Molekulare Mechanismen der *Helicobacter pylori*-Infektion: Rolle von gastrischen Epithelzellen und Granulozyten

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.),

genehmigt durch

die Fakultät für Naturwissenschaften

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biologin Steffi Gieseler

geb. am: 18.10.1975 in Burg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Wolfgang König

2. Prof. Dr. rer. nat. Rainer Haas

3. Prof. Dr. med. Peter Malfertheiner

Eingereicht am: 25.10.2005

Verteidigung am: 14.06.2006

In liebevoller Erinnerung an meine Oma,

Elisabeth Helm

Ein Teil dieser Arbeit wurde unter folgendem Titel veröffentlicht:

Gieseler, S., König, B., König, W. und Backert, S. (2005) Strain-specific expression profiles of virulence genes in *Helicobacter pylori* during infection of gastric epithelial cells and granulocytes. *Microbes Infect*. **7**, 437-447.

Inhaltsverzeichnis

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 1

2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS 3

3. TABELLENVERZEICHNIS 5

4. ZUSAMMENFASSUNG 6

5. EINLEITUNG 8

5.1 Pathogenese der *Helicobacter pylori*-Infektion 8

5.1.1 Epidemiologie 8

5.1.2 Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori* 9

5.1.3 Wechselwirkung von *H. pylori* mit Zielzellen 11

5.2 Das angeborene Immunsystem 14

5.2.1 Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs) 14

5.2.2 Die Rolle von polymorphkernigen Leukozyten (PMNs) 17

5.3 Zielstellung der Arbeit 20

6. MATERIAL UND METHODEN 21

6.1 Chemikalien, Antibiotika, Oligonukleotide und Enzyme 21

6.2 Mikroorganismen 21

6.2.1 Herkunft der *Helicobacter pylori*-Stämme 21

6.6.2 Herkunft der E. coli-Stämme 22

6.3 Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien 23

6.3.1 *Helicobacter*-Platten 23

6.3.2 *Helicobacter*-Flüssigmedium 24

6.3.3 Selektive *Luria Broth*-Platten (LB-Platten) 24

6.3.4 *Luria Broth*-Medium (LB-Medium) 24

6.4 Aktivatoren 24

6.5 Inhibitoren 25

6.6 PCR-Oligonukleotide 25

6.6.1 Oligonukleotide zur Typisierung von *H. pylori* 25

6.6.2	Standard-Fingerprint-(RAPD)-PCR-Primer	27
6.6.3	Oligonukleotide zur Amplifikation von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs)	27
6.6.4	Oligonukleotide zur Amplifikation des Haushaltgens GAPDH	27
6.6.5	CpG-DNA-Oligonukleotide	27
6.7	**Kultivierung von eukaryotischen Zellen**	28
6.7.1	Kultivierung von Magenkarzinomzellen (AGS-Zellen)	28
6.7.2	Isolierung von polymorphkernigen Leukozyten (PMNs)	28
6.7.3	Transfektion eukaryotischer Zellen	28
6.8	**Mikrobiologische Methoden**	29
6.8.1	Infektion von Zelllinien mit *H. pylori*	29
6.8.2	Infektion von PMNs mit *H. pylori*	29
6.8.3	Lebendzellzahlbestimmung	30
6.8.4	Mikroskopische Methoden	30
6.9	**Molekularbiologische Methoden**	30
6.9.1	DNA-Isolierung	30
6.9.2	RNA-Isolierung	30
6.9.3	Agarose-Gelelektrophorese	31
6.9.4	Polymerase-Kettenreaktion (Standard-PCR)	31
6.9.5	Fingerprint-(RAPD)-PCR	32
6.9.6	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	32
6.9.7	Quantitative Echtzeit-PCR	33
6.9.8	Klonierung von PCR-Produkten	37
6.9.9	Präparation des externen Standards für die Echtzeit-PCR	37
6.10	**Biochemische Methoden**	38
6.10.1	SDS-PAGE	38
6.10.2	Western Blot	39
6.11	**Immunologische Methoden**	40
6.11.1	ELISA	40
6.11.2	FACS-Analyse	40
6.12	**Statistische Analyse**	42

7. ERGEBNISSE 43

7.1. Genotypisierung von klinischen *H. pylori* Stämmen 43

7.2 Charakterisierung der Genregulation von *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren 46

7.2.1 Optimierung der Echtzeit-PCR am TaqMan 46

7.2.2 Genexpression von *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren während der Kultivierung mit Magenepithelzellen 47

