktoren, da sich die Immunantwort auf *H. pylori* im Verlauf des Lebens ändert (124,133). Im kindlichen Organismus überwiegt die Antwort durch regulatorische T-Zellen mit entsprechend höherer Ausschüttung von FoxP3 und IL-10. Daher ist die Magenmukosa im Kindesalter anfälliger für eine *H. pylori* Infektion, ist jedoch auch mit einer geringen Entzündungsreaktion assoziiert. In Gebieten mit hoher *H. pylori* Durchseuchungsrate erfolgt die Infektion häufig bereits im Kindesalter (134). Die Infektion persistiert, ohne Behandlung, in der kindlichen Magenmukosa lebenslang (135). Glücklicherweise entwickeln die meisten infizierten Kinder, durch eine Herunterregulation der Th17-Antwort, keine Komplikationen wie eine Gastritis als Folge der

H. pylori Infektion (135). Bei erwachsenen Menschen, die dauerhaft mit *H. pylori* infiziert sind überwiegt, im Vergleich zu nicht infizierten Menschen, die Anzahl der infiltrierenden Leukozyten wie B- und T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen (136,137). Bei Erwachsenen steht die Th17-Immunantwort im Vordergrund, was auf eine anhaltende chronische Entzündung hindeutet. Die von Th17-Zellen ausgeschütteten Zytokine sind mit mehr Zellschädigung assoziiert und begünstigen somit die Entstehung von Ulcera im Magen (138).

Wir haben versucht mit Hilfe des Scoring-Systems das Th17/T_{reg}-Gleichgewicht im INS-GAS-Mausmodell darzustellen. Man könnte spekulieren, dass mit zunehmendem Alter der *H. pylori*-positiven INS-GAS-Mäuse und der damit einhergehenden Persistenz der Inflammation eine Dominanz von ROR γ t und IL-17 gegenüber Foxp3 und IL-10 vorhanden ist (Th17/T_{reg} > 1). Dies entspricht den bereits vorliegenden Ergebnissen, die bereits eine Dominanz der Th17-Immunantwort mit zunehmendem Alter, verglichen mit der Immunantwort beispielsweise im kindlichen Organismus (Th17/T_{reg} < 1), zeigten. Die o.g. Studien beziehen sich jedoch auf menschliche Organismen (133, 139).

4.7 Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus

Die Überexpression von miR-155 kann von zentraler klinischer Bedeutung sein, da sie als Hinweis für mögliche einzusetzende Therapien zur Senkung des miR-155-Spiegels fungiert und die Entzündungsreaktion so eindämmen kann (140). Um die miR-155 zukünftig für diagnostische und auch therapeutische Zwecke zu nutzen, sind weiteren Experimente in humanen Proben notwendig.

Die derzeit verfügbaren Daten zeigen eine umgekehrte Beziehung zwischen T_{reg}-Zellen und Karzinomen (141). Eine hohe FoxP3-Expression in Tumorzellen steht für eine geringere Überlebenschance bei Magenkarzinomen, möglicherweise im Zusammenhang mit Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und Lymphozyten in der Mikroumgebung. Neuere immunologische Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Fehlregulation bestimmter miRNAs, z. B. *miR-155*, im Zusammenhang mit einer *H. pylori*-Infektion von entscheidender Bedeutung für maligne Signalwege ist und zur Deregulierung von Genen führt, die für die Kontrolle der genomischen Stabilität relevant sind. Klinische Strategien, die darauf abzielen, die Überexpression von miR-155 zu verhindern, können daher eine vielversprechende Methode zur Therapie von Tumoren darstellen (141).

4.7 Limitationen

Trotz der ersten Ergebnisse zu diesem Thema sollen an dieser Stelle einige Limitationen wie das Studiendesign und die Analyse als Solche erwähnt werden.

Durch die Kooperation mit dem Institut für Pathologie durften wir die bereits verfügbaren Proben des etablierten Mausmodells verwenden und konnten auf weitere Versuchstiere und das damit einhergehende Leid der Tiere verzichten. Aus diesem Grund ist die Proportion der Tiere, beispielsweise der männlichen und weiblichen Tiere, nicht vollständig. Die ungleiche Verteilung der Geschlechter stellte für bestimmte Fragen eine Limitation dar.

Des Weiteren gibt es zahlreiche Methoden zur Evaluation von miRNA im Gewebe. Die von uns verwendete TaqMan-basierte qPCR hat gegenüber Microarrays den Vorteil der hohen Spezifität und Sensitivität sowie der Möglichkeit der miRNA-Quantifizierung. Dagegen erlauben Microarrays die gleichzeitige Untersuchung einer Vielzahl von miRNAs. Wir führten im Rahmen unserer Studie kein miRNA-Profilung durch, sondern untersuchten lediglich die Expression der miR-155 in Gewebeproben des Magens der INS-GAS-Maus. Andere miRNAs könnten in diesen Proben ebenfalls verändert und möglicherweise als potenzieller Biomarker des Magenkarzinoms besser geeignet sein. Ein Vorteil der gezielten Auswahl der miR-155 könnte die Vermeidung möglicher Verzerrungen durch ein ungezieltes Screening einer großen Anzahl von miRNAs sein. Wie bereits diskutiert, deuten mehrere Studien auf die Relevanz der miRNA-155 im Zusammenhang mit einer *H. pylori*-Infektion und dem Magenkarzinom hin.

Ein weiterer wesentlicher Diskussionspunkt sind die unterschiedlichen Normalisierungsmethoden in den hier zitierten Studien. In dieser Arbeit wurde zur Normalisierung der miR-155 die etablierte Referenz ‚snoR202‘ verwendet. Die Wahl der Referenz kann einen Einfluss auf die Interpretation der Daten und damit auf den Vergleich verschiedener Arbeiten haben. Aktuell gibt es jedoch keine einheitliche Strategie zur optimalen Normalisierung für Expressionsanalysen der miRNAs (142). Dies betrifft jedoch vor allem die zirkulierende miRNA, so dass die Ergebnisse dieser Studie davon nicht betroffen sein sollten.

