

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Innere Medizin I

Ärztlicher Direktor:
Prof. Dr. med. Thomas Seufferlein

Regulation der gastralen Hepsidinexpression durch
Helicobacter pylori

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Johanna Kübler
Geburtsort Friedrichshafen

2012

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hasan Kulaksiz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Steffen Stenger

Tag der Promotion: 09.05.2014

~ Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet ~

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
---------------------------------	----------

Abkürzungsverzeichnis	III
------------------------------------	------------

1 Einleitung.....	1
--------------------------	----------

1.1 Eisenstoffwechsel	1
1.2 Hepcidin.....	4
1.3 Helicobacter pylori	8
1.4 Protonenpumpenhemmer	12
1.5 Ziel der Arbeit	14

2 Material und Methoden.....	15
-------------------------------------	-----------

2.1 Chemikalien, Primer und Kits.....	15
2.2 Materialien und Geräte	16
2.3 Methoden.....	17
2.3.1 Probanden und Biopsieentnahme	17
2.3.2 Aufbereitung der Biopsie	20
RNA-Isolierung	20
cDNA-Synthese	22
Quantitative RT-PCR	22
2.3.3 Aufbereitung des Serums	24
Bestimmung der Hepcidin-/Prohepcidinserumkonzentration	24
Bestimmung der Serumeisenwerte	25
2.3.4 Statistische Analysen	26

3 Ergebnisse.....	27
--------------------------	-----------

3.1 Probanden	27
3.2 Einfluss der Serumeisenwerte auf die gastrale Hepcidinexpression.....	28
3.3 Einfluss der PPI auf die gastrale Hepcidinexpression.....	29
3.4 Gastrale Hepcidin- und IL6-Expression bei <i>H. pylori</i> -Infektion.....	30
3.5 Gastrale Hepcidin- und IL6-Expression nach Eradikationstherapie	32
3.6 Einfluss der gastralen Hepcidinexpression auf die Hepcidin- und Prohepcidinkonzentration im Serum	37

4 Diskussion.....	39
5 Zusammenfassung	47
6 Literatur	48
7 Danksagung	60
8 Lebenslauf	61

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGS	humane Magenzelllinie
ANOVA	Analysis of Variance
AS	Aminosäure
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	copy desoxyribonucleic acid
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	Cycle Threshold (Schwellenwert-Zyklus)
Dcytb	Duodenales Cytochrom B
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
DMT1	Divalent Metal Transporter 1
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Erad	eradiziert
et al.	et alii
Fe	Eisenion
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisenion
Fe ³⁺	dreiwertiges Eisenion
fl	Femtoliter
GDF15	Growth differentiation factor
HAMP	Hepatic antimicrobial peptide
H ⁺ /K ⁺ -ATPase	H ⁺ /K ⁺ -Adenosintriphosphatase
Hb	Hämoglobin
Hepc-20	Hepcidin-20
Hepc-22	Hepcidin-22
Hepc-25	Hepcidin-25

HFE	Hämochromatose-Gen
HH	Hereditäre Hämochromatose
HJV	Hämojuvelin
HP	<i>H. pylori</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
hs	human
HUT	Helicobacter-Urease-Test
IL6	Interleukin 6
KO	knock out
m	männlich
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
MCH	Mean corpuscular haemoglobin
MCV	Mean corpuscular volume
mg	Milligramm
min	Minute
μ	Micro
mRNA	messenger ribonucleic acid
n	Anzahl
neg	negativ
nm	Nanometer
PCR	Polymerase chain reaction
Pers	persistierend
p	pico
p	Signifikanzwert
pos	positiv
PPI	Protonenpumpeninhibitoren
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	real time polymerase chain reaction
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
SD	Standard deviation
sek	Sekunde
s.o.	siehe oben

Tab.	Tabelle
TFR2	Transferrin Rezeptor Protein 2
TWSG1	Twisted gastrulation protein homolog 1
U	Unit
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VacA	Vacuolating cytotoxin A
vs.	versus
w	weiblich
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Eisenstoffwechsel

Eisen ist ein essentielles Spurenelement. Es ist nicht nur Bestandteil von sauerstoffbindenden Proteinen wie Hämoglobin und Myoglobin, sowie von Depot- und Reserveproteinen wie Ferritin und Hämosiderin, sondern auch Kofaktor für Enzyme wie Zytochrome, Peroxidasen und Katalasen. Es hat somit große Bedeutung beim Energiestoffwechsel des Körpers [31]. Der Sauerstofftransport, die Sauerstoffspeicherung, die Katalysierung von Redoxreaktionen und auch diverse Zellfunktionen wie zum Beispiel der mitochondriale Elektronentransport sind ohne Eisen nicht möglich. Darüber hinaus ist Eisen bei der DNA-Synthese unentbehrlich [25].

Der menschliche Körper enthält durchschnittlich 3000-4000 mg Eisen. Der tägliche Eisenbedarf allein für die Erythropoese liegt täglich bei etwa 20 mg, welcher hauptsächlich durch körpereigenes Eisen gedeckt wird. Dies ist vor allem dadurch möglich, dass der Körper das Eisen, welches beim Abbau von alten Erythrozyten frei wird, zurückhält, um es dann bei der Erythropoese erneut zu verwenden (Abb.1). Das Recycling von Eisen im menschlichen Körper ist sehr wichtig, da über die Nahrung nur etwa 1-2 mg Eisen pro Tag aufgenommen werden.

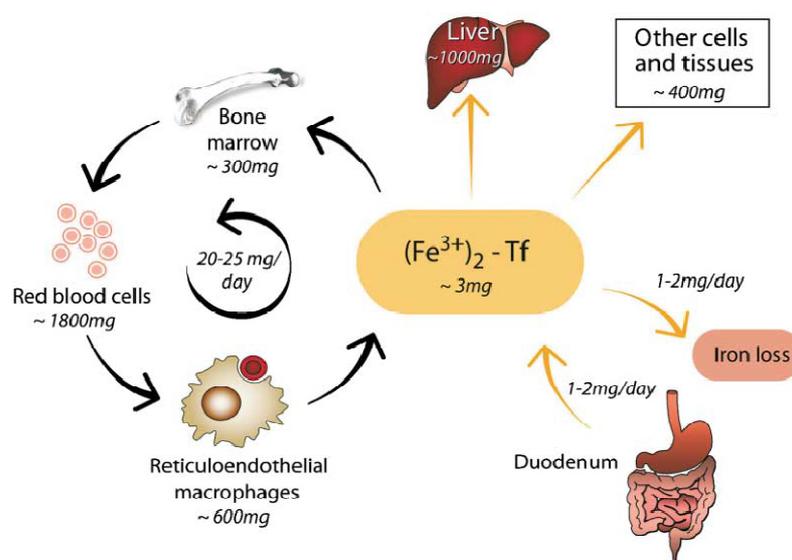


Abb.1: Darstellung des Eisenstoffwechsels im menschlichen Körper [35]. Tf = Transferrin

Eine strikte Regulation des Eisenstoffwechsels ist entscheidend, da nicht nur der Bedarf an Eisen gedeckt, sondern auch ein Überschuss vermieden werden muss, welcher lang anhaltend zu Organschäden führen kann [6]. Ursache dafür ist die toxische Wirkung von freiem Eisen (Fe^{2+}), welches die Bildung von reaktiven freien Radikalen katalysiert [2].

Eine aktive Ausscheidung von Eisen ist nicht möglich, weshalb die Homöostase dieses Spurenelementes im menschlichen Körper lediglich über die Absorption im proximalen Dünndarm reguliert werden kann (Abb.2).

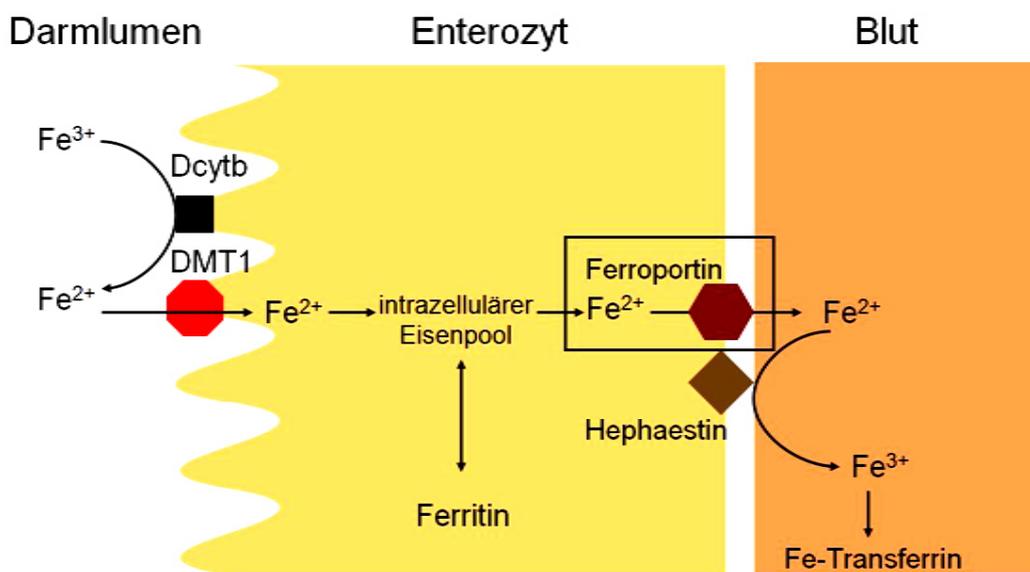


Abb.2: Darstellung der Eisenaufnahme im proximalen Dünndarm. Verändert nach Trinder et al. (2002) [96]. Mit freundlicher Genehmigung von BMJ Publishing Group Ltd. Dcytb = Duodenales Cytochrom B; DMT1 = Divalent Metal Transporter 1.

Hierbei wird nur ein kleiner Teil des Eisens (10-15%) direkt in Form von zweiwertigen Ionen (Fe^{2+}) über einen eigenen Transportweg in den Körper eingeschleust [35]. Der größte Eisenanteil in der Nahrung besteht jedoch aus dreiwertigen Ionen (Fe^{3+}), welche vor Aufnahme in die Zelle durch die Reduktase **Duodenales Cytochrom B** (Dcytb) zu Fe^{2+} reduziert werden müssen [61]. Fe^{2+} wird dann mit Hilfe des Eisentransporters **Divalent Metal Transporter 1** (DMT1) über die luminal gelegene Zellmembran in die Zelle transportiert [29]. Im Zytoplasma wird Eisen an Ferritin gebunden und gespeichert. Um Eisen in die Blutbahn abgeben zu können, wird der basolateral lokalisierte Transporter Ferroportin benötigt [60, 77]. Ferroportin wird nicht nur in den duodenalen

Enterozyten, sondern auch in Makrophagen, in Hepatozyten und in Synzytiotrophoblasten der Plazenta exprimiert [32]. Ferroportin transportiert Eisen aus der Zelle heraus [60], wo Ferroxidasen Fe^{2+} in Fe^{3+} umwandeln [98]. Nach der Redoxreaktion wird Fe^{3+} schließlich im Plasma an Transferrin gebunden und so zu den Eisenspeicherorganen im Körper transportiert [84].

Bei dem Export von Eisen aus der Zelle bindet der zentrale Eisenregulator Heparin an Ferroportin und induziert damit dessen Internalisierung und lysosomale Degradation [68]. Die Entfernung des Transporters von der Zelloberfläche führt zu einer verminderten Eisenabgabe ins Serum und bedingt die Akkumulation von Eisen in den Enterozyten [22]. Die rege Zellabschilferung im Dünndarm führt schließlich dazu, dass das in den Enterozyten eingeschlossene Eisen über den Stuhl verloren geht [32]. Parallel wird über den gleichen Mechanismus auch die Freisetzung von Eisen aus Makrophagen verhindert [32, 68].

1.2 Hepcidin

Hepcidin ist ein Peptidhormon, welches erstmals von zwei Forschergruppen aus menschlichem Blut bzw. Urin isoliert wurde [47, 74]. Das Peptid wird hauptsächlich in der Leber gebildet [47, 48, 74]. Eine Hepcidinexpression wird jedoch auch in zahlreichen extrahepatischen Geweben, wie der Niere, dem Fettgewebe, dem Herzen, dem Pankreas, dem biliären System und dem Gehirn gefunden [8, 21, 49, 50, 62, 92]. Die Expression von Hepcidin und seine zelluläre Lokalisation in den Parietalzellen wurden vor kurzem erstmals von der Arbeitsgruppe Kulaksiz nachgewiesen [86]. Die Funktion von gastralem Hepcidin wurde parallel zu meiner Studie von der AG Kulaksiz untersucht [86].

Aufbau des Peptidhormons Hepcidin

Hepcidin wird zunächst als 84 Aminosäuren (AS) langes Präprohormon synthetisiert [47, 74]. Nach Abspalten eines Signalpeptids (24 AS) entsteht das Prohormon Prohepcidin, welches in der Blutbahn nachgewiesen werden kann [47, 48]. Furin spaltet die Proregion (35 AS) von Prohepcidin ab [97], wodurch schließlich das biologisch aktive Hepcidin (25 AS) entsteht.

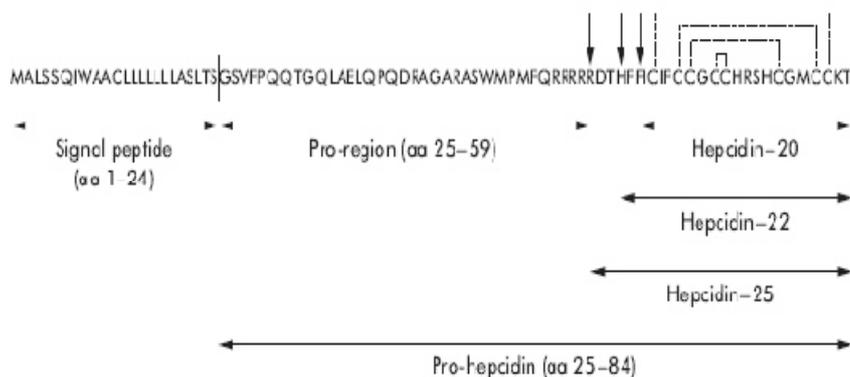


Abb.3: Aminosäuresequenz des humanen Präprohepcidin bestehend aus einem 24 AS langen Signalpeptid am N-Terminus, einer 35 AS langen Proregion und je nach Splicing (senkrechte Pfeile) einem 20, 22 oder 25 AS langen Hepcidin am C-Terminus. Die gestrichelten Linien stellen mögliche Verbindungen der Cysteine über Disulfidbrücken dar. Verändert nach Kulaksiz et al. (2004) [48]. Mit freundlicher Genehmigung von BMJ Publishing Group Ltd.

Hepc-25 enthält acht Cysteine, die durch vier intramolekulare Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abb.3). Neben Hepc-25 existieren zwei weitere Hepcidine (Hepc-20 und Hepc-22) [74], deren biologische Funktion bislang jedoch unklar ist.

Hepcidin – ein antimikrobielles Peptid

Hepcidin besitzt antimikrobielle Wirkung, welche dem Peptid seinen Namen gab: **Hepatic bactericidal protein** [74]. Das Wirkspektrum reicht von antibakteriell (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptokokken* der Serogruppe B) bis antimykotisch (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*) [74]. Aufgrund der antimikrobiellen Wirkung und seiner komplexen Struktur wird Hepcidin den β -Defensin-ähnlichen Peptiden zugeordnet, welche als Teil des angeborenen Immunsystems schnell auf Pathogene reagieren und mittels Chemotaxis das adaptive Immunsystem stimulieren [27, 102]. Entsprechend wird bei Infektionen und Entzündungen die Produktion von Hepcidin durch das Zytokin Interleukin 6 (IL6) induziert [45, 52, 66, 67].

Eine erhöhte Hepcidinexpression bei Infektion bewirkt eine Speicherung von Eisen in den Makrophagen und gleichzeitig eine verminderte Aufnahme des Spurenelements im Dünndarm und entzieht somit eingedrungenen Mikroorganismen das für ihr Wachstum und ihr Überleben notwendige Eisen [42]. Passend hierzu konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Eisenüberladung anfälliger für eine Reihe intrazellulärer Bakterien wie *Salmonella typhimurium* und *Mycobacterium tuberculosis* sind [19].

Dieser Mechanismus könnte erklären, weshalb sich bei andauerndem Infekt eine Entzündungsanämie, auch Anämie chronischer Erkrankungen (anemia of chronic disease) genannt, entwickeln kann.

Eine Schlüsselrolle von Hepcidin bei der infektbedingten Eisenverschiebung im Körper konnte von Nicolas et al. gezeigt werden [71]. Sie induzierten durch Injektion von Terpentin eine Entzündung bei hepcidindefizienten Mäusen und Wildtypmäusen. Interessanterweise zeigte sich im Gegensatz zu den

Wildtypmäusen bei Hpcidinmangelmäusen keinerlei Veränderung in der Eisenregulation [71].

Hpcidin - Hauptregulator des Eisenstoffwechsels

Neben seinen antimikrobiellen Eigenschaften stellt Hpcidin den Hauptregulator des Eisenstoffwechsels dar [79]. Eine funktionierende Regulation ist hierbei sehr wichtig, da Störungen der Homöostase zu Eisenüberschuss bzw. Eisenmangel führen können.