7.2.3 Genexpression von *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren während der Kultivierung mit Granulozyten 50

7.3 Die Rolle der Magenkarzinom-Epithelzellen während der Interaktion mit *H. pylori* 55

7.3.1 Infektion von AGS-Zellen mit klinischen *H. pylori* Stämmen 55

7.3.2 Tyrosin-Phosphorylierung des bakteriellen CagA-Proteins durch AGS-Zellen 56

7.3.3 Freisetzung von Interleukin-8 (IL-8) durch AGS-Zellen 57

7.3.4 mRNA-Expression von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) in AGS-Zellen 58

7.3.5 Einfluß von *H. pylori*-Mutanten auf die Expression von TLR9 und TLR5 in AGS-Zellen 62

7.4 Die Rolle von Granulozyten während der Interaktion mit *H. pylori* 67

7.4.1 Charakterisierung der Infektion von PMNs mit *H. pylori* 67

7.4.2 Die Rolle des bakteriellen CagA-Proteins in PMNs 68

7.4.3 IL-8-Sekretion durch PMNs 69

7.4.4 mRNA-Expression von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) in PMNs 70

7.5 Infektion von PMNs mit *H. pylori* und Poststimulation mit verschiedenen Agonisten 74

7.5.1 Expression von Oberflächenmolekülen auf PMNs nach Präinkubation mit *H. pylori* und Postinkubation mit fMLP, PMA und NaF 74

7.5.2 Mediatorenfreisetzung von PMNs nach Infektion mit *H. pylori* und Postinkubation mit fMLP, PMA und NaF 79

7.5.3 Expression anderer Faktoren während der Infektion mit *H. pylori* und der Nachstimulation mit fMLP, PMA und NaF 82

8.	**DISKUSSION**	85
8.1	**Genregulation der *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren**	85
8.2	**Morphologische Veränderungen an humanen Zellen während der *H. pylori*-Infektion**	90
8.2.1	Induktion des Elongationsphänotyps an AGS-Zellen	90
8.2.2	Ausbildung homotypischer Zellaggregate durch PMNs	92
8.3	**Interleukin-8 (IL-8)-Sekretion**	93
8.4	**Erkennung von bakteriellen Strukturen mittels Toll-ähnlicher Rezeptoren (TLRs)**	95
8.4.1	Die Rolle von TLR2 und TLR4	95
8.4.2	Die Rolle von TLR5 und TLR9	99
8.5	**Die Rolle von PMN-spezifischen Oberflächenmolekülen während der Infektion mit *H. pylori***	101
8.5.1	L-Selektin CD62L	102
8.5.2	Chemokinrezeptor CXCR2	103
8.5.3	Integrin CD11b	104
8.5.4	fMLP-Rezeptor	105
8.6	**Die Rolle von IL-8 und Lipidmediatoren während der Infektion von PMNs mit *H. pylori***	106
8.7	**Phagozytose von *H. pylori* durch PMNs**	108
9.	**LITERATURVERZEICHNIS**	111
10.	**ANHANG**	134
11.	**DANKSAGUNG**	162
12.	**LEBENSLAUF**	164
13.	**PUBLIKATIONSLISTE**	165
14.	**ERKLÄRUNG**	166

1. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AGS	Zellinie; engl. *stomach; gastric adenocarcinoma*
Alp AB	engl. *adherence-associated lipoprotein A and B*
BabA	engl. *Leb blood group antigen binding adhesin A*
BHI	engl. *brain heart infusion*
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cagA	engl. cytotoxin-associated gene A
cDNA	engl. *copy DNA*
CD11b	Integrin
CD62L	L-Selektin
Cm^R	Chloramphenicol Resistenz
CXCR2	Chemokin-Rezeptor 2
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. *enzyme linked immuno sorbant assay*
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	N-formyl-MetLeuPhe
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GERD	engl. *gastroesophageal reflux disease*
GROα	engl. *growth regulated alpha*
Hek293	*engl.* Human embryonic kidney cells 293
Hp	*Helicobacter pylori*
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Km^R	Kanamycin-Resistenz
LB	*Luria Broth*
LPS	Lipopolysaccharid
LTB_4	Leukotrien B_4
MALT	engl. *mucosa-associated lymphoid tissue*
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MCP-1	engl. *monocyte chemoattractant protein1*
MIP-1α/β	engl. *macrophage inflammatory protein 1 alpha/ beta*
MOI	engl. *multiplicity of infection*
mRNA	engl. *messenger RNA*
NaF	Natriumfluorid
OD	Optische Dichte
Oligo-dT	Oligodeoxythymidin
ORF	engl. *open reading frame*

