

Aus der Abteilung für Tropenmedizinische Grundlagenforschung des  
Bernhard Nocht Institutes für Tropenmedizin  
Prof. Dr. Rolf D. Horstmann

Genomweite Kopplungsanalyse zur Identifizierung chromosomaler Regionen mit Einfluss  
auf die *Helicobacter pylori*-Infektion

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg  
vorgelegt von

Thorsten Thye  
aus Cloppenburg

Hamburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

---

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Einführung in die Thematik.....	1
1.2 Klinik der <i>H. pylori</i> Infektion.....	3
1.3 Diagnostik.....	4
1.3.1 Biopsie.....	4
1.3.2 Urease Atemtest.....	4
1.3.3 Serologie.....	5
1.4 Therapie.....	5
1.5 Morphologie und Genom von <i>H. pylori</i> .....	6
1.6 Epidemiologie und Übertragung der <i>H. pylori</i> Infektion.....	7
1.7 Pathogenese.....	8
1.8 Immunantwort auf <i>H. pylori</i> .....	11
1.9 Wirtsfaktoren mit Einfluss auf die <i>H. pylori</i> -Infektion.....	12
1.10 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	14
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Studienpopulation.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Material.....</b>	<b>15</b>
2.2.1 Geräteliste.....	15
2.2.2 Puffer und Lösungen.....	15
2.2.3 Enzyme.....	17
2.2.4 Längenstandard.....	17
2.2.5 Mengenstandard.....	17
2.2.6 Reaktionssysteme.....	17
2.2.7 Chemkalien.....	17

---

<b>2.3 Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.3.1 Phänotypisierung.....	18
2.3.1.1 Phänotypisierung.....	18
2.3.1.2 Phosphorylcholin-ELISA.....	19
2.3.2 DNA – Isolierung.....	19
2.3.2.1 QIAgen Aufreinigungskit.....	19
2.3.2.2 AGS-Hybrid Aufreinigungskit.....	19
2.3.3 DNA–Qualitätskontrolle.....	20
2.3.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	20
2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Produkten.....	21
2.3.6 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	21
2.3.7 Genomweite Typisierung von "short-tandem repeat"-Markern (STR- Mikrosatelliten).....	21
2.3.8 Sequenzierung.....	22
2.3.8.1 IFNGR1-Sequenzierung.....	24
2.3.9 Mutationsanalyse mit dem Light Cycler-System.....	25
2.3.9.1 Light-Cycler-PCR.....	25
2.3.10 Genetische Statistik.....	26
2.3.10.1 Parametrische Methoden.....	27
2.3.10.2 Nichtparametrische Methoden.....	28
2.3.10.2.1 Haseman-Elston-Statistik.....	29
2.3.10.2.2 Nichtparametrischer Rangsummentest.....	30
2.3.10.3 Transmissions Disequilibrium Test.....	30
2.4 Programme für die genetische Analyse.....	31
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>32</b>
3.1 Phänotypisierung.....	32
3.2 Kontrolle auf Spezifität der Höhe des Serumantikörpertiters gegen H.pylori.....	33
3.3 Verteilung der Antikörperkonzentrationen.....	33
3.4 Genomweite Kopplungsanalyse.....	34
3.5 Kopplungsanalyse für Chromosom 6q22-24.....	36

---

3.6	Sequenzierung von <i>IFNGR1</i> .....	38
3.6.1	Identifikation von Mutationen in Promotor und Exons von <i>IFNGR1</i> .....	41
3.7	Analyse der IFNGR1-Varianten.....	46
3.7.1	Quantitativer Transmissions-Disequilibrium-Test.....	47
3.8	Frequenzen der Polymorphismen in unabhängigen Gruppen.....	47
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>49</b>
<b>5.</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>65</b>
6.1	Summary.....	66
<b>7.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>67</b>

**Abkürzungen**

AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cM	CentiMorgan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
H-E	Haseman Elston Statistik
HLA	Humanes leukozytäres Antigen
HPLC	high pressure liquid chromatography
IBD	identical by descent
IFNGR1	Interferon Gamma Rezeptor 1
IFN $\gamma$	Interferon Gamma
IgG/E	ImmunglobulinG/E
JAK1/2	Januskinase1/2
LOD	logarithm of the odds
log	logarithmiert
M	molar
mM	millimolar
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
min	Minuten
ml	Milliliter
n	Anzahl
ng	Nanogramm
PC	Phosphorylcholin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
QTDT	Quantitativer Transmissions-Disequilibrium-Test
$r^2$	Bestimmtheitsmaß
sec	Sekunden
SA	Standardabweichung
STAT1	signal transducers and activators of transcription
STR	short tandem repeat
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TDT	Transmissions Disequilibrium Test
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
var	Variante
wt	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung in die Thematik und Zielsetzung der Arbeit

Die Verbreitung und klinische Manifestation von Infektionskrankheiten wird von unterschiedlichen Faktoren bestimmt. Ein wichtiges Element dabei ist die genetische Ausstattung des Wirts. Im humanem Genom konnten in Assoziationsstudien und familienbasierten Kopplungsstudien eine Reihe von Polymorphismen identifiziert werden, die Suszeptibilität und Resistenz für bestimmte Erreger beeinflussen. So bietet ein Austausch in dem Gen für die Betakette von Hämoglobin relativen Schutz vor dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* (Friedman 1981). Deletionen des Chemokinrezeptorgens CCR5 verhindern eine Infektion mit dem HI-Virus Typ II (Samson 1996). Hingegen führen Mutationen mit Verlust der Wirkung von Interferon- $\gamma$  zu fulminanten Verläufen bei atypischen Mykobakterien-Infektionen (Jouanguy 1996). Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass auch der Infektionsverlauf von *H. pylori* erblichen Einflüssen unterliegt. Zwillingsstudien zeigten, dass eineiige Zwillinge häufiger gleichzeitig mit *H. pylori* infiziert sind als zweieiige Zwillinge (Malaty 1994). Die höhere Konkordanz für das Auftreten einer Infektion bei monozygoten Zwillingen macht einen erblichen Faktor aufgrund der identischen genetischen Basis wahrscheinlich. Daneben wurden in verschiedenen Ethnien differierende Prävalenzen von *H. pylori* gefunden, unabhängig der äußeren Bedingungen. Diese Unterschiede konnten bei Afroamerikanern gegenüber Kaukasiern in den USA sowie bei Volksgruppen in Taiwan, Neuseeland und Australien beobachtet werden (Hopkins 1990; Graham 1991; Teh 1994; Morris 1986; Dwyer 1988).

Als Maß, eine *H. pylori*-Infektion nachzuweisen und die Intensität der Infektion darzustellen, haben sich die Konzentrationen der IgG-Antikörper in Serum bewährt (Herbrink 2000). Die Höhe des Antikörperspiegels korrelierte dabei mit der Entzündungsaktivität in der Magenschleimhaut und gab die Besiedlungsdichte mit *H. pylori* im Magen wieder (Sheu 1997). Die Eigenschaft der IgG-Konzentration über lange Zeit, bis zu 20 Jahren, konstant zu bleiben (Perez-Perez 2002), macht sie für genetische Studien mit *H. pylori* in hohem Maße geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine genomweite Kopplungsanalyse mit der IgG-Antikörperkonzentration gegen *H. pylori*

im humanen Genom Regionen identifiziert werden können, die einen Einfluss auf die Ausprägung der Infektion haben.

## 1.2 Klinik der *Helicobacter pylori* Infektion



Elektronenmikroskopische Darstellung von *H. pylori*.

*H. pylori* verursacht bei allen infizierten Personen eine chronische Entzündungsreaktion des Magens, die mit einem zellulären Infiltrat der Mukosa einhergeht. In der Mehrzahl der Fälle führt dies zu keiner klinischen Symptomatik (Blaser 1998). Bei einem Teil der Infizierten kommt es jedoch nach einer mehrjährigen asymptomatischen Phase zu ernsthaften Erkrankungen des Magens oder Duodenums. Als mildeste Form bilden sich dyspeptische Beschwerden. Schwere Verläufe gehen mit der Entstehung von Ulzera des Magens und Zwölffingerdarms, MALT-Lymphomen und Adenokarzinomen des Magens einher. Ca 7 Millionen Fälle dieser Folgeerkrankungen treten weltweit jedes Jahr auf (Blaser 1998). Seropositive Personen entwickeln in den USA in 3% und in Japan sogar in 25% der Fälle peptische Ulzera (Schlemper 1996).

Das Verteilungsmuster der Gastritis ist für die Art der Komplikation verantwortlich. Eine überwiegend im Antrum lokalisierte Gastritis führt über säurebedingte gastrale Metaplasie häufiger zu Geschwüren im Duodenum. Hingegen verursacht eine multifokale Atrophie des Magens sowie eine Gastritis des Korpus vielfach Magenulzera und Adenokarzinome. Aufgrund von größeren sero-epidemiologischen Studien, die zeigten, dass

Helicobacterträger ein signifikant erhöhtes Risiko für Adenokarzinome haben, stuft die WHO 1994 *H. pylori* als krebserregend ein (Typ 1 Karzinogen) (Parsonnet 1991). Auch das Auftreten von MALT-Lymphomen des Magens ist eng korreliert mit dem Vorhandensein von *H. pylori*. 72 bis 98% der Patienten mit MALT-Lymphomen sind mit dem Erreger infiziert. Eine Eradikationstherapie bewirkt bei bis zu 75% der Fälle eine Regression des Lymphoms (Bayerdorffer 1995).

### 1.3 Diagnostik

Für die Diagnostik einer *H. pylori*-Infektion stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die sich in Sensitivität und Spezifität sowie im apparativen Aufwand, in der Belastung für den Patienten und nicht zuletzt in den Kosten deutlich unterscheiden. Die wichtigsten Verfahren sind die Biopsie, der Urease-Atem-Test sowie die Serologie.

#### 1.3.1 Biopsie

Zur Diagnostik einer aktiven *H. pylori*-Infektion ist endoskopisch gewonnenes Biopsiematerial der Goldstandard. Damit eine Infektion definitiv ausgeschlossen oder bestätigt werden kann, wird aus mehreren Regionen des Magens Material entnommen. Mit dem Biospat kann eine Schnelltestung auf *H. pylori* über die Urease-Aktivität erfolgen (Laine 1996). Kulturen aus den Gewebeproben ermöglichen nach Anzucht und molekularbiologischer Differenzierung eine genaue Charakterisierung des Erregerstamms (Lin 1992). Mit histologischen Untersuchungen schließlich kann das Ausmaß der Entzündungsreaktion über eine Quantifizierung der Infiltration von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten erfolgen (Price 1991). Der wesentliche Nachteil der Biopsie liegt in dem apparativen Aufwand, der Belastung für den Patienten und der Möglichkeit bei der Probenentnahme betroffene Areale des Magens zu übersehen.

#### 1.3.2 Urease Atemtest

Bei dem Atemtest macht man sich die starke Ureaseaktivität von *H. pylori* zunutze. Nach oraler Gabe von mit  $^{13}\text{C}$  Kohlenstoffisotopen markiertem Harnstoff wird dieser durch die Urease von *H. pylori* hydrolisiert. Als Reaktionsprodukt kann  $^{13}\text{CO}_2$

massenspektrographisch in der Atemluft gemessen werden (Koletzko 1995). Die Menge an entstandenem  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoff korreliert mit dem Umfang der Kolonisierung des Magens. Als qualitativer Test zur Diagnose einer aktiven Infektion liegen Sensitivität und Spezifität bei über 90 % (Cohen 1999).

### 1.3.3 Serologie

Ein serologischer *H. pylori* Nachweis wird über die Bestimmung der Immunglobulin-G-oder Ig-A Konzentrationen unter Verwendung von ELISA-Systemen durchgeführt. Die Sensitivität und Spezifität der kommerziell erwerblichen ELISA-Systeme liegt bezogen auf die IgG-Konzentration bei 90 bis 95 %, womit sie vergleichbare Ergebnisse wie die anderen Verfahren liefern (Herbrink 2002). Soll nach Therapie einer Infektion der Behandlungserfolg im Verlauf überprüft werden, kann dies über den Nachweis eines IgG-Konzentrationsabfalls von über 50 % in einem Zeitraum von 3 bis 6 Monaten geschehen. Bei unbehandelten Infizierten bleiben die IgG-Konzentrationen über einen langen Zeitraum stabil. Untersuchungen belegen einen konstanten Antikörperspiegel bis zu 20 Jahren (Perez-Perez 2002). Dabei korreliert die Höhe des IgG-Spiegels mit dem Entzündungsgeschehen der Magenmukosa und in geringerem Umfang mit der Besiedlungsdichte (Sheu 1996). Erhöhte Antikörperkonzentrationen weisen demnach auf eine stärkere Entzündungsreaktion und größere Anzahl von Erregern hin. Die IgG-Konzentration eignet sich jedoch nicht zur Beurteilung von Ulzera des Magens oder Duodenums oder der Schwere dyspeptischer Erkrankungen.

## 1.4 Therapie

Eine Heilung der *H. pylori*-Infektion ist heute nahezu bei jedem Patienten möglich. Aufgrund der weiten Verbreitung des Keims, aber des in der Regel milden Verlaufes einer Infektion besteht eine Therapieindikation nur bei einem Teil der Infizierten mit entsprechender Symptomatik oder entsprechendem Krankheitsbild. Absolute Indikationen für eine Eradikation sind ein Ulcus ventriculi oder Ulcus duodeni, MALT-Lymphome des Magens, eine Riesenfaltengastritis oder Adenokarzinome des Magens mit *H. pylori* Nachweis. Andere Indikationen sind relativ und orientieren sich zum Teil an dem klinischen Bild. Dazu zählen die funktionelle Dyspepsie, erosive *H. pylori*-positive Gastritis,

das Anastomosenulkus im operierten Magen und die Prophylaxe des Magenkarzinoms. Die Primärbehandlung erfolgt mit der modifizierten "italienischen" Triple-Therapie für 7 Tage: Protonenpumpenhemmer (2 x 20mg Omeprazol/ Tag), Clarithromycin (2 x 250 mg/ Tag) und Metronidazol ( 2 x 400 mg/ Tag). Bei primärem Therapieversagen nach dem oben genannten Schema kann eine Modifikation als "französische" Tripel-Therapie zur Heilung führen: Protonenpumpenhemmer (2 x 20-40mg Omeprazol/Tag), Clarithromycin (2 x 500 mg/Tag) und Amoxicillin ( 2 x 1g/Tag) (Megraud 2003).

### 1.5 Morphologie und Genom von *H. pylori*

*H. pylori* ist ein gramnegatives, spiralig gewundenes oder gekrümmtes Bakterium (Goodwin 1987). Es ist 2.5 bis 5.0µm lang und bis 1.0µm breit. Vier bis 6 unipolare Flagellen, von denen jede ca. 30µm lang und ca. 2.5nm breit und von einer säureresistenten Phospholipidschicht umgeben ist, versetzen es in die Lage, korkenzieherartige Bewegungen auszuführen (Geis 1993).

Unter Stress ändert *H. pylori* seine spiralige Form. Es entsteht eine gebogene, teils kokkoide Gestalt, welche wahrscheinlich metabolisch aktiv ist, aber nicht kultiviert werden kann (Nilius 1993). Die Feinstruktur der äußeren Membran hat einen glykokalixartigen Aufbau, über den wahrscheinlich eine Adhärenz an Mikrovilli der Epithelzellen erfolgt (Goodwin 1987). Auf der Oberfläche von kultivierten Erregern finden sich ringförmige Aggregate von Urease und HspB, einem Homolog des Hitzeschockproteins GroEL von *Escherichia coli* (Austin 1992). Beide Proteine wurden bei *H. pylori* ebenfalls in vivo gefunden.

Das Genom von *H. pylori* variiert von 1.6 bis 1.73Mb mit einer durchschnittlichen Größe von 1.67Mb (Beji 1988). Ungefähr 40% der Isolate besitzen Plasmide in einer Größe von 1.5 bis 23.3 kb. Keines der untersuchten Plasmide trägt bekannte Virulenzfaktoren (Kleanthous 1991).

Die variable Organisation vieler Gene auf der genomischen Karte von *H. pylori* lässt auf intensive Neuarrangements des Genoms schließen (Bukanov 1994). *H. pylori* zeigt dabei in verschiedenen Genen eine ausgesprochen hohe Sequenzdiversität. Hierbei wurden unterschiedliche Sequenzen für Urease, strukturelle und akzessorische Proteine, Flagellin, vakuolisierendes Zytotoxin (*vacA*) und CagA gefunden (Foxall 1992, Desai 1994, Forbes 1995, Garner 1995).

## 1.6 Epidemiologie und Übertragung der *H. pylori*-Infektion

*H. pylori* ist hinter dem Karieserreger *Streptococcus mutans* der zweithäufigste Infektionserreger weltweit (Megraud 1989). Es wird geschätzt, dass ungefähr die Hälfte der Weltbevölkerung mit *H. pylori* infiziert ist, wobei allerdings erhebliche regionale Unterschiede bestehen (Graham 1991).

Die Infektion wird üblicherweise vor dem zehnten Lebensjahr erworben (Taylor 1995). Sie erfolgt wahrscheinlich durch Übertragung von Mensch zu Mensch, da *H. pylori* ausschließlich den Magen des Menschen und einiger Primaten besiedelt. Auch wurde *H. pylori* niemals bei domestizierten Tieren gefunden oder aus natürlichen Quellen isoliert (Goodman 1995). Der genaue Modus der Transmission, ob oral-oral oder fäkal-oral ist ungeklärt (Berkowicz 1987). Da *H. pylori* sowohl in Fäzes als auch im Speichel nachgewiesen wurde, spielen vermutlich beide Übertragungswege eine Rolle.

Die Prävalenz der *H. pylori*-Infektion in verschiedenen Ländern zeigt, dass der Industrialisierungsgrad entscheidenden Einfluss auf die Akquisition des Erregers hat. Entwicklungsländer haben in sero-epidemiologischen Untersuchungen mit 60-90% *H. pylori*-Infizierter deutlich höhere Durchseuchungsraten als Industrieländer mit 25-50% (Megraud 1989). Studien zur Prävalenz von *H. pylori* in Westafrika verdeutlichen dies (Kidd 1999). In der Elfenbeinküste ergab sich bei serologischer Testung von 274 Personen auf eine durchschnittliche Infektionsrate von 67%, mit altersspezifischen Unterschieden. Personen unter 10 Jahren hatten zu 55%, zwischen 10 und 50 Jahren zu 77% und über 50 Jahren zu 82% Antikörper. Die nachgewiesene hohe Anzahl seropositiver Personen schon im Kindesalter sowie die mit dem Lebensalter ansteigende Prävalenz konnte in anderen afrikanischen Ländern wie Algerien, Nigeria und Südafrika ebenfalls gefunden werden. Prävalenzen aus dem Senegal zeigen vergleichbare Resultate, liegen allerdings nur von symptomatischen Personen vor (Mbenge 1997).

Dass ähnliche, die Infektion fördernde Bedingungen auch in den inzwischen entwickelten Ländern vorgeherrscht haben müssen, zeigt der Geburtenkohorteneffekt (Banatvala

1993). Dieser beschreibt, dass verschiedene Generationen unterschiedliche Prävalenzen besitzen. Personen älterer Generationen, vermutlich durch schlechte hygienische Bedingungen in der Kindheit, zeigen erhöhte, jüngere Generationen demgegenüber niedrigere Infektionsraten mit *H. pylori*. Der zunehmende Industrialisierungsgrad und die damit verbundenen verbesserten Lebensbedingungen sind wahrscheinlich der Grund, warum der vormals auch in den Industrieländern weit verbreitete Keim nur noch bei 10% der jüngeren Generation zu finden ist (Vandenplas 1992).