Wegen des uns zur Verfügung stehenden Materials erfolgte keine histologische Abschlussuntersuchung der einzelnen Gewebeproben der Tiere. Auch wenn die Ergebnisse dazu recht eindeutig sind, wäre eine histologische Validierung zur Bestätigung wünschenswert. Letztendlich basieren unsere Untersuchungen auf der gleichen Kohorte und es kann nicht mit letzter Sicherheit bewiesen werden ob tatsächlich alle Tiere in unserem Experiment im Alter von 50 Wochen eine schwere Dysplasie/Neoplasie aufwiesen. Die Diskussion stützt sich auf vergleichbare Daten aus parallelen Untersuchungen. Dafür werden

neue Mausexperimente oder weitere Untersuchungen in humanen Proben benötigt. Vor allem der zweite Aspekt ist zur Evaluation der Übertragbarkeit auf den Menschen relevant.

Es konnte gezeigt werden, dass miR-155 in Gewebeproben der Magenmukosa der INS-GAS-Maus durch ein direktes Zusammenspiel entzündlicher Prozesse vermehrt exprimiert wird und sich daher als Biomarker für das Vorliegen einer *H. pylori*-Infektion eignen könnte. Ob sich die miR-155 auch als Biomarker für das Vorliegen von Magenkarzinomen eignet, kann aus unserer Studie nicht geschlussfolgert werden. Letztlich bleibt unklar, ob die Erhöhung der miR-155 auch ohne *H. pylori*-Besiedlung bei fortgeschrittener Karzinogenese auftreten würde. Die Untersuchung des Anstiegs der miR-155 in Proben wie Serum und Stuhl und somit die Eignung als nicht invasiver Biomarker muss zukünftig geprüft werden.

Bereits aus Vorarbeiten der Gruppe konnte eine eindeutige Verbindung zwischen der miR-155 und der durch *H. pylori* induzierten Gastritis festgestellt werden. Aber die mit der miR-155 verbundene immunologische Analyse ist keinesfalls vollständig, daher liefern diese Daten wertvolle Ergebnisse.

4.8 Ausblick

In der hier vorliegenden Arbeit haben wir versucht einen tieferen Einblick in die immunologischen Prozesse der *H. pylori* induzierten Entzündungsreaktion in der INS-GAS-Maus mit Fokus auf miR-155 zu gewinnen. In einem nächsten Schritt sind Studien mit einer größeren Studienpopulation und einem ausgeglichenen Geschlechterverhältnis notwendig. Auch Studien mit anderen Mausmodellen und miR-155-Knockout-Mäuse können interessante Ansatzpunkte darstellen. Vor dem Hintergrund einer potenziellen klinischen Nutzung der miRNAs sollten auch humane Studien angelegt werden. Die Übertragbarkeit unseres Scoring-System zur Objektivierbarkeit des Th17/T_{reg}-Gleichgewichts sollte geprüft werden. Dazu sind auch Untersuchungen *in-vitro* zur Prüfung der Entzündungsaktivität denkbar.

Die Mechanismen der miRNA-Freisetzung im Rahmen der Immunreaktion scheinen unzureichend erforscht. Zu diesem Thema und zur genaueren Physiologie der miRNAs bedarf es weiterer Studien. Das immunologische Verständnis kann nicht nur für die Diagnostik, sondern möglicherweise auch in der potenziellen Therapie eingesetzt werden.

Molekulare Impfstoffe bieten großes Potential und wären ein wichtiger Schritt in der Prävention chronischer Infektionen. Die Übertragbarkeit auf andere Erkrankungen mit komplexen Reaktionen des Immunsystems wie Autoimmunerkrankungen sollte genauer

betrachtet werden. Da die miR-Expression zell- und gewebsspezifisch ist müssen Effekte auf nicht erkrankte Zellen berücksichtigt werden.

5 Zusammenfassung

Die durch *H. pylori* ausgelöste chronische Entzündung des Magens ist eine der Hauptursachen für die Entstehung des Magenkarzinoms. Die von der normalen Magenschleimhaut über die chronische Gastritis, die atrophische Gastritis sowie die intestinale Metaplasie und Dysplasie bis hin zum Adenokarzinom führende Sequenz wird als Correa-Kaskade bezeichnet und stellt eines der wichtigsten Modelle für die Karzinogenese dar. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zur Entstehung des Magenkarzinoms sind noch nicht abschließend geklärt. In dieser Arbeit führten wir Genexpressionsanalysen der miR-155 in Gewebeproben des Korpus im INS-GAS-Mausmodell durch, bei dem die Tiere Dysplasien und Karzinome entwickelten. Diese Genexpressionsanalysen der miR-155 lassen Rückschlüsse des Einflusses auf die Th17-Zellen und T_{reg}-Zellen zu und legen den Zusammenhang zur Karzinomentstehung dar. Mit dem Fortschreiten der *H. pylori* Infektion und des Alters der Tiere beobachteten wir einen Anstieg der miR-155 Expression. Auch konnte ein geschlechtsspezifischer Unterschied der Expression der miR-155 festgestellt werden. Die männlichen Tiere zeigten, im Vergleich zu den weiblichen Tieren, einen deutlichen Anstieg. Zusätzlich wurde der Einfluss der miR-155 auf das Gleichgewicht der Th17/T_{reg}-Zellen in Gewebeproben im INS-GAS-Mausmodell untersucht. Zur weiteren Evaluation eines möglichen immunologischen Gleichgewichts entwickelten wir ein Scoring-System. Es zeigte sich mit zunehmendem Alter der mit *H. pylori* infizierten Tiere eine vermehrte Expression der miR-155 und eine vermehrte Expression der proinflammatorischen Th17-Zellen. Es zeigte sich jedoch auch ein, im Vergleich zur Expression der Th17-Zellen, deutlich geringerer Anstieg der Expression der regulatorischen T-Zellen. Zu diesem Zweck wurden Veränderungen der Expression der miR-155 in der Mukosa in Gewebeproben des Magenkorpus im Zusammenhang mit T-Zellen und der damit verbundenen Balance des Immunsystems untersucht. Inwieweit daraus sich Therapieansätze entwickeln können, die direkt die T-Zellen modulieren und so Einfluss auf die Karzinogenese haben bedarf weiterer Untersuchungen. Sowohl das T-Zell-Gleichgewicht als auch die miR-155 können zukünftig durch Immunmodulation Ansatzpunkte sowohl präventiver Maßnahmen als auch therapeutischer Maßnahmen bei der Behandlung der *H. pylori* Infektion und des Magenkarzinoms sein. Die Verschiebung der Th17/T_{reg}-Gleichgewichts zugunsten der Th17-Zellen könnte einen zusätzlichen Faktor der Pathophysiologie der *H. pylori* Infektion assoziierten Erkrankungen darstellen. Das hypothetische Ziel könnte sein die Th17/T_{reg}-Balance gezielt so auszugleichen, um die Entwicklung von Erkrankungen wie peptische Ulkuserkrankungen und der Karzinogenese entgegen zu wirken.