Ein Beispiel für eine unverhältnismäßig hohe Eisenaufnahme in den Körper ist die hereditäre Hämochromatose (HH) [78]. Ursache für die Entstehung dieser Eisenspeicherkrankheit sind Mutationen in Genen des Eisenstoffwechsels (HFE, HAMP, HJV, TFR2), die für Hpcidin selbst bzw. dessen Regulation kodieren und zu einer erniedrigten Hpcidinexpression in der Leber führen [1, 12, 65, 69, 73, 82]. Bei HH werden aufgrund des Hpcidinmangels trotz Eisenüberladung im Körper große Mengen an Eisen aus der Nahrung absorbiert. Dies führt zur Akkumulation von überschüssigem Eisen in den Organen und in der Folge zu Organschäden [6]. Hierbei kommt es beispielsweise zur Ausbildung von Hepatomegalie und Leberzirrhose, endokrinen Störungen wie Diabetes, sekundärer Kardiomyopathie und Arthropathien [36].

Bei einer erniedrigten Eisenaufnahme, die sich klinisch in Form einer Eisenmangelanämie manifestieren kann, wurde hingegen eine übermäßige Expression von Hpcidin nachgewiesen [70, 100].

Bei funktionierender Eisenregulation reagiert der Körper auf Zustände wie Anämie oder Hypoxie mit einer verminderten Hpcidinsynthese [71]. Studien zeigen, dass Erythropoietin, GDF15 und TWSG1 eine derartige Hemmung der Hpcidinexpression bewirken [72, 93]. Diese Regulation führt schließlich dazu, dass vermehrt Eisen aufgenommen wird und somit auch mehr Eisen für die kompensatorische Erythropoese zur Verfügung steht.

Hepcidinexpression im Magen

Zahlreiche Studien der Arbeitsgruppe Kulaksiz und auch Studien anderer Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Hepcidin in der Niere, im Herzen, in den β -Zellen des Pankreas, im biliären System und auch im Fettgewebe und im Gehirn exprimiert wird [8, 21, 49, 50, 62, 92].

Kürzlich konnte die AG Kulaksiz auch im Magen eine Hepcidinexpression nachweisen [86]. Mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) wurde bei Ratten und Mäusen eine Hepcidinexpression im Magen gezeigt, wobei die Expression hauptsächlich in den drüsenreichen Regionen in Corpus und Fundus und weniger ausgeprägt im Antrum zu finden war [86]. Passend zu den Ergebnissen bei der qRT-PCR detektierten regionspezifische Hepcidinantikörper das Peptid in Western Blot-Untersuchungen mit einem starken Signal in Corpus und Fundus, einem schwachen Signal im Antrum und keinem Signal in aglandulärem Magengewebe [86].

Die gastrale Hepcidinexpression ist in etwa vergleichbar mit der kardialen Hepcidinsynthese und entspricht ca. 10-30% der hepatischen Expression [86].

Mit Hilfe von immunhistochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Hepcidin in Parietalzellen der Magenschleimhaut lokalisiert ist [86]. Aufgrund der Ko-Lokalisation zu der in den Parietalzellen exprimierten H^+/K^+ -ATPase wurde untersucht, ob Hepcidin bei der Säureregulation beteiligt ist. Hepcidin-KO-Mäuse wiesen deutlich niedrigere H^+/K^+ -ATPase-Level auf. Demnach scheint Hepcidin die Magensäuresekretion zu induzieren [86]. Außerdem konnte bei Hepcidin-KO-Mäusen eine reduzierte Expression von Genen und Proteinen der Magensäuresekretion wie Gastrin gezeigt werden [86]. Weiterführende Untersuchungen an Mäusen wiesen nach PPI-Injektion eine Stimulation der Hepcidinsekretion nach [86]. Hepcidin scheint also nicht nur die Magensäuresekretion zu beeinflussen, sondern umgekehrt auch vom pH-Wert beeinflusst zu werden.

In vitro Untersuchungen (AGS-Zellen) zeigten je nach Eisenangebot Veränderungen in der Hepcidinexpression. Außerdem konnte in diesen Versuchen nachgewiesen werden, dass eine Infektion mit *H. pylori* zu einer Induktion der Hepcidinexpression führt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit *in vivo* Untersuchungen anhand von humanen Magenbiopsien durchgeführt.

1.3 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) ist ein gramnegatives, mikroaerophiles Stäbchenbakterium. Es weist eine Länge von 2-4 μm und einen Durchmesser von ca. 0,5-1 μm auf. Das Bakterium besitzt zwei bis sechs unipolar angeordnete Flagellen von etwa 3 μm Länge [51]. Obwohl *H. pylori* im sauren Milieu des Magens lebt und sich vermehrt, ist das Bakterium neutralophil [90]. Ein Überleben im Magen wird mitunter durch das Enzym Urease ermöglicht. Urease spaltet den in geringen Mengen im Magensaft vorkommenden Harnstoff in Ammoniak und Kohlendioxid. Ammoniak alkalisiert als Akzeptor von Wasserstoffionen die unmittelbare Umgebung des Erregers und schützt *H. pylori* somit vor dem niedrigen pH-Wert im Magen [87].

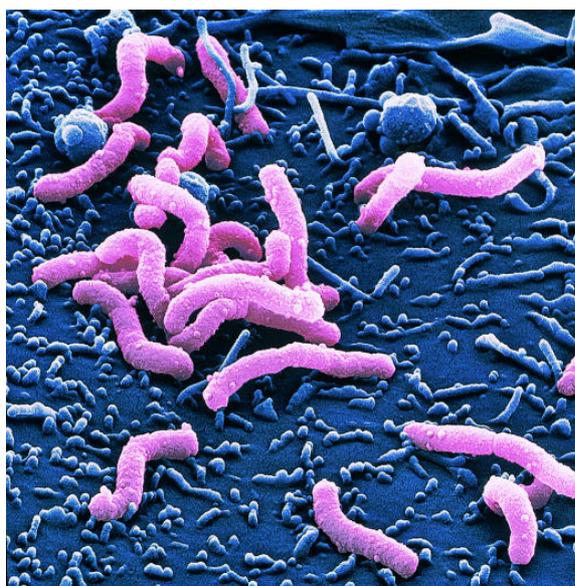


Abb.4: *Helicobacter pylori* unter dem Elektronenmikroskop [55]. Mit freundlicher Genehmigung von BMJ Publishing Group Ltd.

Eine Kultivierung von *H. pylori* gelang erstmals 1982 durch Barry Marshall und Robin Warren [57], wofür ihnen schließlich im Jahr 2005 der Nobelpreis in Physiologie und Medizin verliehen wurde. Der genaue Übertragungsweg dieses Bakteriums ist jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt. Es wird von einem oral-oralen oder fäko-oralen Übertragungsweg von Mensch zu Mensch ausgegangen. Dass eine direkte Infektion über orale Aufnahme möglich ist, wurde durch Selbstversuche von Marshall und Morris bewiesen [58, 63].

Die Infektion mit *H. pylori* ist weltweit sehr verbreitet. Sie wird hauptsächlich in früher Kindheit erworben und weist je nach Entwicklungsstand des Landes und den damit verbundenen hygienischen Bedingungen deutliche Unterschiede in der Prävalenz vor [55]. In Deutschland sind etwa 60 % der über 51jährigen von dieser Infektion betroffen [11].

Klinische Manifestation des Erregers *H. pylori*

Eine *H. pylori*-Infektion wird zwar vom Organismus bekämpft, kann jedoch für gewöhnlich nicht vollständig eliminiert werden. Ohne Therapie kommt es meist zu einer lebenslangen Besiedlung der Magenschleimhaut. Diese kann für den Patienten symptomlos bleiben, sie kann sich aber auch in Form einer aktiven chronischen Entzündung manifestieren. Zusätzlich wird das Risiko, ein Geschwür, Magenkarzinom oder MALT-Lymphom zu entwickeln, durch eine Infektion mit *H. pylori* erhöht [51, 59, 91]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Bakterium eine Rolle bei der Entstehung von extragastralen Erkrankungen wie etwa der Eisenmangelanämie spielt [64]. Patientengruppen mit erhöhtem Risiko für eine Eisenmangelanämie wie prämenopausale Frauen und Kinder waren häufiger von einer begleitenden Eisenmangelanämie bei *H. pylori*-Infektion betroffen [23]. Es wird vermutet, dass sich die Eisenmangelanämie in Folge von pH-Wert-Veränderungen bei *H. pylori*-Infektion entwickelt [4, 5]. Hierbei kommt es zu einer abnormalen Säureregulation im Magen [5].

Veränderte Säuresekretion bei *H. pylori*-Infektion

Eine akute Infektion kann zu reduzierter Magensäure (Hypochlorhydrie) führen, während eine chronische Infektion je nach Manifestationsort eine verminderte oder vermehrte Säureproduktion bewirken kann. Laut Schubert scheint die Hemmung der Säuresekretion bei akuter *H. pylori*-Infektion von mehreren Faktoren abhängig zu sein [85]. Dazu gehört u.a. die Produktion des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-1 β , die Hemmung der H⁺/K⁺-ATPase α -Untereinheit-Promotoraktivität und die vacuolating cytotoxin A (VacA) induzierte Proteolyse von Ezrin [85]. Wang et al. konnten zeigen, dass eine Behandlung von kultivierten Parietalzellen mit VacA zu einer Hemmung der Säuresekretion führt [99]. Im Jahre 1994

untersuchten Jablonowski et al. menschliche Parietalzellen, um die Zusammenhänge einer *H. pylori*-Infektion und der veränderten gastralen Säureproduktion besser verstehen zu können [41]. Dabei zeigte sich, dass verschiedene Helicobacterstämme die Säureproduktion im Magen unterschiedlich beeinflussen. Dies ist gut vereinbar mit den Beobachtungen von Wang et al., da VacA nicht in allen Helicobacterstämmen zu finden ist.

Bei der chronischen *H. pylori*-Infektion hängt die Menge der Säureproduktion von der Schwere und der Lokalisation der Infektion ab. Ein Befall des Antrums bewirkt eine verminderte Menge an Somatostatin bei gleichzeitiger Erhöhung der Gastrinwerte [85]. Die Hypergastrinämie führt zu einer Hyperacidität im Magen, was wiederum prädisponierend für Duodenalulcera ist [24]. Im Gegensatz dazu kommt es bei einer Infektion des Corpus bzw. einer Infektion von Corpus und Antrum (Pangastritis) zu einer verminderten Säuresekretion [59, 85], was zur Ausbildung von gastralen Ulcera und einem Magenkarzinom führen kann [51, 59]. McColl macht für das erhöhte Karzinomrisiko v.a. steigende Nitritwerte, deutlich erniedrigte Ascorbinsäurewerte im Magensaft und die vermehrte Besiedlung Nitritbildender Bakterien im Magen bei Hypochlorhydrie verantwortlich [59]. Die oben dargestellten Zusammenhänge werden in Abb.5 zusammengefasst.

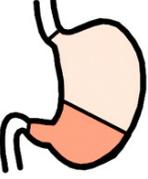
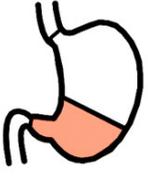
Pattern of gastritis	Gastric histology	Duodenal histology	Acid secretion	Clinical condition
 Pan-gastritis	<ul style="list-style-type: none"> • Chronic inflammation • Atrophy • Intestinal metaplasia 	<ul style="list-style-type: none"> • Normal 	<ul style="list-style-type: none"> • Reduced 	<ul style="list-style-type: none"> • Gastric ulcer • Gastric cancer
 Antral-predominant	<ul style="list-style-type: none"> • Chronic inflammation • Polymorph activity 	<ul style="list-style-type: none"> • Gastric metaplasia • Active chronic inflammation 	<ul style="list-style-type: none"> • Increased 	<ul style="list-style-type: none"> • Duodenal ulcer

Abb.5: Magensaftsekretion bei *Helicobacter pylori*-Infektion [51]. Mit freundlicher Genehmigung von American Society for Microbiology.

Diagnostik und Therapie

Für die Diagnosestellung einer *H. pylori*-Infektion stehen sowohl invasive als auch nicht-invasive Untersuchungsmethoden zur Verfügung. Bei den nicht-invasiven Methoden wird das Bakterium indirekt über die Ureaseaktivität beim Atemtest oder über Antigene im Stuhl nachgewiesen. Ein Antikörpernachweis im Serum ist für den Nachweis einer aktiven Infektion nicht geeignet, da ein positiv ausfallender Test nicht zwischen einer früheren und einer noch fortbestehenden Infektion differenzieren kann. Ein direkter Nachweis setzt eine Gastroskopie mit Biopsieentnahme voraus. Mit Hilfe dieser Biopsie wird *H. pylori* für gewöhnlich über einen *Helicobacter*-Urease-Test (HUT) oder eine Histologie nachgewiesen. Sowohl die direkten als auch die indirekten Tests haben eine hohe Sensitivität und Spezifität [28].

Therapie der Wahl ist eine medikamentöse Triple-Therapie, bestehend aus einem Protonenpumpenhemmer und zwei Antibiotika über sieben Tage. Als Erstbehandlung werden v.a. die italienische und die französische Triple-Therapie empfohlen (siehe Tab. 1), wobei aufgrund besserer Verträglichkeit die italienische Therapie vorzuziehen ist [28].

Tab. 1: Therapieschemata zur Erstlinientherapie der *Helicobacter pylori*-Infektion. Verändert nach Fischbach et al. (2009) [28]. TT = Tripletherapie; PPI = Protonenpumpenhemmer.

Name	Schema	Dosierung
Italienische TT	PPI	1-0-1
	Clarithromycin 250-500 mg	1-0-1
	Metronidazol 400-500 mg	1-0-1
Französische TT	PPI	1-0-1
	Clarithromycin 500 mg	1-0-1
	Amoxicillin 1000 mg	1-0-1

1.4 Protonenpumpenhemmer

Protonenpumpenhemmer (PPI) bewirken durch Hemmung der Säureproduktion eine Reduktion der Magensäure und somit eine Erhöhung des pH-Werts im Magen. Die Gabe von PPI ist bei Erkrankungen indiziert, für deren Heilung eine Magensäurereduktion notwendig ist. Zudem sind PPI ein fester Bestandteil der Eradikationstherapie bei *H. pylori*-Infektion [44]. Obwohl das Medikament relativ nebenwirkungsarm ist, konnte bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen werden, dass eine Erhöhung des pH-Werts im Magen, wie sie u.a. nach Einnahme von PPI vorkommt, zu Störungen in der Infektabwehr, in der Eisenabsorption und möglicherweise auch zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms führen können [30, 81].

Prädisposition für Infektionen bei Hypochlorhydrie

Eine verminderte Magensäuresekretion führt zu einer Prädisposition für Infektionen im oberen Gastrointestinaltrakt. Magensaft sorgt im Normalfall dafür, dass der Großteil der Erreger vor Erreichen des Dünndarms abgetötet wird [39, 43, 81]. So konnte bei einer pH-Wert-Erhöhung ein übermäßiges bakterielles Wachstum im Magen von Gastrin-KO-Mäusen und im Magen des Menschen bei Hypochlorhydrie nachgewiesen werden [30, 33]. Im Darm bewirkte eine Hemmung der Magensäureproduktion außerdem eine Zunahme der Besiedlung durch *Clostridium difficile* [20]. Bei einer Medikamenten-induzierten Hemmung der Magensäuresekretion scheint das Ausmaß der bakteriellen Besiedlung von der Medikation, der Dosierung und der Einnahmedauer des jeweiligen Medikaments abhängig zu sein [81, 95]. Dennoch ist die klinische Bedeutung einer bakteriellen Überbesiedlung nach langfristiger PPI-Einnahme unklar, da sie selten zur Ausbildung klinischer Erkrankungen führt [101].

Störungen in der Eisenabsorption bei PPI-Einnahme

Die Hemmung der Magensäureproduktion hat zudem Einfluss auf die Eisenresorption im Duodenum [16, 88], da ein ausreichend saures Milieu im Magen benötigt wird, um die für die Resorption notwendige Umwandlung von dreiwertigem Eisen in zweiwertiges Eisen zu gewährleisten [14]. Bezwoda et al. zeigten, dass bei pH-Werten unter 2,5 die Eisenaufnahme am höchsten ist und bei Werten über 2,5 die Eisenaufnahme proportional abnimmt [9]. Bei einer Medikamenten-induzierten Hemmung der Magensäureproduktion hängt die Reduktion der intestinalen Eisenaufnahme ähnlich der bakteriellen Überbesiedlung von der Medikamentendosierung ab [89].

Erhöhtes Risiko für Magenkarzinom

Neben den oben genannten Veränderungen wird über ein erhöhtes Risiko für ein Magenkarzinom bei Hypochlorhydrie diskutiert [13, 30, 40, 59]. Langzeitstudien konnten bisher jedoch nicht beweisen, dass eine Hemmung der Magensäuresekretion durch PPI zu einer steigenden Rate von malignen Erkrankungen im oberen Gastrointestinaltrakt führt [81].

Bezüglich des gastralen Hepcidin konnte von Seiten der Arbeitsgruppe Kulaksiz nachgewiesen werden, dass eine PPI-Injektion bei Hepcidin-WT-Mäusen zu einer erhöhten Hepcidinexpression im Magen führt [86]. Da PPI im Zuge der Eradikationstherapie wichtig sind, sollte in der vorliegenden Arbeit eine Beeinflussung der gastralen Hepcidinexpression durch PPI beim Menschen ausgeschlossen werden.