Neben sozioökonomisch bedingten Unterschieden der Prävalenz geben epidemiologische Studien Hinweise, dass auch genetische Faktoren hierbei eine Rolle spielen. Dass eine erbliche Disposition für eine erhöhte Empfänglichkeit für die *H. pylori* Infektion verantwortlich sein kann, ergaben Zwillingsstudien von Malaty (Malaty 1994). Er wies das mögliche Vorhandensein einer genetischen Komponente bei dem Erwerb des Erregers über das Verhältnis zwischen gleichzeitig infizierten eineiigen und zweieiigen Zwillingen nach. Weitere Anhaltspunkte auf genetische Einflüsse ergaben Untersuchungen zur Prävalenz von *H. pylori* in verschiedenen Ethnien einzelner Länder. In Maryland, USA, wiesen Afroamerikaner und Hispanier mit einer Prävalenz von 57% im Vergleich zu der weißen Bevölkerung mit nur 26% auch nach Berücksichtigung verschiedener Umwelteffekte eine signifikant höhere Helicobacterdurchseuchung auf (Hopkins 1990). Ähnliche Ergebnisse erhielt man bei Studien in anderen Staaten der USA (Graham 1991). Weitere ethnisch bedingte Unterschiede wurden bei Volksgruppen in Taiwan (Teh 1994), Neuseeland (Morris 1986) und Australien (Dwyer 1988) gefunden und konnten auch dort nur zum Teil den unterschiedlichen Lebensbedingungen zugeschrieben werden.

## 1.7 Pathogenese

Zu den wesentlichen Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori* zu Beginn einer Infektion zählen Urease, Flagellen und Adhäsine. Ammoniak, das bei der Hydrolyse von Harnstoff durch Urease gebildet wird, dient dem Erreger zum Überleben in dem stark sauren Milieu des Magens (Moblely 2001). Über Ausschleusung des basischen Moleküls in den periplasmatischen Raum und die nähere Umgebung gelingt so die Errichtung einer neutralen Mikroumgebung. Dies erlaubt es dem Bakterium, das Magenepithel zu erreichen. Dabei wird die Enzymaktivität durch einen pH-abhängigen Harnstoff-Kanal reguliert. Dieser öffnet sich bei niedrigen pH-Werten und verschließt sich wieder unter

neutralen Bedingungen (Weeks 2001). Eine ausgeprägte Motilität durch unipolar angeordnete Flagellen befähigen das gewundene Bakterium zu einem korkenzieherartigen Durchdringen der den Magen schützenden Schleimschicht (Suerbaum 1993). Hat *H. pylori* seinen eigentlichen Lebensraum zwischen Schleim und Epithel erreicht, erlauben ihm verschiedene Bindungsproteine ein Anheften an die Epithelzellen. Das dabei am besten charakterisierte Protein BabA heftet sich an das Lewis-b-Blutgruppenantigen auf der Zelloberfläche des Magens (Ilver 1998). Durch In-vitro-Studien konnten extrazelluläre Matrixproteine wie Laminin, Fibronectin, einige Kollagene und Heparansulfat als weitere mögliche Liganden ausgemacht werden (Ljungh 1996).

Mit Bindung an die Magenzellen sezerniert *H. pylori* eine Reihe von Proteinen, mit deren Hilfe einerseits die Versorgung mit Nährstoffen gewährleistet wird, andererseits durch verschiedene Mechanismen eine chronische Entzündung induziert und schließlich etabliert wird.

Ein wichtiger Virulenzfaktor dabei ist die Pathogenitätsinsel (PAI) (Perez-Perez 1997), ein 40kD großes Insertionselement, welches weltweit bei ca. 60 bis 90% aller *H. pylori*-Stämme gefunden wurde (Doorn 1999). Die PAI beinhaltet Gene, die für ein Typ-IV Sekretionssystem kodieren, welches das 120kDa messende *cagA* (cytotoxicity associated gene)-Protein in die Zellen der Mukosa inserieren lässt (Odenbreit 2000; Aras 2003).

Entsprechende Systeme wurden bereits bei anderen Bakterien wie *Escherichia coli* oder *Bordetella pertussis* beschrieben, mit der Funktion, Makromoleküle aus anderen Zellen oder in andere Zellen zu befördern (Pohlmann 1994; Tummuru 1995). In der Wirtszelle wird *cagA* über eine Tyrosinkinase phosphoryliert (Selbach 2002). So modifiziert interagiert es mit SHP-2 (Higashi 2002), einer Tyrosin-Phosphatase, welche die Verteilung, Migration und Adhäsion epithelialer Zellen beeinflusst (Yamazaki 2003).

Intrazellulär interferiert *cagA* mit einer Reihe von Signaltransduktionswegen. Interaktionen mit Grb2 und dem Ras/MEK/ERK Signalweg, der Src Familie der Protein-Kinasen und dem Csk Signaltransduktionweg sind bekannt (Mimuro 2002; Tsutsumi 2002). Über diese Mechanismen werden in den betroffenen Zellen wahrscheinlich Proliferation bzw. Apoptose vermittelt.

*vacA* ist ein weiteres pathogenetisch bedeutsames Protein von *H. pylori*. Dieses nicht von allen Stämmen gebildete hochmolekulare Toxin induziert eine Porenbildung in der Phospholipidmembran mit konsekutiver Vakuolenbildung in den Zielzellen (Cover 1992).

*vacA* ist im Gegensatz zu *cagA* in allen *H. pylori*-Stämmen konserviert, weist aber einige signifikante Varianten auf (Atherton 1995). Dazu zählen die s1/s2 Allele der Signalregion des Gens und die m1/m2 Allele der mittleren Genregion. Die Bildung von Poren und der Vakuolen führt zu einem Efflux von Ionen und Harnstoff (Iwamoto 1999; Tombola 2001). Daneben induziert *vacA* eine Lockerung epithelialer "Tight Junctions" mit möglichem Übergang von Nährstoffen in das Magenlumen (Papini 1998). In-vitro-Versuche zeigten zusätzliche potentielle Effekte des Toxins mit jedoch unklarer Bedeutung für das Geschehen in vivo. Sowohl Immunsuppression durch Blockierung der Phagosomenreifung, Inhibition der Antigenpräsentation und der T-Zell Proliferation, als auch Minderung der Th1-Aktivität durch Interaktion mit Calcineurin wurden beobachtet (Zheng 2003; Molinari 1998; Gebert 2003). Neben diesen Effekten verursacht *vacA*, vermutlich über Veränderungen des Zytoskeletts, Apoptose, Suppression epithelialer Zellproliferation und -migration und schließlich, durch Vakuolenbildung, eine direkte Zellschädigung (Pai 1999; Kuck 2001; Cover 2003). Verschiedene Formen des *vacA*-Toxins führen zu unterschiedlichen Phänotypen und weisen teilweise Assoziationen mit der Ausprägung von gastroduodenalen Erkrankungen auf. Variationen in der Signalpeptidregion zeigen einerseits den voll aktiven s1 Typ des *vacA*-Proteins und den N-terminal gekürzten s2 Typ (Pai 1999). Bei diesem sind die Anzahl der Poren in der Epithelmembran reduziert, und die Vakuolenbildung ist abgeschwächt (McClain 2001). Verschiedene Kombinationen der Varianten der Signalsequenz und der mittleren Region des *vacA* Gens führen zu Erregertypen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Der s1/m2 Haplotyp bewirkt bei einer geringeren Anzahl Epithelzellen eine Schädigung als der s1/m1 Haplotyp (Letley 2003). Letzterer wurde in Assoziation mit Magenkarzinomen gefunden (Kidd 1999; Miehle 2000).

Genetische Analysen von *H. pylori* zeigen, dass *cagA* und *vacA*, obwohl weit im Genom voneinander entfernt, eng miteinander gekoppelt sind (Alm 1999). Der s1 Genotyp des *vacA* Gens korreliert mit dem Auftreten der *cag* PAI (Atherton 1995). Umgekehrt tritt der s2 Typ nur bei Abwesenheit der Pathogenitätsinsel auf. Der Zusammenhang kann in der Interaktion zwischen den Proteinen *cagA* und *vacA* liegen (Asahi 2003). Ein solcher ist bisher aber nur in geringem Umfang nachgewiesen worden, erklärt deshalb also nicht das volle Ausmaß der Assoziation. Eine alternative Hypothese besagt, dass die virulentere Variante von *vacA* auf die Anwesenheit der PAI hin selektiert. Immunsuppression durch

*vacA* bewirkt vermutlich eine ungenügende Freisetzung von Nährstoff, was über den *cagA*-Effekt der Lockerung des Zellgefüges aber kompensiert werden könnte (Amieva 2003).

## 1.8 Immunantwort auf *H. pylori*

*H. pylori* verfügt über verschiedene Mechanismen, die Immunantwort des Wirts zu unterdrücken. Die Persistenz der Bakterien im Magenlumen verhindert zunächst das unmittelbare Zusammentreffen mit den Effektorzellen des Immunsystems (Marshall 1983). Durch Bindung an die Epithelzellen sowie direkt zellschädigende Wirkung erfolgt schließlich eine Aktivierung der unspezifischen und erworbenen Immunantwort (Peek 1995). *H. pylori* ist in der Lage, die inflammatorische Reaktion auf unterschiedlichen Wegen zu begrenzen. Signale der Toll-like Rezeptoren (TLR), Trigger für die unspezifische Entzündungsreaktion, werden auf verschiedene Art und Weise umgangen (Takeda 2003). Die Erkennung von Flagellen durch TLR5 wird durch *H. pylori* nicht stimuliert (Gewirtz 2003). Nichtmethylierte DNA, die von TLR9 erkannt wird kommt bei *H. pylori* kaum vor (Krieg 2002; Takata 2002). LPS von *H. pylori* ist, verglichen mit LPS anderer enteritischer Bakterien, anerg. Während *H. pylori*-LPS von TLR4 der Makrophagen erkannt wird, bleibt es von TLR4 gastraler Epithelzellen unerkant (Maeda 2001; Backhed 2003). Nod1, ein intrazelluläres Bindungsprotein der unspezifischen Immunantwort, erkennt jedoch Bestandteile von *H. pylori* (Giardin 2003). Die resultierende NF- $\kappa$ B-induzierte Zytokinexpression führt zur Entzündungsreaktion und ist ein wesentlicher Grund für einen kontinuierlichen inflammatorischen Stimulus (Peek 1995). Neben der unspezifischen wird auch die spezifische Immunantwort aktiviert. Es finden sich Zeichen für zelluläre und humorale Abwehrreaktionen gegen *H. pylori*, obgleich verschiedene Mechanismen vorhanden sind, sie zu unterdrücken (Bamford 1998). Über *vacA* vermag *H. pylori* mit der Antigenpräsentation, sowohl bei der Aufnahme, als auch bei der Prozessierung von Proteinen zu interferieren (Molinari 1998). Die T-Zellaktivierung und -proliferation wird verhindert, und es kommt durch Wirkung von *vacA* zur T-Zell-spezifischen Apoptose (Gebert 2003).

Trotz weiterer Strategien, dem Immunsystem auszuweichen, wie molekulares Mimikry über das Lewis Antigen und Antigenvariation von Oberflächenproteinen, wird eine humorale und zelluläre Immunantwort mit Th1- und Th2-Komponenten induziert. Experimentelle Befunde ergaben dabei eine Th1-dominierte Immunantwort in der Mukosa des Magens, obwohl *H. pylori* ein extrazellulärer Erreger ist (Bamford 1998). Studien im Mausmodell zeigten, dass diese Th1-geführte Antwort die Besiedlungsdichte von *H. pylori* im Magen zu reduzieren vermag, jedoch auch eine stärkere Entzündungsreaktion bewirkt (Mohammadi 1997; Fox 2000). Eine Beobachtung von gleichzeitig mit *Helicobacter felis* und dem murinen Nematoden *Heligmosomoides polygyrus* infizierten Mäusen weist in dieselbe Richtung. So wurde im Vergleich zu nur mit *H. felis* infizierten Mäusen eine abgeschwächte Th1-Antwort mit reduzierter Atrophie der Magenzotten vorgefunden. Vermutlicher Grund hierfür ist die Induktion einer Th2-Antwort des Immunsystems als Reaktion auf die Nematodenkoinfektion mit konsekutiver Suppression der Th1-Antwort (Fox 2000). Dies ist auch eine mögliche Erklärung dafür, dass in einigen Ländern Afrikas trotz hoher Prävalenzen von *H. pylori* die Rate an Magenkarzinomen wesentlich niedriger ist als in anderen Ländern mit vergleichbar hohen Anteilen seropositiver Personen. Es wird vermutet, dass die in Afrika häufig vorzufindenden Wurminfektionen die Th1-Antwort auf *H. pylori* und ihre Komplikationen supprimieren.

### 1.9 Wirtsfaktoren mit Einfluss auf die *H. pylori*-Infektion

Die Bedeutung von Wirtsfaktoren bei der *H. pylori*-Infektion konnte in verschiedenen Studien demonstriert werden. Dabei kann zwischen solchen, die eine erhöhte Anfälligkeit für die Infektion bewirken, und anderen mit modulierendem Effekt auf den Infektionsverlauf unterschieden werden.

Mit einer erhöhten Suszeptibilität für *H. pylori* sind die Anwesenheit des Lewis-b-Blutgruppenantigens (Boren 1993), einzelne Glykopeptide des Magenepithels (Lingwood 1989), bestimmte Allele der Humanen Leukozytären Antigene (HLA) (Wee 1992; Chiba 1995; Ihan 1995) und das männliche Geschlecht (Replogle 1995) in Zusammenhang gebracht worden.

Für die erfolgreiche Etablierung einer Infektion müssen die Bakterien zunächst an Wirtszellen adhären. Ein möglicher Rezeptor ist das Lewis-b-Blutgruppenantigen, das auf der Oberfläche von Magenepithelzellen exprimiert wird. Personen mit Blutgruppe A

und B im Vergleich zu Personen mit Blutgruppe 0 haben eine geringere Anzahl des Lewis-b-Antigens, was eine mögliche Erklärung für das erhöhte Auftreten von Ulzera bei Personen mit Blutgruppe 0 ist. Die hochpolymorphen Gene des HLA-Systems spielen für die Immunantwort gegen Infektionserkrankungen eine wesentliche Rolle.

Dementsprechend wurden zahlreiche Assoziationen gefunden. Beobachtungen bei *H. pylori*-infizierten Personen ergaben eine erhöhte Expression von HLA-DR mit 92% gegenüber 39% bei nicht infizierten Personen. Die Frequenz von HLA-DQA1\*0301 bei *H. pylori*-negativen Personen (21,4%) lag signifikant niedriger, als bei *H. pylori*-positiven Personen mit Duodenalulzera mit (41,8%) (Wee 1992; Chiba 1995; Azuma 1993).

Wirtsfaktoren, die möglicherweise den klinischen Verlauf der Erkrankung beeinflussen können, sind schwer zu ermitteln, da die Infektion schon über einen unbestimmten Zeitraum vor Entwicklung einer klinischen Symptomatik vorhanden sein kann (Sipponen 1990). Hinweise verdichteten sich allerdings dahingehend, dass die Immunantwort in der Tat einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben könnte. Wie beim Erwerb, so spielt auch bei dem Fortgang einer Infektionserkrankung das HLA-System eine wichtige Rolle. Assoziationen wurden bei HLA-I und II Genen gefunden. HLA-DQA1\*0102 wurde häufiger bei *H. pylori*-negativen Patienten als bei solchen mit Duodenalulzera gefunden (Azuma 1994). HLA-DQA1\*0301 war im Gegensatz dazu bei der gesunden Kontrollgruppe erniedrigt. Beales fand eine erhöhte Frequenz von HLA-DQ5 in Patienten mit Schleimhautatrophie des Magens oder mit intestinalen Metaplasien (Beales 1995). Auch Mutationen in Genen proinflammatorischer Mediatoren konnten mit der Krankheitsausprägung in Verbindung gebracht werden. So wurde bei Austausch, die die Interleukin-1 $\beta$  Antwort auf *H. pylori* verstärken, ein höheres Risiko für Magenatrophie, Hypochlorhydrie oder der Entstehung von Adenokarzinomen beobachtet (Machado 2003; El-Omar 2000). Mutationen im Tumornekrose- $\alpha$ - und Interleukin-10-Gen, die zu einer stärkeren Sekretion der Zytokine führten, resultierten in den gleichen, wenn auch weniger stark ausgeprägten Komplikationen (Figueiredo 2002; Wu 2003).

### **1.10 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Mit der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob genetische Varianten des Menschen existieren, die den Verlauf von *H. pylori*-Infektionen so wirkungsvoll beeinflussen, dass sie durch eine genetische Kopplungsanalyse identifiziert werden können. Als phänotypischer Parameter wurden *H. pylori*-reaktive IgG-Serum-Antikörper gewählt, da sie gegenwärtig als das geeignete Maß für die individuelle Empfänglichkeit gegenüber der Infektion angesehen werden. Sollten sich signifikante Kopplungsbefunde ergeben, soll versucht werden, die entsprechenden genomischen Region einzugrenzen und ggf. die entscheidenden Genvarianten zu identifizieren. Solche Varianten können Einblicke in wesentliche Mechanismen von Empfänglichkeit, Resistenz oder Immunitätsentwicklung bei *H. pylori*-Infektionen geben und möglicherweise auf neuartige Interventions- oder Immunisierungsstrategien hinweisen.

## 2 Material & Methoden

### 2.1.1 Studienpopulation

Die Studiengruppe besteht aus Teilnehmern, die für eine Untersuchung zur Bestimmung genetischer Faktoren mit Einfluss auf die Infektionsintensität von *Schistosoma mansoni* rekrutiert worden waren (Müller Myhsok 1997). Alle Personen stammten aus Ndombo, einem Dorf 4km südlich der Stadt Richard Toll im Norden Senegals. Hier leben ca. 4000 Menschen aus der Volksgruppe der Woloff, die mit ca. 43% zahlenmäßig die größte Ethnie des Landes stellt. Aufgrund geringer Ab- und Zuwanderung besitzt Ndombo eine homogene Bevölkerungsstruktur. In die Studie wurden 22 Großfamilien einbezogen, die für die weitere Analyse in 35 Kernfamilien unterteilt wurden. Die Studiengruppe setzt sich aus 10 Familien mit 2 Kindern, 12 Familien mit 3 Kindern, 10 Familien mit jeweils 4 Kindern und 3 Familien mit 5 Kindern zusammen.