6 Literaturverzeichnis

1. Krienitz W. Über das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventrikuli. Deutsche Medizinische Wochenschrift. 1906; 32, S. 872.
2. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet. 1984;1(8390):1311-1315. doi:10.1016/s0140-6736(84)91816-6
3. Goodwin CS, McCulloch RK, Armstrong JA et al. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. J Med Microbiol. 1985;19(2):257-267. doi:10.1099/00222615-19-2-257
4. Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1990;9(1):1-13. doi:10.1007/BF01969526
5. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994;61:1-241.
6. Whalen MB, Massidda O. *Helicobacter pylori*: enemy, commensal or, sometimes, friend?. J Infect Dev Ctries. 2015;9(6):674-678. Published 2015 Jul 4. doi:10.3855/jidc.7186
7. Yokota S, Konno M, Fujiwara S, et al. Intrafamilial, Preferentially Mother-to-Child and Intrafamilial, *Helicobacter pylori* Infection in Japan Determined by Multilocus Sequence Typing and Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting. Helicobacter. 2015;20(5):334-342. doi:10.1111/hel.12217
8. Fischbach W, Malfertheiner P. *Helicobacter Pylori* Infection. Dtsch Arztebl Int. 2018;115(25):429-436. doi:10.3238/arztebl.2018.0429
9. Kim JS, Chang JH, Chung SI, et al. Molecular cloning and characterization of the *Helicobacter pylori* flhD gene, an essential factor in flagellar structure and motility. J Bacteriol. 1999;181(22):6969-6976. doi:10.1128/JB.181.22.6969-6976.1999
10. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Rev. 2006;19(3):449-490. doi:10.1128/CMR.00054-05
11. Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, et al. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. Infect Immun. 1991;59(7):2470-2475. doi:10.1128/iai.59.7.2470-2475.1991
12. Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, et al. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. Infect Immun. 1996;64(7):2445-2448. doi:10.1128/iai.64.7.2445-2448.1996
13. Sakamoto S, Watanabe T, Tokumaru T, et al. Expression of Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x, Lewis^y, sialyl-Lewis^a, and sialyl-Lewis^x blood group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue. Cancer Res. 1989;49(3):745-752.
14. Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, et al. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. Science. 2002;297(5581):573-578. doi:10.1126/science.1069076
15. Odenbreit S, Till M, Hofreuter D, et al. Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. Mol Microbiol. 1999;31(5):1537-1548. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01300.x

16. Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*. 1992;267(15):10570-10575.
17. Chen SY, Zhang RG, Duan GC. Pathogenic mechanisms of the oncoprotein CagA in *H. pylori*-induced gastric cancer (Review). *Oncol Rep*. 2016;36(6):3087-3094. doi:10.3892/or.2016.5145
18. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*. 2002;347(15):1175-1186. doi:10.1056/NEJMra020542
19. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-E386. doi:10.1002/ijc.29210
20. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76(2):182-188. doi:10.1111/his.13975
21. Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, et al. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(5):700-713. doi:10.1158/1055-9965.EPI-13-1057
22. Bornschein J, Malfertheiner P. Gastric carcinogenesis. *Langenbecks Arch Surg*. 2011;396(6):729-742. doi:10.1007/s00423-011-0810-y
23. Peek RM Jr, Crabtree JE. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *J Pathol*. 2006;208(2):233-248. doi:10.1002/path.1868
24. Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade. *J Dig Dis*. 2012;13(1):2-9. doi:10.1111/j.1751-2980.2011.00550.x
25. Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston RH, Lindblad-Toh K, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002;420(6915):520-562. doi:10.1038/nature01262
26. Rogers AB, Taylor NS, Whary MT, et al. *Helicobacter pylori* but not high salt induces gastric intraepithelial neoplasia in B6129 mice. *Cancer Res*. 2005;65(23):10709-10715. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1846
27. Wang TC, Dangler CA, Chen D, et al. Synergistic interaction between hypergastrinemia and *Helicobacter* infection in a mouse model of gastric cancer. *Gastroenterology*. 2000;118(1):36-47. doi:10.1016/s0016-5085(00)70412-4
28. Takaishi S, Tu S, Dubeykovskaya ZA, et al. Gastrin is an essential cofactor for *helicobacter*-associated gastric corpus carcinogenesis in C57BL/6 mice. *Am J Pathol*. 2009;175(1):365-375. doi:10.2353/ajpath.2009.081165
29. Fox JG, Rogers AB, Ihrig M, et al. *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer in INS-GAS mice is gender specific. *Cancer Res*. 2003;63(5):942-950.
30. Link A, Goel A. MicroRNA in gastrointestinal cancer: a step closer to reality. *Adv Clin Chem*. 2013;62:221-268. doi:10.1016/b978-0-12-800096-0.00006-8
31. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-y
32. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855-862. doi:10.1016/0092-8674(93)90530-4
33. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294(5543):853-858. doi:10.1126/science.1064921

34. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nat Rev Genet.* 2008;9(2):102-114. doi:10.1038/nrg2290
35. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation [published correction appears in *Nat Rev Genet.* 2004 Aug;5(8):631]. *Nat Rev Genet.* 2004;5(7):522-531. doi:10.1038/nrg1379
36. Balaguer F, Link A, Lozano JJ, et al. Epigenetic silencing of miR-137 is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.* 2010;70(16):6609-6618. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0622
37. Bushati N, Cohen SM. MicroRNAs in neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 2008;18(3):292-296. doi:10.1016/j.conb.2008.07.001
38. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003;425(6956):415-419. doi:10.1038/nature01957
39. Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, et al. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol.* 2005;15(3):331-341. doi:10.1016/j.sbi.2005.05.006
40. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* 2004;305(5689):1437-1441. doi:10.1126/science.1102513
41. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet.* 2009;10(10):704-714. doi:10.1038/nrg2634.
42. Asgari S. Role of MicroRNAs in Insect Host-Microorganism Interactions. *Front Physiol.* 2011;2:48. Published 2011 Aug 15. doi:10.3389/fphys.2011.00048
43. Shin VY, Chu KM. MiRNA as potential biomarkers and therapeutic targets for gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2014;20(30):10432-10439. doi:10.3748/wjg.v20.i30.10432
44. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435(7043):834-838. doi:10.1038/nature03702
45. Elton TS, Selemon H, Elton SM, et al. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene.* 2013;532(1):1-12. doi:10.1016/j.gene.2012.12.009
46. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, et al. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(5):1604-1609. doi:10.1073/pnas.0610731104
47. Thai TH, Calado DP, Casola S, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science.* 2007;316(5824):604-608. doi:10.1126/science.1141229
48. Wan J, Xia L, Xu W, et al. Expression and Function of miR-155 in Diseases of the Gastrointestinal Tract. *Int J Mol Sci.* 2016;17(5):709. Published 2016 May 11. doi:10.3390/ijms17050709
49. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2007;120(5):1046-1054. doi:10.1002/ijc.22394
50. Wang X, Tang S, Le SY, et al. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS One.* 2008;3(7):e2557. Published 2008 Jul 2. doi:10.1371/journal.pone.0002557
51. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(7):2257-2261. doi:10.1073/pnas.0510565103
52. Yao R, Ma YL, Liang W, et al. MicroRNA-155 modulates Treg and Th17 cells differentiation and Th17 cell function by targeting SOCS1. *PLoS One.* 2012;7(10):e46082. doi:10.1371/journal.pone.0046082

53. Oertli M, Engler DB, Kohler E, et al. MicroRNA-155 is essential for the T cell-mediated control of *Helicobacter pylori* infection and for the induction of chronic Gastritis and Colitis. *J Immunol.* 2011;187(7):3578-3586. doi:10.4049/jimmunol.1101772
54. Wu K, Zhu C, Yao Y, et al. MicroRNA-155-enhanced autophagy in human gastric epithelial cell in response to *Helicobacter pylori*. *Saudi J Gastroenterol.* 2016;22(1):30-36. doi:10.4103/1319-3767.173756
55. Perrone G, Ruffini PA, Catalano V, et al. Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *Eur J Cancer.* 2008 Sep;44(13):1875-82. doi: 10.1016/j.ejca.2008.05.017. Epub 2008 Jul 9. PMID: 18617393.
56. Prinz C, Hafsi N, Volland P. *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. *Trends Microbiol.* 2003;11(3):134-138. doi:10.1016/s0966-842x(03)00024-6
57. Murphy K, Weaver C, 2018. *Janeway Immunologie.* 9. Auflage. Berlin. Springer.
58. Murphy K, Weaver C. Die Entwicklung der B- und T-Lymphocyten. *Janeway Immunologie.* 2018 Apr 23:377-440. German. doi: 10.1007/978-3-662-56004-4_8. PMID: PMC7844872.
59. Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity.* 2019 May 21;50(5):1132-1148. doi: 10.1016/j.immuni.2019.04.011. PMID: 31117010; PMID: PMC6532429.
60. Murphy K, Weaver C. Wie Antigene den T-Lymphocyten präsentiert werden. *Janeway Immunologie.* 2018 Apr 23:273-326. German. doi: 10.1007/978-3-662-56004-4_6. PMID: PMC7844868.
61. O'Connell RM, Kahn D, Gibson WS, et al. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity.* 2010;33(4):607-619. doi:10.1016/j.immuni.2010.09.009
62. Algood HM, Gallo-Romero J, Wilson KT, et al. Host response to *Helicobacter pylori* infection before initiation of the adaptive immune response. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;51(3):577-586. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00338.x
63. Kandulski A, Malfertheiner P, Wex T. Role of regulatory T-cells in *H. pylori*-induced gastritis and gastric cancer. *Anticancer Res.* 2010;30(4):1093-1103.
64. Prinz C, Schwendy S, Volland P. *H. pylori* and gastric cancer: shifting the global burden. *World J Gastroenterol.* 2006;12(34):5458-5464. doi:10.3748/wjg.v12.i34.5458
65. Cheng HH, Tseng GY, Yang HB, et al. Increased numbers of Foxp3-positive regulatory T cells in gastritis, peptic ulcer and gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2012;18(1):34-43. doi:10.3748/wjg.v18.i1.34
66. Caza T, Landas S. Functional and Phenotypic Plasticity of CD4(+) T Cell Subsets. *Biomed Res Int.* 2015;2015:521957. doi:10.1155/2015/521957
67. Lohoff M, Röllinghoff M, Sommer F. *Helicobacter pylori* gastritis: a Th1 mediated disease?. *J Biotechnol.* 2000;83(1-2):33-36. doi:10.1016/s0168-1656(00)00295-9
68. Goll R, Gruber F, Olsen T, et al. *Helicobacter pylori* stimulates a mixed adaptive immune response with a strong T-regulatory component in human gastric mucosa. *Helicobacter.* 2007;12(3):185-192. doi:10.1111/j.1523-5378.2007.00495.x
69. D'Elcios MM, Andersen LP. *Helicobacter pylori* inflammation, immunity, and vaccines. *Helicobacter.* 2007;12 Suppl 1:15-19. doi:10.1111/j.1523-5378.2007.00530.x

70. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24(2):179-189. doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001
71. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1123-1132. doi:10.1038/ni1254
72. Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1133-1141. doi:10.1038/ni1261
73. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-1133. doi:10.1016/j.cell.2006.07.035
74. Taams LS, Palmer DB, Akbar AN, et al. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology*. 2006;118(1):1-9. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02348.x
75. Kandulski A, Wex T, Kuester D, et al. Naturally occurring regulatory T cells (CD4+, CD25high, FOXP3+) in the antrum and cardia are associated with higher *H. pylori* colonization and increased gene expression of TGF-beta1. *Helicobacter*. 2008;13(4):295-303. doi:10.1111/j.1523-5378.2008.00612.x
76. Lundgren A, Strömberg E, Sjöling A, et al. Mucosal FOXP3-expressing CD4+ CD25high regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Infect Immun*. 2005;73(1):523-531. doi:10.1128/IAI.73.1.523-531.2005
77. Zhuang Y, Shi Y, Liu XF, et al. *Helicobacter pylori*-infected macrophages induce Th17 cell differentiation. *Immunobiology*. 2011;216(1-2):200-207. doi:10.1016/j.imbio.2010.05.005
78. Shiomi S, Toriie A, Imamura S, et al. IL-17 is involved in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Helicobacter*. 2008;13(6):518-524. doi:10.1111/j.1523-5378.2008.00629.x
79. Mizuno T, Ando T, Nobata K, et al. Interleukin-17 levels in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa and pathologic sequelae of colonization. *World J Gastroenterol*. 2005;11(40):6305-6311. doi:10.3748/wjg.v11.i40.6305
80. Luzzza F, Parrello T, Sebkova L, et al. Expression of proinflammatory and Th1 but not Th2 cytokines is enhanced in gastric mucosa of *Helicobacter pylori* infected children. *Dig Liver Dis*. 2001;33(1):14-20. doi:10.1016/s1590-8658(01)80130-4
81. Algood HM, Gallo-Romero J, Wilson KT, et al. Host response to *Helicobacter pylori* infection before initiation of the adaptive immune response. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;51(3):577-586. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00338.x
82. Kim JY, Bae BN, Kang G, et al. Cytokine expression associated with *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinogenesis. *APMIS*. 2017;125(9):808-815. doi:10.1111/apm.12725
83. Wang Y, Wu H, Wu X, et al. Interleukin 17A promotes gastric cancer invasiveness via NF-κB mediated matrix metalloproteinases 2 and 9 expression. *PLoS One*. 2014;9(6):e96678. Published 2014 Jun 6. doi:10.1371/journal.pone.0096678
84. Cheng G, Wei L, Xiurong W, et al. IL-17 stimulates migration of carotid artery vascular smooth muscle cells in an MMP-9 dependent manner via p38 MAPK and ERK1/2-dependent NF-kappaB and AP-1 activation. *Cell Mol Neurobiol*. 2009;29(8):1161-1168. doi:10.1007/s10571-009-9409-z
85. Taams LS, Palmer DB, Akbar AN, et al. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology*. 2006;118(1):1-9. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02348.x

86. Vigorito E, Kohlhaas S, Lu D, et al. miR-155: an ancient regulator of the immune system. *Immunol Rev.* 2013;253(1):146-157. doi:10.1111/imr.12057
87. Zahorsky-Reeves JL, Wilkinson JE. The murine mutation scurfy (sf) results in an antigen-dependent lymphoproliferative disease with altered T cell sensitivity. *Eur J Immunol.* 2001;31(1):196-204. doi:10.1002/1521-4141(200101)31:1<196::AID-IMMU196>3.0.CO;2-9
88. Huter EN, Stummvoll GH, DiPaolo RJ, et al. Cutting edge: antigen-specific TGF beta-induced regulatory T cells suppress Th17-mediated autoimmune disease. *J Immunol.* 2008;181(12):8209-8213. doi:10.4049/jimmunol.181.12.8209
89. Lundgren A, Suri-Payer E, Enarsson K, et al. Helicobacter pylori-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to H. pylori in infected individuals. *Infect Immun.* 2003;71(4):1755-1762. doi:10.1128/IAI.71.4.1755-1762.2003
90. Xiao B, Liu Z, Li BS, et al. Induction of microRNA-155 during Helicobacter pylori infection and its negative regulatory role in the inflammatory response. *J Infect Dis.* 2009;200(6):916-925. doi:10.1086/605443
91. Jang TJ. The number of Foxp3-positive regulatory T cells is increased in Helicobacter pylori gastritis and gastric cancer. *Pathol Res Pract.* 2010;206(1):34-38. doi:10.1016/j.prp.2009.07.019
92. Kandulski A, Wex T, Kuester D, et al. Naturally occurring regulatory T cells (CD4+, CD25high, FOXP3+) in the antrum and cardia are associated with higher H. pylori colonization and increased gene expression of TGF-beta1. *Helicobacter.* 2008;13(4):295-303. doi:10.1111/j.1523-5378.2008.00612.x
93. Link A, Schirrmester W, Langner C, et al. Differential expression of microRNAs in preneoplastic gastric mucosa. *Sci Rep.* 2015;5:8270. Published 2015 Feb 5. doi:10.1038/srep08270
94. Wang TC, Bonner-Weir S, Oates PS, et al. Pancreatic gastrin stimulates islet differentiation of transforming growth factor alpha-induced ductular precursor cells. *J Clin Invest.* 1993 Sep;92(3):1349-56. doi: 10.1172/JCI116708. PMID: 8376589; PMCID: PMC288276.
95. Burkitt MD, Varro A, Pritchard DM. Importance of gastrin in the pathogenesis and treatment of gastric tumors. *World J Gastroenterol.* 2009 Jan 7;15(1):1-16. doi: 10.3748/wjg.15.1. PMID: 19115463; PMCID: PMC2653300.
96. Krueger S, Roessner A, Kuester D. Murine models of H. pylori-induced gastritis and gastric adenocarcinoma. *Pathol Res Pract.* 2011 Oct 15;207(10):599-607. doi: 10.1016/j.prp.2011.09.005. Epub 2011 Oct 19. PMID: 22014883.
97. Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, et al. A standardized mouse model of Helicobacter pylori infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology.* 1997 Apr;112(4):1386-97. doi: 10.1016/s0016-5085(97)70155-0. Erratum in: *Gastroenterology* 1997 Aug;113(2):732. PMID: 9098027.
98. Mouse Genome Sequencing Consortium; Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 2002 Dec 5;420(6915):520-62. doi: 10.1038/nature01262. PMID: 12466850.
99. Pritchard DM, Przemeck SM. Review article: How useful are the rodent animal models of gastric adenocarcinoma? *Aliment Pharmacol Ther.* 2004 Apr 15;19(8):841-59. doi: 10.1111/j.1365-2036.2004.01911.x. PMID: 15080846.
100. Jiang Y, Yu Y. Transgenic and gene knockout mice in gastric cancer research. *Oncotarget.* 2017 Jan 10;8(2):3696-3710. doi: 10.18632/oncotarget.12467. PMID: 27713138; PMCID: PMC5356912.