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
PAMP	engl. *pathogen-associated molecular pattern*
RANTES	engl. *regulated on activation normal T cell expressed and presumably secreted*
PBS	engl. *phosphate-buffered saline*
PCR	engl. *polymerase chain reaction*
PGE_2	Prostaglandin E_2
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMNs	engl. *polymorphonuclear neutrophils*
PRRs	engl. *pattern-recognition-receptors*
p-Tyr	Phosphotyrosin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SabA	engl. *sialic acid-binding adhesin A*
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Taq-Polymerase	*Thermus aquaticus* DNA Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TLR	engl. *toll like receptor*
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T4SS	TypIV-Sekretionsystem
u	*unit*
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactosid

2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 5.1: Induktion von Entzündung und Gewebeschäden der Magenschleimhaut durch Infektion mit *H. pylori*. 12

Abb. 5.2: Struktur von VacA und CagA. 13

Abb. 5.3: Aktivierung der TLR-Signalwege durch Erkennung der verschiedenen PAMPs. 16

Abb. 5.4: Extravasation von PMNs aus dem Blutgefäß ins Gewebe. 19

Abb. 7.1: RAPD-PCR-Analyse von acht klinischen Isolaten von *H. pylori.* 43

Abb. 7.2: DNA-Microarray-Analyse von verschiedenen *H. pylori* Stämmen. 45

Abb. 7.3: Standardkurve der *16SrRNA* von *H. pylori* analysiert durch quantitative Echtzeit-PCR. 46

Abb. 7.4: Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl der regulierten Gene in *H. pylori* während der Infektion mit AGS-Zellen durch Echtzeit-PCR. 49

Abb. 7.5: Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl der regulierten Gene in *H. pylori* während der Infektion mit PMNs durch Echtzeit-PCR. 52

Abb. 7.6: Infektion von AGS-Zellen mit acht klinischen Isolaten von *H. pylori.* 55

Abb. 7.7: CagA Translokation von *H. pylori* in AGS-Zellen. 56

Abb. 7.8: Induktion der IL-8-Sekretion in AGS-Zellen während der Infektion mit *H. pylori.* 58

Abb. 7.9: Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) in AGS-Zellen während der Infektion mit *H. pylori* durch Echtzeit- PCR. 61

Abb. 7.10: Expression von TLR9 in AGS-Zellen während der Infektion mit *H. pylori*. 63

Abb. 7.11: Expression von TLR5 in AGS-Zellen während der Infektion mit *H. pylori.* 65

Abb. 7.12: Expression von TLR5 in AGS-Zellen. 66

Abb. 7.13: Infektion von PMNs mit acht genetisch unterschiedlichen *H. pylori* Stämmen. 67

Abb. 7.14: Die Rolle des bakteriellen CagA-Proteins in PMNs 69

Abb. 7.15: Induktion der IL-8-Sekretion in PMNs während der Infektion mit *H. pylori.* 70

Abb. 7.16: Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) in PMNs während der Infektion mit *H. pylori* durch Echtzeit-PCR. 73

Abb. 7.17: Expression von Oberflächenmolekülen auf PMNs während der Infektion mit *H. pylori* und der Nachstimulation mit FMLP, PMA und NaF ermittelt durch FACS-Analyse. 78

Abb. 7.18: Sekretion von verschiedenen Mediatoren von PMNs während der Infektion mit *H. pylor*i und der Poststimulation mit fMLP, PMA und NaF. 80

Abb. 7.19: Expression der Untereinheiten der NADPH-Oxidase in PMNs während der Infektion mit *H. pylori* und der Poststimulation mit fMLP, PMA und NaF. 83

Abb. 7.20: Expression der Cyclooxygenase-2 in PMNs während der Infektion mit *H. pylori* und der Poststimulation mit fMLP, PMA und NaF. 84

Abb. 7.21: Expression der 5-Lipoxygenase in PMNs während der Infektion mit *H. pylori* und der Poststimulation mit fMLP, PMA und NaF. 84