## 2.2 Material

### 2.2.1 Geräteliste

Zentrifuge, Eppendorf 5414 C

Zentrifuge, Sigma 4 K 10

Thermomixer, Eppendorf 5436

T3 Thermocycler, Biometra

Primus 384 Thermocycler, MWG

LightCycler™, Roche Diagnostics

Sequenzierautomaten, ABI377 und ABI3100, Perkin Elmer

### 2.2.2 Puffer und Lösungen

DNA-Ladepuffer (6x):

0,1% Bromphenolblau

0,1% Xylen Cyanol

40% Saccharose (w/v) in ddH<sub>2</sub>O

## Ethidiumbromid-Stammlösung:

10mg Eth. Br<sup>-</sup> /ml ddH<sub>2</sub>O

## PBS-Puffer:

80g NaCl  
2g KCl  
26,8g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x7H<sub>2</sub>O  
2,4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 800ml H<sub>2</sub>O  
pH 7,4 mit HCl  
add 1L

## PBS/Tween20 - Puffer:

PBS mit 0,05% TWEEN20

## Phosphorylcholinlösung:

10mg/ml PC-BSA in 0,1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 9,0

## Taq-Puffer, 10fach konzentriert:

500mM KCl,  
100mM Tris-HCl (pH 8,3 bei RT)  
15mM MgCl<sub>2</sub>  
1mg/ml Gelatine

## TBE (Tris/Borat/EDTA) 10fach konzentriert:

108g Tris-base  
55g Borsäure  
40ml 0,5 M EDTA pH 8,0  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

## TE (Tris/EDTA)

100mM Tris-HCL  
10mM EDTA

### 2.2.3 Enzyme

Taq DNA Polymerase	QIAGEN, Germany
Proteinase K	QIAGEN, Germany

### 2.2.4 Längenstandard

100bp DNA-Leiter	Pharmacia, Uppsala, Schweden
------------------	------------------------------

### 2.2.5 Mengenstandard

Lambda-DNA in Verdünnungen von 2-100ng	Sigma
--	-------

### 2.2.6 Reaktionssysteme

BigDye™ Terminator CycleSequencing Kit	(PE-Biosystems, Warrington, England)
DNA Isolationskit	(AGS Hybaid)
High Pure PCR-Product Purification Kit	(Boehringer Mannheim)
QIAGEN Blood Prep	(QIAGEN)
QIAGEN PCR Purification Kit	(QIAGEN)
Synelisa Helicobacter	(Synelisa, Pharmacia)
Weber Set 6a Genethon	(Généthon)

### 2.2.7 Chemikalien

Acrylamid/ Bisacrylamid	Sigma
Agarose	Roth
Ammoniumpersulfat	Sigma
Borsäure	Biomol
Bromphenolblau	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Calciumchlorid	Merck
Chloroform	Merck
Desoxynucleotid Set (dATP, dGTP, dTTP, dCTP )	Hybaid-AGS
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma

Glycerol	Merck
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Sigma
Phosphorylcholin-BSA	Biosearchtech
Salzsäure	Merck
Schwefelsäure	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma
Tris-HCL	Biomol
Tris-Base	Biomol
Tween20	Merck
Xylencyanol	Serva

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Phänotypisierung

Allen in die Studie einbezogenen Personen wurde 2ml Vollblut entnommen. Das Serum wurde mit einem ELISA (Synelisa, Pharmacia Upjohn) auf Anti-*H. pylori*-IgG untersucht (Nilius 2001). Für die Detektion der Antikörper wurde eine Mischung aus rekombinanten Proteinen und komplettem Zelllysate des Erregers als Antigen verwendet. Durch Bindung eines zweiten mit Meerrettichperoxidase gekoppelten Anti-Fc-IgG Antikörpers kam es nach Zugabe eines Substrats zu einer messbaren Farbstoffentwicklung. Ein positiver Test auf *H. pylori*, im Sinne des ELISA-Tests, lag bei einem Wert von größer 10 U/ml. Im Serum wurden ebenfalls IgG-Antikörper gegen Phosphorylcholin mit einem selbst entwickelten ELISA bestimmt. Als Antigen wurde gereinigtes Phosphorylcholin eingesetzt, Hauptbestandteil der Zellmembran

ubiquitärer oraler Bakterien wie *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Streptococcus oralis* und *sanguis*.

### **2.3.1.2 Phosphorylcholin-ELISA**

Der ELISA dient der Bestimmung von Antikörpern gegen Phosphorylcholin. Phosphorylcholin wurde zuvor bei einem, in 0.05 M Natriumdihydrogenphosphat pH-Wert 9.0, gelöst. Mit einer 1:1000 Verdünnung dieser Lösung wurden (1.25µg/ml) Mikrotiterplatten (Nunc Polysorb) 18 Stunden bei 4°C beschichtet. Unspezifische Valenzen wurden mit 1% BSA Lösung abgesättigt. Zwischen jedem der nachfolgenden Schritte erfolgte ein dreimaliger Waschzyklus mit PBS/TWEEN20. Das Patientenserum wurde in Verdünnungen von 1:100 bis zu 1:3200 zur Bindung an Phosphorylcholin 18 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend kam Anti-Human-IgG Antikörper gekoppelt mit Meerrettichperoxidase bei 20°C für 1 Stunde in einer Verdünnungen von 1:4000 hinzu. Alle Verdünnungen erfolgten in PBS. Unter Zugabe von 100µl TMB-Lösung für 10min kam es über die enzymatische Wirkung der Peroxidase zu einer Farbreaktion. Gestoppt wurde die Reaktion schließlich mit 2M Schwefelsäure. Die Messung der optischen Dichte erfolgte unmittelbar anschließend auf einem ELISA-Lesegerät bei 450nm.

### **2.3.2 DNA-Isolierung**

#### **2.3.2.1 DNA Isolierung (QIAgen Aufreinigungs Kit)**

Die DNA-Extraktion aus Blut erfolgte über Proteinase-K-Abbau der Zellproteine, Bindung der DNA an eine Matrix, Reinigung der DNA und anschließender Elution mit Wasser. Dabei wurden 2 ml mit Puffer-AS (QIAgen) konserviertes Vollblut mit 222 µl Lyse-Puffer (QIAgen) und 140µl Proteinase K (20µg/µl) bei 70°C für 1h inkubiert. Nach Zugabe von 1110µl Ethanol absolut wurde die DNA an eine Säule (QIAgen) gebunden und dort mit Waschpuffer (QIAgen) gereinigt. Die Elution geschah mit auf 80°C vorgeheiztem sterilem Wasser.

#### **2.3.2.2 DNA Isolierung (AGS-HYBAID Aufreinigung Kit)**

Die Extraktion von DNA aus Harnstoff-konserviertem Vollblut mit dem AGS-Hybaid Kit basiert auf dem Prinzip der Hochsalzfällung. Dafür wurden 300µl 8M Harnstoff-

konserviertes Vollblut mit 600µl Puffer-1 (AGS HYBAID) zur Lyse bei 68°C für 10min inkubiert. Nach Zugabe eines gleichen Volumens Chloroform wurde bei 14000Upm für 2min zentrifugiert. Anschließend kam der Überstand zusammen mit einem gleichen Teil sterilem Wasser und 100µl Puffer-2 (AGS HYBAID) in ein neues Reaktionsgefäß. Nach erneuter Zentrifugation bei 14000Upm für 2min wurde das entstandene Pellet in 300µl Puffer-3 (AGS HYBAID) resuspendiert und mit 750µl Ethanol 96% überschichtet. Die DNA-Fällung erfolgte durch vorsichtiges Umschwenken. Das im Anschluss an die 10min-Zentrifugation entstandene Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 200µl TE-Puffer aufgenommen.

### **2.3.3 DNA-Qualitätskontrolle**

Zur Kontrolle wurden die extrahierten Nukleinsäuren zusammen mit einem Mengenstandard auf einem 1% Agarosegel aufgetragen. Als Vergleich diente Lambda-DNA (Sigma) in einer definierten Konzentration. Dabei kamen Verdünnungen von 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50 und 100ng Lambda-DNA zur Anwendung. Degradierete oder zu schwach konzentrierte DNA (<2ng/µl) wurde erneut extrahiert.

### **2.3.4 PCR**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung einer definierten Ziel-DNA-Sequenz in vitro. Aus einem heterogenen Pool von DNA Sequenzen können gezielt Bereiche amplifiziert werden. Die Spezifität der PCR-Reaktion wird über die Sequenz der Primer erreicht, die in ihrer Kombination nur an einer für sie definierten Position binden können. Ausgangsmaterial der PCR war in der Regel genomische DNA. Die PCR-Reaktion läuft in drei Schritten ab. Zunächst wird die DNA initial zur Erzeugung von DNA-Einzelsträngen bei 94°C denaturiert. In dem folgenden Schritt binden Oligonukleotidprimer bei einer Temperatur zwischen 40 und 60°C an die Zielsequenz. Im dritten Schritt synthetisiert die hitzestabile Taq-Polymerase von den Primern ausgehend bei 72°C einen komplementären Einzelstrang in 3'-Richtung. Bei diesem Schritt werden die in der Reaktionslösung befindlichen dNTPs in den neuen DNA-Strang eingefügt. Um eine effiziente Vervielfachung der DNA zu erreichen wird der Zyklus von Denaturierung, Anlagerung und Synthese 30-35x wiederholt.

### 2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Produkten

Die amplifizierte DNA wurde zur Kontrolle und Größenbestimmung auf einem mit Ethidiumbromid (0,5µg/ml) versetzten 1,5%igem Agarose Gel aufgetrennt. Hierzu wurde Agarose in einfach konzentriertem TBE-Puffer aufgekocht. Zur Auftrennung von PCR-Produkten im Bereich von 100-5000bp war eine Agarosekonzentration von 1-2% erforderlich. Die Amplifikate wurden mit Ladepuffer versetzt und in vorgefertigte Taschen auf das Gel aufgetragen. Die Separation der PCR-Produkte erfolgte in speziellen Elektrophoresekammern bei einer Spannung von 5Volt/cm Gellänge. Im Vergleich zu einem Längenstandard wurden die Fragmentgrößen abgeschätzt. Unter UV-Bestrahlung wurde mit Ethidiumbromid angefärbte DNA sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

### 2.3.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden säulenchromatographisch von überschüssigen Primern, Nukleotiden und anderen Pufferkomponenten gereinigt (High Pure PCR Product Purifikation Kit, Roche). Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Es binden nur Amplifikate einer Größe über 100bp an die Matrix der Säulen, kleinere Fragmente und Nukleotide werden durch Waschen entfernt. Eine Konzentrationsabschätzung der gereinigten Produkte erfolgte auf einem 1%igen Agarosegel.

### 2.3.7 Genomweite Typisierung von "short-tandem-repeat"-Markern (STR-Mikrosatelliten)

Der Reaktionsansatz für die Genotypisierung von Mikrosatellitenmarkern entspricht dem einer konventionellen PCR. Eines der beiden Oligonukleotide des Primerpaares ist dabei mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (FAM, HEX, TET, PE-Biosystems). Das Volumen eines Reaktionsgemisches von 10µl enthält:

DNA	4ng
Primer	8ng
dNTP's	jeweils 200µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
MgCl	1,75mM
KCL	50mM
Tris-HCl	10mM, pH8,3
Taq Polymerase	5U

initale Denaturierung	94°C	5min		
Denaturierung	94°C	30sec	}	33x
Anlagerung	55°C	1min		
Kettenverlängerung	72°C	1min		

Aus dem Sortiment 6a von Weber (Dubovsky 1995) wurden 373 STR-Marker entsprechend einer annähernd gleichmäßigen Verteilung über das Genom mit einem Abstand von 10 cM zueinander ausgewählt. Die Heterozgotenrate der Marker betrug ca. 76%. Pro Reaktionsansatz wurden bis zu 6 Primerpaare, zusammengestellt nach Größe ihrer resultierenden Produkte, gleichzeitig in einer PCR eingesetzt (Research Genetics, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California). Die Amplifizierung der DNA erfolgte bei einer Anlagerungstemperatur von 55°C in Mikrotiterplatten auf einem automatischen Thermocycler (MWG) mit 384 Reaktionskammern. Zur elektrophoretischen Trennung wurden die PCR-Produkte entsprechend unterschiedlicher Längen und Farbstoffmarkierungen zusammengestellt. Je 2µl der PCR-Produkte, die mit den Farbstoffen FAM und TET markiert waren, und 4µl der HEX-markierten Produkte wurden gemischt, und 1,5 µl dieser Lösung wurde mit 2,5µl TAMRA500 Längenstandard (PE-Biosystems) versetzt und bei 92°C für 2 min denaturiert. Die Auftrennung der Allele fand auf einem denaturierendem Polyacrylamid-Gel mit einem ABI377 Sequenzer nach Anweisungen des Herstellers statt (PE Biosystems). Mit dem Programmen GenScan™ und GENOTYPER™ (Applied Biosystems) erfolgte im Anschluss die Analyse der Marker mit Definition der Allelgrößen. Die aus der GENOTYPER™ Software exportierten Alleltabellen wurden anschließend in das für die statistische Auswertung entsprechende Format konvertiert.

### 2.3.8 Sequenzierung

Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems, ABI) nach der von Sanger (Sanger 1977) entwickelten Kettenabbruchmethode durchgeführt. Sie beruht auf der Neusynthese von DNA an einer einzelsträngigen Matrize und dem zufälligen Einbau von basenspezifischen Didesoxynukleotiden, der zum Abbruch der Reaktion führt.

Gekoppelt mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ergeben die vier Didesoxynukleotide nach Anregung durch einen Laser ein spezifisches Emissionspektrum. Über eine Detektionseinheit wird bei der elektrophoretischen Auftrennung das Spektrum aufgenommen und als sequenzspezifisches Bandenmuster wiedergegeben.

Der Reaktionsansatz für eine Sequenzierung beinhaltet:

DNA	2µl (2ng/µl)
Big Dye vers2.0 Reaktionsmix	8µl
Primer	1µl (10ng/µl)
HPLC gereinigtes Wasser	9µl

Die PCR-Produkte für die Sequenzierung wurden mit dem Boehringer PCR-Aufreinigungskit von überschüssigen dNTPs und Primerdimeren befreit. Die Sequenzierung fand mit 2µl (5ng/µl) PCR-Amplifikat als Matrize in einem Thermocycler der Firma Biometra unter folgenden Bedingungen statt:

#### Programm der Sequenzierungsreaktion

Initiale Denaturierung	96°C	3min	
Denaturierung	96°C	30sec	} 24x
Anlagerung	50°C	15sec	
Kettenverlängerung	60°C	1min	

Aufreinigung und Laufbedingungen folgten den Angaben des Herstellers (PE Biosystems). Die Auftrennung der Reaktionsprodukte geschah in dem halbautomatischen Kapillar-Sequenzierer 3100ABI (Applied Biosystems). Die resultierenden Sequenzen wurden in dem Programm SEQUENCE EDITOR (PE Biosystems) mit den entsprechenden Vergleichssequenzen aus der GenBank-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) verglichen und auf Mutationen überprüft.

### 2.3.8.1 *IFNGR1*-Sequenzierung

Zur Sequenzierung des *IFNGR1*-Gens wurde für jedes Exon separat aus den intronischen Bereichen ein Primerpaar abgeleitet. Die ersten 1045bp der 5` untranslatierten Region wurden durch zwei getrennte PCR-Reaktionen amplifiziert.

Tabelle 2.1

Primer zur Amplifikation von *IFNGR1*

Exon/ Promotor	Sense und Antisense Primersequenzen 5'→3' Orientierung	Produkt größe (bp)	MgCl <sub>2</sub>	Anlagerungs- temperatur der Primer
Promoter teilbereich1	TGATTTGACACTGAATTGCTG CCTGCTCACACCCTGCATGAC	652	1	55°C
Promoter teilbereich2	TGATCTGGCTGATAATACCTC ATCGGCTTGACCAAGAACTAC	525	1	55°C
1	GCACGACGCCGTGCTCACTGC AACCACGGAGCCCCAGTCTCG	473	1	55°C
2	TATACATATCTGGGCAATGTG GAAGGCTGATGAAAGAACACAG	301	1,75	54°C
3	ACTTTCTCTGGCGTCTCCATC ATGCTCAACCTGTACTGACTC	466	1,75	55°C
4	GTCCTGCTTTAGAACCAACCAG AATGTATTCACATGGTCAGTG	499	1,75	55°C
5	CAGATGCATAGTATCGTGCTG TCTAAGGAATGGAACATAATGC	511	1,75	54°C
6	ATTGCTATCTAAGACAGATAC TGATTGATGGCAGGTGACATC	436	1,75	55°C
7	GGTGGTCCATTACTTCAGACC ACAATTTCTGAGATCATAATC	791	1,75	55°C

Pro1 und Pro2 bezeichnen die Primerpaare für den proximalen sowie distalen Anteil der 5'-Region von *IFNGR1*. Die Primer wurden von der „*Homo sapiens* chromosome 6 working draft“ Sequenz Segmentnummer NT\_025741.8 abgeleitet.

### 2.3.9 Mutationsanalyse mit dem Light Cyclier

Das Light-Cyclier-System ist eine PCR-basierte Methode zur Detektion von Einzelnukleotidvarianten (Single Nucleotide Polymorphism, SNP). Hierfür werden dem üblichen PCR-Reaktionsansatz zwei weitere Oligonukleotide hinzugefügt, die an die Sequenz um den SNP hybridisieren. Die Oligonukleotide, als Anker und Sensor bezeichnet, sind mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt. Der Sensor, welcher mit komplementärer Sequenz den Austausch abdeckt, liegt mit seinem Farbstoff in geringer Entfernung zu dem des Ankers. Nur beide Farbstoffe in unmittelbarer Nähe ergeben bei Anregung über Licht einer definierten Wellenlänge eine Fluoreszenz. Das System, von der Firma Hoffmann LaRoche entwickelt, wird auch als DASH-FRET (Dynamische allelspezifische Hybridisierung mit Fluoreszenz-Resonanz Energietransfer) bezeichnet. Werden Anker und Sensor im Anschluss an die PCR abgeschmolzen, kommt es zum Verlust der Farbstoffwirkung und somit der Fluoreszenz. Der Sensor löst sich aufgrund seiner kürzeren Sequenz als erstes und entsprechend dem Allel des Wildtyps oder der Mutation mit unterschiedlicher Kinetik ab. Anhand des charakteristischen Fluoreszenzspektrums kann die Mutation oder der Wildtyp bestimmt werden.

#### 2.3.9.1 Light-Cyclier-PCR

Ein Reaktionsansatz beinhaltet: 2µl (4ng) DNA, 1µl 10x PCR-Puffer (QIAGEN), 0.2µl dNTPs (100µmol), 0.5µl BSA(10mg/ml), je 1µl 10pmol/µl der PCR-Primer, 0.5µl (4pmol/µl) Anker und Sensor sowie 0,2µl Taq-Polymerase (5U/µl), aufgefüllt mit ddH<sub>2</sub>O auf 10µl Gesamtvolumen. Die eigentliche PCR-Reaktion sowie das Abschmelzen von Anker und Sensor wurden nach Angaben des Herstellers in speziellen Glaskapillaren durchgeführt.

Tabelle 2.2

Primer mit Anker und Sensor für die LightCycler-Analyse der -56C->T , H318P und

L450P *IFNGR1*-Varianten.