101. Doyle A, McGarry MP, Lee NA, et al. The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. *Transgenic Res.* 2012 Apr;21(2):327-49. doi: 10.1007/s11248-011-9537-3. Epub 2011 Jul 29. PMID: 21800101; PMCID: PMC3516403.
102. Wang TC, Koh TJ, Varro A, et al. Processing and proliferative effects of human progastrin in transgenic mice. *J Clin Invest.* 1996 Oct 15;98(8):1918-29. doi: 10.1172/JCI118993. PMID: 8878444; PMCID: PMC507632.
103. Lee CW, Rickman B, Rogers AB, et al. *Helicobacter pylori* eradication prevents progression of gastric cancer in hypergastrinemic INS-GAS mice. *Cancer Res.* 2008 May 1;68(9):3540-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6786. Epub 2008 Apr 25. PMID: 18441088; PMCID: PMC2653414.
104. Link A, Kupcinkas J, Wex T, et al. Macro-role of microRNA in gastric cancer. *Dig Dis.* 2012;30(3):255-67. doi: 10.1159/000336919. Epub 2012 Jun 20. PMID: 22722550.
105. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014 Sep 11;513(7517):202-9. doi: 10.1038/nature13480. Epub 2014 Jul 23. PMID: 25079317; PMCID: PMC4170219.
106. Mahboobi R, Fallah F, Yadegar A, et al. Expression analysis of miRNA-155 level in *Helicobacter pylori*-related inflammation and chronic gastritis. *Iran J Microbiol.* 2022 Aug;14(4):495-502. doi: 10.18502/ijm.v14i4.10235. PMID: 36721512; PMCID: PMC9867648.
107. Pritchard DM, Przemeck SM. Review article: How useful are the rodent animal models of gastric adenocarcinoma? *Aliment Pharmacol Ther.* 2004 Apr 15;19(8):841-59. doi: 10.1111/j.1365-2036.2004.01911.x. PMID: 15080846.
108. Higgs G, Slack F. The multiple roles of microRNA-155 in oncogenesis. *J Clin Bioinforma.* 2013 Sep 28;3(1):17. doi: 10.1186/2043-9113-3-17. PMID: 24073882; PMCID: PMC3849775.
109. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2008 May;141(5):672-5. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x. Epub 2008 Mar 3. PMID: 18318758.
110. Petrocca F, Visone R, Onelli MR, et al. E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell.* 2008 Mar;13(3):272-86. doi: 10.1016/j.ccr.2008.02.013. PMID: 18328430.
111. Prinz C, Weber D. MicroRNA (miR) dysregulation during *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and cancer development: critical importance of miR-155. *Oncotarget.* 2020 Mar 10;11(10):894-904. doi: 10.18632/oncotarget.27520. PMID: 32206186; PMCID: PMC7075464.
112. Peek RM Jr, Crabtree JE. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *J Pathol.* 2006 Jan;208(2):233-48. doi: 10.1002/path.1868. PMID: 16362989.
113. Li BS, Zhao YL, Guo G, et al. Plasma microRNAs, miR-223, miR-21 and miR-218, as novel potential biomarkers for gastric cancer detection. *PLoS One.* 2012;7(7):e41629. doi: 10.1371/journal.pone.0041629. Epub 2012 Jul 30. PMID: 22860003; PMCID: PMC3408505.
114. Hayakawa Y, Fox JG, Gonda T, et al. Mouse models of gastric cancer. *Cancers (Basel).* 2013 Jan 24;5(1):92-130. doi: 10.3390/cancers5010092. PMID: 24216700; PMCID: PMC3730302.
115. Petrovchich I, Ford JM. Genetic predisposition to gastric cancer. *Semin Oncol.* 2016 Oct;43(5):554-559. doi: 10.1053/j.seminoncol.2016.08.006. Epub 2016 Sep 22. PMID: 27899187.