1.5 Ziel der Arbeit

Hepcidin wird vorwiegend in der Leber produziert. Allerdings konnte eine Hepcidinexpression bereits in zahlreichen extrahepatischen Geweben nachgewiesen werden. Neueste Ergebnisse der Arbeitsgruppe Kulaksiz belegen, dass Hepcidin auch im Magen synthetisiert wird. *In vitro* Studien mit der Magenzelllinie AGS ergaben, dass auch das gastrale Hepcidin entzündungsabhängig transkribiert wird. Sowohl nach Stimulation mit IL6 als auch nach Infektion mit *H. pylori* konnten deutlich erhöhte Hepcidin-mRNA-Level in der humanen Magenzelllinie beobachtet werden. Entsprechende *in vivo* Untersuchungen lagen bisher nicht vor.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die gastrale Hepcidin- und IL6-Expression in *H. pylori* infizierten Patienten und *H. pylori* negativen Kontrollpatienten vergleichend zu analysieren.

Da PPI Bestandteil der Eradikationstherapie bei *H. pylori*-Infektion sind und in Mäusen gezeigt werden konnte, dass die Gabe von PPI einen stark induzierenden Effekt auf die Hepcidinexpression ausübt, sollte in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die gastrale Hepcidinexpression bei Patienten mit PPI-Einnahme bestimmt werden. Mögliche Veränderungen der gastralen Hepcidinlevel aufgrund von PPI-Einnahme sollten hierbei ausgeschlossen werden.

Desweiteren sollte überprüft werden, ob Patienten mit einer *H. pylori* assoziierten Eisenmangelanämie höhere Hepcidinlevel aufweisen als *H. pylori* infizierte Patienten ohne Anzeichen einer Anämie.

Ein weiteres Ziel war es die Serumspiegel von Hepcidin und seiner inaktiven Vorstufe Prohepcidin sowie verschiedener Eisenparameter in den untersuchten Gruppen zu bestimmen. Dies sollte Aussagen darüber ermöglichen, ob das gastrale Hepcidin durch Änderungen des systemischen Eisenstoffwechsels reguliert wird bzw. ob Veränderungen der gastralen Hepcidinlevel einen Einfluss auf den Serumpool des Hormons sowie auf den Gesamteisenstoffwechsel haben.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Primer und Kits

Chemikalien:

Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
dNTP-Mix	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
2-Mercaptoethanol, min. 98%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Oligo(dT) ₂₀ -Primer (0,2 µg/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
RT2 Real Time SYBR Green/ROX	Qiagen, Hilden

Primer:

Die in dieser Studie verwendeten Primer (Tab. 4) wurden von Biomers, Ulm bezogen.

Kits:

RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript III RT Kit	Invitrogen, Darmstadt
DRG Hepcidin ELISA Kit	DRG Instruments GmbH, Marburg
DRG Hepcidin Prohormone ELISA Kit	DRG Instruments GmbH, Marburg

2.2 Materialien und Geräte

Materialien:

Jatrox H.p.-Test	C.H.R. Heim Arzneimittel GmbH, Darmstadt
Vasofix Braunüle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanüle (braun, Gr.18)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterile Einmalspritze 1 ml	BD Plastipak, Heidelberg
Reaktiongefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsröhrchen 15 ml und 50 ml	BD Falcon, USA
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen	Sorenson Bioscience, USA
UV-Küvette mikro	Brand, Wertheim
Glashomogenisator 2 ml	Sartorius, Göttingen
MicroAmp®Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, USA
MicroAmp®Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, USA

Geräte:

Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Varifuge RF	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5417C	Eppendorf AG, Hamburg
Labofuge 400R	Heraeus, Hanau
PTC 200 (Peltier Thermal Cycler)	MJ Research, Watertown Massachusetts
Real-time SDS 7500 Fast RT-PCR Gerät	Applied Biosystems, Darmstadt

2.3 Methoden

2.3.1 Probanden und Biopsieentnahme

Im Rahmen dieser Studie sollte der Einfluss einer *H. pylori*-Infektion auf die lokale Hecpidinexpression im Magen bzw. die systemische Hecpidinkonzentration im Serum *in vivo* untersucht werden. Alle im Folgenden beschriebenen Eingriffe, sowie die Versuche mit entnommenem Patientenmaterial wurden bereits vor Beginn der Studie von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Ulm genehmigt (Antragnummer 72/2009, Zusage vom 11.05.2009).

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte hauptsächlich in der Endoskopie-Ambulanz des Universitätsklinikum Ulm. Patienten mit unklaren abdominellen Beschwerden, die sich zur Magenspiegelung in der Endoskopie vorstellten und bei denen der Verdacht auf *H. pylori*-Infektion bestand, wurden hinsichtlich ihrer Eignung für die Studie bewertet. Bei Erfüllung der Einschlusskriterien (Volljährigkeit und Einwilligungsfähigkeit) wurde den Patienten die Studie vorgestellt, wobei ihnen neben dem Studienablauf, auch die möglichen Risiken der Probeentnahme erklärt wurden. Bei Zustimmung gaben die Patienten gemäß der Deklaration von Helsinki ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Die Ein- und Ausschlusskriterien sind in Tab. 2 dargestellt.

Vor Beginn der Gastroskopie wurde dem Patienten eine Verweilkanüle zur intravenösen Sedierung mittels Midazolam und Propofol gelegt. Hieraus wurde unmittelbar nach Punktion Blut zur späteren Bestimmung der Hecpidin- und Prohepcidinkonzentration im Serum und der Eisenwerte im Serum (Eisen, Ferritin, Transferrin) entnommen. Wichtige Parameter zur Bestimmung einer möglichen Anämie (Hb, MCV, MCH) wurden von zeitnah abgenommenen Blutwerten übernommen.

Tab. 2: Ein- und Ausschlusskriterien. V.a. = Verdacht auf; Z.n. = Zustand nach; CED = chronisch entzündliche Darmerkrankungen.

Einschlusskriterien	
	<ul style="list-style-type: none"> • V.a. <i>Helicobacter pylori</i> Infektion • Volljährigkeit • Einwilligungsfähigkeit
Ausschlusskriterien	
Erkrankungen/Faktoren mit möglichem Einfluss auf die Hepcidinkonzentration im Serum	<ul style="list-style-type: none"> • Leberzirrhose • Alkoholabusus • Drogenabhängigkeit • Hämochromatose • Steatosis hepatis • Terminale Niereninsuffizienz
Erkrankungen/Faktoren mit möglichem Einfluss auf Hepcidin im Magen	<ul style="list-style-type: none"> • Z.n. Magenresektion • Gastritis (ohne Typ B Gastritis) • Protonenpumpenhemmer (ohne Gruppe 4 (siehe Tab. 3))
Erkrankungen/Faktoren mit möglichem Einfluss auf den Eisenstoffwechsel	<ul style="list-style-type: none"> • Eisenmangelernährung • CED • Anorexia nervosa • Karzinome • Blutungen • Erosionen, Ulcera • Eisenmangelanämie (ohne Gruppe 2 (siehe Tab. 3))

Während der Gastroskopie wurden dem Patienten routinemäßig Biopsien aus Antrum und Corpus entnommen. Diese dienten unabhängig von der Studie der *H. pylori*-Diagnostik in Form eines *Helicobacter*-Urease-Tests (HUT) und einer

Histologie. Die Kombination der beiden Testverfahren entspricht den Empfehlungen der S3-Leitlinien der DGVS [28]. In diesem Rahmen wurden für die Studie zwei weitere Biopsien (je eine Probe aus Antrum bzw. Corpus) entnommen und für die Bestimmung der lokalen Hecpidinexpression verwendet.

Je nach Ergebnis des HUT bzw. der Histologie wurden die Patienten in vier verschiedene Gruppen eingeteilt, welche bereits vor Studienbeginn definiert worden sind (siehe Tab. 3). Eine Eisenmangelanämie lag in dieser Studie definitionsgemäß bei erniedrigten Hämoglobinwerten (Hb < 14 g/l beim Mann bzw. Hb < 12 g/l bei der Frau), reduziertem Ferritin im Serum (< 50 µg/l), einem verringerten mittleren Erythrozyteneinzelvolumen (MCV < 80 fl), sowie einem herabgesetzten mittleren korpuskulären Hämoglobin (MCH < 27,5 pg) vor.

Tab. 3: Übersicht der Patientengruppen. *H. pylori* = *Helicobacter pylori*

Gruppe	Definition
Gruppe 1	<i>H. pylori</i> positive Patienten ohne Eisenmangelanämie
Gruppe 2	<i>H. pylori</i> positive Patienten mit Eisenmangelanämie
Gruppe 3	Kontrollgruppe (ohne <i>H. pylori</i> -Infektion, ohne Protonenpumpenhemmereinnahme und ohne Eisenmangelanämie)
Gruppe 4	<i>H. pylori</i> negative Patienten mit Protonenpumpenhemmereinnahme und ohne Eisenmangelanämie

Patienten, bei denen *H. pylori* nachgewiesen werden konnte, erhielten eine Eradikationstherapie. Für gewöhnlich wurde die italienische Tripletherapie eingesetzt. Diese beinhaltet eine siebentägige Einnahme von Pantoprazol 40 mg (1-0-1), Clarithromycin 250 mg (1-0-1) und Metronidazol 400 mg (1-0-1). Bei Helicobacterresistenz wurden die Antibiotika individuell je nach Resistenzlage verschrieben. Unabhängig von der Art der Eradikationstherapie wurde die Therapie mit Pantoprazol 40 mg (1-0-0) nach Absetzen der Antibiotika für weitere drei Wochen fortgeführt. Danach sollte der Proband keine der oben genannten Medikamente mehr einnehmen.

Sechs Wochen nach Therapiebeginn wurde eine Kontrollgastroskopie mit Biopsie- und Blutentnahme analog zur ersten Gastroskopie (s.o.) durchgeführt.

Abweichend von der ersten Magenspiegelung wurden bei der Kontrollgastroskopie zusätzlich die Laborparameter Hb, MCV und MCH in der Zentralen Einrichtung Klinische Chemie der Universität Ulm (ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. M. G. Bachem) bestimmt, um mögliche Veränderungen der Parameter während der Therapie zu erfassen.

Das Serumröhrchen für die Bestimmung der Hepcidin-, Prohepcidinkonzentration und der Eisenwerte im Serum wurde unmittelbar nach Blutentnahme für den Zeitraum der Gastroskopie auf Eis gelegt. Anschließend wurde das Blut für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Serum (Überstand) wurde sauber entnommen, aliquotiert und bis zur Bestimmung der Hepcidin-, Prohepcidinkonzentration und der Eisenwerte bei -80°C tiefgefroren.

2.3.2 Aufbereitung der Biopsie

Die Biopsien zur Bestimmung der Hepcidinexpression im Magen wurden unmittelbar nach der Entnahme in ein Eppendorf Reaktionsgefäß mit RNAlater Reagenz gegeben. Nach 24-stündiger Kühlung bei 4°C wurden die Biopsien bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

RNA-Isolierung

Die Gewebeprobe wurde zunächst mit 600 µl RLT und β-Mercaptoethanol im Verhältnis 100:1 versetzt, was zur Lyse der Zellen führte. Zur Verstärkung des Zellaufschlusses wurde das Biopsie-Puffer-Gemisch in einem Glashomogenisator mechanisch zu einem homogenen Lysat zerrieben und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Eine noch bessere Homogenisierung des Lysats wurde durch Auf- und Abziehen des Biopsie-Puffer-Gemischs mit einer sterilen Einmalspritze und einer kleinelumigen Kanüle erzielt. Das fertige Homogenisat wurde bei -80°C tiefgefroren.

Die Gesamt-RNA der Homogenisate wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit isoliert. Die hierbei verwendete Methode macht sich die Bindungseigenschaften einer auf Silikagel basierenden Membran zu eigen. In den speziellen Säulen wird die Gesamt-RNA gebunden, während Proteine und DNA in mehreren Waschschritten effektiv von der Membran gewaschen werden.

Vor der RNA-Extraktion wurden die tiefgefrorenen Proben bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend für 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, um im Lysat verbliebene Zellbruchstücke sauber abzutrennen. Der Überstand wurde mit 70%igem Ethanol im Verhältnis 1:1 versetzt, was ein Aufbrechen der Hydrathülle der RNA bewirkt. Anschließend wurde die Probe auf eine QIA-Säule geladen und für 20 sek bei 10.000 rpm zentrifugiert. Durch die hohe Wasseraffinität des im Gemisch enthaltenen RLT-Puffers (chaotrophe Salzlösung) wird schließlich die Bindung der RNA an die Membran der Säule ermöglicht.

Um die in der Lösung enthaltene DNA zu beseitigen, war ein DNase-Verdau notwendig. Zuvor wurde zum Waschen der membrangebundenen RNA 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und für 20 sek bei 10.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden für den Verdau 80 µl DNase-Mix (RDD Puffer und DNase I im Verhältnis 7:1) direkt auf die Membran gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Verdau wurden erneut 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben, um die DNA von der Membran zu waschen.

Nach der Zentrifugation von 20 sek bei 10.000 rpm wurde die Säule in ein neues Sammelröhrchen überführt. 500 µl RPE-Puffer (RPE und 96-100%iges Ethanol im Verhältnis 1:4) wurden zum Waschen der Membran auf die Säule gegeben. Die Säule wurde für 20 sek bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Daraufhin folgte ein zweiter Reinigungsschritt mit 500 µl RPE-Puffer. Eine 2 min andauernde Zentrifugation sollte ein Zurückbleiben von Ethanol auf der Membran verhindern, was die Elution der RNA störend beeinflussen könnte. Zur Elution der gebundenen RNA wurden 40 µl RNase-freies H₂O auf die Säule gegeben und während einer Minute bei 10.000 rpm in ein frisches, steriles Reaktionsgefäß zentrifugiert. Um die Konzentration der gewonnenen RNA zu erhöhen, wurde das Eluat ein weiteres Mal auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Das Eluat wurde nach Beendigung der Arbeitsschritte in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und bei -80 °C tiefgefroren.

cDNA-Synthese

Nach langsamem Auftauen der RNA wurde eine wässrige Lösung (300 µl RNase freies H₂O + 4 µl der jeweiligen RNA) zur photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration hergestellt und in eine Küvette überführt. Die RNA-Konzentration in µg/µl wurde schließlich bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spectrophotometer bestimmt.

Für die cDNA-Synthese wurde eine Mischung aus 12 µl RNase-freiem Wasser und 2 µg der jeweiligen RNA verwendet. Dieser Lösung wurde je 1 µl Oligo(dT)₂₀-Primer und dNTP-Mix (je 10mM) zugegeben. Der Oligo(dT)₂₀-Primer bindet an den Poly-A-Schwanz intakter mRNA, was die Bildung eines neuen cDNA-Strangs ermöglicht. Nach Inkubation bei 60°C für 5 min wurden zusätzlich 4 µl First-Strand-Buffer, 1 µl 0,1M DTT und 1 µl SuperScript III RT (200 U/µl) aus dem SuperScript III Reverse Transcriptase Kit zu dem Reaktions-Mix hinzugegeben. Die Synthese der cDNA erfolgte in einem Thermozykler mit folgendem Programm:

1. 25 °C für 5 min
2. 50 °C für 50 min
3. Inaktivierung des Enzyms bei 70 °C für 15 min

Anschließend wurde die cDNA bei -20 °C tiefgefroren.

Quantitative RT-PCR

Nach Synthese der cDNA wurden mittels qRT-PCR die spezifischen Hecpidin- und IL6-Expressionlevel bestimmt.

Bei der qRT-PCR läßt sich mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen die Transkriptmenge eines ausgewählten Gens bestimmen. Hierfür werden der Lösung Fluorophoren – in diesem Fall SYBR Green – zugegeben, welche in doppelsträngige Nukleinsäuren einlagern und fluoreszieren.

In dieser Studie wurde die qRT-PCR in einem real-time SDS 7500 Fast RT-PCR-Gerät durchgeführt, das über den gesamten Verlauf der PCR die Zunahme der Fluoreszenz bestimmt. Grafisch dargestellt, ergibt sich dabei ein sigmoidaler

Kurvenverlauf. Zum Rückschluss auf die Menge der enthaltenen bzw. synthetisierten Nukleinsäuren wird der Wendepunkt der jeweiligen Kurve betrachtet, welcher von der 7500 Fast System Sequence Detection Software Version 1.4 berechnet und ausgegeben wird. An diesem Punkt verläuft die PCR unter idealen Bedingungen, da hier die Enzymaktivität optimal ist und es nicht zu Störungen durch dNTP-Limitierung oder Zusammenlagerung von PCR-Produkten aufgrund eines ungünstigen Primer-Template-Verhältnisses kommt. Je früher der Wendepunkt erreicht wird, desto mehr Template ist im Ansatz enthalten bzw. desto stärker wird das zu untersuchende Gen exprimiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primersequenzen sind in Tab. 4 aufgeführt. Humanes β -Aktin diente als endogene Kontrolle.

Tab. 4: Verwendete Primersequenzen für qRT-PCR. IL6 = Interleukin 6.

Gen	Hin	rück
Hepcidin	5'-gac ggg aca act tgc aga gc-3'	5'-gcc tct gga aca tgg gca t-3'
IL6	5'-cag ccc tga gaa agg aga ca-3'	5'-cca ggc aag tct cct cat tg-3'
β -Aktin	5'-agg atg cag aag gag atc act g-3'	5'-ggg tgt aac gca act aag tca tag-3'

Der Ansatz für die qRT-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

1 μ l cDNA (1:10 verdünnt)

1 μ l Primer-Mix, (Hin- und Rückprimer [je 3 pmol/ μ l])

5 μ l SYBR-Mix

3 μ l H₂O

Die Reaktionen wurden auf einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen angesetzt, in welche je 10 μ l dieses Reaktionsgemisches gegeben wurden.