Variation	Sense-Primer (5'→3')	Antisense-Primer (5'→3')	Anlagerungs Temperatur
-56C->T	GCACGACGCCGTGCTCACTGC	AACCACGGAGCCCCAGTCTCG	58°C
	<b>Sensor</b> GACCAGCCCAGCACTGCCC	<b>Anker</b> CCAGCCCCGGCCTTACGTCACTTCC	
H318P	GGTGGTCCATTACTTCAGACC	CTTCAGTAGTCACCACTTCTGTTA	54°C
	<b>Sensor</b> CCAGGCATGCATACCGAAGAC	<b>Anker</b> AAGAGCCGTTGTCTCCAGCAACAGT	
L450P	CCTCCTTTGGTTATGATAAACCACA	ACAATTTCTGAGATCATAATC	54°C
	<b>Sensor</b> TCATCCACAAGTAGATCCACTAGC	<b>Anker</b> AACCAATCAAGGACTCTTTACCGCT	

### 2.3.10 Genetische Statistik

Methoden der genetischen Epidemiologie ermöglichen es, funktionell relevante Gene bei monogenen und komplexen Erkrankungen zu identifizieren. Im Gegensatz zu monogen bedingten Erkrankungen sind bei der Entstehung komplexer Erkrankungen, zu denen auch Infektionserkrankungen zählen, mehrere Gene beteiligt. Zur Identifikation entsprechender Gene in einer genomweiten Kopplungsanalyse muss neben der Erhebung des Phänotyps genetische Information gewonnen werden. Dies geschieht über die Typisierung von STR-Markern, hochpolymorphen DNA-Abschnitten, in der Regel aus den nichtkodierenden Bereichen des Genoms. Ihre Lokalisation im Genom sind in Markerkarten abgebildet, die die lineare Anordnung von Genen und Markerloci sowie deren Abstände zueinander wiedergeben. Eine genetische Distanz von 1cM (CentiMorgan) entspricht dabei einem ungefähren Abstand von 1Mio Basenpaaren. Die Allele der genetischen Marker können mit einem phänotypischen Merkmal korreliert und auf einen statistisch signifikanten Zusammenhang hin überprüft werden.

Die Methoden, die hierbei zur Anwendung kommen, unterteilt man in modellbasierte parametrische und modellfreie nichtparametrische Anwendungen.

### 2.3.10.1 Parametrische Methoden

Vereinfachend lässt sich sagen, dass parametrische Methoden bei Kenntnis des Vererbungsmodus zur Identifikation monogener Merkmale herangezogen werden. Bei dieser Art Analyse wird die Weitergabe von Markerallelen innerhalb von Familien in Verknüpfung mit dem Phänotyp untersucht (Abb 2.3).

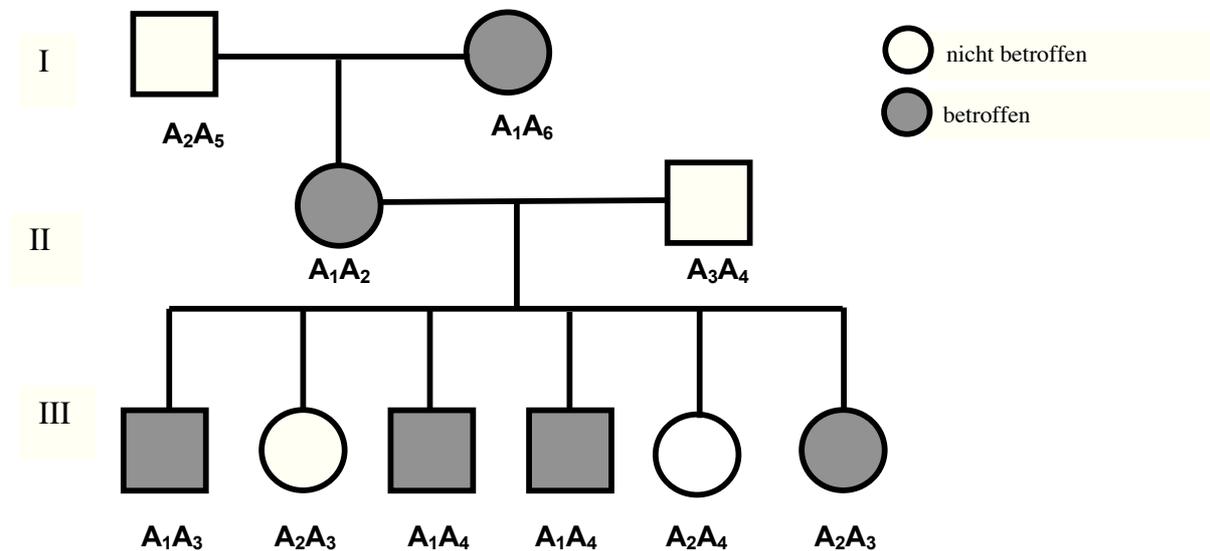
Als Maß für die Stärke einer Kopplung zwischen Markerallel und Merkmalslocus wird die Anzahl der innerhalb einer Meiose aufgetretenen Rekombinationen genommen. Ungekoppelt, das heißt lägen Marker und Merkmalslocus auf unterschiedlichen Chromosomen, ist eine Rekombinationsrate von 0.5 zu erwarten, da zufallsbedingt Rekombinanten und Nichtrekombinanten in gleicher Zahl zu finden wären. Dieses Verhältnis verschiebt sich gegen Null je näher Marker und Merkmalslocus beieinanderliegen. Befinden sich Marker und beeinflussendes Gen in direkter Nachbarschaft, treten keine Rekombinationen auf. Markerallel und Merkmalslocus würden zusammen, also gekoppelt, zu finden sein. Ein statistisches Maß dieser Kopplung ist der LOD-Score (Logarithm of the Odds). Er beschreibt das Verhältnis der vorliegenden Rekombinationsrate  $L(\theta)$  zu jener im nicht gekoppelten Zustand  $L(0.5)$ .

$$\text{LOD} = \text{Log}_{10} \left[ \frac{L(\theta)}{L(0.5)} \right]$$

Werte über 3.0 im LOD-Score entsprechen einem Verhältnis von 1:1000 zugunsten einer Kopplung und werden als signifikantes Ergebnis gewertet.

Abbildung 2.3

Beispiel einer Kopplungsberechnung für einen Merkmalslocus mit einem genetischen Marker in einer Familie.



Ist ein Markerlocus **A** mit einem Merkmalslocus, mit der Rekombinationsfraktion  $\theta$  gekoppelt, ist die Wahrscheinlichkeit für eine Rekombination in einer Meiose  $\theta$ , die für das Auftreten einer Nicht-Rekombinante  $1-\theta$ . Werden die Loci unabhängig voneinander vererbt beträgt die Wahrscheinlichkeit der Meiose rekombinant oder nicht rekombinant zu sein  $1/2$ . In der abgebildeten Familie sind 5 Nichtrekombinanten (III<sub>1</sub>-III<sub>5</sub>) und eine Rekombinante (III<sub>6</sub>) in der dritten Generation aufgetreten. Die Wahrscheinlichkeit für eine Kopplung in diesem Teil der Familie beträgt dann  $(1-\theta)^5 \cdot \theta$ . Die Wahrscheinlichkeit gegen eine Kopplung ist  $(1/2)^6$ . Das Verhältnis der logarithmierten Wahrscheinlichkeiten ergibt den LOD-Score:  $\text{LOD} = \text{Log}_{10} \left[ \frac{(1-\theta)^5 \cdot \theta}{(1/2)^6} \right]$ .

LOD-Score,  $Z$ , bei Rekombinationsfraktionen von 0 bis 0.5.

$\theta$	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
$Z$	$-\infty$	0.577	0.623	0.509	0.299	0

(Modifiziert nach Strachan und Read 2004 Human Molecular Genetics)

### 2.3.10.2 Nichtparametrische Methoden

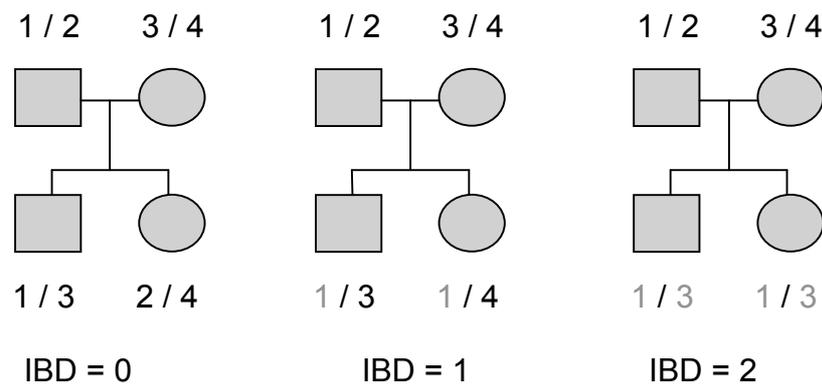
Da sich bei komplexen Phänotypen häufig kein eindeutiges Vererbungsmuster zeigt und mehrere Gene an der Ausprägung beteiligt sind, wurden modellfreie Statistiken entwickelt, die dies in der Analyse berücksichtigen.

Grundlage für die modell- oder parameterfreien Methoden mit quantitativen wie auch qualitativen Phänotypen ist der IBD-Wert (Identical by Descent). Über den IBD-Wert

wird die genetische Ähnlichkeit oder der Unterschied von Personen in einer Familie bestimmt. Er beschreibt die Anzahl der Allele eines Geschwisterpaares, die nach Herkunft gleich sind. Bei Geschwisterpaaren können sie die Werte 0, 1 oder 2 annehmen.

Abbildung 2.4

IBD-Werte eines polymorphen Markers



1 / 2 = paternale Allele eines Mikrosatellitenmarkers

3 / 4 = maternale Allele eines Mikrosatellitenmarkers

Der IBD (Identical by descent)-Wert bezeichnet die Abstammung eines Markerallels nach Herkunft.

Parameterfreie Methoden bei quantitativen Merkmalen wie der Haseman-Elston Test und der Rangsummentest von Lander und Kruglyak korrelieren Ähnlichkeiten des Phänotyps von Geschwisterpaaren mit der Ähnlichkeit im Genotyp, definiert durch den IBD Wert des Geschwisterpaares.

### 2.3.10.2.1 Haseman-Elston-Statistik

Das Haseman-Elston Verfahren beruht auf der Annahme, dass Geschwister, die sich in einem Phänotyp ähneln, auch auf genetischer Ebene Gemeinsamkeiten zeigen.

Als Maß für die phänotypische Übereinstimmung wird die quadrierte Differenz der Phänotypen  $(x_1 - x_2)^2$  benutzt. Die genetische Ähnlichkeit wird über den Anteil der

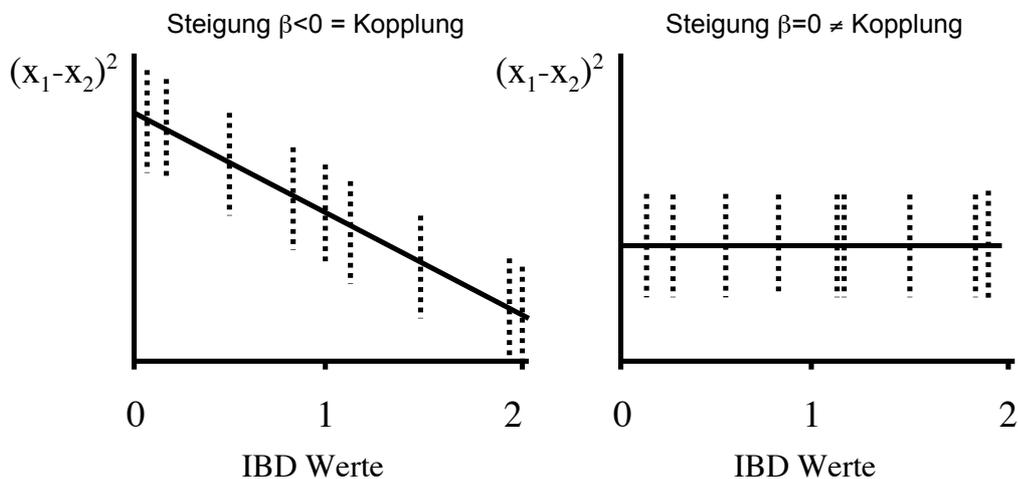
IBD-Werte bestimmt. Bei Kopplung zeigt die Regression der quadrierten

phänotypischen Differenz auf den Anteil der IBD-Allele eine negative Steigung,  $\beta < 0$ .

Ungekoppelt ist der Regressionskoeffizient  $\beta$  gleich Null und die Regressionsgerade läuft parallel zur Abszisse.

Abbildung 2.5

Haseman-Elston Statistik mit und ohne Kopplung



### 2.3.10.2.2 Nichtparametrischer Rangsummentest

Lander und Kruglyak entwickelten eine nichtparametrischen Statistik, die auf dem Rangsummentest von Wilcoxon basiert. Im Vergleich zu der Haseman-Elston Methode zeigte sie sich unempfindlicher gegen Ausreisser. Die quadrierten phänotypischen Differenzen  $(x_1 - x_2)^2$  von  $n$  Geschwisterpaaren werden entsprechend ihrer Ränge  $r_k$  geordnet. Es wird die Funktion  $f$  der IBD-Werte benutzt, wobei die Werte 1, 0 und -1 den IBD Werten 0, 1 und 2 entsprechen. Die Rangsummenstatistik ergibt sich dann wie folgt:

$$T = \sum_{k=1}^n r_k * f(k)$$

- $n$  = Anzahl der Geschwisterpaare
- $r_k$  = Ränge der phänotypischen Differenzen der Geschwisterpaare
- $f(k)$  = Funktion der IBD-Werte

### 2.3.10.3 Transmissions-Disequilibrium-Test

Der Transmissions-Disequilibrium-Test (TDT) ist ein familienbasierter Assoziationstest in Anwesenheit von Kopplung. Der Grundgedanke des TDT ist, dass ein Markerallel, welches mit einem Krankheitsallel gekoppelt ist, überzufällig häufig gemeinsam mit dem krankheitsverursachendem Allel an ein betroffenes Kind

weitergegeben wird. Besteht eine Kopplung zwischen dem untersuchten Allel und der Erkrankung, müsste dieses häufiger als mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,5 von den Eltern auf das Kind vererbt werden. Diese Art der Analyse erfordert eine familienbezogenen Untersuchung, in der beide Elternteile und ein phänotypisch charakterisiertes Kind genotypisiert werden. Idealerweise sollten die Eltern für das untersuchte Allel heterozygot sein. Der klassische TDT-Test ist nur bei qualitativen Phänotypen anzuwenden wohingegen der neuere quantitative TDT (QTDT) auch bei quantitativen Phänotypen eingesetzt wird.

#### **2.4 Programme für die genetische Analyse**

Eine Vielzahl von Computerprogrammen für unterschiedliche Anwendungen der genetischen Statistik ist frei im Internet verfügbar. Eine umfangreiche Sammlung ist auf der Internetseite der Rockefeller University mit der Adresse <http://linkage.rockefeller.edu> zu finden.

Zur Überprüfung auf einen mendelschen Erbgang der Allele der STR-Marker in den Familien ist das PEDCHECK Programm eingesetzt worden (O'Connell 1998). Personen, deren Markerallele mit der angegebenen Familienstruktur nicht übereinstimmten, wurden aus der Analyse entfernt. Die Allelfrequenzen der einzelnen Marker wurden mit der DOWNFREQ-Software ermittelt (Terwilliger 1995). Das Programm GENEHUNTER (Kruglyak & Lander 1995) wurde für die Berechnung der Haseman-Elston-Statistik und des nichtparametrischen Wilcoxon-Rangsummentest eingesetzt. Dieses Programm erlaubt die Analyse mehrerer genetischer Marker gleichzeitig (Mehrpunktanalyse). Der quantitative Transmissions-Disequilibrium-Test wurde mit dem Programm QTDT (Abecasis 2000) berechnet.

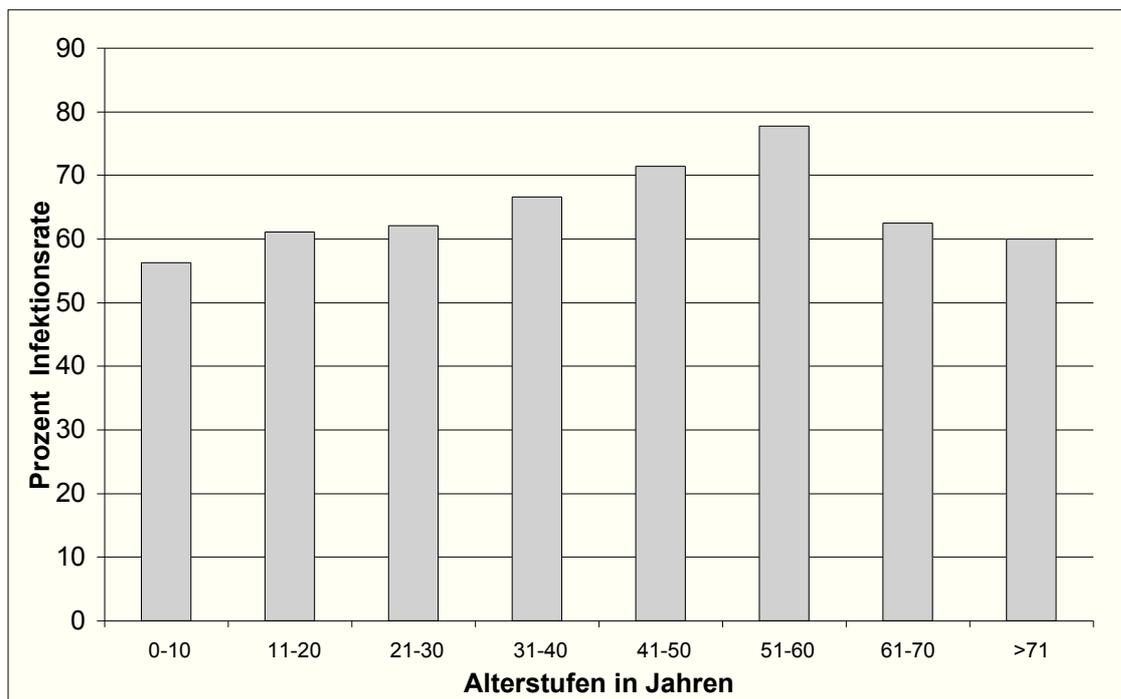
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Phänotypisierung

Einhundertelf Geschwister im Alter von 5 bis 60 Jahren aus 35 senegalesischen Kernfamilien wurden durch quantitative Bestimmung *H. pylori*-reaktiver Serumantikörper hinsichtlich ihrer Empfänglichkeit für eine Infektion mit *H. pylori* phänotypisiert. Bei 63% der Personen wurden Antikörperkonzentrationen nachgewiesen, die allgemein als Hinweis für eine bestehende oder durchgemachte Infektion gewertet wird. Die Prävalenz in den verschiedenen Altersstufen wies keine signifikante Altersabhängigkeit ( $r^2 = 0.009$ ) auf. Es zeigte sich jedoch ein Trend in Richtung einer erhöhten Infektionsrate mit zunehmendem Alter.

Abbildung 3.1

Prävalenz von *H. pylori* in Ndombo im Senegal, ermittelt über die Serum Anti-*H. pylori*-IgG-Konzentration.



### **3.2 Kontrolle auf Spezifität der Höhe der Antikörperkonzentrationen gegen *H. pylori***

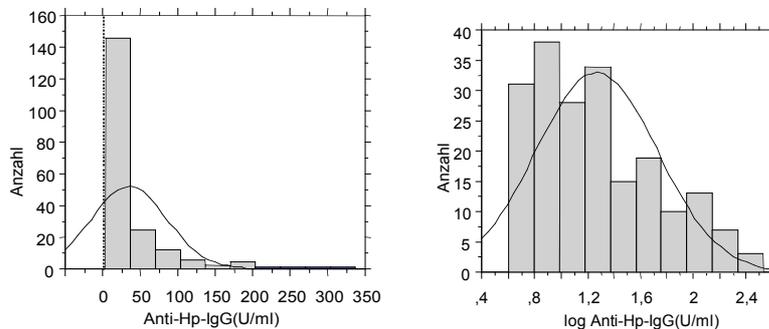
Zur Überprüfung darauf, dass die Höhe der gemessenen Antikörperkonzentrationen gegen *H. pylori* eine für diese Antikörper spezifische Aussage beinhaltet und nicht die Fähigkeit des Immunsystems widerspiegelt, generell IgG-Antikörper zu bilden, wurde zum Vergleich die Höhe der Konzentration von Antikörpern gegen ubiquitäre Antigene bestimmt. Zu diesem Zweck wurden Antikörper gegen Phosphorylcholin (PC), ein wesentlicher Bestandteil von C-Polysacchariden der Zellwände ubiquitärer Bakterien in der Mundhöhle ist (Schenkein 2001), ausgewählt, da sich solche Antikörper bei allen Menschen nachweisen lassen. Der Vergleich der Anti-*H. pylori*-IgG Konzentration mit dem Anti-PC-Antikörperspiegel ergab keine signifikante Korrelation ( $r=0.12$ ,  $p=0.21$ ).