Abb. 8.1: Interaktion von CagA mit Epithelzellen. 90

Abb. 8.2: Biosynthese von Lipidmediatoren infolge Abbaus von Phospholipiden der zellmembran durch Phospholipase A2. 106

Abb. 10.3: Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl der regulierten Gene in *H. pylori* während der Infektion mit AGS-Zellen durch Echtzeit-PCR. 142

Abb. 10.4: Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl der regulierten Gene in *H. pylori* während der Infektion mit PMNs durch Echtzeit-PCR. 148

Abb. 10.5: Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) an AGS-Zellen während der Infektion mit *H. pylori* durch Echtzeit- PCR. 154

Abb. 10.6: Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) an PMNs während der Infektion mit *H. pylori* durch Echtzeit-PCR. 158

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 5.1:	*H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren	10
Tabelle 6.1:	Verwendete *knockout H. pylori*-Stämme	22
Tabelle 6.2:	Verwendete Aktivatoren	24
Tabelle 6.3:	Verwendete Inhibitoren	25
Tabelle 6.4:	Einzelne Komponenten einer PCR-Reaktion	32
Tabelle 6.5:	Einzusetzende Mengen der einzelnen Komponenten einer RT-PCR	33
Tabelle 6.6:	Sequenzen der verwendeten Sonden	34
Tabelle 6.7:	Reaktionsansätze mit QuantiTectProbe™ RT-PCR Kit	35
Tabelle 6.8:	Amplifikationsbedingungen mit QuantiTectProbe™ RT-PCR Kit	36
Tabelle 6.9:	Reaktionsansätze mit Universal-PCR Master Mix®	36
Tabelle 6.10:	Verwendete Antikörper	40
Tabelle 7.1:	Genotypisierung der *H. pylori* Stämme durch PCR	44
Tabelle 7.2:	TaqMan-Analyse von *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren während der Inkubation mit AGS-Zellen	48
Tabelle 7.3:	TaqMan-Analyse von *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren während der Inkubation mit humanen PMNs	51
Tabelle 7.4:	mRNA-Expression von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) auf AGS-Zellen während der Infektion mit *H. pylori* ermittelt durch Echtzeit-PCR	60
Tabelle 7.5:	mRNA-Expression von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) in PMNs während der Infektion mit *H. pylori* ermittelt durch Echtzeit-PCR	71
Tabelle 7.6:	Expressionsstudien von PMN-spezifischen Oberflächen-molekülen während der Infektion mit *H. pylori* für 10 min und der Postinkubation mit fMLP, PMA und NaF für 90 min ermittelt durch FACS-Analyse	77
Tabelle 8.1:	TLR2 und TLR4 und ihre Liganden	96

4. Zusammenfassung

Helicobacter pylori besiedelt den menschlichen Magen und kann Gastritis, Magengeschwüre und Magenkrebs verursachen. Für die unterschiedlichen klinischen Manifestationen sind sowohl genetische Faktoren des Bakteriums als auch des Wirts verantwortlich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die bidirektionale Wechselwirkung von acht genetisch unterschiedlichen *H. pylori*-Stämmen, die aus Patienten mit verschiedenen klinischen Symptomen isoliert wurden, mit unterschiedlichen Zielzellen untersucht. Es erfolgte die Analyse der Genexpressionsprofile von ausgewählten *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren während der Infektion von Magenepithelzellen (AGS) und polymorphkernigen Granulozyten (PMNs). Unter Verwendung der quantitativen Echtzeit-PCR, wurde die mRNA-Expression von *cagA, ureA, napA, katA, vacAs1* und *vacAs2* in einer Zeitspanne von 1 bis 6 Stunden bestimmt. Die Expressionsprofile der untersuchten Gene variieren von Stamm zu Stamm und werden während der Wechselwirkung mit AGS-Zellen überwiegend hoch reguliert oder bleiben unverändert. Im Vergleich dazu werden die Gene während der Interaktion mit PMNs überwiegend herunter reguliert. Folgende Hauptaussagen konnten während der Untersuchung beobachtet werden: (i) genetisch unterschiedliche *H. pylori*-Stämme zeigen unterschiedliche mRNA-Expressionsprofile, (ii) die Expressionsmuster sind stammspezifisch und zeitabhängig und (iii) die Regulation der Expressionsprofile ist wirtszellabhängig.