116. Sugano K, Tack J, Kuipers EJ, et al. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*. 2015 Sep;64(9):1353-67. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309252. Epub 2015 Jul 17. PMID: 26187502; PMCID: PMC4552923.
117. Wacleche VS, Landay A, Routy JP, et al. The Th17 Lineage: From Barrier Surfaces Homeostasis to Autoimmunity, Cancer, and HIV-1 Pathogenesis. *Viruses*. 2017 Oct 19;9(10):303. doi: 10.3390/v9100303. PMID: 29048384; PMCID: PMC5691654.
118. Shi Y, Liu XF, Zhuang Y, et al. *Helicobacter pylori*-induced Th17 responses modulate Th1 cell responses, benefit bacterial growth, and contribute to pathology in mice. *J Immunol*. 2010 May 1;184(9):5121-9. doi: 10.4049/jimmunol.0901115. Epub 2010 Mar 29. PMID: 20351183.
119. Zhuang Y, Shi Y, Liu XF, et al. *Helicobacter pylori*-infected macrophages induce Th17 cell differentiation. *Immunobiology*. 2011 Jan-Feb;216(1-2):200-7. doi: 10.1016/j.imbio.2010.05.005. Epub 2010 May 19. PMID: 21112468.
120. Yao R, Ma YL, Liang W, et al. MicroRNA-155 modulates Treg and Th17 cells differentiation and Th17 cell function by targeting SOCS1. *PLoS One*. 2012;7(10):e46082. doi: 10.1371/journal.pone.0046082. Epub 2012 Oct 16. PMID: 23091595; PMCID: PMC3473054.
121. Mizuno T, Ando T, Nobata K, et al. Interleukin-17 levels in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa and pathologic sequelae of colonization. *World J Gastroenterol*. 2005 Oct 28;11(40):6305-11. doi: 10.3748/wjg.v11.i40.6305. PMID: 16419159; PMCID: PMC4320334.
122. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol*. 2007 Feb;8(2):191-7. doi: 10.1038/ni1428. Epub 2006 Nov 30. PMID: 17136045.
123. Jang TJ. The number of Foxp3-positive regulatory T cells is increased in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *Pathol Res Pract*. 2010 Jan 15;206(1):34-8. doi: 10.1016/j.prp.2009.07.019. Epub 2009 Oct 12. PMID: 19819643.
124. Harris PR, Wright SW, Serrano C, et al. *Helicobacter pylori* gastritis in children is associated with a regulatory T-cell response. *Gastroenterology*. 2008 Feb;134(2):491-9. doi: 10.1053/j.gastro.2007.11.006. Epub 2007 Nov 4. PMID: 18242215.
125. Enarsson K, Lundgren A, Kindlund B, et al. Function and recruitment of mucosal regulatory T cells in human chronic *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma. *Clin Immunol*. 2006 Dec;121(3):358-68. doi: 10.1016/j.clim.2006.07.002. Epub 2006 Aug 23. PMID: 16934529.
126. Zhou Z, Zhang H, Deng T, et al. Exosomes Carrying MicroRNA-155 Target Forkhead Box O3 of Endothelial Cells and Promote Angiogenesis in Gastric Cancer. *Mol Ther Oncolytics*. 2019 Oct 31;15:223-233. doi: 10.1016/j.omto.2019.10.006. Retraction in: *Mol Ther Oncolytics*. 2022 May 10;25:262. PMID: 31828217; PMCID: PMC6889542.
127. Lu LF, Thai TH, Calado DP, et al. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity*. 2009 Jan 16;30(1):80-91. doi: 10.1016/j.immuni.2008.11.010. PMID: 19144316; PMCID: PMC2654249.
128. Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, et al. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):936-40. doi: 10.1038/nature05563. Epub 2007 Jan 21. PMID: 17237761.

129. Wang D, Tang M, Zong P, et al. MiRNA-155 Regulates the Th17/Treg Ratio by Targeting SOCS1 in Severe Acute Pancreatitis. *Front Physiol.* 2018 Jun 8;9:686. doi: 10.3389/fphys.2018.00686. PMID: 29937734; PMCID: PMC6002743.
130. Ouyang W, Li MO. Foxo: in command of T lymphocyte homeostasis and tolerance. *Trends Immunol.* 2011 Jan;32(1):26-33. doi: 10.1016/j.it.2010.10.005. Epub 2010 Nov 23. PMID: 21106439; PMCID: PMC3053075.
131. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006 May 11;441(7090):235-8. doi: 10.1038/nature04753. Epub 2006 Apr 30. PMID: 16648838.
132. Banerjee S, Biehl A, Gadina M, et al. JAK-STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects. *Drugs.* 2017 Apr;77(5):521-546. doi: 10.1007/s40265-017-0701-9. Erratum in: *Drugs.* 2017 May;77(8):939. Erratum in: *Drugs.* 2017 Jun 12;.
133. Daugule I, Rowland M. Helicobacter pylori infection in children. *Helicobacter.* 2008 Oct;13 Suppl 1:41-6. doi: 10.1111/j.1523-5378.2008.00632.x. PMID: 18783521.
134. Freire de Melo F, Rocha AM, Rocha GA, et al. A regulatory instead of an IL-17 T response predominates in Helicobacter pylori-associated gastritis in children. *Microbes Infect.* 2012 Apr;14(4):341-7. doi: 10.1016/j.micinf.2011.11.008. Epub 2011 Nov 25. PMID: 22155622.
135. Serrano C, Wright SW, Bimczok D, et al. Downregulated Th17 responses are associated with reduced gastritis in Helicobacter pylori-infected children. *Mucosal Immunol.* 2013 Sep;6(5):950-959. doi: 10.1038/mi.2012.133. Epub 2013 Jan 9. PMID: 23299619; PMCID: PMC3775337.
136. Rahimian G, Sanei MH, Shirzad H, et al. Virulence factors of Helicobacter pylori vacA increase markedly gastric mucosal TGF- β 1 mRNA expression in gastritis patients. *Microb Pathog.* 2014 Feb-Mar;67-68:1-7. doi: 10.1016/j.micpath.2013.12.006. Epub 2014 Jan 21. PMID: 24462401.
137. Suzuki T, Kato K, Ohara S, et al. Localization of antigen-presenting cells in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa. *Pathol Int.* 2002 Apr;52(4):265-71. doi: 10.1046/j.1440-1827.2002.01347.x. PMID: 12031081.
138. Freire de Melo F, Rocha GA, Rocha AM, et al. Th1 immune response to H. pylori infection varies according to the age of the patients and influences the gastric inflammatory patterns. *Int J Med Microbiol.* 2014 May;304(3-4):300-6. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.11.001. Epub 2013 Nov 9. PMID: 24373859.
139. Razavi A, Bagheri N, Azadegan-Dehkordi F, et al. Comparative Immune Response in Children and Adults with H. pylori Infection. *J Immunol Res.* 2015;2015:315957. doi: 10.1155/2015/315957. Epub 2015 Oct 1. PMID: 26495322; PMCID: PMC4606101.
140. Asgari S. Role of MicroRNAs in Insect Host-Microorganism Interactions. *Front Physiol.* 2011 Aug 15;2:48. doi: 10.3389/fphys.2011.00048. PMID: 21886625; PMCID: PMC3155871.
141. Moyat M, Velin D. Immune responses to Helicobacter pylori infection. *World J Gastroenterol.* 2014 May 21;20(19):5583-93. doi: 10.3748/wjg.v20.i19.5583. PMID: 24914318; PMCID: PMC4024767.
142. Schwarzenbach H, da Silva AM, Calin G, et al. Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin Chem.* 2015 Nov;61(11):1333-42. doi: 10.1373/clinchem.2015.239459. Epub 2015 Sep 25. PMID: 26408530; PMCID: PMC4890