### **3.3 Verteilung der Antikörperkonzentrationen**

Die Mehrzahl der statistischen Methoden in der Genetik setzt eine Normalverteilung des untersuchten Merkmals voraus. Aufgrund der stark linksgipfeligen Verteilung der Konzentrationen der Antikörper gegen *H. pylori* wurde eine Logarithmierung der Werte vorgenommen. Die Transformation ergab eine bessere Annäherung an eine Normalverteilung, gemessen an der Schiefe und Kurtosis (Tab. 3.1). Die so modifizierten Werte wurden als Phänotyp in der statistischen Analyse eingesetzt.

Tabelle 3.1

Verteilung der Serumkonzentrationen des *H. pylori*-reaktiven IgG vor und nach Logarithmierung.

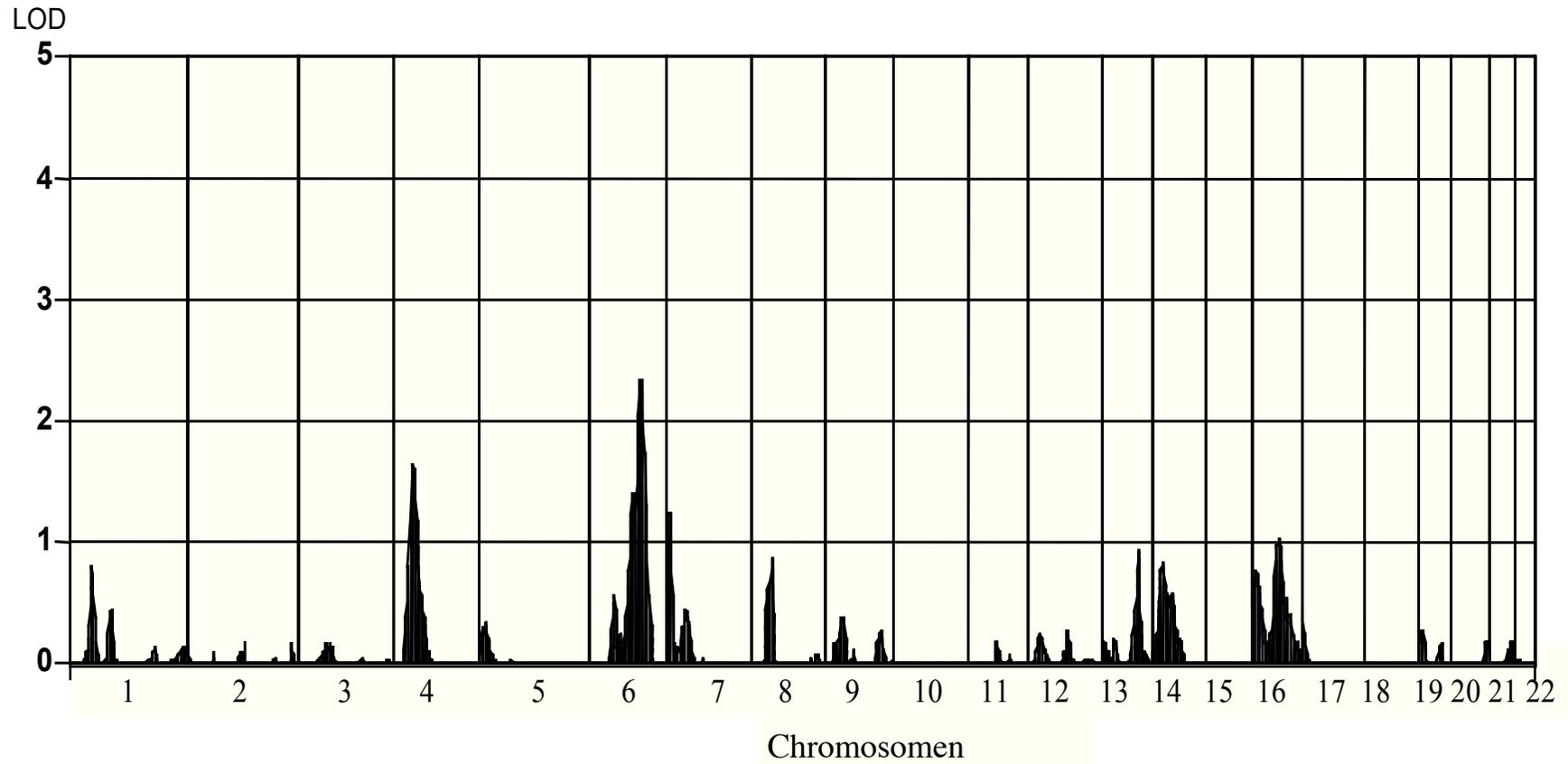


	Kurtosis	Schiefe
Rohwerte	10.935	3.032
Log-Werte	-0.431	0.647

### 3.4 Genomweite Kopplungsanalyse

In die Kopplungsanalyse wurden 111 Geschwisterpaare aus 35 Kernfamilien einbezogen, von denen phänotypische und genotypische Daten vorlagen. Die Berechnung auf Kopplung mit dem Phänotyp erfolgte mit der Haseman-Elston-Methode und dem Rangsummentest von Kruglyak und Lander. Chromosomale Bereiche, die bei der initialen Analyse mit der Haseman-Elston-Statistik einen LOD-Score von größer 2.0 erreichten und mit dem nichtparametrischen Rangsummentest an gleicher Lokalisation einen positiven Wert erzielten, wurden weiter untersucht. Die genomweite Analyse erbrachte einen einzelnen, auf dem langen Arm von Chromosom 6 lokalisierten Bereich, der die Maßgaben erfüllte (Abb. 3.2).

Abbildung 3.2



**Genomweite Kopplungsanalyse mit 136 Geschwisterpaaren für die Intensität der *H. pylori*-Infektion, definiert über die Serumkonzentration von Anti-*H. pylori*-IgG.**

### 3.5 Kopplungsanalyse für Chromosom 6q22-24

Der Haseman-Elston Test ergab in der Mehrpunktanalyse ein maximales Signal von 2.3 zwischen den Markern D6S1009 und D6S1003 an Position 150cM auf Chromosom 6q23. Der nichtparametrische Test von Kruglyak und Lander für quantitative Phänotypen zeigte an gleicher Stelle einen LOD-Score von 1.36.

Abbildung 3.3

Multipoint LOD-Score der Haseman-Elston-Statistik für Chromosom 6 mit einem maximalen Score von 2.3 zwischen den STR-Markern D6S1009 und D6S1003 an Position 150cM.

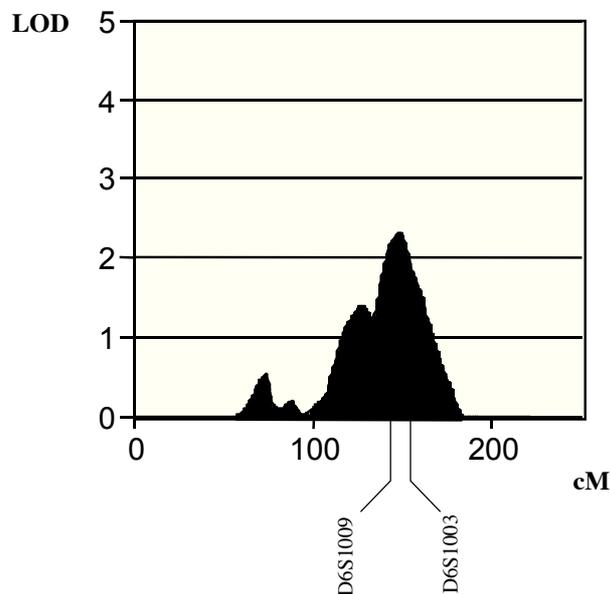


Tabelle 3.2

Maximaler LOD-Score der Haseman-Elston-Statistik und des Rangsummentests für Chromosom 6 zwischen den STR-Markern D6S1009 und D6S1003.

	Chr6q23	
	LOD-Score	p-Wert
Haseman-Elston-Statistik	2.3	0.005
Nichtparametrischer Test	1.36	0.04

Eine Sichtung der Gene im Bereich des positiven Signals der Kopplungsanalyse zwischen den Markern D6S1009 und D6S1003 ergab verschiedene immunologisch relevante Chemokine und Rezeptoren wie zum Beispiel *IL20RA*, *IL22RA2*, *IFNGR1*, *TNFAIP3* (Tab. 3.3). Ein funktioneller Zusammenhang mit der *H. pylori*-Infektion konnte für die Genprodukte oder ihren Reaktionspartner bei Interferon- $\gamma$ , mit dem Interferon-Gamma-Rezeptor-1 als Teil des Signaltransduktionsweges gefunden werden (Sawai 1999). Aus diesem Grund wurde ein zusätzlicher Marker, FA1 (Altare 1998), im sechsten Intron von *IFNGR1* typisiert.

Tabelle 3.3

Genomische Karte der Kopplungsregion von Chromosom 6q22-24, eingegrenzt auf den Bereich zwischen den Mikrosatelliten-Markern D6S1009 und D6S1003.

Startposition (bp)	Gen	Lokalisation	Bezeichnung
137282762	<b>D6S1009</b>		
137301678	<b>IL20RA</b>	6q22.33-q23.1	interleukin 20 receptor, alpha
137445527	<b>IL22RA2</b>	6q25.1	interleukin 22 receptor, alpha 2
137499192	<b>IFNGR1</b>	<b>6q23-q24</b>	<b>interferon gamma receptor 1</b>
137793906	<b>OLIG3</b>	6q23.2	oligodendrocyte transcription factor 3
138169151	<b>TNFAIP3</b>	6q23	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
138392496	<b>PERP</b>	6q24	PERP, TP53 apoptosis effector
138508801	<b>KIAA1244</b>	6q23.3	KIAA1244
138517693	<b>PBOV1</b>	6q23-q24	prostate and breast cancer overexpressed 1
138705906	<b>HEBP2</b>	6q24	heme binding protein 2
138994177	<b>LOC401275</b>	6q23.3	hypothetical gene supported by AK128874
139075227	<b>C6orf80</b>	6q23.1-q24.1	chromosome 6 open reading frame 80
139124414	<b>CCRL1P</b>	6q23.3	chemokine (C-C motif) receptor-like 1 pseudogene
139144698	<b>LOC345930</b>	6q23.3	similar to Ect2 protein
139206190	<b>REPS1</b>	6q23.1-q24.1	RALBP1 associated Eps domain containing 1
139316715	<b>C6orf115</b>	6q23.3	chromosome 6 open reading frame 115
139436819	<b>HECA</b>	6q23-q24	headcase homolog (Drosophila)
139541769	<b>C6orf198</b>	6q23.3	chromosome 6 open reading frame 198
144574867	<b>D6S1003</b>		

Nach Auswertung und erneuter Berechnung ergab sich ein LOD-Score von 3.1 mit der Haseman-Elston-Statistik und 1.83 mit dem nichtparametrischen Rangsummentest. Diese Ergebnisse erhärteten den Verdacht, dass Varianten im Gen des Interferon- $\gamma$ -Rezeptors für die beobachtete Kopplung verantwortlich waren.

Abbildung 3.4

Multipoint LOD-Score der Haseman-Elston-Statistik mit einem maximalen Score von 3.1 unter Verwendung des im 6 Intron von *IFNGR1* gelegenen STR-Markers FA1.

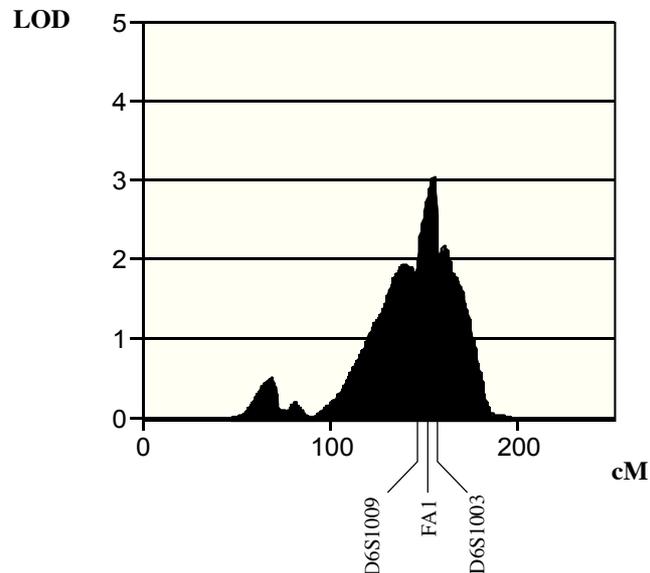


Tabelle 3.4

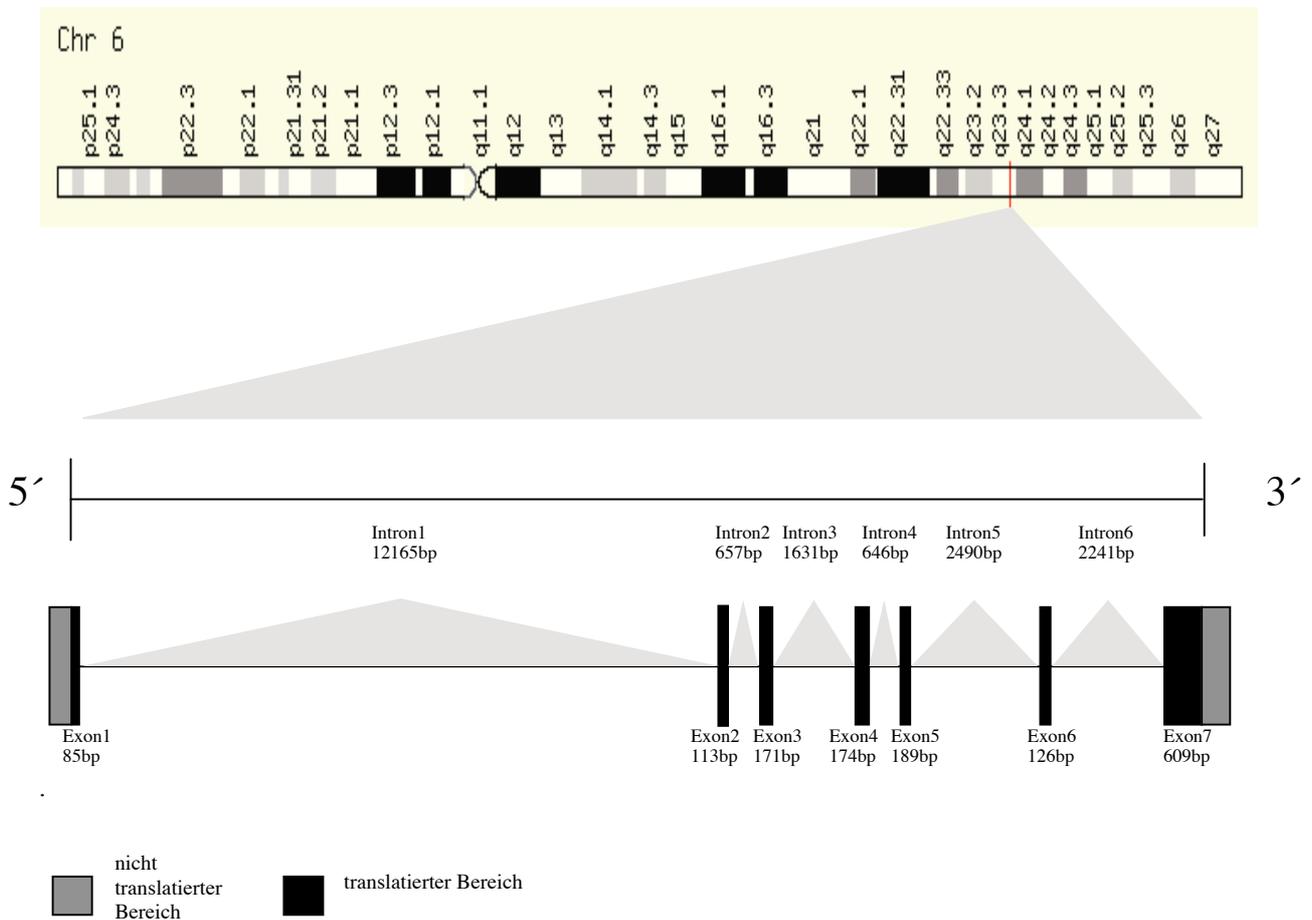
Maximaler LOD-Score der Haseman-Elston-Statistik und des Rangsummentests für Chromosom 6 mit dem Marker FA1.

	Chr6q23	
	LOD-Score	p-Wert
Haseman-Elston-Statistik	3.1	0.0008
Nichtparametrischer Test	1.83	0.015

### 3.6 Sequenzierung von *IFNGR1*

Die deutliche Signifikanzsteigerung bei der Kopplung unter Einbeziehung des im *IFNGR1* gelegenen Mikrosatellitenmarker FA1 war der Grund, nach Varianten im Gen zu suchen. Alle 7 Exons des Gens und ein 1045bp großes Fragment des Promotors wurden sequenziert. Für die Sequenzanalyse wurden solche Geschwisterpaare ausgewählt, die einen möglichst diskordanten Phänotyp besaßen und in der Kopplungsanalyse mit der Haseman-Elston-Statistik einen positiven Beitrag zum LOD-Score erbrachten.

Abbildung 3.5

Genomische Organisation von *IFNGR1*.

Sequenziert wurden zunächst Gene von 4 Geschwisterpaaren, die eine hohe phänotypische Diskordanz im Phänotyp aufwiesen und den positiven Kopplungsbefund wesentlich beeinflusst hatten. Sie stammten aus den Familien 29, 901, 2 und 1004, aufgelistet in der Reihenfolge ihres Beitrags zum Kopplungsbefund (Tab. 3.5).

Tabelle 3.5

Ausgewählte Personen für die *IFNGR1*-Sequenzierung.

Familie	Person	log Anti- <i>H. pylori</i> - Antikörperkonzentration	Beitrag der Familie zum Gesamt-LOD-Score
29	1704	0,772	1.185
	1706	2,255	
901	251	0,708	0.997
	253	2,388	
2	1538	0,945	0.823
	1541	2,071	
1004	151	2,247	0.243
	152	0,714	

Insgesamt wurden 10 Personen auf Mutationen in allen Exons und dem Promotorbereich sowie 20 Personen auf Varianten im Promotor und Exon 1, 2 und 7 untersucht. Varianten, die zu Änderungen der Aminosäurekette führten, und solche im Promotor, die regulatorische Elemente des *IFNGR1* beeinflussten, wurden in der ganzen Studiengruppe typisiert.

Tabelle 3.6

Varianten von *IFNGR1* im kodierenden Bereich und einem 1045bp umfassenden Promotorsegment bei Geschwisterpaaren mit hoher Diskordanz im Phänotyp.