Parallel erfolgte die Untersuchung von wirtszellspezifischen Erkennungsstrukturen (Toll-ähnliche Rezeptoren; TLRs) des angeborenen Immunsystems, die bestimmte bakterielle Komponenten erkennen können und somit zur Induktion von Immunantworten führen. Durch die Verwendung der quantitativen Echtzeit-PCR und Western Blot-Analyse wurde die mRNA-Expression und Proteinexpression von TLR2, TLR4, TLR5 und TLR9 durch AGS-Zellen und PMNs während der Infektion mit genetisch unterschiedlichen *H. pylori* Stämmen untersucht. Die mRNA-Expressionprofile von TLR2, TLR4 und TLR9 zeigen eine simultane Expression bzw. Regulation in beiden Zelltypen. Die Hauptaussage dieser Untersuchung ist, dass TLR2 und TLR9 auf mRNA-Ebene während der Infektion mit *H. pylori* reguliert werden, während TLR4 nicht reguliert wird. Die Expression von TLR5 und TLR9 auf Protein-Ebene zeigt ebenfalls keine Regulation.

Weitere Untersuchungen erfolgten an PMNs, die ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind. Sie sind in der Lage aus der Blutbahn ins Gewebe zum Ort der Infektion zu infiltrieren und Mikroorganismen zu phagozytieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von PMN-spezifischen Oberfächenmolekülen, die bei der transendothelialen Migration eine Rolle spielen, untersucht. Wobei genetisch definierte *H. pylori* Mutanten es ermöglichen sollten, weitere detaillierte Aussagen der Pathogen-Wirtszellreaktion zu machen. Durch FACS-Analyse konnte eine erhöhte Expression des Integrins Mac-1 (CD11b/CD18) und des fMLP-Rezeptors, sowie eine Abnahme der Expression des L-Selektins CD62L und des Chemokinrezeptors CXCR2 während der Präinkubation mit verschiedenen *H. pylori*-Stämmen und der Postinkubation mit fMLP, PMA und NaF beobachtet werden. Parallel wurde die Freisetzung von IL-8 und der Lipidmediatoren LTB_4 und PGE_2 durch infizierte PMNs analysiert. Die Hauptaussage ist, das die Expression der PMN-spezifischen Proteine und die Freisetzung von anderen Mediatoren *H. pylori* Stamm-unabhängig und zumeist Stimulus-unabhängig ist.

5. Einleitung

5.1 Pathogenese der *Helicobacter pylori*-Infektion

5.1.1 Epidemiologie

Helicobacter pylori ist ein Gram-negatives, spiralförmig gebogenes, mikroaerophiles, etwa 2-3 µm langes Bakterium, dass auf Grund seiner lophotrichen Begeißelung sehr beweglich ist. Das Bakterium kolonisiert die Magenmukosa und konnte 1983 aus Magenbiopsieproben isoliert werden (MARSHALL UND WARREN, 1984). *H. pylori* ist die Ursache einer der häufigsten Infektionskrankheiten des Menschen. Insgesamt sind etwa 50% der Weltbevölkerung mit dem Keim infiziert, wobei die Durchseuchungsrate in zahlreichen Entwicklungsländern sogar bis zu 90% betragen kann (FELDMAN *ET AL*., 1997). Die *H. pylori*-Infektion erfolgt in der Regel während der Kindheit auf fäkal-oralem oder oral-oralem Wege (MITCHELL UND MEGRAUD, 2002). *H. pylori* kann ein Leben lang persistieren, wenn der Erreger nicht durch Antibiotika-Kombinationstherapie eradiziert wird (MONTECUCCO UND RAPPUOLI, 2001). Die Infektion mit *H. pylori* hat die Entstehung einer chronischen Gastritis zur Folge, die jedoch in den meisten Fällen asymptomatisch verläuft. Allerdings entwickeln etwa 10-15% der infizierten Patienten schwere Komplikationen wie Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüre oder maligne Tumore des Magens (Adenokarzinom, MALT-Lymphom) (NOMURA *ET AL*., 1994; PARSONNET *ET AL*., 1991; WOTHERSPOON *ET AL*., 1993). Aus diesem Grund wurde *H. pylori* durch die Weltgesundheitsorganisation WHO (IARC, 1994) als Karzinogen der Klasse 1 eingestuft. Auf der anderen Seite spielt eine Kolonisierung mit *H. pylori* eine protektive Rolle z.B. bei der Refluxerkrankung, dem Rückfluss von Magensäure in die Speiseröhre (*gastroesophageal reflux disease,* GERD), und der Entwicklung des sogenannten Barrett Ösophagus bzw. dem Ösophaguskarzinom (BLASER, 1999). Hinzu kommen Befunde, die zeigen, das *H. pylori*-infizierte Kinder weniger Durchfallerkrankungen erleiden (ROTHENBACHER *ET AL*., 2000). Für diese unterschiedlichen klinischen Manifestationen sind vermutlich sowohl genetische Faktoren des Bakteriums als auch des Wirts verantwortlich.