Vor Beginn der qRT-PCR wurde die Platte zentrifugiert, um mögliche Luftblasen in den Ansätzen zu entfernen.

Das für die Amplifikation der cDNA verwendete Programm war folgendermaßen aufgebaut:

1. Hitzeaktivierung der Polymerase 95 °C, 10 min
2. Denaturierung 95 °C, je 15 sek
3. Primer-Annealing und Elongation 60 °C, 1 min
4. 45 Amplifikationszyklen bestehend aus den Schritten 2. und 3.

Anschließend wurde eine Schmelzkurvenuntersuchung durchgeführt, um die Spezifität der vervielfältigten PCR-Produkte zu bestimmen. Die Ergebnisse wurden mit der 7500 Fast System Sequence Detection Software ausgewertet. Die genspezifische Transkriptmenge (y) in Relation zu β -Aktin wurde mit folgender Formel berechnet:

$$y = 2^{-\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct = Ct(\text{Hepcidin bzw. IL6}) - Ct(\beta\text{-Aktin})$$

2.3.3 Aufbereitung des Serums

Bestimmung der Hepcidin-/Prohepcidinserumkonzentration

Die in dieser Studie untersuchte Hepcidin- und Prohepcidinkonzentration im Serum wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Janetzko (DRG Instruments GmbH, Marburg) mittels ELISA (**E**nzyme-linked **I**mmunosorbent **A**ssay) bestimmt.

ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren für Proteine in Proben wie z.B. Blut oder Urin, welches sich spezifische Antigen-Antikörper-Bindungen zu Nutze macht. Bei den in dieser Studie verwendeten ELISAs handelt es sich um kompetitive Immunoassays.

Die verwendeten Mikrotiterplatten sind je nach Assay mit einem monoklonalen Anti-Hepcidin-Antikörper bzw. mit einem polyklonalen Anti-Prohepcidin-Antikörper beschichtet, um welche die Antigene konkurrieren. 20 μ l der zu untersuchenden Proben, Standards und Kontrollen wurden zusammen mit je 10 μ l Sample-Buffer in die Mikrotiterplatten gegeben. Nach 30 minütiger Inkubation wurden schließlich je 100 μ l Hepcidin-Biotin-Konjugat bzw. Prohepcidin-Biotin-Konjugat mit 150 μ l

Assay-Buffer hinzugefügt. Während der anschließenden Inkubationszeit von 180 min konnte das Antigen der Proben und das Antigen des jeweiligen Biotin-Konjugats um die Bindungsstelle des Antikörpers konkurrieren. Danach wurden nicht gebundene Konjugate ausgewaschen. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe mit einem 100 µl Streptavidin-Peroxidase-Enzym-Komplex für 45 min inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl Substratlösung dazugegeben und für 30 min inkubiert, was zu einer Farbentwicklung führte. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Stopplösung unterbrochen. Die Intensität der Farbentwicklung erlaubt eine quantitative Bestimmung des am Antikörper gebundenen Hepsidin-Biotin-Konjugats bzw. Prohepcidin-Biotin-Konjugats. Diese Konzentration ist indirekt proportional zu der Hepsidin- bzw. Prohepcidinkonzentration in der Patientenprobe.

Bestimmung der Serumeisenwerte

Für die Bestimmung der Eisenwerte wurden die Seren gesammelt an die zentrale Einrichtung Klinische Chemie der Universität Ulm (ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Bachem) gesandt. Folgende Parameter wurden aus dem Serum bestimmt:

Eisen:	Referenzwerte 4.0-30.0 [µmol/l]
Ferritin:	Referenzwerte 30-300 [µg/l]
Transferrin:	Referenzwerte 2.0-3.6 [g/l]

Die Eisensättigung wurde dann mit Hilfe der Eisen- und Transferrinwerte über folgende Formel berechnet:

$$\text{Eisensättigung} = \frac{\text{Eisen im Serum (}\mu\text{mol/l)}}{\text{Transferrin im Serum (g/l)}} \times 3,98$$

2.3.4 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA). Die Unterschiede in den Hepcidinexpressionsleveln bzw. in den Serumspiegeln zwischen den untersuchten Patientengruppen wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse bzw. Wilcoxon-U-Test ermittelt. Die Beziehung der gastralen Hepcidinexpression mit den Serumparametern wurde mittels Korrelation nach Pearson bestimmt. Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als signifikant, Ergebnisse mit $p < 0,01$ als hochsignifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Probanden

In dem Zeitraum von 06/2009 bis 12/2009 wurden die Patienten in die Studie eingeschlossen und gastroskopiert. Von diesen Patienten wurden während der Magenspiegelung – wie in 2.3.1 beschrieben – zusätzliche Gewebe- und Blutproben für die Studie entnommen. Abhängig von dem Ergebnis im HUT und der Histologie wurden die Patienten in die vier im Voraus definierten Gruppen eingeteilt (siehe Tab. 3). 14 Patienten konnten aufgrund ihrer Merkmale keiner der vier Gruppen zugeteilt werden und wurden aus der Studie ausgeschlossen. Unter den verbliebenen Patienten wiesen 13 Patienten eine Infektion mit *H. pylori* auf (Gruppe 1). Passende Patienten für Gruppe 2 waren unter den Studienteilnehmern nicht vertreten. Die wenigen Patienten mit *H. pylori*-Infektion und gleichzeitiger Eisenmangelanämie, welche an der Universität Ulm untersucht worden sind, hatten bereits vor der Gastroskopie Magenschutztabletten eingenommen und mussten deshalb von dieser Studie ausgeschlossen werden. Den 13 *H. pylori* positiven Patienten (Gruppe 1), sowie 20 Patienten mit PPI-Einnahme (Gruppe 4) wurden Kontrollpatienten entsprechend dem Alter und Geschlecht zugeordnet. Die Verteilung der Patienten innerhalb der verschiedenen Gruppen ist in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Übersicht über die Patientenmerkmale in den verschiedenen Gruppen. n = Anzahl; w/m = weiblich/männlich; SD = Standard deviation.

Gruppe	1	2	3	4
<i>Helicobacter pylori</i>	Positiv	positiv	negativ	negativ
Patienten (n)	13	0	20	20
Geschlecht w/m	3/10	–	10/10	14/6
Alter (Jahre±SD)	45±13	–	43±16	56±15

3.2 Einfluss der Serumeisenwerte auf die gastrale Hepcidinexpression

Um Unterschiede in den Serumeisenwerten, welche die gastrale Hepcidinexpression beeinflussen könnten, auszuschliessen, wurden die Eisenparameter (Eisen, Ferritin, Transferrin und Eisensättigung) von *H. pylori* positiven Patienten vor und nach Eradikation sowie von Patienten mit PPI-Einnahme mit den Serumeisenwerten der Kontrollpatienten verglichen. Bei keiner der oben genannten Patientengruppen konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Unterschiede in den Eisenparametern beobachtet werden (Abb. 6).

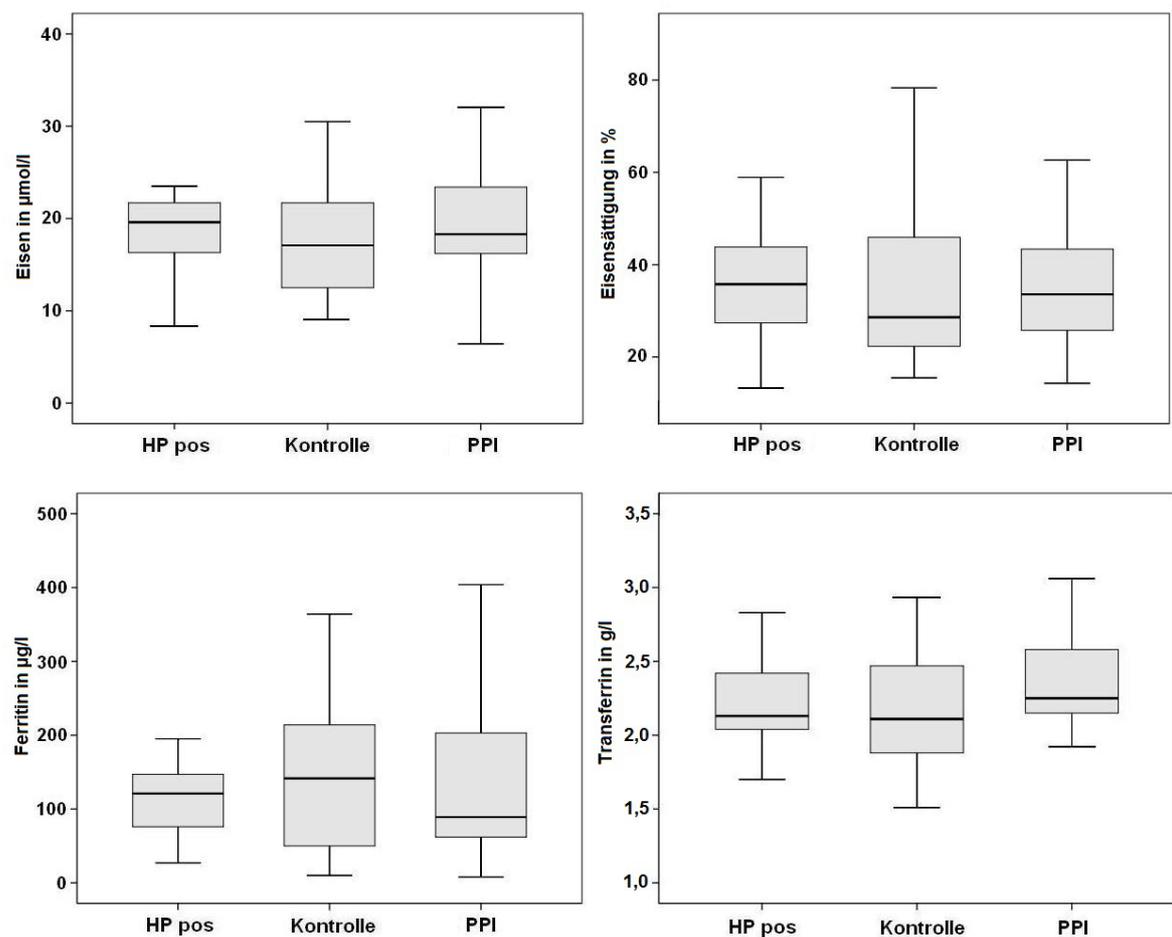


Abb. 6: Unterschiede der Serumeisenwerte (Eisen, Eisensättigung, Ferritin und Transferrin) zwischen *Helicobacter pylori* positiven Patienten (HP pos), nicht infizierten Kontrollpatienten (Kontrolle) und Patienten mit Protonenpumpenhemmereinnahme (PPI). Die Boxplots zeigen den Median mit der ersten und dritten Perzentile. Die Antennen geben den jeweils höchsten bzw. niedrigsten Wert wieder.

3.3 Einfluss der PPI auf die gastrale Hepcidinexpression

In Versuchen mit Hepcidin-WT-Mäusen wurde nach PPI-Gabe eine erhöhte gastrale Hepcidinexpression beobachtet [86]. Um beim Menschen den Einfluss einer PPI-Therapie auf die Expression von Hepcidin im Magen auszuschließen, wurde die gastrale Hepcidinexpression von Patienten mit PPI-Einnahme und der Kontrollgruppe bestimmt und miteinander verglichen. Hierbei konnte im Antrum kein Unterschied in der gastralen Hepcidinexpression zwischen Patienten mit PPI-Einnahme und den Kontrollpatienten festgestellt werden (Repräsentatives Ergebnis: $1,07 \pm 0,78$ vs. $1,00 \pm 0,77$, $p < 0,85$) (Abb. 7).

Auch im Corpus zeigten sich bezüglich der gastralen Hepcidinexpression der oben genannten Patienten keine Unterschiede (Repräsentatives Ergebnis: $1,39 \pm 1,18$ vs. $1,00 \pm 0,61$, $p < 0,4$) (Abb. 7).

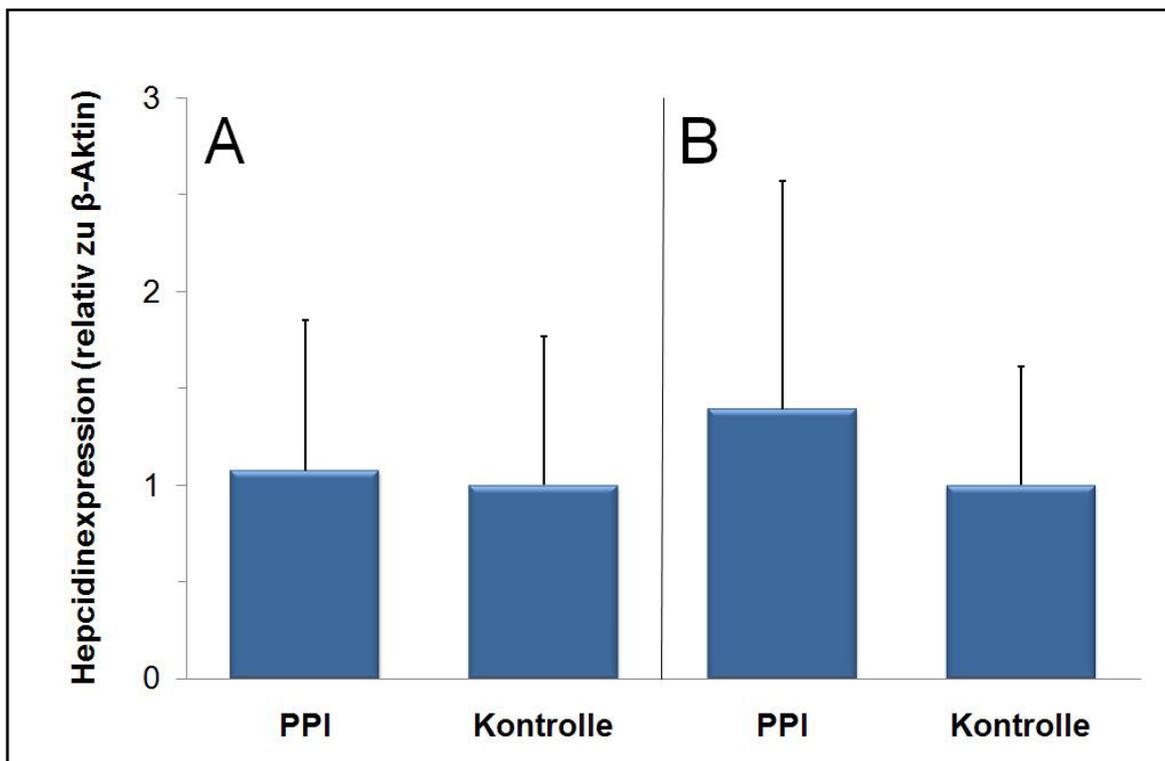


Abb. 7: Gastrale Hepcidinexpressionslevel bei Patienten mit Protonenpumpenhemmereinnahme (PPI) und der Kontrollgruppe im Antrum (A) und im Corpus (B). Das Expressionslevel der Kontrollgruppe wurde jeweils auf einen Wert von 1 gesetzt. Die dargestellten Ergebnisse sind Durchschnittswerte (\pm Standard deviation).

3.4 Gastrale Hepcidin- und IL6-Expression bei *H. pylori*-Infektion

Um den Einfluss einer *H. pylori*-Infektion auf Hepcidin zu untersuchen, wurde das spezifische Expressionslevel in *H. pylori* positiven Patienten (Gruppe 1) und nicht infizierten Kontrollpatienten (Gruppe 3) bestimmt und miteinander verglichen. Bei *H. pylori* positiven Patienten war die relative Expression von Hepcidin zu β -Aktin im Antrum 4,3 mal höher ($4,33 \pm 3,56$ vs. $1,00 \pm 0,93$, $p < 0,01$).

Im Corpus zeigte die Hepcidinexpression in *H. pylori* positiven Patienten gegenüber den Kontrollen sogar einen um Faktor 8,4 höheren Wert ($8,43 \pm 6,85$ vs. $1,00 \pm 0,71$, $p < 0,003$).

Demnach war in den *H. pylori* infizierten Patienten eine signifikant höhere Expression von Hepcidin sowohl im Antrum, als auch im Corpus festzustellen (Abb. 8).