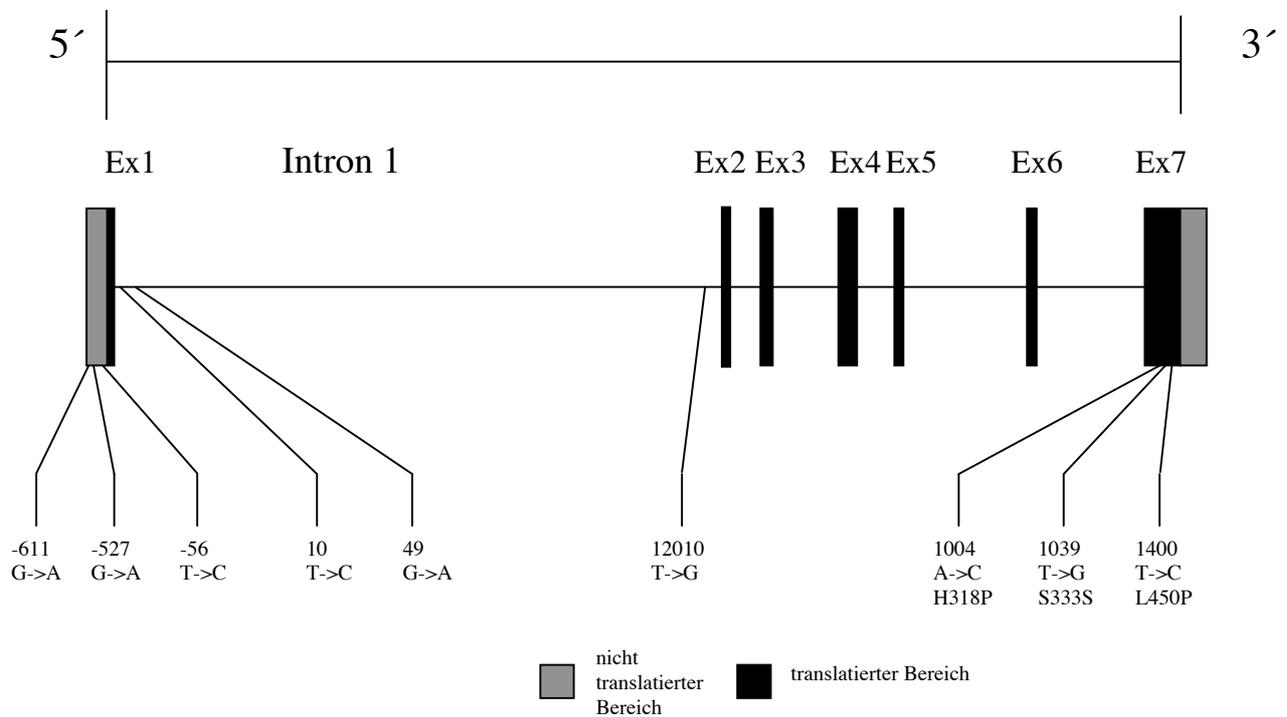
Familie	Person	log AK	Promotor		E1	Intron1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
1004	151	2,247	-611/-611	-56/-56	-	g.10+1T>C/ g.10+1T>C	-	-	-	-	-	1004/ -
	152	0,714	-611/-611	-56/ -	-	-	-	-	-	-	-	-
901	251	0,708	-611/-611	-56/ -	-	g.10+1T>C/ -	-	-	-	-	-	-
	253	2,388	-611/-611	-56/ -	-	-	-	-	-	-	-	-
2	1538	0,945	-611/-611	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1541	2,071	-611/ -	-527/ - -56/ -	-	-	-	-	-	-	-	1004/ -
29	1700	2,118	-611/-611	-56/ -	-	g.10+1T>C/ - g.45-2T->G -	-	-	-	-	-	-
	1702	1,309	-611/-611	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1704	0,772	-611/-611	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1706	2,255	-611/-611	-56/ -	-	g.10+1T>C/ - g.45-2T->G -	-	-	-	-	-	-

log AK beschreibt die logarithmierte Anti-*H. pylori*-IgG-Konzentration; E1 – E7 bezeichnen Exon 1 bis 7; ein Minuszeichen (-) zeigt die Wildtypsequenz an.

### 3.6.1 Identifikation von Mutationen in Promotor und Exons von *IFNGR1*

Die Sequenzierung des Promotors von *IFNGR1* ergab zwei bekannte Varianten an Position -611G->A und -56C->T und einen neuen Austausch an Position -527G->A (Tab. 3.7). Polymorphismen in Exons mit möglicher funktioneller Bedeutung wurden ausschließlich in Exon 7 entdeckt. Die schon bekannte Mutation 1400T->C (L450P) und eine weitere an Position 1004A->C (H318P) wurden neben einem ebenfalls schon bekannten synonymen Austausch an Position 1039T->G (S333S) gefunden. Intron-Varianten konnten nur in den Bereichen identifiziert werden, die bei der Sequenzierung der Exons einbezogen wurden. Hierbei wurden Austausche in dem, mit 12165 Basenpaaren größten Intron 1 an Position g.10+1T>C g.49+1G>A und g.45-2T->G gefunden.

Abbildung 3.6

Genomische Lokalisation der *IFNGR1*-Varianten.

Drei Varianten wurden in dem gesamten Studienkollektiv analysiert. Ein -56C->T Austausch im Promotor des *IFNGR1*-Gens, der, wie sich zeigte, in einer bekannten Transkriptionsbindungsstelle liegt. Zwei weitere Austausche 1004A->C und 1400T->C im siebten Exon, die eine Aminosäuresubstitution zur Folge hatten. Dabei ergab 1004A->C einen Wechsel von Histidin zu Prolin an Position 318 der Aminosäurekette, und 1400T->C führte zu dem Austausch von Lysin zu Prolin an Position 450 (Tab 3.8).

Tabelle 3.7

Nukleotidsequenz des 5'UTR und Exon1 von *IFNGR1* mit Positionen der Promotorvarianten und Transkriptionsfaktoren-Bindungsstellen.

Position	Sequenz <i>IFNGR1</i> Promotor + Exon 1
-615 bis -577	gcct <b>1</b> gataaactgatttgacactgaattgctgagaaggt
-576 bis -537	aatgcaaatagtttttttctccaagaacaaagtagttctt
-536 bis -498	ggtcaagcc <b>2</b> gatttgatttgggctgtgggaatctgcaca
-497 bis -458	aaccatttcactagctaagtctcaggttcctcaaatgaaa
-457 bis -418	aagcagggactggaaatggcttttgaagtctcattctctt
-417 bis -378	ctaaaaatgtcaggctccaagacaaccagggtgaagtccaa
-377 bis -338	gagttagtaaaaataaggattgtggctcggctgtggcctaa
-337 bis -298	tgcaaaacttgacaaccccaggaaaccgaaaaaaactgga
-297 bis -258	agaagaattgcagaatggggtgccaggttgaaagacctta
-257 bis -218	acctttgactcaaattcctcccacaccagaagtccagg
-217 bis -178	tcccgaccgcacgacgccgtgctcactgctgggtgctgcg
-177 bis -138	cctgagtcgcctcctgcggttcccggacttgaccccgc
-137 bis -98	ccacgccttggtcccgcctcctgccgacgccggcacagac
-97 bis -61	cccggtgacggaagtgacgtaa <b>3</b> ggccggggctgga <b>4</b> gg
-60 bis -25	gcag <b>5</b> tgctgggctgggtcccgca <b>6</b> ggcgct <b>7</b> cggggttg
-24 bis -1	gag <b>8</b> ccagcgaccgtcggttagcagcATGGCTCTCTCTTTT
<b>1 bis 15</b>	CTCCTACCCCTTGTCATGCAGGGTGTGAGCAGGGCTGAGA
<b>16 bis -55</b>	Exon1
<b>56 bis -85</b>	TGGGCACCGCGGATCTGGGGCCGTCCTCAG

**Varianten:**

- 1** = Position -611 G->A  
**2** = Position -527 G->A  
**5** = Position -56 T->C

**Transkriptionsfaktoren-Bindungsstellen:**

- 3** = Position 74-75 GG  
**4** = Position 61-62 GG  
**5** = Position 54-56 CGT  
**6** = Position 37-38 GG  
**7** = Position 30-32 GGC  
**8** = Position 20-21 CC

Tabelle 3.8

Abgeleitete Proteinsequenz von IFNGR1 mit Positionen der strukturellen Varianten H318P und L450P und der putativen Bindungsstellen der Januskinasen 1 und der STAT1-Proteine.

Position	Protein-Sequenz IFNGR1
1-44	MALLFLLPLVMQGVSR <b>A</b> EMGTADLGPSSVPTPTNVTIESYNMNP
45-88	IVYWEYQIMPQVPVFTVEVKNYGVKNSEWIDACINISHHYCNIS
89-132	DHVGDPNSLWVRVKARVGQKESAYAKSEEFVAVCRDGKIGPPKL
133-176	DIRKEEKQIMIDIFHPSVFNVDGDEQEVVDYDPEETTCYIRVYNVYV
177-220	RMNGSEIQYKILTQKEDDCDEIQQLAIPVSSLNSQYCVSAEGV
221-264	LHVWGVTTTEKSKEVCITIFNSSIKGSLWIPVVAALLLFLVLSLV
265-308	FICFYIKKINPLKEKSI <b>I</b> L <b>PKS</b> LISVVRSATLETKPESKYVSLI
309-352	TSYQPFSLKEVVCCEEPLSPATVPGM <b>H</b> ITEDNPGKVEHTEELSSI
353-396	TEVVTTEENIPDVVPGSHLTPIERESSSPLSSNQSEPGSIALNS
397-440	YHSRNCSESDHSRNGFDTDSSCLESHSSLSLSDSEFPNNKGEIKT
441-484	EGQELITVIKAPTSFG <b>YDKPH</b> VLVDL <b>L</b> VDDSGKESLIGYRPT
485-490	DSKEFS

Position 1-17 = Signalsequenz

Position 283-286 Motif **LPKS** = putative Bindungsstelle der Januskinasen 1

Position 457-461 Motif **YDKPH** = putative Bindungsstelle des Stat1-Aktivators

Position 335 **H** mit Signalpeptidsequenz = Austausch von Histidin zu Prolin

Position 467 **L** mit Signalpeptidsequenz = Austausch von Lysin zu Prolin

Die Frequenz der Mutation -56C->T im Promotor von *IFNGR1* lag in der analysierten Population bei 0.47. Fünfunddreißig Personen besaßen ausschließlich den Wildtyp, 67 waren heterozygot und 36 homozygot für die Mutation. 1004A->C trat mit einer Frequenz von 0.06 auf, und 1400T->C wurde mit einer Frequenz von 0.01. Bei 123 Personen wurde ausschließlich der Wildtyp an Position 1004 gefunden, 16 waren heterozygot für die Mutation und nur eine Person homozygot. Die Variante 1400T->C zeigte sich nur in heterozygoter Form bei 7 von 150 Personen (Tab. 3.9). Eine Person besaß die Varianten 1004A->C und 1400T->C in kombinierter Heterozygotie. Die Varianten in Exon 7 lagen mit einer geringeren Häufigkeit vor.

Tabelle 3.9

Häufigkeiten der *IFNGR1*-Varianten in der Studienpopulation

Polymorphismus	wt/wt	wt/var	var/var
Promotor -56C->T	35	67	36
Exon7 L318P	123	16	1
Exon7 H450P	143	7	0

Die identifizierten Varianten wurden als zusätzliche genetische Marker in die Kopplungsanalyse einbezogen. Dadurch stieg der LOD-Score auf 4.2 mit der Haseman-Elston-Methode und auf 2.6 mit dem Rangsummentest( Abb. 3.7).

Abbildung 3.7

Multipoint LOD-Score für Chromosom 6 mit den *IFNGR1* Varianten -56C->T, 1004A->C und 1400T->C als ergänzende genetische Marker.

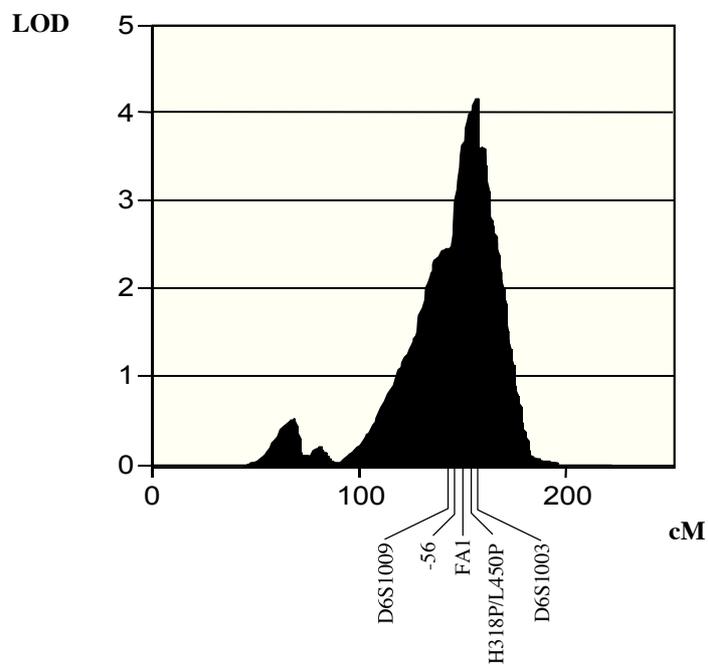


Tabelle 3.10

Maximaler LOD-Score der Haseman-Elston-Statistik und des Rangsummentests mit den zusätzlichen Markern FA1, -56 und H318P/L450P.

	Chr6p23	
	LOD-Score	p-Wert
Haseman-Elston-Statistik	4.2	0.00006
Nichtparametrischer Test	2.66	0.002

### 3.7 Analyse der IFNGR1-Varianten

Die Analyse der Varianten in den 111 Geschwistern ergab für den Wildtyp des -56C->T Austausches einen logarithmierten (log) Mittelwert der Anti-*H. pylori*-Antikörperkonzentration von  $1,07 \pm 0,41$  log U/ml. Die heterozygoten und homozygoten Träger der Promotervariante besaßen mittlere Antikörperspiegel von  $1,33 \pm 0,49$  log U/ml bzw  $1,33 \pm 0,44$  log U/ml. Die Antikörperkonzentration des Wildtyps der H335P Variante lag bei  $1,23 \pm 0,46$  log U/ml, die der heterozygoten Träger bei  $1,52 \pm 0,52$  log U/ml. Die L450P Variante in Exon 7 ergab für den Wildtyp einen Antikörperspiegel von  $1,26 \pm 0,46$  log U/ml gegenüber einer Antikörperkonzentration von  $1,51 \pm 0,90$  log U/ml bei den heterozygoten Trägern (Tab. 3.11).

Tabelle 3.11

Mittelwerte der logarithmierten Anti-*H. pylori*-Antikörperkonzentration bezogen auf die Genotypen der untersuchten Varianten –56T->C, H318P und L450P.

	–56T->C			H318P			L450P		
	log AT U/ml	SA	n	log AT U/ml	SA	n	log AT U/ml	SA	n
<b>wt/wt</b>	<b>1.07</b>	0.41	127	<b>1.23</b>	0.46	106	<b>1.26</b>	0.46	109
<b>wt/var</b>	<b>1.33</b>	0.49	55	<b>1.52</b>	0.52	14	<b>1.51</b>	0.90	3
<b>var/var</b>	<b>1.33</b>	0.44	29	<b>1.38</b>		1			

Auflistung der Mittelwerte und Standardabweichung (SA) der logarithmierten Antikörperkonzentration (log AT) gegen *H. pylori* bezogen auf die Genotypen (wt = Wildtyp; var = Variante) der Varianten –56T->C, H318P und L450P.

### 3.7.1 Quantitativer Transmissions-Disequilibrium-Test

Eine familienbasierte Analyse der Assoziation der einzelnen Austausche wurde mit 111 Eltern-Kinder-Trios durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm QTDT, welches die Berechnung eines quantitativen Transmissions-Disequilibrium-Tests ermöglicht. Auf Assoziation mit dem Phänotyp wurde mit den Statistiken von Allison und Rabinowitz getestet. Lediglich die –56C->T Promotorvariante lag in ausreichender Anzahl für eine Analyse vor. Es ergab sich eine positive Assoziation mit hohen Anti-*H. pylori*-IgG-Konzentrationen (Teststatistik von Rabinowitz  $p = 0,04$  und Allison  $p = 0,05$ ).

### 3.8 Frequenzen der Polymorphismen in unabhängigen Gruppen

Die Frequenzen der -56C->T, H318P und L450P Varianten wurden in 100 Chromosomen von 50 unabhängigen Individuen der senegalesischen Studienpopulation sowie bei einer Gruppe von 50 unabhängigen deutschen Personen bestimmt. H318P und L450P wurden dabei ausschließlich in der afrikanischen Gruppe gefunden. -56C->T kam mit einer Frequenz von 0.36 in der deutschen Gruppe gegenüber einer Frequenz von 0.46 in der afrikanischen Studienpopulation vor.

Tabelle 3.12

Frequenzen der *IFNGR1*-Varianten bei unabhängigen Personen.

Varianten	Afrikanische Gruppe	Kaukasische Gruppe
-56C->T	0.47	0.36
1004A->C (H318P)	0.06	0
1400T->C (L450P)	0.01	0

## 4 Diskussion

Bei einer Vielzahl von Infektionserkrankungen konnten genetische Varianten im humanem Genom identifiziert werden, die die Manifestation der Erkrankung wesentlich beeinflussen. So bietet ein Austausch in dem Gen für die Betakette von Hämoglobin einen relativen Schutz vor dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* (Friedman 1981). Deletionen in *CCR5* verhindern eine Infektion mit dem HI-Virus Typ II (Samson 1996). Hingegen führen Mutationen mit Verlust der Wirkung von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) zu fulminanten Verläufen bei atypischen Mykobakterien-Infektionen (Jouanguy 1996).

Für *H. pylori* gibt es Hinweise aus verschiedenen Studien, die den Einfluss hereditärer Faktoren bei der Akquisition des Erregers und bei der Ausprägung des Schweregrads klinischer Verläufe vermuten lassen.

Verschiedene Allele der für die Immunreaktion wichtigen HLA-Gene konnten mit Manifestationen der *H. pylori*-Infektion assoziiert werden. So lag die Frequenz des HLA-Allels DQA1\*0301 bei *H. pylori*-negativen Personen (21,4%) signifikant niedriger, als bei *H. pylori*-positiven Personen mit Duodenalulzera (41,8%) (Wee 1992; Chiba 1995; Azuma 1993). Das HLA-DQA1\*0102-Allel wurde häufiger bei *H. pylori*-negativen Patienten als bei solchen mit Duodenalulzera gefunden (Azuma 1994). HLA-DQA1\*0301 war im Gegensatz dazu bei der gesunden Kontrollgruppe erniedrigt. Beales et al. fanden eine erhöhte Frequenz von HLA-DQ5 in Patienten mit Schleimhautatrophie des Magens oder mit intestinalen Metaplasien (Beales 1995). Daneben wurde bei Mutationen im Gen des proinflammatorischen Mediators Interleukin-1 $\beta$ , die die Immunantwort auf *H. pylori* verstärken, ein höheres Risiko für Magenatrophie, Hypochlorhydrie oder der Entstehung von Adenokarzinomen beobachtet (Machado 2003; El-Omar 2000).