5.1.2 Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori*

H. pylori besitzt mit 1,65 Millionen Basenpaaren ein relativ kleines Genom und ein Vergleich der *H. pylori*-Genomsequenzen konnte zeigen, das der Stamm 26695, theoretisch für 1590 Proteine und der Stamm J99 für 1495 Proteine kodiert (TOMB *ET AL*., 1997; ALM *ET AL*., 1999). Durch zweidimensionale Gelelektrophorese konnten ca. 1800 *H. pylori*-Proteine verifiziert werden (JUNGBLUT *ET AL*., 2000; BUMANN *ET AL*., 2001; BACKERT *ET AL*., 2005). Trotz intensiver Forschungstätigkeit ist die Funktion für nur wenige dieser Proteine bekannt und in den letzten Jahren sind verschiedene bakterielle Faktoren beschrieben worden, die während der Wechselwirkung mit humanen Wirtszellen eine wichtige Rolle spielen (BLASER UND BERG, 2001; MONTECUCCO UND RAPPUOLI, 2001; PEEK UND BLASER, 2002) (Tabelle 5.1). Nach der oralen Aufnahme müssen die Bakterien für kurze Zeit im sauren Milieu des Magenlumens überleben, bevor sie das fast neutrale Milieu des epithelnahen Magenschleims erreichen. Hierfür ist die Urease, ein Enzym, das Harnstoff in Ammoniak und CO_2 spalten kann, essenziell (CUSSAC *ET AL*., 1992). Die Bakterien verdanken ihre Beweglichkeit einem unipolaren Bündel von Geißeln, die sie durch Rotation vom Magenlumen bis zur Schleimhaut vordringen lassen (SUERBAUM *ET AL*., 1993). Dort kann sich *H. pylori* mit Hilfe verschiedener Adhäsionsmoleküle an die Epithelzellen anheften. Bisher konnten folgende Proteine AlpA, AlpB, BabA und SabA als Adhäsine identifiziert werden (ILVER *ET AL*., 1998; ODENBREIT *ET AL*., 1999; MAHDAVI *ET AL*., 2002; ODENBREIT *ET AL*., 2002). Der durch Adhäsion vermittelte Kontakt zwischen Bakterien und Wirtszelle ist eine Vorraussetzung für weitere pathogene Prozesse. Denn es wird angenommen, dass adhärente Bakterien für den größten Teil der Schädigung des Magengewebes verantwortlich sind, während Bakterien, die sich frei in der Schleimhaut aufhalten, kaum Gewebeschäden hervorrufen (GURUGE *ET AL*., 1998; ILVER *ET AL*., 1998; GERHARD *ET AL*:, 1999; BLASER UND BERG, 2001).

Weitere wichtige Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori* sind das Protein NapA (*neutrophil-activating protein*), das die Adhäsion von polymorphkernigen Leukozyten (PMNs) an Epithelzellen bewirkt (SATIN *ET AL*., 2000) und die transendotheliale Migration von PMNs induziert (BRISSLERT *ET AL*., 2005), das Enzym Katalase (KatA), welches reaktive Sauerstoffverbindungen eliminiert (ODENBREIT *ET AL*., 1996; LOEWEN *ET AL*., 2004) und die Proteine Ice A1/A2, die Homologien zu Restriktionsendonukleasen aufweisen und deren Expression durch den Kontakt mit Epithelzellen induziert wird (PEEK *ET AL*., 1998).