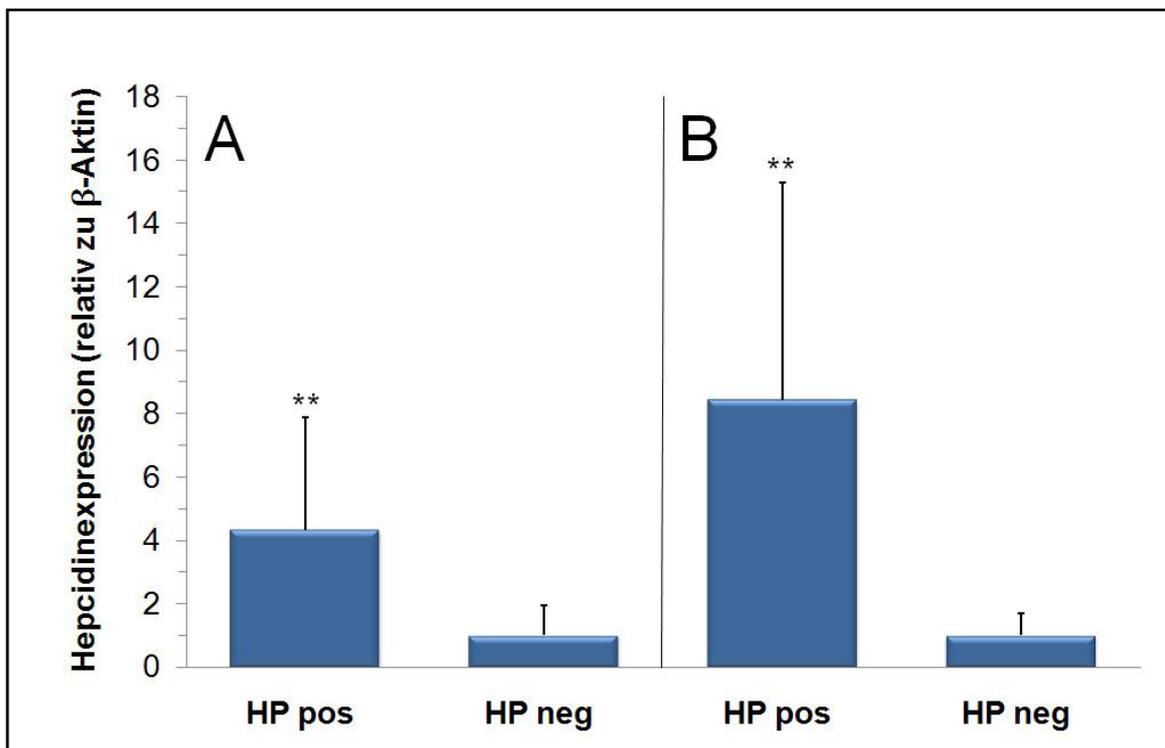


Abb. 8: Gastrale Hepcidinexpressionslevel bei *Helicobacter pylori* positiven (HP pos) und nicht infizierten Probanden (HP neg) im Antrum (A) und im Corpus (B). Das Expressionslevel der *Helicobacter pylori* negativen Probanden wurde auf einen Wert von 1 gesetzt. Die dargestellten Ergebnisse sind Durchschnittswerte (\pm Standard deviation). $**p < 0,01$. p = Signifikanzwert.

Eine Infektion mit *H. pylori* löst eine Entzündung des Magens aus. Aus Untersuchungen in anderen Organen ist bereits bekannt, dass Hepcidin bei Entzündung durch IL6 verstärkt exprimiert wird [26, 62, 66, 71, 92, 94]. Um zu überprüfen, ob die beobachtete Hochregulation der Hepcidinexpression bei *H. pylori*-Infektion durch die Entzündung verursacht wird, wurde stichprobenartig (n=6) die IL6-Expression in Antrum und Corpus von *H. pylori* positiven Patienten und der Kontrollgruppe untersucht. Hierbei wurde im Antrum eine um den Faktor 3,2 höhere relative IL6-Expression bei *H. pylori* positiven Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen ($3,17 \pm 2,13$ vs. $1,00 \pm 0,65$, $p < 0,04$) (Abb. 9). Die IL6-Expression bei den Proben *H. pylori* positiver Patienten war im Corpus 1,9mal höher als bei Proben der Kontrollpatienten ($1,86 \pm 1,28$ vs. $1,00 \pm 1,23$, $p < 0,3$) (Abb. 9). Im Antrum zeigte sich demnach ein signifikanter Unterschied zwischen *H. pylori* positiven Patienten und der Kontrollgruppe. Im Corpus war der Unterschied zwischen *H. pylori* positiven Patienten und der Kontrollgruppe nicht signifikant.

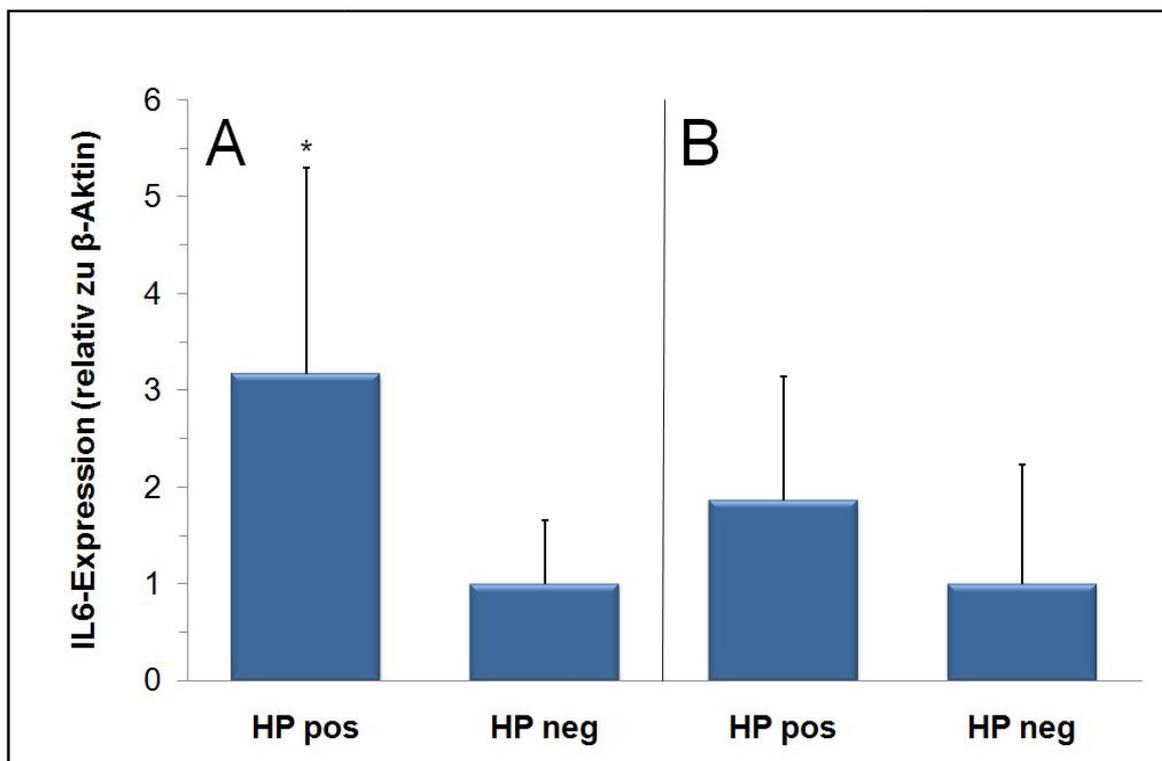


Abb. 9: Gastrale Interleukin 6-Expressionslevel (IL6) bei *H. pylori* positiven (HP pos) und *H. pylori* negativen Probanden (HP neg) im Antrum (A) und im Corpus (B). Das Expressionslevel der *H. pylori* negativen Probanden wurde auf einen Wert von 1 gesetzt. Die dargestellten Ergebnisse sind Durchschnittswerte (\pm Standard deviation). * $p < 0,05$. *H. pylori* = *Helicobacter pylori*; p = Signifikanzwert.

3.5 Gastrale Hepcidin- und IL6-Expression nach Eradikationstherapie

Um zu bestätigen, dass die beobachtete erhöhte Hepcidinexpression durch die *H. pylori*-Infektion bedingt wurde, sollten die Expressionslevel nach Eradikation des Erregers bestimmt werden.

Von den 13 initial untersuchten *H. pylori* positiven Patienten entschied sich ein Patient gegen eine Eradikationstherapie. Drei weitere Patienten erhielten zwar eine Tripletherapie, erschienen jedoch nicht zur Kontrolluntersuchung. Für den Vergleich zwischen den Hepcidinexpressionen der ersten und zweiten Gastroskopie standen somit Proben von neun Patienten zur Verfügung.

Unter diesen neun Patienten waren drei Patienten therapierefraktär. Diese Patienten waren also auch nach erfolgter Eradikationstherapie noch *H. pylori* positiv (siehe Abb. 10)

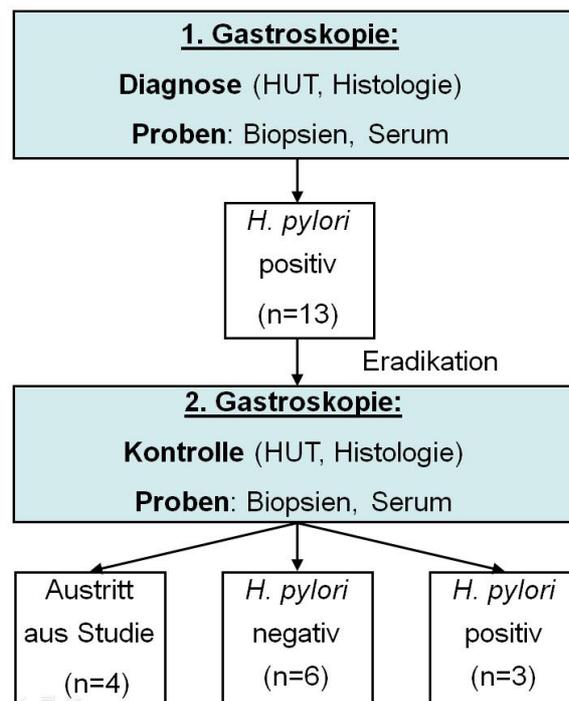


Abb. 10: Studienaufbau zur Untersuchung der Hepcidinexpressionslevel vor und nach Eradikationstherapie. HUT= Helicobacter Urease Test; *H. pylori* = *Helicobacter pylori*; n = Anzahl.

Nach erfolgreicher Eradikation verringerte sich die Hepcidinexpression in Biopsien des Antrums um den Faktor 3,35 ($1,00 \pm 0,42$ vs. $0,30 \pm 0,06$, $p < 0,01$) (Abb. 11).

Der Unterschied zwischen den Hepcidinexpressionsleveln vor und nach Eradikationstherapie war hier deutlich signifikant.

Bei den Corpusbiopsien erfolgreich eradizierter Patienten kam es nach Therapie zu einem Abfall der Hepcidinexpression um den Faktor 4 ($1,00 \pm 1,08$ vs. $0,24 \pm 0,15$, $p < 0,15$) (Abb. 11). Der Unterschied zwischen den Hepcidinexpressionsleveln war nicht signifikant.

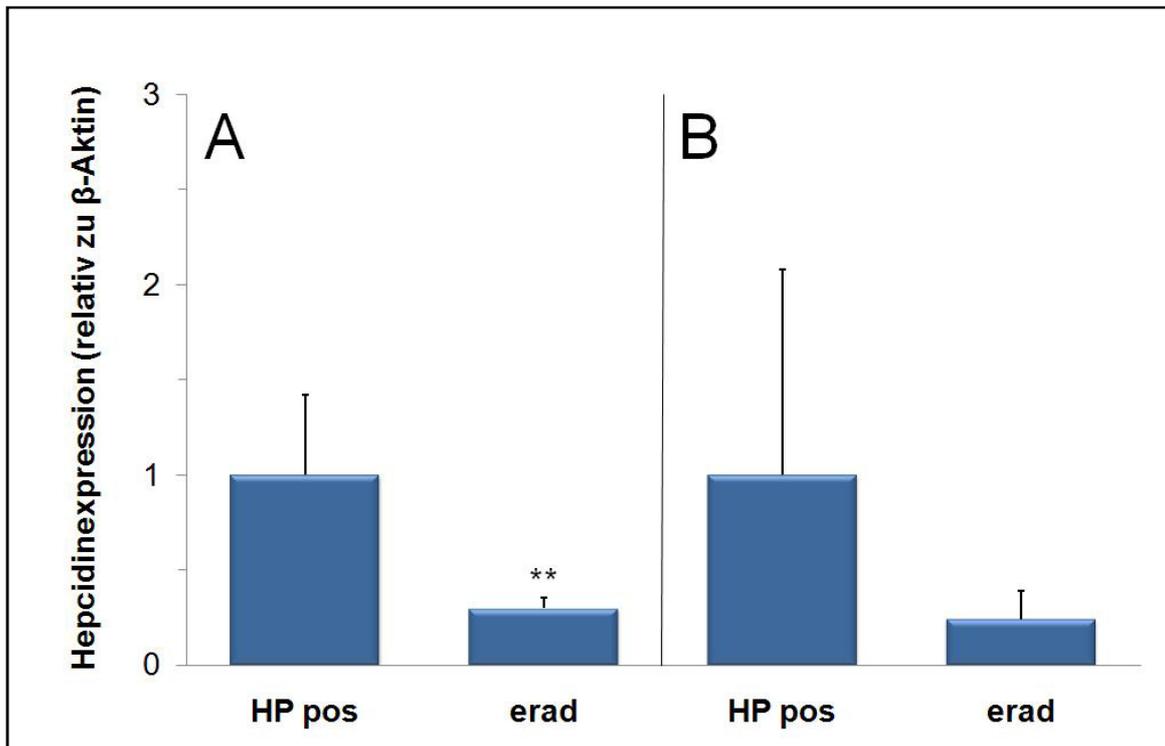


Abb. 11: Gastrale Hepcidinexpressionslevel vor (HP pos) und nach Eradikationstherapie (erad) bei erfolgreich therapierten Patienten im Antrum (A) und im Corpus (B). Das Expressionslevel vor Eradikation wurde auf einen Wert von 1 gesetzt. Die dargestellten Ergebnisse sind Durchschnittswerte (\pm Standard deviation). ** $p < 0,01$. p = Signifikanzwert.

In den Antrum- und Corpusproben von Patienten mit Therapieversagen verringerte sich die Hepcidinexpression zwischen der ersten Gastroskopie nicht signifikant (Antrum: $1,00 \pm 0,77$ vs. $0,60 \pm 0,38$, $p < 0,5$; Corpus: $1,00 \pm 0,79$ vs. $1,08 \pm 0,70$, $p < 0,95$) (Abb. 12).

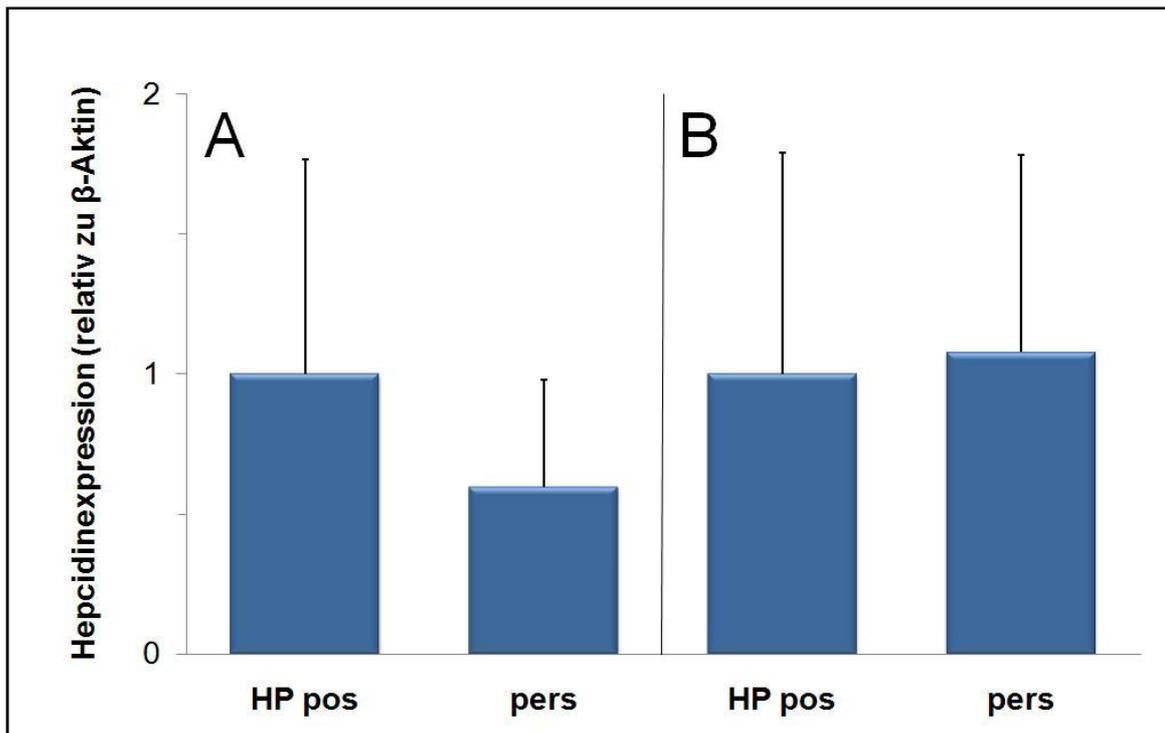


Abb. 12: Gastrale Hepcidinexpressionslevel vor (HP pos) und nach Eradikationstherapie (pers) bei therapierefraktären Patienten im Antrum (A) und im Corpus (B). Das Expressionslevel vor Eradikation wurde auf einen Wert von 1 gesetzt. Die dargestellten Ergebnisse sind Durchschnittswerte (\pm Standard deviation).

Um zu untersuchen, ob der beobachtete Abfall der Hepcidinexpressionslevel durch einen Rückgang der Entzündung bedingt ist, wurde neben der Hepcidinexpression auch die IL6-Expression nach Eradikationstherapie bestimmt.

In Antrumproben erfolgreich therapierter Patienten fiel die IL6-Expression vom Zeitpunkt der ersten Gastroskopie bis zur Kontrollgastroskopie um das 3,3 fache ab. Die Werte waren somit tendenziell verringert, jedoch nicht signifikant ($1,00 \pm 0,89$ vs. $0,30 \pm 0,20$, $p < 0,1$) (Abb. 13).