In der vorliegenden Studie wurde durch eine genomweite Kopplungsanalyse mit *H. pylori*-reaktivem IgG als Phänotyp Varianten des *IFNGR1* identifiziert, die assoziiert sind mit hohen Anti-*H. pylori*-Antikörperkonzentrationen. IFN- $\gamma$  und sein Rezeptor sind als wichtiges Signalsystem in der Immunantwort gegenüber Krankheitserregern eines der wesentlichen Elemente der T-Zell bedingten Immunantwort, (Shtrichman 2001). Zusammen mit Interleukin-2 lenkt IFN- $\gamma$  naive T-Zellen bei ihrer Differenzierung in Richtung auf Th1-Helferzellen, die zelluläre Effektoren induzieren. Der Rezeptor besteht aus den beiden Ketten IFNGR1 und IFNGR2. Man geht davon aus, dass IFNGR2 bei Bedarf hochreguliert wird, wohingegen IFNGR1 konstitutiv

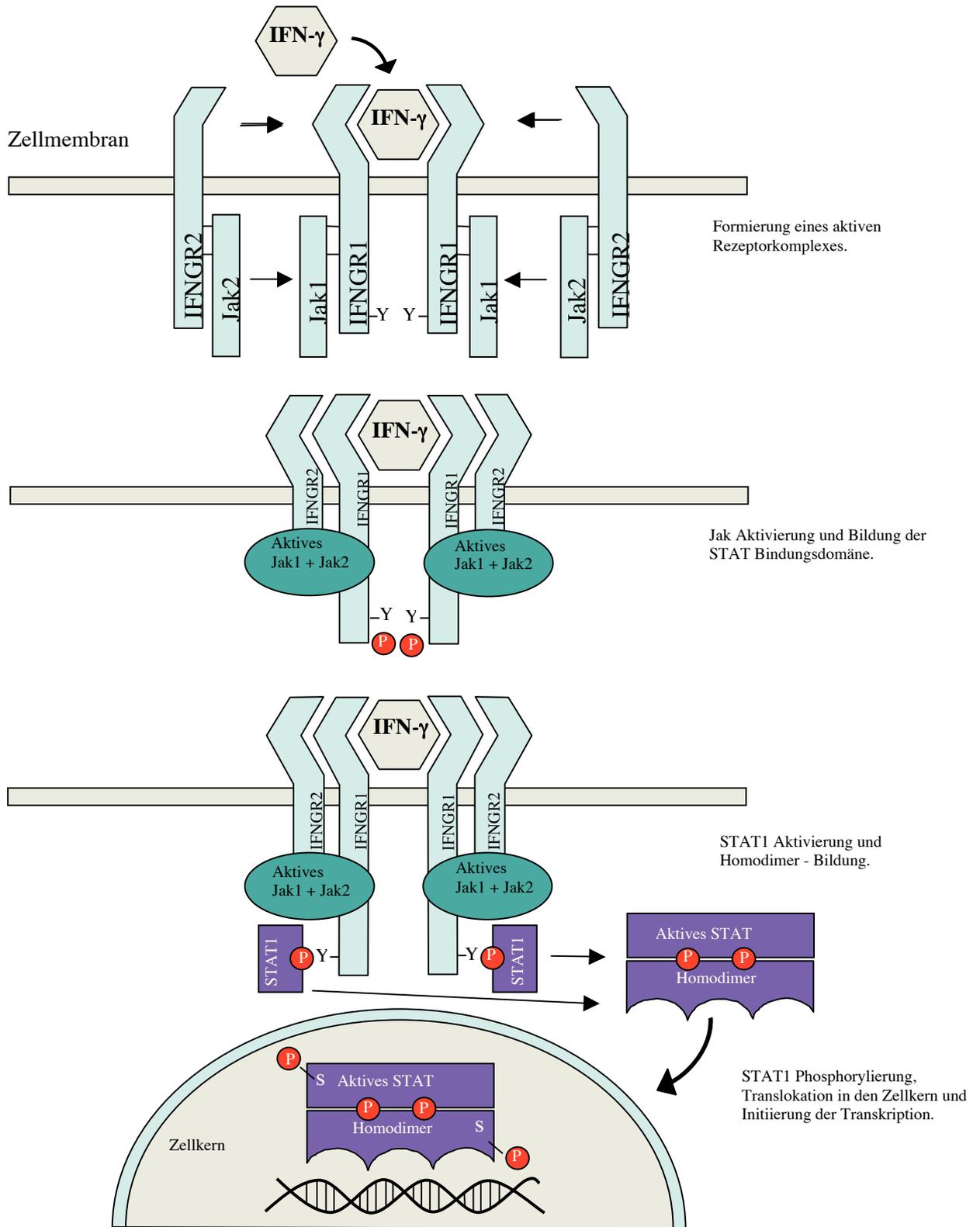
exprimiert und in Vakuolen gesammelt wird. Zusammen mit IFN- $\gamma$  bilden beide Ketten einen Komplex, der zunächst zur Aktivierung der mit den IFNGR-Ketten assoziierten Januskinasen 1 und 2 (JAK1; JAK2) führt. Diese bewirken über die Phosphorylierung eines Tyrosinrestes Y<sub>440</sub> der IFNGR1-Kette die Ausbildung einer Bindungsdomäne für STAT1-Proteine. Bei Bindung der STAT1-Proteine kommt es zur Phosphorylierung von STAT1 an Position Y<sub>701</sub> durch die Januskinasen. Die so aktivierten STAT-Proteine bilden nach Dissoziation von der Bindungsstelle Dimere. Über Verlagerung in den Zellkern kommt es zur Bindung der Proteindimere an GAS-Elemente (IFN- $\gamma$  activation sites) in Promotoren von Genen die durch IFN- $\gamma$  reguliert werden. In Kombination mit dem Kernfaktor NF $\kappa$ B bewirkt die Bindung des STAT1-Homodimers eine verstärkte Transkription von IRF1 (Interferon Regulatorfaktor 1). IRF1 ist seinerseits ein Transkriptionsfaktor der zur Expression einer Vielzahl von Genen führt, die verschiedene Aufgaben bei der Antigenpräsentation (LMP / TAP), bei der Abwehr viraler Erreger (PKR / ADAR), bei der Apoptose (FAS / PKR), bei der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (gp91<sup>phox</sup>) und Stickstoffmonoxid (iNOS) erfüllen (Strobl 2001; Wong 1997, Patterson 2004; Takizawa 1996; Xu 1998; MacMicking 1997; Cassatella 1990).

Bezüglich *H. pylori* haben klinische Studien gezeigt, dass die Immunreaktion in der Mukosa des Magens durch IFN- $\gamma$  produzierende Th1-Zellen dominiert wird (D'Elisio 1997). Studien mit *Helicobacter felis* im Mausmodell ergaben, dass IFN- $\gamma$  zudem einen Einfluss auf die Pathogenese und die Immunprotektion der Infektion hat (Sawai et al. 1999; Kamradt et al. 2000).

Hier wird gezeigt, dass hohe Konzentrationen von zirkulierenden Anti-*H. pylori*-IgG gekoppelt und assoziiert sind mit Promotor- und strukturellen Polymorphismen von *IFNGR1*. Anti-*H. pylori*-IgG ist ein verlässlicher Indikator einer *H. pylori*-Infektion (Evans 1989; Marchildon 1999). Um auszuschließen, dass die gemessenen Antikörperkonzentrationen gegen *H. pylori* nicht die Fähigkeit des Immunsystems widerspiegelt, generell IgG-Antikörper zu bilden, wie sie bei Veränderungen des IFN- $\gamma$  Signalweges zu erwarten wäre, wurde mit einem Antikörper gegen Phosphorylcholin, welcher durch dentale Bakterien induziert, ubiquitär bei fast allen Menschen auftritt, verglichen. Es konnte keine Korrelation zwischen der Höhe der IgG-Konzentration gegenüber *H. pylori* und Phosphorylcholin gefunden werden. Dies ist als Hinweis darauf zu werten, dass nicht die Antikörperproduktion an sich, sondern der Infektionsverlauf durch die *IFNGR1*-Mutationen beeinflusst wurde.

Abbildung 4.1

Interferon- $\gamma$  Signaltransduktionsweg



IFN- $\gamma$  = Interferon Gamma; IFNGR1/2 = Interferon Gamma Rezeptor1/2; Jak1/2 = Januskinase1/2; STAT = Signalvermittler und Aktivatoren der Transkription (Signal transducers and activators of transcription). Modifiziert nach Schreiber et al. 1998.

H318P ist im zytoplasmatischen Teil von IFNGR1 lokalisiert, zwischen der Bindungsstelle von JAK1 an Aminosäureposition 266-269 und einem Tyrosinrest an Position 440, welcher während der Signaltransduktion bei Verbindung von JAK1 und JAK2 phosphoryliert wird (Bach 1997). L450P liegt in unmittelbarer Nähe zu der Phosphorylierungsstelle. Bei beiden Varianten wurde Prolin in die Aminosäurekette eingebaut, welches möglicherweise strukturelle Veränderungen über einen Wechsel der Ausrichtung des Polypeptidgerüsts zur Folge hat. Unklar ist, ob die Varianten im zytoplasmatischen Teil von IFNGR1 zu einer Beeinflussung der Signaltransduktion führen. Die Zugänglichkeit zu Y<sub>440</sub> für die Phosphorylierung über die Januskinasen 1 und 2 könnte sich so ändern, und die IFNGR1-vermittelte Signaltransduktion könnte beeinflusst werden.

Studien weisen eher auf eine Verminderung der Funktion hin. Klinische und epidemiologische Untersuchungen beim Menschen und experimentelle Studien bei Mäusen zeigen, dass Serumantikörper ein Indikator für Infektion sind, nicht aber für Schutz vor der Infektion (Blanchard 1999). Ferner belegen Studien im Mausmodell, dass IFN- $\gamma$  für Schutz vor einer Infektion und Elimination der Erreger verantwortlich ist (Sawai et al. 1999; Kamradt et al. 2000).

Funktionelle Studien von Rosenzweig et al. haben gezeigt, dass -56C->T eine Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren von *IFNGR1* verändert und so zu einer verminderten Transkription des Gens führt (Rosenzweig 2004). Demzufolge, und weil -56C->T mit hohen Anti-*H. pylori*-Antikörperspiegeln assoziiert ist, kann vermutet werden, dass die Variante mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber *H. pylori* einhergeht.

Die geringere Frequenz der *IFNGR1*-Varianten bei der kaukasischen Kontrollgruppe könnte die Beobachtung erklären, dass in einigen afrikanischen Ländern trotz der hohen Prävalenz von *H. pylori* das Auftreten von Magenkarzinomen bemerkenswert gering ist (Holcombe 1992; Mitchell 2002). Diese Beobachtungen wurden von Studien im Mausmodell gestützt, bei denen eine durch *H. pylori* induzierte Th1-Antwort mit konsekutiver Gastritis durch eine Helminthen Koinfektion abgeschwächt wurde (Fox 2000). Diese Resultate wurden dahingehend interpretiert, dass die Pathologie verursacht durch *H. pylori* über eine zusätzlich auftretende Helmintheninfektion und die daraus resultierende Th2-Antwort abgeschwächt wird. In Einklang mit den experimentellen Ergebnissen, dass IFN- $\gamma$  Einfluss auf Pathologie und Besiedlungsdichte bei einer *H. pylori*-Infektion hat (Sawai 1999; Kamradt 2000),

geben die Daten der *IFNGR1*-Varianten Hinweise darauf, dass die Austauschpartner ebenfalls in der Lage sein können, die pathologischen Befunde in Mägen seropositiver Individuen in der afrikanischen Bevölkerung abzuschwächen. Studien zur Genetik von Infektionskrankheiten haben den IFN $\gamma$  Signaltransduktionsweg als wesentlichen Bestandteil der Immunabwehr speziell gegen Mykobakterien aufgedeckt (Dupuis 2000). Schwere und atypische mykobakterielle Erkrankungen in der Kindheit wurden in Assoziation mit seltenen Mutationen des *IFNGR1* und anderen Komponenten des zugehörigen Signaltransduktionsweges gefunden, die zu einem kompletten Verlust der Funktion führen.

-56C->T ist eine häufig vorkommende Variante und verursacht vermutlich eine mildere Form des Funktionsverlustes von *IFNGR1*. Solche Polymorphismen sind postuliert worden, Einfluss auf klassische mykobakterielle Erkrankungen zu haben, die wie *H. pylori* hunderte Millionen Menschen weltweit betreffen (Dupuis 2000).

- Abecasis GR, Cardon LR, Cookson WO., A general test of association for quantitative traits in nuclear families. *Am J Hum Genet.* 2000 Jan;66(1):279-92.
- Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B, Guild BC, deJonge BL, Carmel G, Tummino PJ, Caruso A, Uria-Nickelsen M, Mills DM, Ives C, Gibson R, Merberg D, Mills SD, Jiang Q, Taylor DE, Vovis GF, Trust TJ., Genomic-sequence comparison of two un isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* 1999 Jan 14;397(6715):176-80.
- Altare F, Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Fondaneche MC, Fizame C, Ribierre F, Merlin G, Dembic Z, Schreiber R, Lisowska-Groszpiere B, Fischer A, Seboun E, Casanova JL., A causative relationship between mutant IFN $\gamma$ R1 alleles and impaired cellular response to IFN $\gamma$  in a compound heterozygous child. *Am J Hum Genet.* 1998;62:723-726.
- Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S., Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science.* 2003 May 30;300(5624):1430-4.
- Aras RA, Fischer W, Perez-Perez GI, Crosatti M, Ando T, Haas R, Blaser MJ., Plasticity of repetitive DNA sequences within a bacterial (Type IV) secretion system component. *J Exp Med.* 2003 Nov 3;198(9):1349-60. Epub 2003 Oct 27.
- Asahi M, Tanaka Y, Izumi T, Ito Y, Naiki H, Kersulyte D, Tsujikawa K, Saito M, Sada K, Yanagi S, Fujikawa A, Noda M, Itokawa Y., *Helicobacter pylori* CagA containing ITAM-like sequences localized to lipid rafts negatively regulates VacA-induced signaling in vivo. *Helicobacter.* 2003 Feb;8(1):1-14.
- Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL., Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem.* 1995 Jul 28;270(30):17771-7.
- Atherton JC, Peek RM Jr, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ., Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 1997 Jan;112(1):92-9.
- Austin JW, Doig P, Stewart M, Trust TJ., Structural comparison of urease and a GroEL analog from *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 1992 Nov;174(22):7470-3.
- Azuma T, Konishi J, Tanaka Y, Hirai M, Ito S, Kato T, Kohli Y., Contribution of HLA-DQA gene to host's response against *Helicobacter pylori*. *Lancet.* 1994 Feb 26;343(8896):542-3.
- Backhed F, Rokbi B, Torstensson E, Zhao Y, Nilsson C, Seguin D, Normark S, Buchan AM, Richter-Dahlfors A., Gastric mucosal recognition of *Helicobacter pylori* is independent of Toll-like receptor4. *J Infect Dis.* 2003 Mar 1;187(5):829-36.

- Bach EA, Aguet M & Schreiber RD., The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:563-591.
- Bamford KB, Fan X, Crowe SE, Leary JF, Gourley WK, Luthra GK, Brooks EG, Graham DY, Reyes VE, Ernst PB., Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology.* 1998 Mar;114(3):482-92.
- Banatvala N, Mayo K, Megraud F, Jennings R, Deeks JJ, Feldman RA., The cohort effect and *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis.* 1993 Jul;168(1):219-21.
- Bayerdorffer E, Neubauer A, Rudolph B, Thiede C, Lehn N, Eidt S, Stolte M. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. *Lancet.* 1995 Jun 24;345(8965):1591-4.
- Beales IL, Davey NJ, Pusey CD, Lechler RI, Calam J., Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. *Lancet.* 1995 Aug 5;346(8971):381-2.
- Beji A, Megraud F, Vincent P, Gavini F, Iazard D, Leclerc H., GC content of DNA of *Campylobacter pylori* and other species belonging to the genus *Campylobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 1988 Sep-Oct;139(5):527-34.
- Berkowicz J, Lee A., Person-to-person transmission of *Campylobacter pylori*. *Lancet.* 1987 Sep 19;2(8560):680-1.
- Blanchard TG, Nedrud JG, Reardon ES, Czinn SJ., Qualitative and quantitative analysis of the local and systemic antibody response in mice and humans with *Helicobacter* immunity and infection. *J Infect Dis.* 1999;179:725-728.
- Blaser MJ., *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *Br Med J.* 1998;316:1507-1510.
- Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S., Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science.* 1993 Dec 17;262(5141):1892-5.
- Bukanov NO, Berg DE., Ordered cosmid library and high-resolution physical-genetic map of *Helicobacter pylori* strain NCTC11638. *Mol Microbiol.* 1994 Feb;11(3):509-23.
- Cassatella, M. A., Bazzoni, F., Flynn, R. M., Dusi, S., Trinchieri, G., Rossi, F. (1990) Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. *J. Biol. Chem.* 265, 20241–20246.
- Chiba M, Ishii N, Ishioka T, Murata M, Masamune O, Sugiyama T, Yachi A., Topographic study of *Helicobacter pylori* and HLA-DR antigen expression on gastric epithelium. *J Gastroenterol.* 1995 Apr;30(2):149-55

- Cohen H, Rose S, Lewin DN, Retama B, Naritoku W, Johnson C, Bautista L, Crowe H, Pronovost A. Accuracy of four commercially available serologic tests, including two office-based tests and a commercially available <sup>13</sup>C urea breath test, for diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 1999 Mar;4(1):49-53.
- Cover TL, Blaser MJ., Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*. 1992 May 25;267(15):10570-5.
- Cover TL, Krishna US, Israel DA, Peek RM Jr., Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res*. 2003 Mar 1;63(5):951-7.
- Laine L, Chun D, Stein C, El-Beblawi I, Sharma V, Chandrasoma P. The influence of size or number of biopsies on rapid urease test results: a prospective evaluation. *Gastrointest Endosc*. 1996 Jan;43(1):49-53.
- Lin SK, Lambert JR, Schembri M, Nicholson L, Finlay M, Wong C, Coulepis A. A comparison of diagnostic tests to determine *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol*. 1992 Mar-Apr;7(2):203-9.
- D'Elios MM, Manghetti M, De Carli M, Costa F, Baldari CT, Burrioni D, Telford JL, Romagnani S, Del Prete G., T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J Immunol*. 1997;158:962-967.
- Desai M, Linton D, Owen RJ, Stanley J., Molecular typing of *Helicobacter pylori* isolates from asymptomatic, ulcer and gastritis patients by urease gene polymorphism. *Epidemiol Infect*. 1994 Feb;112(1):151-60.
- Dubovsky J, Sheffield VC, Duyk GM, Weber JL., Sets of short tandem repeat polymorphism for efficient linkage screening of the human genome. *Hum Mol Genet*. 1995; 4:449452
- Dupuis S, Doffinger R, Picard C, Fieschi C, Altare F, Jouanguy E, Abel L, Casanova JL., Human interferon-gamma-mediated immunity is a genetically controlled continuous trait that determines the outcome of mycobacterial invasion. *Immunol Rev*. 2000;178:129-137.
- Dwyer B, Kaldor J, Tee W, Marakowski E, Raios K. , Antibody response to *Campylobacter pylori* in diverse ethnic groups. *Scand J Infect Dis*. 1988;20(3):349-50.
- El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS., Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*. 2000 Mar 23;404(6776):398-402.