7 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die mich während der Entstehung der vorliegenden Promotionsarbeit begleitet haben.

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Alexander Link für die außerordentliche Betreuung dieser Arbeit, die stetige Diskussions- und die Hilfsbereitschaft aussprechen. Er hatte trotz seiner beruflichen Belastung stets ein offenes Ohr für Probleme und fand Zeit für fachlichen Rat und moralische Unterstützung. Ich danke Frau Dr. rer. nat. Wiebke Schirrmeister, die mich bei der Planung und Durchführung der Experimente, bei der Analyse und Interpretation der Ergebnisse unterstützt hat.

Ich danke Herrn Prof. Peter Malfertheiner für die Möglichkeit dieses Thema an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie am Universitätsklinikum Magdeburg bearbeiten zu können und für die Schaffung einer angenehmen wissenschaftlichen Arbeitsatmosphäre an der Klinik. Bedanken möchte ich mich außerdem bei allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. Insbesondere danke ich Frau Ursula Stolz, die mich mit viel Engagement bei der Einarbeitung in die experimentellen Methoden unterstützt hat, dabei jede meiner Fragen ernst genommen und geduldig beantwortet hat.

Meinen Freunden, meiner Großmutter, meinem verstorbenen Großvater und meinem Onkel möchte ich nicht nur für die Unterstützung bei dieser Arbeit danken. Durch unendliches Verständnis und Engagement konnte ich die Ausarbeitung dieser Arbeit beenden.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern Simone und Günter Dahnke für die emotionale Teilhabe, nicht nur während meiner gesamten Ausbildung, sondern in jeglichen Lebensabschnitten danken, für jedes aufmunternde Wort, den dauerhaften Rückhalt, euer ehrliches Interesse an meiner Arbeit und eure fortwährende Unterstützung.

Nicht zuletzt danke ich meinem Ehemann Johannes Pott für die Unterstützung, die Zuversicht und die unendliche Geduld, besonders während der letzten Phase der Verfassung der Dissertation.

9 Erklärung zur Strafrechtlichen Verurteilung

Ich erkläre hiermit, nicht wegen einer Straftat verurteilt worden zu sein, die
Wissenschaftsbezug hat.

Gehrden, den 4.09.2024

10 Darstellung des Bildungsweges

Persönliche Daten

Name	Kathleen Pott geb. Dahnke
Geburtsdatum	23. Mai 1990
Geburtsort	Ludwigslust

Schulbildung

1997 – 2001	Peter-Joseph- Lenne-Grundschule Ludwigslust
2001 – 2009	Goethe-Gymnasium Ludwigslust
2009-2016	Medizinstudium an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
06-09/2010	Studium an der University of California, Los Angeles, USA
09/2012	1. Staatsexamen
10/2015	2. Staatsexamen (schriftlicher Teil)
11/2016	3. Staatsexamen (mündlicher Teil)
12/2016	Approbation als Ärztin

Praktisches Jahr

11/2015-03/2016	Helios Kliniken Schwerin, Lehrkrankenhaus der Universität Rostock Klinik für Pädiatrie
03/2016-06/2016	Luzerner Kantonsspital, Lehrkrankenhaus der Universitäten Zürich/Basel/Bern Klinik für Innere Medizin
06/2016 – 10/2016	Klinikum Stendal Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Unfallchirurgie

Berufserfahrungen

03/2017 – 03/2022	Assistenzärztin der Klinik für Herz- und Gefäßkrankheiten und internistische Intensivmedizin Klinikum Region Hannover Robert-Koch-Krankenhaus Gehrden - Prof. Dr. M. Merx
04/2022	Facharztprüfung zur Fachärztin für Innere Medizin
04/2022-08/2024	Fellowship Interventionelle Kardiologie und Weiterbildung zur Fachärztin für Kardiologie
09/2024	Funktionsoberärztin in der Klinik für Herz- und Gefäßkrankheiten und internistische Intensivmedizin
02/2023	Zusatzbezeichnung Notfallmedizin

Sonstiges

07/2013

Beginn der Promotionsarbeit der Universitätsklinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

Betreuer: Prof. Dr. med. Alexander Link

Thema: Charakterisierung der miR-155 Veränderungen im Helicobacter pylori- Magenkarzinogenese Mausmodell

10/2022-08/2024

Master of Health Business Administration (MHBA) an der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg

Gehrden, 4.09.2024

11 Anlagen