In den Corpusproben dieser Patienten verminderte sich die IL6-Expression deutlich um den Faktor 1,93. Auch hier waren die Unterschiede zwischen den IL6-Expressionswerten vor und nach Eradikation noch nicht signifikant ($1,00 \pm 1,01$ vs. $0,52 \pm 0,45$, $p < 0,35$) (Abb. 13).

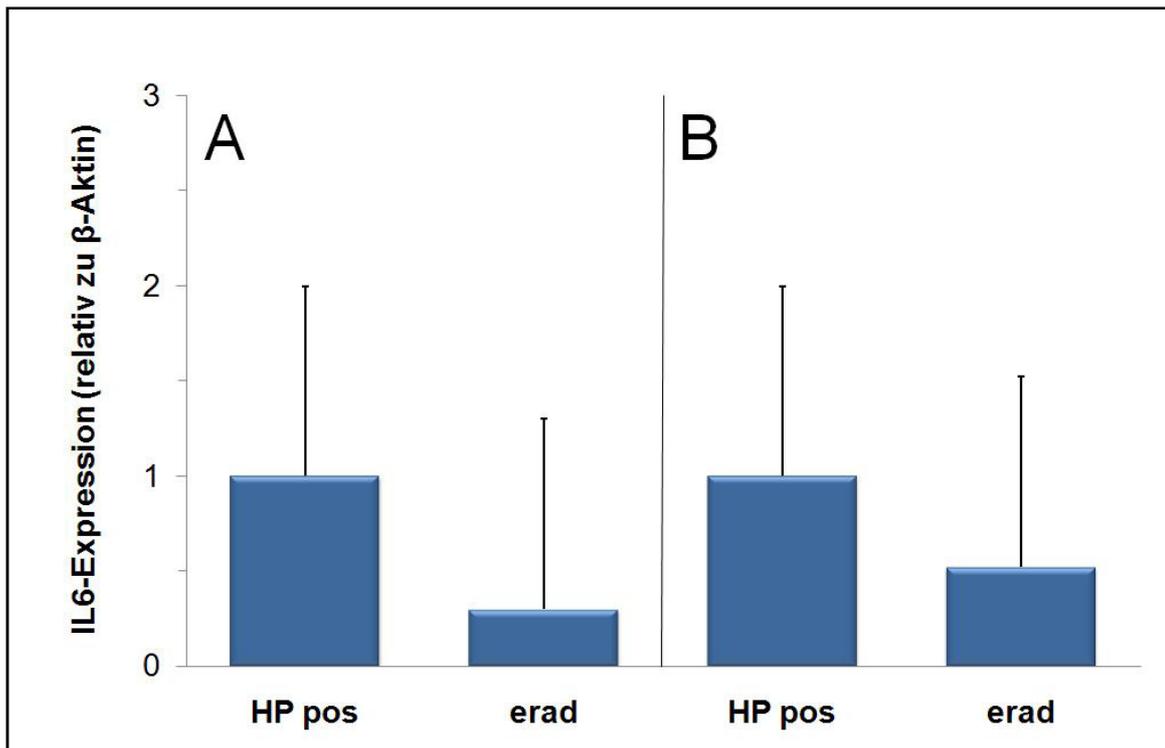


Abb. 13: Gastrale Interleukin 6-Expressionslevel (IL6) vor (HP pos) und nach Eradikationstherapie (erad) bei erfolgreich therapierten Patienten im Antrum (A) und im Corpus (B). Das Expressionslevel vor Eradikation wurde auf einen Wert von 1 gesetzt. Die dargestellten Ergebnisse sind Durchschnittswerte (\pm Standard deviation).

In den Proben therapierefraktärer Patienten war sowohl in den Antrum-, als auch in den Corpusproben keine Änderung der IL6-Expression zu beobachten (Antrum: $1,00 \pm 0,39$ vs $1,13 \pm 0,60$, $p < 0,8$; Corpus: $1,00 \pm 0,05$ vs. $1,17 \pm 0,94$, $p < 0,8$) (Abb. 14).

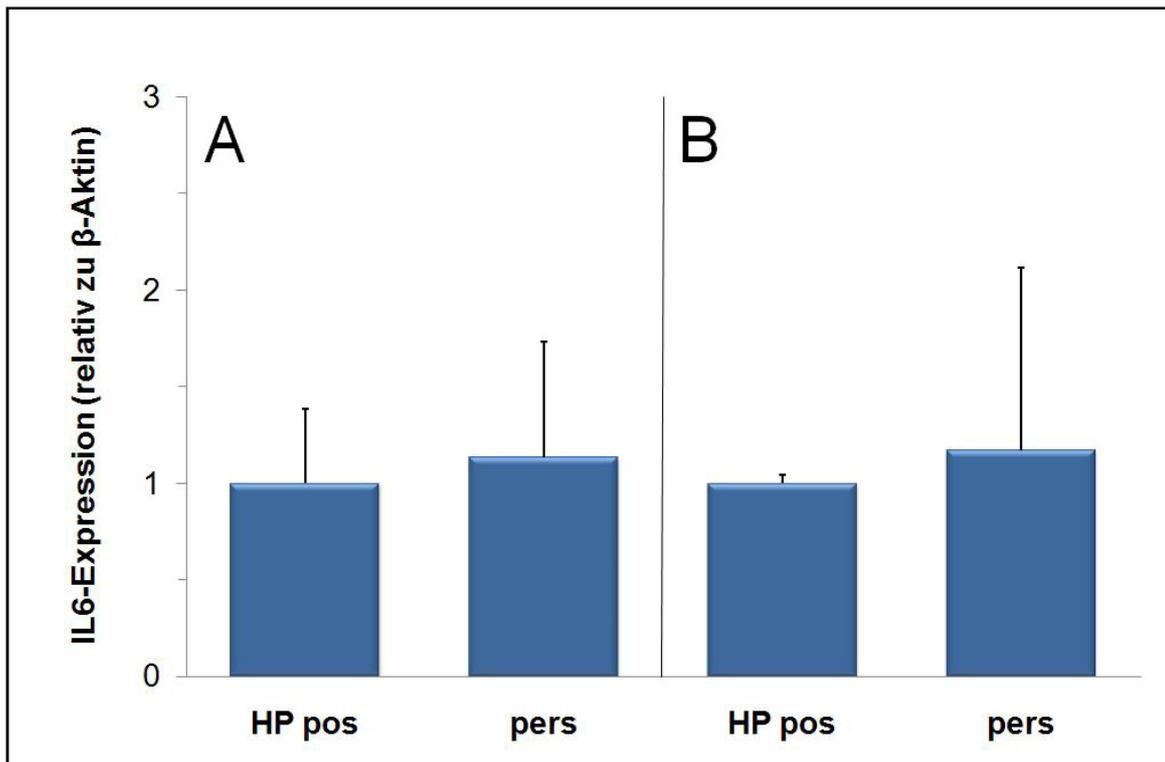


Abb. 14: Gastrale Interleukin 6-Expressionslevel (IL6) vor (HP pos) und nach Eradikationstherapie (pers) bei therapierefraktären Patienten im Antrum (A) und im Corpus (B). Das Expressionslevel vor Eradikation wurde auf einen Wert von 1 gesetzt. Die dargestellten Ergebnisse sind Durchschnittswerte (\pm Standard deviation).

3.6 Einfluss der gastralen Hepcidinexpression auf die Hepcidin- und Prohepcidinkonzentration im Serum

Durch Bestimmung der Hepcidin- und Prohepcidinkonzentrationen im Serum sollte überprüft werden, ob die veränderte gastrale Hepcidinexpression einen Einfluss auf die systemisch zirkulierende Hepcidinkonzentration hat und zu Veränderungen im Serum-Hepcidinspiegel führt.

Die Hepcidin- und Prohepcidinserumkonzentrationen von *H. pylori* positiven Patienten vor und nach Eradikationstherapie, sowie von Patienten mit PPI-Einnahme wurden mit denen von Kontrollpatienten verglichen. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (siehe Abb. 15, Tab. 6).

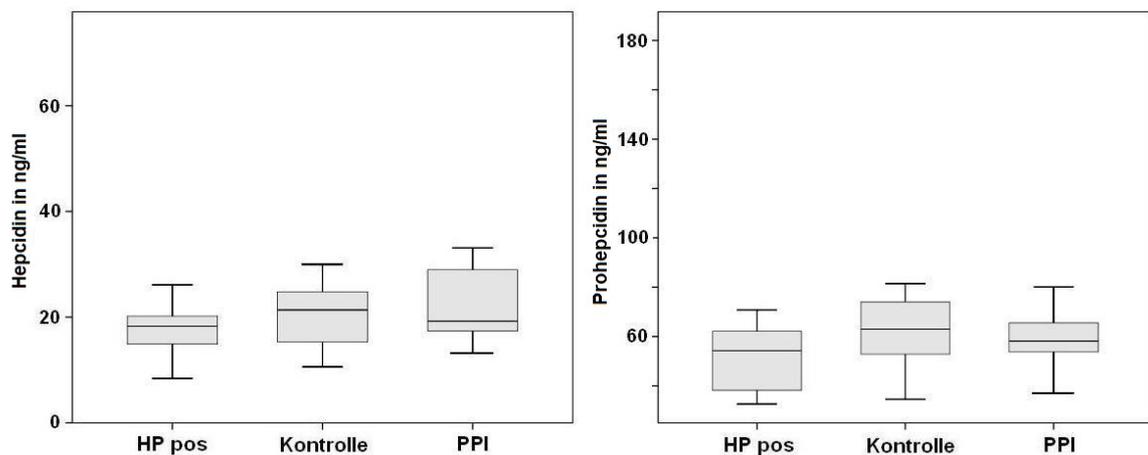


Abb. 15: Unterschiede der Hepcidin - und Prohepcidinserumkonzentration zwischen *Helicobacter pylori* positiven Patienten (HP pos), nicht infizierten Kontrollpatienten (Kontrolle) und Patienten mit Protonenpumpenhemmereinnahme (PPI). Die Boxplots zeigen den Median mit der ersten und dritten Perzentile. Die Antennen geben den jeweils höchsten bzw. niedrigsten Wert wieder.

Tab. 6: Unterschiede der Hepcidin- und Prohepcidinkonzentration. Die Signifikanz (2-seitig) ist mittels p-Wert dargestellt. *H. pylori* = *Helicobacter pylori*.

Unterschied zwischen	Signifikanz (2-seitig)	
	Hepcidin	Prohepcidin
<i>H. pylori</i> positiven Patienten vor Eradikation und der Kontrollgruppe	0,26	0,38
<i>H. pylori</i> positiven Patienten nach Eradikation und der Kontrollgruppe	0,17	0,16
Patienten mit Protonenpumpenhemmereinnahme und der Kontrollgruppe	0,84	0,27

Durch Bestimmung einer möglichen Korrelation zwischen gastralem Hepcidin und den Hepcidin- und Prohepcidinkonzentrationen im Serum sollten die oben dargestellten Ergebnisse überprüft werden.

Bei *H. pylori* positiven Patienten war tendenziell eine Beziehung zwischen der gastralen Hepcidinexpression im Corpus und Hepcidinkonzentration im Serum zu beobachten (**p=0,07**, Tab. 7). Bei Patienten mit PPI-Einnahme zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen der gastralen Hepcidinexpression im Antrum und der Prohepcidinkonzentration im Serum. Alle weiteren bestimmten Beziehungen zeigten keine Korrelationen zueinander (Tab. 7).

Tab. 7: Korrelation zwischen der Hepcidinexpression von Magenbiopsien und den Hepcidin- und Prohepcidinkonzentrationen im Serum in den unterschiedlichen Gruppen. Die Signifikanz (2-seitig) ist mittels p-Wert dargestellt. HP pos = *Helicobacter pylori* positive Patienten; PPI = Patienten mit Protonenpumpenhemmereinnahme; Kontrolle = Kontrollgruppe.

Biopsie	HP pos		PPI		Kontrolle	
	Antrum	Corpus	Antrum	Corpus	Antrum	Corpus
Hepcidin	0,25	0,07	0,18	0,40	0,81	0,38
Prohepcidin	0,80	0,98	0,03	0,73	0,83	0,56

4 Diskussion

Hepcidin ist ein Peptidhormon, welches antimikrobielle und eisenregulatorische Eigenschaften aufweist [74, 79]. Neben dem Hauptsyntheseort – der Leber – wird Hepcidin auch in zahlreichen extrahepatischen Geweben wie der Niere, dem Fettgewebe, dem Herzen, dem Pankreas, dem biliären System und dem Gehirn gebildet [8, 21, 47, 48, 49, 50, 62, 74, 92]. Kürzlich wurde auch in den Parietalzellen des Magens eine Hepcidinexpression nachgewiesen [86]. Allerdings war bisher unklar, ob auch das gastrale Hepcidin - wie bisher für alle untersuchten Organe gezeigt - einer Regulation durch Entzündung unterliegt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb untersucht werden, wie das gastrale Hepcidin bei einer durch *H. pylori* induzierten Entzündung reguliert wird. Zudem sollte ermittelt werden, ob Veränderungen in der gastralen Hepcidinexpression systemische Veränderungen in den Hepcidin- bzw. Prohepcidinkonzentrationen im Serum bewirken können.

***H. pylori* zur Untersuchung der Hepcidinregulation bei Infektion**

Die entzündungsbedingte Hepcidinregulation im Magen wurde an *H. pylori* infizierten Patienten untersucht. Eine Infektion durch *H. pylori* ist Magen-spezifisch und geht mit einer Gastritis einher [83, 85]. Mit diesem Erreger infizierte Patienten eignen sich deshalb hervorragend, um den Effekt einer lokal begrenzten Entzündung des Magens auf die gastrale Hepcidinexpression zu untersuchen. Gleichzeitig konnte in diesen Patienten der Einfluss der Hepcidinproduktion im Magen auf die Serumspiegel des Peptidhormons analysiert werden, da aufgrund der Magenspezifität der Infektion nicht von einem Einfluss auf andere Organe (und damit auf die Serumhepcidinkonzentration) auszugehen war. Dies ist von besonderem Interesse, da spekuliert werden kann, dass Eisenmangelanämien, welche zum Teil bei einer *H. pylori*-Infektion beobachtet werden [4, 7, 37, 38, 64], auf eine vermehrte Produktion von Hepcidin und dem daraus resultierenden Einfluß auf die (lokale) Eisenhomöostase zurückgehen.

Ausschlusskriterien

Da Hepcidin bekanntermaßen die Aufgabe eines Eisenregulators innehat [79], konnten Veränderungen in der gastralen Hepcidinexpression durch zu hohe bzw. zu niedrige Serumeisenwerte nicht ausgeschlossen werden. Desweiteren sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob das gastrale Hepcidin Veränderungen in den Hepcidin- und Prohepcidinkonzentrationen im Serum bewirken kann. Um diesbezüglich Aussagen machen zu können, war es wichtig Eisenstoffwechselveränderungen und damit verbundene Veränderungen des Hepcidin, die unabhängig von der *H. pylori* Infektion auftreten, im Voraus auszuschließen.

Hepcidin wurde in den Parietalzellen im Magen nachgewiesen [86]. Untersuchungen bezüglich einer Beeinflussung der gastralen Hepcidinexpression bei Veränderungen in der Magenschleimhaut wurden bisher nicht durchgeführt. Aufgrund dessen wurden Magenerkrankungen und eine Magenresektion in der Vorgeschichte als Ausschlusskriterien betrachtet.

Hepcidin wird hauptsächlich in der Leber gebildet [47, 48, 74] und bekanntermaßen sind viele Lebererkrankungen mit Veränderungen der Hepcidin Spiegel assoziiert. Eine Steatosis hepatis geht beispielsweise mit erhöhten Serumferritinleveln einher [103], was möglicherweise die Folge einer niedrigen Hepcidinexpression ist. Bei der Eisenspeicherkrankheit Hämochromatose und bei Alkoholabusus konnte eine erniedrigte hepatische Hepcidinexpression bereits nachgewiesen werden [34, 48]. Steatosis hepatis, Hämochromatose und Alkoholabusus können sich in der Leber in Form einer Leberzirrhose manifestieren. Patienten mit derartigen Erkrankungen wurden deshalb nicht in die Studie aufgenommen.

Kulaksiz et al. konnten zeigen, dass Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz erhöhte Prohepcidinwerte aufweisen, was vermuten lässt, dass die Niere am Metabolismus oder an der Ausscheidung von Prohepcidin beteiligt ist [48]. Bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz wird daher von falsch erhöhten Hepcidinexpressionsleveln ausgegangen, weswegen diese Patienten nicht in die Studie eingeschlossen wurden.

In Versuchen mit Hepcidin-WT-Mäusen konnten nach PPI-Injektion Veränderungen in der gastralen Hepcidinexpression beobachtet werden [86]. Da

am Menschen der Einfluss von PPI auf die gastrale Hepcidinexpression noch nicht untersucht worden ist und somit Veränderungen in der Hepcidinexpression nicht ausgeschlossen werden konnten, galt die vorherige Einnahme von PPI bei *H. pylori* positiven Patienten und der Kontrollgruppe in dieser Studie ebenfalls als Ausschlusskriterium.