- Evans DJ Jr, Evans DG, Graham DY & Klein PD., A sensitive and specific serologic test for detection of *Campylobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 1989;96:1004-1008.
- Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, Capelinha AF, Quint W, Caldas C, van Doorn LJ, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M., *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Nov 20;94(22):1680-7.
- Forbes KJ, Fang Z, Pennington TH., Allelic variation in the *Helicobacter pylori* flagellin genes *flaA* and *flaB*: its consequences for strain typing schemes and population structure. *Epidemiol Infect*. 1995 Apr;114(2):257-66.
- Fox JG, Beck P, Dangler CA, Whary MT, Wang TC, Shi HN, Nagler-Anderson C., Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces *helicobacter*-induced gastric atrophy. *Nat Med*. 2000 May;6(5):536-42.
- Foxall PA, Hu LT, Mobley HL., Use of polymerase chain reaction-amplified *Helicobacter pylori* urease structural genes for differentiation of isolates. *J Clin Microbiol*. 1992 Mar;30(3):739-41.
- Friedman, M. J.; Trager, W., The biochemistry of resistance to malaria. *Sci. Am*. 244(3): 154-164, 1981.
- Garner JA, Cover TL., Analysis of genetic diversity in cytotoxin-producing and non-cytotoxin-producing *Helicobacter pylori* strains. *J Infect Dis*. 1995 Jul;172(1):290-3.
- Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R., *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*. 2003 Aug 22;301(5636):1099-102.
- Geis G, Suerbaum S, Forsthoff B, Leying H, Opferkuch W. , Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*. 1993 May;38(5):371-7.
- Gewirtz AT, Yu Y, Krishna US, Israel DA, Lyons SL, Peek RM Jr., *Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *J Infect Dis*. 2004 May 15;189(10):1914-20.
- Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zahringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, Philpott DJ., Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*. 2003 Jun 6;300(5625):1584-7.
- Goodman KJ, Correa P., The transmission of *Helicobacter pylori*. A critical review of the evidence. *Int J Epidemiol*. 1995 Oct;24(5):875-87.

- Goodwin CS, McCulloch RK, Armstrong JA, Wee SH., Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J Med Microbiol.* 1985 Apr;19(2):257-67.
- Graham DY, Malaty HM, Evans DG, Evans DJ Jr, Klein PD, Adam E., Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterology.* 1991 Jun;100(6):1495-501.
- Graham DY, Adam E, Reddy GT, Agarwal JP, Agarwal R, Evans DJ Jr, Malaty HM, Evans DG., Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India. Comparison of developing and developed countries. *Dig Dis Sci.* 1991 Aug;36(8):1084-8.
- Haseman JK, Elston RC. The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. *Behav Genet.* 1972 Mar;2(1):3-19.
- Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, Hatakeyama M., SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science.* 2002 Jan 25;295(5555):683-6.
- Herbrink P, van Doorn LJ. Serological methods for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and monitoring of eradication therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000 Mar;19(3):164-73.
- Holcombe C., *Helicobacter pylori*: the African enigma. *Gut.* 1992;33:429-431.
- Hopkins RJ, Russell RG, O'Donnoghue JM, Wasserman SS, Lefkowitz A, Morris JG Jr., Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Seventh-Day Adventists and other groups in Maryland. Lack of association with diet. *Arch Intern Med.* 1990 Nov;150(11):2347-8.
- Ihan A, Krizman I, Ferlan-Marolt V, Tepez B, Gubina M., HLA-DR expression on CD8 lymphocytes from gastric mucosa in urease-positive and urease-negative gastritis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1995 Feb;10(3-4):295-9
- Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L, Boren T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science.* 1998 Jan 16;279(5349):373-7.
- Jouanguy, E.; Altare, F.; Lamhamedi, S.; Revy, P.; Emile, J.-F.; Newport, M.; Levin, M.; Blanche, S.; Seboun, E.; Fischer, A.; Casanova, J.-L. :Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. *New Eng. J. Med.* 335: 1956-1961, 1996.
- Iwamoto H, Czajkowsky DM, Cover TL, Szabo G, Shao Z., VacA from *Helicobacter pylori*: a hexameric chloride channel. *FEBS Lett.* 1999 Apr 30;450(1-2):101-4.

- Kamradt AE, Greiner M, Ghiara P & Kaufmann SH., *Helicobacter pylori* infection in wild-type and cytokine-deficient C57BL/6 and BALB/c mouse mutants. *Microbes Infect.* 2000;2:593-597.
- Kidd M, Louw JA, Marks IN., *Helicobacter pylori* in Africa: observations on an 'enigma within an enigma'. *J Gastroenterol Hepatol.* 1999 Sep;14(9):851-8.
- Kidd M, Lastovica AJ, Atherton JC, Louw JA., Heterogeneity in the *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genes: association with gastroduodenal disease in South Africa? *Gut.* 1999 Oct;45(4):499-502.
- Kleanthous H, Clayton CL, Tabaqchali S., Characterization of a plasmid from *Helicobacter pylori* encoding a replication protein common to plasmids in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 1991 Oct;5(10):2377-89.
- Koletzko S, Haisch M, Seeboth I, Braden B, Hengels K, Koletzko B, Hering P. Isotope-selective non-dispersive infrared spectrometry for detection of *Helicobacter pylori* infection with <sup>13</sup>C-urea breath test. *Lancet.* 1995 Apr 15;345(8955):961-2.
- Krieg AM., CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:709-60.
- Kruglyak L & Lander ES., Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. *Am J Hum Genet.* 1995;57:439-454.
- Kuck D, Kolmerer B, Iking-Konert C, Krammer PH, Stremmel W, Rudi J., Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immun.* 2001 Aug;69(8):5080-7.
- Langenberg W, Rauws EA, Oudbier JH, Tytgat GN., Patient-to-patient transmission of *Campylobacter pylori* infection by fiberoptic gastroduodenoscopy and biopsy. *J Infect Dis.* 1990 Mar;161(3):507-11.
- Lingwood CA, Law H, Pellizzari A, Sherman P, Drumm B., Gastric glycerolipid as a receptor for *Campylobacter pylori*. *Lancet.* 1989 Jul 29;2(8657):238-41.
- Letley DP, Rhead JL, Twells RJ, Dove B, Atherton JC., Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.* 2003 Jul 18;278(29):26734-41.
- Ljungh A, Wadstrom T., Interactions of bacterial adhesins with the extracellular matrix. *Adv Exp Med Biol.* 1996;408:129-40.
- Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S, Castro Alves C, Campos ML, Van Doorn LJ, Caldas C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M., A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology.* 2003 Aug;125(2):364-71.

- MacMicking, J., Xie, Q. W., Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323–350.
- Maeda S, Akanuma M, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Yoshida H, Shiratori Y, Omata M., Distinct mechanism of *Helicobacter pylori*-mediated NF-kappa B activation between gastric cancer cells and monocytic cells. *J Biol Chem.* 2001 Nov 30;276(48):44856-64.
- Malaty HM, Engstrand L, Pedersen NL, Graham DY., *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins. *Ann Intern Med.* 1994 Jun 15;120(12):982-6.
- Marchildon P, Balaban DH, Sue M, Charles C, Doobay R, Passaretti N, Peacock J, Marshall BJ, Peura DA., Usefulness of serological IgG antibody determinations for confirming eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:2105-2108.
- Marshall BJ, Warren JR., Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 1984 Jun 16;1(8390):1311-5.
- Mbengue M, Diouf ML, Dangou JM, Ka MM, Ba-Seck A, Ndiaye MF, Moreira-Diop T, Ndiaye PD, Bao O., [Frequency of *Helicobacter pylori* infection in symptomatic patients in Senegal] *Med Trop (Mars).* 1997;57(3):256-8.
- McClain MS, Cao P, Iwamoto H, Vinion-Dubiel AD, Szabo G, Shao Z, Cover TL., A 12-amino-acid segment, present in type s2 but not type s1 *Helicobacter pylori* VacA proteins, abolishes cytotoxin activity and alters membrane channel formation. *J Bacteriol.* 2001 Nov;183(22):6499-508.
- Megraud F, Brassens-Rabbe MP, Denis F, Belbouri A, Hoa DQ., Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J Clin Microbiol.* 1989 Aug;27(8):1870-3.
- Megraud F, Lamouliatte H. Review article: the treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003 Jun 1;17(11):1333-43.
- Merlin G, van der Leede BJ, McKune K, Knezevic N, Bannwarth W, Romquin N, Viegas-Pequignot E, Kiefer H, Aguet M, Dembic Z., The gene for the ligand binding chain of the human interferon gamma receptor. *Immunogenetics.* 1997;45:413-421.
- Miehlke S, Kirsch C, Agha-Amiri K, Gunther T, Lehn N, Malferttheiner P, Stolte M, Ehninger G, Bayerdorffer E., The *Helicobacter pylori* vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int J Cancer.* 2000 Aug 1;87(3):322-7.
- Mitchell HM, Ally R, Wadee A, Wiseman M, Segal I., Major differences in the IgG subclass response to *Helicobacter pylori* in the first and third worlds. *Scand J Gastroenterol.* 2002;37:517-522.

- Mimuro H, Suzuki T, Tanaka J, Asahi M, Haas R, Sasakawa C., Grb2 is a key mediator of helicobacter pylori CagA protein activities. *Mol Cell*. 2002 Oct;10(4):745-55.
- Mobley, H.L.T. Helicobacter pylori urease. 2001 In M. Achtman and S. Suerbaum (ed.), *Helicobacter pylori: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Press, United Kingdom. Pp. 155-170.
- Mohammadi M, Nedrud J, Redline R, Lycke N, Czinn SJ., CD4 T-cell response to Helicobacter infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load. *Gastroenterology*. 1997 Dec;113(6):1848-57.
- Molinari M, Salio M, Galli C, Norais N, Rappuoli R, Lanzavecchia A, Montecucco C., Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by Helicobacter pylori toxin VacA. *J Exp Med*. 1998 Jan 5;187(1):135-40.
- Morris A, Nicholson G, Lloyd G, Haines D, Rogers A, Taylor D., Seroepidemiology of Campylobacter pyloridis. *N Z Med J*. 1986 Sep 10;99(809):657-9.
- Muller-Myhsok B, Stelma FF, Guisse-Sow F, Muntau B, Thye T, Burchard GD, Gryseels B, Horstmann RD., Further evidence suggesting the presence of a locus, on human chromosome 5q31-q33, influencing the intensity of infection with Schistosoma mansoni. *Am J Hum Genet*. 1997;61:452-454.
- Nilius M, Strohle A, Bode G, Malfertheiner P., Coccoid like forms (CLF) of Helicobacter pylori. Enzyme activity and antigenicity. *Zentralbl Bakteriol*. 1993 Sep;280(1-2):259-72.
- Nilius M, Wex T, Muller-Dietz G, Leodolter A, Schilling D, Malfertheiner P., Comparative evaluation of two hemagglutination tests for the detection of anti-Helicobacter pylori antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001;41:221-223.
- O'Connell JR & Weeks DE., PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am J Hum Genet*. 1998;63:259-266.
- Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R., Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1497-500.
- Pai R, Cover TL, Tarnawski AS., Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin (VacA) disorganizes the cytoskeletal architecture of gastric epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Aug 19;262(1):245-50.
- Papini E, Satin B, Norais N, de Bernard M, Telford JL, Rappuoli R, Montecucco C., Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by Helicobacter pylori vacuolating toxin. *J Clin Invest*. 1998 Aug 15;102(4):813-20.

- Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med.* 1991 Oct 17;325(16):1127-31
- Patterson, J. B., Thomis, D. C., Hans, S. L., Samuel, C. E. (1995)  
Mechanism of interferon action: double-stranded RNA-specific adenosine deaminase from human cells is inducible by alpha and gamma interferons. *Virology* 210, 508–511.
- Peek RM Jr, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Zhao X, Atherton JC, Blaser MJ., Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to *cagA*+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest.* 1995 Dec;73(6):760-70.
- Perez-Perez GI, Bhat N, Gaensbauer J, Fraser A, Taylor DN, Kuipers EJ, Zhang L, You WC, Blaser MJ., Country-specific constancy by age in *cagA*+ proportion of *Helicobacter pylori* infections. *Int J Cancer.* 1997 Jul 29;72(3):453-6.
- Perez-Perez GI, Salomaa A, Kosunen TU, Daverman B, Rautelin H, Aromaa A, Knekt P, Blaser MJ., Evidence that *cagA*(+) *Helicobacter pylori* strains are disappearing more rapidly than *cagA*(-) strains. *Gut.* 2002 Mar;50(3):295-8.
- Pohlman RF, Genetti HD, Winans SC., Common ancestry between *IncN* conjugal transfer genes and macromolecular export systems of plant and animal pathogens. *Mol Microbiol.* 1994 Nov;14(4):655-68.
- Price AB. The Sydney System: histological division. *J Gastroenterol Hepatol.* 1991 May-Jun;6(3):209-22.
- Replogle ML, Glaser SL, Hiatt RA, Parsonnet J., Biologic sex as a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in healthy young adults. *Am J Epidemiol.* 1995 Oct 15;142(8):856-63
- Rosenzweig SD, Schaffer AA, Ding L, Sullivan R, Enyedi B, Yim JJ, Cook JL, Musser JM, Holland SM. Interferon-gamma receptor 1 promoter polymorphisms: population distribution and functional implications. *Clin Immunol.* 2004 Jul;112(1):113-9.
- Samson, M.; Libert, F.; Doranz, B. J.; Rucker, J.; Liesnard, C.; Farber, C.-M.; Saragosti, S.; Lapoumeroulie, C.; Cogniaux, J.; Forceille, C.; Muyldermans, G.; Verhofstede, C.; Burtonboy, G.; Georges, M.; Imai, T.; Rana, S.; Yi, Y.; Smyth, R. J.; Collman, R. G.; Doms, R. W.; Vassart, G.; Parmentier, M., Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382: 722-725, 1996.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7.
- Sawai N, Kita M, Kodama T, Tanahashi T, Yamaoka Y, Tagawa Y, Iwakura Y, Imanishi J., Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Infect Immun.* 1999;67:279-285.

- Schlemper RJ, van der Werf SD, Vandenbroucke JP, Biemond I, Lamers CB. Risk factors of peptic ulcer disease: different impact of *Helicobacter pylori* in Dutch and Japanese populations? *J Gastroenterol Hepatol*. 1996 Sep;11(9):825-31.
- Selbach M, Moese S, Hauck CR, Meyer TF, Backert S., Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 2002 Mar 1;277(9):6775-8.
- Sheu BS, Shiesh SC, Yang HB, Su IJ, Chen CY, Lin XZ. Implications of *Helicobacter pylori* serological titer for the histological severity of antral gastritis. *Endoscopy*. 1997 Jan;29(1):27-30.
- Shtrichman R & Samuel CE., The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Curr Opin Microbiol*. 2001;4:251-259.
- Sipponen P, Varis K, Fraki O, Korri UM, Seppala K, Siurala M., Cumulative 10-year risk of symptomatic duodenal and gastric ulcer in patients with or without chronic gastritis. A clinical follow-up study of 454 outpatients. *Scand J Gastroenterol*. 1990 Oct;25(10):966-73.
- Strobl, B., Arulampalam, V., Is'harc, H., Newman, S. J., Schlaak, J. F., Watling, D., Costa-Pereira, A. P., Schaper, F., Behrmann, I., Sheehan, K. C., Schreiber, R. D., Horn, F., Heinrich, P. C., Kerr, I. M. (2001) A completely foreign receptor can mediate an interferon-gamma-like response. *EMBO J*. 20, 5431–5442.
- Suerbaum S, Josenhans C, Labigne A. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin genes and construction of *H. pylori* flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J Bacteriol*. 1993 Jun;175(11):3278-88.
- Takata T, Aras R, Tavakoli D, Ando T, Olivares AZ, Blaser MJ., Phenotypic and genotypic variation in methylases involved in type II restriction-modification systems in *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jun 1;30(11):2444-52.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S., Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-76.
- Taylor, D.N. and Parsonnet, J. (1995). Epidemiology and natural history of *Helicobacter pylori* infection. In *Infections of the Gastrointestinal Tract* (ed. M. J. Blaser, P. D. Smith, J. I. Ravdin, H. B. Greenberg and R. L. Guerrant), pp. 551-563. New York: Raven Press.
- Takizawa, T., Ohashi, K., Nakanishi, Y. (1996) Possible involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase in cell death by influenza virus infection. *J. Virol*. 70, 8128–8132.
- Teh BH, Lin JT, Pan WH, Lin SH, Wang LY, Lee TK, Chen CJ. ,Seroprevalence and associated risk factors of *Helicobacter pylori* infection in Taiwan. *Anticancer Res*. 1994 May-Jun;14(3B):1389-92.

- Terwilliger JD., A powerful likelihood method for the analysis of linkage disequilibrium between trait loci and one or more polymorphic marker loci. *Am J Hum Genet.* 1995; 56:777-787.
- Tombola F, Morbiato L, Del Giudice G, Rappuoli R, Zoratti M, Papini E., The *Helicobacter pylori* VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. *J Clin Invest.* 2001 Sep;108(6):929-37.
- Tsutsumi R, Higashi H, Higuchi M, Okada M, Hatakeyama M., Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J Biol Chem.* 2003 Feb 7;278(6):3664-70.
- Tummuru MK, Sharma SA, Blaser MJ., *Helicobacter pylori* picB, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol.* 1995 Dec;18(5):867-76.
- Vandenplas Y, Blecker U, Devreker T, Keppens E, Nijs J, Cadranel S, Pipeleers-Marichal M, Goossens A, Lauwers S., Contribution of the <sup>13</sup>C-urea breath test to the detection of *Helicobacter pylori* gastritis in children. *Pediatrics.* 1992 Oct;90(4):608-11.
- Van Doorn LJ, Figueiredo C, Megraud F, Pena S, Midolo P, Queiroz DM, Carneiro F, Vanderborght B, Pegado MD, Sanna R, De Boer W, Schneeberger PM, Correa P, Ng EK, Atherton J, Blaser MJ, Quint WG. Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 1999 Apr;116(4):823-30.
- Wee A, Teh M, Kang JY., Association of *Helicobacter pylori* with HLA-DR antigen expression in gastritis. *J Clin Pathol.* 1992 Jan;45(1):30-3.
- Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G., A H<sup>+</sup>-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science.* 2000 Jan 21;287(5452):482-5.
- Wong, A. H., Tam, N. W., Yang, Y. L., Cuddihy, A. R., Li, S., Kirchhoff, S., Hauser, H., Decker, T., Koromilas, A. E. (1997) Physical association between STAT1 and the interferon-inducible protein kinase PKR and implications for interferon and double-stranded RNA signaling pathways. *EMBO J.* 16, 1291–1304.
- Wu MS, Wu CY, Chen CJ, Lin MT, Shun CT, Lin JT., Interleukin-10 genotypes associate with the risk of gastric carcinoma in Taiwanese Chinese. *Int J Cancer.* 2003 May 1;104(5):617-23.
- Xu, X., Fu, X. Y., Plate, J., Chong, A. S. (1998) IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res.* 58, 2832–2837.

Yamazaki S, Yamakawa A, Ito Y, Ohtani M, Higashi H, Hatakeyama M, Azuma T.,  
The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells  
and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. *J Infect Dis.* 2003 Jan  
15;187(2):334-7.

Zheng PY, Jones NL., *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating  
cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and  
retaining TACO (coronin 1) protein. *Cell Microbiol.* 2003 Jan;5(1):25-40.