Erhöhte gastrale Hepcidinexpression bei *H. pylori*-Infektion

Eine entzündungsbedingte Hochregulation der Hepcidinexpression in der Leber konnte *in vitro* bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen werden [53, 66, 71]. Auch im Magen wurde vor kurzem ein gesteigertes Hepcidinexpressionslevel nach Inkubation der Magenzelllinie AGS mit *H. pylori* beobachtet [86]. In der vorliegenden Arbeit wurde nun an Magenbiopsien von *H. pylori* infizierten Patienten untersucht, ob die *in vitro* beobachtete Hochregulation der gastralen Hepcidinexpression bei Infektion auch *in vivo* nachweisbar ist.

Ein direkter Vergleich zwischen Magenbiopsien *H. pylori* positiver Patienten und nicht infizierter Kontrollpatienten zeigte in den Magenbiopsien *H. pylori* positiver Patienten signifikant höhere Hepcidinexpressionslevel. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch im menschlichen Magen eine Hochregulation von Hepcidin durch *H. pylori*-Infektion stattfindet. Nach Abklingen der Infektion sollten demnach die erhöhten Hepcidinexpressionslevel wieder auf ein normales Niveau absinken. Tatsächlich war nach erfolgreicher Therapie ein eindeutiger Abfall der gastralen Hepcidinexpression zu beobachten, während die Hepcidinexpressionslevel bei therapierefraktären Patienten erhöht blieben. Damit konnten die Ergebnisse der *in vitro* Versuche in der vorliegenden Arbeit durch *in vivo* Versuche bestätigt werden.

IL6 induziert Hochregulation der gastralen Hepcidinexpression

Vorhergehende Studien konnten in verschiedenen Organen nachweisen, dass der Entzündungsmediator IL6 eine Induktion der Hepcidinexpression bewirkt [26, 53, 62, 66, 67, 70, 92, 94]. Vor kurzem konnte bei *in vitro* Versuchen der AG Kulaksiz auch in der Magenzelllinie AGS eine deutlich gesteigerte Hepcidinexpression nach IL6-Stimulation nachgewiesen werden [86].

In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob *in vivo* ein Zusammenhang zwischen der beobachteten Hochregulation der Hepcidinexpression und den IL6-Expressionsleveln im Magen besteht. Hierfür wurde die IL6-Expression von Magenbiopsien *H. pylori* positiver Patienten und nicht infizierter Kontrollpatienten, sowie die IL6-Expression von Magenbiopsien *H. pylori* positiver Patienten vor und nach Eradikation bestimmt und miteinander verglichen. Hierbei zeigten sich im Antrum gegenüber den Kontrollpatienten signifikant erhöhte IL6-Expressionslevel bei *H. pylori* positiven Patienten. Zudem konnte im Antrum nach erfolgreicher Eradikation ein tendenzieller Abfall der IL6-Expression beobachtet werden. Ähnlich verhielten sich die IL6-Expressionswerte auch im Corpus. Die Werte waren jedoch nicht signifikant, was möglicherweise durch die geringe Fallzahl und eine große Streuung der individuellen Expressionslevel bedingt ist.

Demnach zeigen sich bei *H. pylori*-Infektion gleichartige Veränderungen in den Hepcidinexpressionsleveln und den IL6-Expressionsleveln. Aufgrund dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass auch die gastrale Hepcidinexpression durch IL6 induziert wird [26, 53, 62, 66, 67, 71, 92, 94]. Die Entzündungsregulation im Magen scheint somit mit der Entzündungsregulation in den oben genannten Hepcidin exprimierenden Organen übereinzustimmen.

Untersuchungen zum Einfluss der PPI auf die gastrale Hepcidinexpression

Versuche mit Hepcidin-WT-Mäusen zeigten nach Injektion von PPI eine erhöhte gastrale Hepcidinexpression [86]. Untersuchungen an humanen Magenbiopsien wurden bis zum Zeitpunkt der Studie nicht durchgeführt. Gemäß den S3-Leitlinien sind PPI fester Bestandteil der Eradikationstherapie [28]. Da in der vorliegenden Arbeit auch Biopsien nach Eradikationstherapie entnommen wurden, sollte ein Einfluss dieser Medikamente auf die gastrale Hepcidinexpression untersucht werden.

Die gastralen Hepcidinexpressionslevel bei Patienten mit PPI-Einnahme und der Kontrollgruppe wiesen keine Unterschiede auf. Auch die Hepcidin- und Prohepcidinkonzentrationen im Serum unterschieden sich bei Patienten mit PPI-Einnahme und der Kontrollgruppe nicht. PPI scheinen demnach beim Menschen

weder im Magen direkt noch systemisch Einfluss auf die Hepcidinexpression zu haben.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch mit den oben beschriebenen Ergebnissen aus den Tierversuchen [86]. Diese Diskrepanz ist höchstwahrscheinlich auf Spezies-spezifische Unterschiede und möglicherweise den unterschiedlichen Gesundheitsstatus der gesunden WT-Mäuse vs. Patienten mit Beschwerden im Oberbauch zurückzuführen.

Gastrale Hepcidinexpression im Zusammenhang mit dem Eisenstoffwechsel

In der Leber ist Hepcidin als Hauptregulator des Eisenstoffwechsels bekannt [79]. Bei *in vitro* Versuchen mit der Magenzelllinie AGS konnte eine Regulation der gastralen Hepcidinexpression durch Eisen beobachtet werden [86]. *In vivo* lagen diesbezüglich noch keine Untersuchungen vor. Um auszuschließen, dass die beobachteten Veränderungen der Hepcidinexpression durch von der Norm abweichende Serumeisenwerte verursacht wurden, wurden in der vorliegenden Arbeit die Eisenwerte im Serum bestimmt. Hierbei konnte eine Beeinflussung der untersuchten Hepcidinexpressionslevel im Magen ausgeschlossen werden.

Ob es umgekehrt auch zu einer Regulation des Eisenstoffwechsels durch die gastrale Hepcidinexpression kommt, wurde bisher ebenfalls nicht untersucht.

Da jedoch Eisenmangelanämien in Verbindung mit *H. pylori*-Infektionen beobachtet werden [4, 38, 46, 56], kann spekuliert werden, dass die infektiobedingte Hochregulation der gastralen Hepcidinexpression zu systemischen Veränderungen wie einer Eisenmangelanämie führt. Derartige Vermutungen wurden bereits von Pellicano und Rizzetto geäußert [75]. Für eine Beteiligung des Eisenregulators Hepcidin spricht vor allem, dass nach erfolgreicher Eradikation von *H. pylori* eine Besserung der Eisenmangelanämie zum Teil sogar ohne Eisensubstitution nachgewiesen werden konnte [3, 18, 38]. Diese Tatsache könnte ausgehend von oben genannter Hypothese durch die Normalisierung der gastralen Hepcidinexpressionslevel nach Eradikation – wie sie in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte – erklärt werden. Der genaue Mechanismus dieser Regulation ist jedoch bisher unbekannt.

Um herauszufinden, ob Hepcidin bei der Entstehung der Eisenmangelanämie bei *H. pylori*-Infektion eine Rolle spielt, sollte in dieser Studie untersucht werden, ob sich die gastrale Hepcidinexpression und die Serumwerte von Prohepcidin, Hepcidin und Eisen *H. pylori* positiver Patienten mit Anämie von denen *H. pylori* positiver Patienten ohne Anämie unterscheidet. Da jedoch keine anämischen *H. pylori* infizierten Patienten gefunden werden konnten, war in dieser Studie lediglich die Untersuchung *H. pylori* positiver Patienten ohne Eisenmangelanämie möglich. Bei diesen Patienten waren trotz Hochregulation der Hepcidinexpression im Magen keine Veränderungen von Prohepcidin, Hepcidin und den Eisenwerten im Serum zu finden. Die vermehrte Produktion des gastralen Hepcidins allein scheint demnach nicht zu systemischen Veränderungen im Eisenstoffwechsel zu führen.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass im Magen Regulationsmechanismen existieren, welche entsprechend dem Alles-oder-nichts-Gesetz nur bei extremer Hochregulation der gastralen Hepcidinexpression zu einer systemischen Veränderung wie einer Eisenmangelanämie führen. Da je nach *H. pylori*-Stamm die klinische Manifestation der Infektion variiert [51, 76, 80], kann spekuliert werden, dass eine derart unverhältnismäßig hohe Hepcidinexpression durch spezielle *H. pylori*-Stämme ausgelöst wird. Dies könnte erklären, warum eine *H. pylori*-Infektion nur in manchen Fällen von einer Eisenmangelanämie begleitet wird. Die Hochregulation der gastralen Hepcidinexpression könnte zusätzlich durch eine intragastrale pH-Wert-Erhöhung induziert werden. Hierfür spricht eine Studie von Capurso et al., in welcher gezeigt werden konnte, dass Patienten mit *H. pylori*-Infektion und gleichzeitiger Eisenmangelanämie eine Corpusgastritis mit intragastraler pH-Wert-Erhöhung aufweisen [15]. Eine Hochregulation der gastralen Hepcidinexpression bei pH-Wert-Erhöhung des Magensaftes konnte von Seiten der Arbeitsgruppe Kulaksiz nachgewiesen werden [86]. Diese pH-Verschiebung könnte also zu einer weiteren Steigerung der Hepcidinproduktion im Magen führen.

Zur Verifizierung dieser Hypothesen sind jedoch weiterführende Studien notwendig. Hierbei könnte eine Differenzierung zwischen den unterschiedlichen *H. pylori*-Stämmen mehr Aufschluss über die Regulation des gastralen Hepcidin geben. Außerdem wäre eine gezielte Differenzierung zwischen Antrum-, Corpus-

bzw. Pangastritis der *H. pylori*-Infektion interessant, da je nach Befallsmuster Unterschiede in der Magensäuresekretion beschrieben werden [51, 85] und eine Beteiligung des gastralen Hepcidin an der Magensäureregulation nachgewiesen werden konnte [86].

Lokale Regulation von gastralem Hepcidin

Obwohl bei *H. pylori*-Infektion eine deutliche Hochregulation der gastralen Hepcidinexpression nachgewiesen werden konnte, zeigten sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe interessanterweise keine Unterschiede der Prohepcidin- und Hepcidinwerte, sowie der Eisenwerte im Serum. Bei der Berechnung der Korrelation zeigte sich tendenziell ein linearer Zusammenhang zwischen der Hepcidinserumkonzentration und der gastralen Hepcidinexpression im Corpus *H. pylori* positiver Patienten. Signifikante Werte zeigten sich jedoch nicht. Da beim Vergleich der Hepcidinserumkonzentrationen keine Unterschiede zu beobachten waren, kann letztlich davon ausgegangen werden, dass gastrales Hepcidin nur eine parakrine Wirkung hat und nicht in die Blutbahn abgegeben wird.

Bei Patienten mit PPI-Einnahme konnte keine veränderte gastrale Hepcidinexpression im Vergleich zu den Kontrollpatienten nachgewiesen werden. So steht auch die deutliche Beziehung zwischen den Prohepcidinserumkonzentrationen und der gastralen Hepcidinexpression im Antrum nicht im Widerspruch mit den restlichen Ergebnissen, die keine Unterschiede in der Prohepcidinserumkonzentration von Patienten mit PPI-Einnahme und den Kontrollpatienten gezeigt haben.

Zusammenfassend scheint demnach kein direkter Zusammenhang zwischen den gastralen Hepcidinexpressionsleveln und den untersuchten Parametern im Serum zu bestehen.

Hinsichtlich der Hepcidin- und Prohepcidinkonzentrationen zeigten frühere Studien vergleichbare Ergebnisse. Cherian et al. und Lee et al. untersuchten die Auswirkung der *H. pylori*-Infektion auf die systemische Hepcidin- bzw. Prohepcidinkonzentration und konnten diesbezüglich keine Veränderungen im Serum nachweisen [17, 54]. In diesen Studien wurden jedoch ausschließlich

Hepcidin- und Prohepcidinkonzentrationen in Urin und Serum bestimmt. Eine Hepcidinexpression im Magen ist erst zu einem späteren Zeitpunkt nachgewiesen worden [86]. Eine lokale Regulation von Hepcidin durch *H. pylori*, wie sie in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde, passt zu Beobachtungen im Herzen, wo ebenfalls eine lokale, gewebespezifische Regulation von Hepcidin nachgewiesen werden konnte [62]. Systemische Veränderungen durch gastrales Hepcidin konnten bis zum heutigen Zeitpunkt nicht nachgewiesen werden. Es fehlen jedoch Untersuchungen hinsichtlich der gastralen Hepcidinexpression bei *H. pylori* positiven Patienten mit Eisenmangelanämie, bei welchen eine Beeinflussung des Eisenstoffwechsels durch gastrales Hepcidin ohne weiterführende Studien nicht sicher ausgeschlossen werden kann.

Da Hepcidin auch in humanem Magensaft zu finden ist [86], wäre es denkbar, dass Hepcidin, welches ins Magenlumen sezerniert wird, mit dem Magensaft ins Duodenum gelangt und dort über den Transporter DMT1 in den Eisenstoffwechsel eingreift. Eine Rolle von Hepcidin bei der Internalisierung von DMT1 konnte kürzlich gezeigt werden [10]. Dabei ist am ehesten von einer Feinregulierung durch Hepcidin aus dem Magen auszugehen, da der über den Darm aufgenommene Eisenanteil nur einen Bruchteil des gesamten Eisenpools im Körper ausmacht. Zur Klärung dieser Hypothese sind jedoch weiterführende Studien nötig.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die hier vorliegende Arbeit dazu beitragen konnte, die Regulation von Hepcidin im Magen weiter aufzuklären und die *in vitro* Befunde *in vivo* zu bestätigen. Eine Rolle von Hepcidin bei der Entstehung von *H. pylori*-assoziierten Eisenmangelanämien ist denkbar, konnte allerdings aufgrund des Fehlens geeigneter Patienten nicht nachgewiesen werden.

5 Zusammenfassung

Hepcidin ist der Hauptregulator des Eisenstoffwechsels. Es wird als antimikrobielles Peptid in zahlreichen Organen exprimiert. *In vitro* konnte anhand der humanen Magenzelllinie AGS eine Hochregulation der Hepcidinexpression bei Infektion mit *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde nun *in vivo* die Regulation des gastralen Hepcidin bei Infektion untersucht.

Hierbei konnte bei *H. pylori* infizierten Patienten eine signifikant erhöhte Hepcidinexpression nachgewiesen werden. Nach erfolgreicher Therapie normalisierten sich die gastralen Hepcidinexpressionslevel wieder, bei therapierefraktären Patienten blieben die gastralen Hepcidinlevel jedoch erhöht. Durch diese Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass die beobachtete Hochregulation der gastralen Hepcidinexpression durch *H. pylori* bedingt ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Hepcidinexpression im Magen durch die entzündungsbedingte Hochregulation von Interleukin 6 verursacht wird.

Eine Auswirkung des Hepcidin im Magen auf die Hepcidin- und Prohepcidinkonzentration im Serum wurde nicht beobachtet, weswegen primär von einer lokalen Regulation des gastralen Hepcidin ausgegangen wird.

Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch in der Eradikationstherapie enthaltene Protonenpumpenhemmer und durch Serumeisenwerte konnte ausgeschlossen werden.

In dieser Studie konnten *in vitro* gezeigte Ergebnisse *in vivo* bestätigt werden. Somit konnte die vorliegende Arbeit dazu beitragen, die Regulation des gastralen Hepcidin bei Infektion weiter aufzuklären.

6 Literatur

- 1 Ahmad KA, Ahmann JR, Migas MC, Waheed A, Britton RS, Bacon BR, Sly WS, Fleming RE: Decreased liver hepcidin expression in the Hfe knockout mouse. *Blood Cells Mol Dis* 29: 361-366 (2002)
- 2 Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M: Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 940-959 (2001)
- 3 Annibale B, Marignani M, Monarca B, Antonelli G, Marcheggiano A, Martino G, Mandelli F, Caprilli R, Delle Fave G: Reversal of iron deficiency anemia after *Helicobacter pylori* eradication in patients with asymptomatic gastritis. *Ann Intern Med* 131: 668-672 (1999)
- 4 Annibale B, Capurso G, Lahner E, Passi S, Ricci R, Maggio F, Delle Fave G: Concomitant alterations in intragastric pH and ascorbic acid concentration in patients with *Helicobacter pylori* gastritis and associated iron deficiency anaemia. *Gut* 52: 496-501 (2003)
- 5 Ashorn M: Acid and iron-disturbances related to *Helicobacter pylori* infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 38: 137-139 (2004)
- 6 Bacon BR: Hemochromatosis: diagnosis and management. *Gastroenterology* 120: 718-725 (2001)
- 7 Barabino A, Dufour C, Marino CE, Claudiani F, De Alessandri A: Unexplained refractory iron-deficiency anemia associated with *Helicobacter pylori* gastric infection in children: further clinical evidence. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 28: 116-119 (1999)
- 8 Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, Ramesh B, Iannelli A, Staccini-Myx A, Casanova D, Ben Amor I, Saint-Paul MC, Huet PM, Sadoul JL, Gugenheim J, Srai SK, Tran A, Le Marchand-Brustel Y: Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 131: 788-796 (2006)

- 9 Bezwoda W, Charlton R, Bothwell T, Torrance J, Mayet F: The importance of gastric hydrochloride acid in the absorption of nonheme food iron. *J Lab Clin Med* 1: 108-116 (1978)
- 10 Brasse-Lagnel C, Karim Z, Letteron P, Bekri S, Bado A, Beaumont C: Intestinal DMT1 cotransporter is down-regulated by hepcidin via proteasome internalization and degradation. *Gastroenterology* 140: 1261-1271 (2011)
- 11 Breuer T, Sudhop T, Hoch J, Sauerbruch T, Malfertheiner P: Prevalence of and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in the western part of Germany. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 8: 47-52 (1996)
- 12 Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, Dixon JL, Purdie DM Crawford DH, Subramaniam VN, Powell LW, Anderson GJ, Ramm GA: Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet* 361: 669-673 (2003)
- 13 Brinton LA, Gridley G, Hrubec Z, Hoover R, Fraumeni JF Jr.: Cancer risk following pernicious anaemia. *Br J Cancer* 59: 810-813 (1989)
- 14 Brittenham GM: New advances in iron metabolism, iron deficiency, and iron overload. *Curr Opin Hematol* 1: 101-106 (1994)
- 15 Capurso G, Lahner E, Marcheggiano A, Caruana P, Carnuccio A, Bordi C, Delle Fave G, Annibale B: Involvement of the corporal mucosa and related changes in gastric acid secretion characterize patients with iron deficiency anaemia associated with *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 15: 1753-1761 (2001)
- 16 Champagne ET: Low gastric hydrochloric acid secretion and mineral bioavailability. *Adv Exp Med Biol* 249: 173-184 (1989)
- 17 Cherian S, Forbes DA, Cook AG, Sanfilippo FM, Kemna EH, Swinkels DW, Burgner DP: An insight into the relationships between hepcidin, anemia, infections and inflammatory cytokines in pediatric refugees: a cross-sectional study. *PLoS One* 3: e4030 (2008)

- 18 Choe YH, Kim SK, Son BK, Lee DH, Hong YC, Pai SH: Randomized placebo-controlled trial of *Helicobacter pylori* eradication for iron-deficiency anemia in preadolescent children and adolescents. *Helicobacter* 4: 135-139 (1999)
- 19 Collins HL: The role of iron in infections with intracellular bacteria. *Immunol Lett* 85: 193-195 (2003)
- 20 Cunningham R, Dale B, Undy B, Gaunt N: Proton pump inhibitors as a risk factor for *Clostridium difficile* diarrhoea. *J Hosp Infect* 54: 243-245 (2003)
- 21 Ding H, Yan CZ, Shi H, Zhao YS, Chang SY, Yu P, Wu WS, Zhao CY, Chang YZ, Duan XL: Hepcidin is involved in iron regulation in the ischemic brain. *PLoS One* 6: e25324 (2011)
- 22 Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC: The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell metabolism* 1: 191-200 (2005)
- 23 DuBois S, Kearney DJ: Iron-deficiency anemia and *Helicobacter pylori* infection: a review of the evidence. *Am J Gastroenterol* 100: 453-459 (2005)
- 24 El-Omar EM, Penman ID, Ardill JE, Chittajallu RS, Howie C, McColl KE: *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. *Gastroenterol* 109: 681-691 (1995)
- 25 Evstatiev R, Gasche C: Iron sensing and signalling. *Gut* 61: 933-952 (2012)
- 26 Fein E, Merle U, Eehalt R, Herrmann T, Kulaksiz H: Regulation of hepcidin in HepG2 and RINm5F cells. *Peptides* 28: 951-957 (2007)
- 27 Fellermann K, Stange EF: Defensins – innate immunity at the epithelial frontier. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13: 771-776 (2001)
- 28 Fischbach W, Malfertheiner P, Hoffmann JC, Bolten W, Bornschein J, Götze O, Höhne W, Kist M, Koletzko S, Labenz J, Layer P, Miehle S, Morgner A, Peitz U, Preiss J, Prinz C, Rosien U, Schmidt W, Schwarzer A, Suerbaum S, Timmer A, Treiber G, Vieth M: S3-guideline "helicobacter

- pylori and gastroduodenal ulcer disease" of the German society for digestive and metabolic diseases (DGVS) in cooperation with the German society for hygiene and microbiology, society for pediatric gastroenterology and nutrition e. V., German society for rheumatology, AWMF-registration-no. 021 / 001. *Z Gastroenterol* 47: 1230-1263 (2009)
- 29 Fleming MD, Trenor CC 3rd, Su MA, Foernzler D, Beier DR, Dietrich WF, Andrews NC: Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* 16: 383-386 (1997)
 - 30 Friis-Hansen L, Rieneck K, Nilsson HO, Wadström T, Rehfeld JF: Gastric inflammation, metaplasia, and tumor development in gastrin-deficient mice. *Gastroenterology* 131: 246-258 (2006)
 - 31 Ganz T: Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 102: 783-788 (2003)
 - 32 Ganz T: Heparin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 29-35 (2006)
 - 33 Giannella RA, Broitman SA, Zamcheck N: Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies in vivo and in vitro. *Gut* 13: 251-256 (1972)
 - 34 Harrison-Findik DD, Schafer D, Klein E, Timchenko NA, Kulaksiz H, Clemens D, Fein E, Andriopoulos B, Pantopoulos K, Gollan J: Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J Biol Chem* 281: 22974-22982 (2006)
 - 35 Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC: Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117: 285-297 (2004)
 - 36 Herold G: *Innere Medizin*. Dr. med Gerd Herold, Köln, S. 474-475 (2006)
 - 37 Hershko C, Ianculovich M, Souroujon M: A hematologist's view of unexplained iron deficiency anemia in males: impact of *Helicobacter pylori* eradication. *Blood Cells Mol Dis* 38: 45-53 (2007)

- 38 Hershko C, Ronson A: Iron deficiency, Helicobacter infection and gastritis. *Acta Haematol* 122: 97-102 (2009)
- 39 Howden CW, Hunt RH: Relationship between gastric secretion and infection. *Gut* 28; 96–107 (1987)
- 40 Hsing AW, Hansson LE, McLaughlin JK, Nyren O, Blot WJ, Ekblom A, Fraumeni JF Jr: Pernicious anemia and subsequent cancer. A population-based cohort study. *Cancer* 71: 745-750 (1993)
- 41 Jablonowski H, Hengels KJ, Kraemer N, Geis G, Opferkuch W, Strohmeyer G: Effects of Helicobacter pylori on histamine and carbachol stimulated acid secretion by human parietal cells. *Gut* 35: 755-757 (1994)
- 42 Jurado RL: Iron, infections and anemia of inflammation. *Clin Infect Dis* 25: 888-895 (1997)
- 43 Kanno T, Matsuki T, Oka M, Utsunomiya H, Inada K, Magari H, Inoue I, Maekita T, Ueda K, Enomoto S, Iguchi M, Yanaoka K, Tamai H, Akimoto S, Nomoto K, Tanaka R, Ichinose M: Gastric acid reduction leads to an alteration in lower intestinal microflora. *Biochem Biophys Res Commun* 381: 666–670 (2009)
- 44 Karow T, Lang-Roth R: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Thomas Karow, Pulheim, S. 386-389 (2005)
- 45 Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, van der Hoeven H, Swinkels D: Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood* 106: 1864-1866 (2005)
- 46 Konturek SJ, Konturek PC, Pieniazek P, Bielanski W: Role of Helicobacter pylori infection in extragastrointestinal disorders: introductory remarks. *J Physiol Pharmacol* 50: 683-694 (1999)
- 47 Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, Adermann K: LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Letters* 480: 147-150 (2000)

- 48 Kulaksiz H, Gehrke SG, Janetzko A, Rost D, Bruckner T, Kallinowski B, Stremmel W: Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut* 53: 735-743 (2004)
- 49 Kulaksiz H, Theilig F, Bachmann S, Gehrke SG, Rost D, Janetzko A, Cetin Y, Stremmel W: The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrinology* 184: 361-370 (2005)
- 50 Kulaksiz H, Fein E, Redecker P, Stremmel W, Adler G and Yalcin C: Pancreatic β -cells express hepcidin, an iron-uptake regulatory peptide. *J Endocrinology* 197: 241-249 (2008)
- 51 Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 19: 449-490 (2006)
- 52 Lee P, Peng H, Gelbart T, Beutler E: The IL-6- and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE-, transferrin receptor 2-, and beta 2-microglobulin-deficient hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9263-9265 (2004)
- 53 Lee P, Peng, H, Gelbart T, Wang L, Beutler E: Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 1906-1910 (2005)
- 54 Lee SY, Song EY, Yun YM, Yoon SY, Cho YH, Kim SY, Lee MH: Serum prohepcidin levels in *Helicobacter pylori* infected patients with iron deficiency anemia. *Korean J Intern Med* 25: 195-200 (2010)
- 55 Logan RP, Walker MM: ABC of the upper gastrointestinal tract: Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Br Med J* 323: 920-922 (2001)
- 56 Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ: Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 56: 772-781 (2007)

- 57 Marshall BJ, Warren JR: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1: 1311-1315 (1984)
- 58 Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ: Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust* 142: 436-439 (1985)
- 59 McColl KE, El-Omar EM, Gillen D: Alterations in gastric physiology in *Helicobacter pylori* infection: causes of different diseases or all epiphenomena? *Ital J Gastroenterol Hepatol* 29: 459-464 (1997)
- 60 Mc Kie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW, Simpson RJ: A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 5: 299-309 (2000)
- 61 McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Shirali S, Hediger MA, Farzaneh F, Simpson RJ: An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 291: 1755-1759 (2001)
- 62 Merle U, Fein E, Gehrke SG, Stremmel W, Kulaksiz H: The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation. *Endocrinology* 148: 2663-2668 (2007)
- 63 Morris A, Nicholson G: Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am J Gastroenterol* 82: 192-199 (1987)
- 64 Moyaert H, Franceschi F, Roccarina D, Ducatelle R, Haesebrouck F, Gasbarrini A: Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection: other *Helicobacters*. *Helicobacter* 13: 47-57 (2008)
- 65 Muckenthaler M, Roy CN, Custodio AO, Minana B, deGraaf J, Montross LK, Andrews NC, Hentze MW: Regulatory defects in liver and intestine implicate abnormal hepcidin and *Cybrd1* expression in mouse hemochromatosis. *Nat Genet* 34: 102-107 (2003)

- 66 Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T: Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 101: 2461-2463 (2003)
- 67 Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T: IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 113: 1271-1276 (2004)
- 68 Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J: Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306: 2090-2093 (2004)
- 69 Nemeth E, Roetto A, Garozzo G, Ganz T, Camaschella C: Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood* 105: 1803-1806 (2005)
- 70 Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, Siritto M, Sawadogo M, Kahn A, Vaulont S: Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4596-4601 (2002)
- 71 Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S: The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia and inflammation. *J Clin Invest* 110: 1037-1044 (2002)
- 72 Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S: Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* 108: 3730-3735 (2006)
- 73 Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dubé MP, Andres L, MacFarlane J, Sakellaropoulos N, Politou M, Nemeth E, Thompson J, Risler JK, Zaborowska C, Babakaiff R, Radomski CC, Pape TD, Davidas O, Christakis J, Brissot P, Lockitch G, Ganz T, Hayden MR, Goldberg YP: Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 36: 77-82 (2004)
- 74 Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T: Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276: 7806-7810 (2001)

- 75 Pellicano R, Rizzetto M: Is hepcidin the bridge linking *Helicobacter pylori* and anemia of chronic infection? A research proposal. *Panminerva Med* 46: 165-169 (2004)
- 76 Perez-Perez GI, Peek RM, Legath AJ, Heine PR, Graff LB: The role of CagA status in gastric and extragastric complications of *Helicobacter pylori*. *J Physiol Pharmacol* 50: 833-845 (1999)
- 77 Pietrangelo A: Hereditary hemochromatosis – a new look at an old disease. *N Eng J Med* 350: 2383-2397 (2004)
- 78 Pietrangelo A: Hemochromatosis: an endocrine liver disease. *Hepatology* 46: 1291-1301 (2007)
- 79 Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loréal O: A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276: 7811-7819 (2001)
- 80 Piñeros DM, Riveros SC, Marin JD, Ricardo O, Diaz OO: *Helicobacter pylori* in gastric cancer and peptic ulcer disease in a Colombian population. Strain heterogeneity and antibody profiles. *Helicobacter* 6: 199-206 (2001)
- 81 Pohl D, Fox M, Fried M, Göke B, Prinz C, Mönnikes H, Rogler G, Dauer M, Keller J, Lippl F, Schiefke I, Seidler U, Allescher HD: Do we need gastric acid? *Digestion* 77: 184–197 (2008)
- 82 Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, Loukopoulos D, Camaschella C: Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 33: 21-22 (2003)
- 83 Sachs G, Wen Y, Scott DR: Gastric infection by *Helicobacter pylori*. *Curr Gastroenterol Rep* 11: 455-461 (2009)
- 84 Schade AL, Caroline L: An iron-binding component in human blood plasma. *Science* 104: 340 (1946)

- 85 Schubert ML: Gastric exocrine and endocrine secretion. *Current Opinion in Gastroenterology* 25: 1-8 (2009)
- 86 Schwarz P, Kübler JA, Strnad P, Müller K, Barth TF, Gerloff A, Feick P, Peyssonnaud C, Vaulont S, Adler G, Kulaksiz H: Hepcidin is localised in gastric parietal cells, regulates acid secretion and is induced by *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 61: 193-201 (2012)
- 87 Scott D, Weeks D, Melchers K, Sachs G: The life and death of *Helicobacter pylori*. *Gut* 43: 56-60 (1998)
- 88 Sharma VR, Brannon MA, Carloss EA: Effect of omeprazole on oral iron replacement in patients with iron deficiency anemia. *South Med J* 97: 887-889 (2004)
- 89 Skikne BS, Lynch SR, Cook JD: Role of gastric acid in food iron absorption. *Gastroenterology* 81: 1068-1071 (1981)
- 90 Stingl K, Uhlemann EM, Schmid R, Altendorf K, Bakker EP: Energetics of *Helicobacter pylori* and its implications for the mechanism of urease-dependent acid tolerance at pH 1. *J Bacteriol* 184: 3053-3060 (2002)
- 91 Stolte M: *Helicobacter pylori* gastritis and gastric MALT-lymphoma. *Lancet* 339: 745-746 (1992)
- 92 Strnad P, Schwarz P, Rasenach MC, Kucukoglu O, Habib RI, Heuberger D, Eehalt R, Müller MW, Stiehl A, Adler G, Kulaksiz H: Hepcidin is an antibacterial, stress-inducible peptide of the biliary system. *PLoS One* 6: e16454 (2011)
- 93 Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Noh SJ, Byrnes C, Bhupatiraju A, Lee YT, Goodnough JB, Harandi O, Ganz T, Paulson RF, Miller JL: Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood* 114: 181-186 (2009)
- 94 Theurl I, Theurl M, Seifert M, Mair S, Nairz M, Rumpold H, Zoller H, Bellmann-Weiler R, Niederegger H, Talasz H, Weiss G: Autocrine formation

- of hepcidin induces iron retention in human monocytes. *Blood* 111: 2392-2399 (2008)
- 95 Thorens J, Froehlich F, Schwizer W, Saraga E, Bille J, Gyr K, Duroux P, Nicolet M, Pignatelli B, Blum AL, Gonvers JJ, Fried M: Bacterial overgrowth during treatment with omeprazole compared with cimetidine: a prospective randomised double blind study. *Gut* 39: 54-59 (1996)
- 96 Trinder D, Fox C, Vautier G, Olynyk JK: Molecular pathogenesis of iron overload. *Gut* 51: 290-295 (2002)
- 97 Valore EV, Ganz T: Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol Dis* 40: 132-138 (2008)
- 98 Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GJ: Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet* 21: 195-199 (1999)
- 99 Wang F, Xia P, Wu F, Wang D, Wang W, Ward T, Liu Y, Aikhionbare F, Guo Z, Powell M, Liu B, Bi F, Shaw A, Zhu Z, Elmoselhi A, Fan D, Cover TL, Ding X, Yao X: *Helicobacter pylori* VacA disrupts apical membrane-cytoskeletal interactions in gastric parietal cells. *J Biol Chem* 283: 26714-26725 (2008)
- 100 Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC: Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood* 100: 3776-3781 (2002)
- 101 Williams C, McColl KE: Review article: proton pump inhibitors and bacterial overgrowth. *Aliment Pharmacol Ther* 23: 3-10 (2006)
- 102 Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ: Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286: 525-528 (1999)

- 103 Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Halpern Z, Oren R: NAFLD and hyperinsulinemia are major determinants of serum ferritin levels. *J Hepatol* 46: 700-707 (2007)

7 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Hasan Kulaksiz, der mir das Thema überlassen hat und mir während der Durchführung und Fertigstellung meiner Arbeit stets zur Seite stand.

Dank auch an Herrn Dr. med. Alfred Janetzko für die Zusammenarbeit bei der Bestimmung der Hecpidin- und Prohepcidinkonzentrationen im Serum.

Ein besonders großer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. rer. biol. hum. Peggy Schwarz, die bei Fragen und Problemen immer sofort zur Stelle war und mich über die ganze Zeit hinweg fachlich und moralisch bei meiner Doktorarbeit unterstützte.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. med. Mark Hänle für die Hilfsbereitschaft und Motivation während der Rekrutierung der Patienten und der Probeentnahme während der Gastroskopie danken.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, Regina Kübler und Dr. med. Wolfgang Kübler, die immer an mich geglaubt haben und mich unterstützt haben. Ebenso möchte ich mich bei meinem Freund Ulrich Kukulus bedanken, der während der Anfertigung der Doktorarbeit stets für mich da war. Danke vor allem auch für die Hilfe bei der Grafik- und Textbearbeitung und für das Korrekturlesen der Arbeit.

8 Lebenslauf

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.