Tabelle 5.1: *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren

Name	Gen	Funktion	Referenzen
Pathogenitätsfaktoren			
Urease	*ureA*	Neutralisation der Magensäure	CUSSAC *ET AL.*, 1992
Flagellen	*flaA, flaB*	Beweglichkeit des Bakteriums	SUERBAUM *ET AL.*, 1993
Katalase	*katA*	schützt das Bakterium vor oxidativen Schäden	ODENBREIT *ET AL.*, 1996; LOEWEN *ET AL.*, 2004
Adhäsionsproteine	*babA, sabA, alpA, alpB*	Adhäsion des Bakteriums an Zielzellen	ILVER *ET AL.*, 1998; ODENBREIT *ET AL.*, 1999; MAHDAVI *ET AL.*, 2002; ODENBREIT *ET AL.*, 2002
IceA	*iceA1, iceA2*	Homolog der *Nla* III-Restriktionsendonukle ase	PEEK *ET AL.*, 1998
Neutrophil-aktivierendes Protein	*napA*	Aktivierung von PMNs	SATIN *ET AL.*, 2000 BRISSLERT *ET AL.*, 2005
Virulenzfaktoren			
Vakuolisierendes Zytotoxin	*vacA (vacAs1a; vacAs1b; vacAs2; vacAm1, vacAm2)*	Bildung von Vakuolen	TUMMURU *ET AL.*, 1993 GEBERT *ET AL.*, 2003
cag-Pathogenitätsinsel	*cag*-PAI	31 Gene kodieren für T4SS	ODENBREIT *ET AL.*, 2000; STEIN *ET AL.*, 2000; ASAHI *ET AL.*, 2000; SEGAL *ET AL*:, 1999; SELBACH *ET AL.*, 2003
Zytotoxin-assoziertes Gen	*cagA*	Immundominantes Antigen (Teil von *cag*-PAI)	COVACCI *ET AL.*, 1993 COVER *ET AL.*, 1990

In den letzten Jahren sind verschiedene Gene von *H. pylori* identifiziert worden, die mit der Entstehung von Erkrankungen des Magen-Darmtraktes assoziiert sind. Zunächst wurde entdeckt, dass Patienten mit Magengeschwüren besonders häufig von *H. pylori* Stämmen infiziert sind, die ein etwa 130 kDa großes Protein

exprimieren (COVER *ET AL*., 1990). Dieses Protein interagiert mit den Antikörpern im Blut infizierter Menschen und wurde daher als immunodominantes Antigen bezeichnet. *H. pylori* Stämme, die das immunodominante Antigen exprimieren, synthetisieren fast immer auch aktives vakuolisierendes Zytotoxin VacA. Daher wurde das Gen, welches das immunodominante Antigen kodiert, als Zytotoxin-assoziiertes Gen A (*cytotoxin-associated gene A, cagA*) bezeichnet (COVACCI *ET AL*., 1993; TUMMURU *ET AL*., 1993).

Genetische Untersuchungen konnten zeigen, dass das *cagA*-Gen Teil eines ca. 40 kb großen Abschnittes auf dem Bakterienchromosom ist und das dieses DNA-Segment ursprünglich von einem anderen Organismus stammt, welches durch horizontalen Gentransfer ins *H. pylori*-Genom gelangt ist (CENSINI *ET AL*., 1996; COVACCI *ET AL*., 1997). Dieser Abschnitt hat für die Virulenz von *H. pylori* eine wichtige Bedeutung und wird als *cag*- (*cytotoxin-associated genes*) Pathogenitätsinsel (PAI) bezeichnet. Diese *cag*-PAI kodiert für ein Typ IV-Sekretionssystem (T4SS), durch welches das Effektorprotein CagA in die Wirtszelle injiziert wird und zur Reorganisation des Zytoskeletts und zu Veränderungen der Zellmorphologie führt. In kultivierten Epithelzellen werden die morphologische Veränderung der Zellen als „Elongationsphänotyp“ bezeichnet. (ODENBREIT *ET AL*., 2000; STEIN *ET AL*., 2000; ASAHI *ET AL*., 2000; SEGAL *ET AL*:, 1999; SELBACH *ET AL*., 2003). Die Induktion dieses Phänotyps in Magenepithelzellen *in vivo* konnten bisher noch nicht beschrieben werden.

5.1.3 Wechselwirkung von *H. pylori* mit Zielzellen

Die Interaktion von *H. pylori* mit Magenepithelzellen und den Zellen des Immunsystems ist schematisch in der Abb. 5.1 dargestellt. Mit Hilfe der Flagellen und der Produktion von Urease gelangt *H. pylori* in die Magenschleimhaut. Dort synthetisiert *H. pylori* das vakuolisierende Zytotoxin VacA, welches zur Bildung von großen Vakuolen im Zytoplasma der Wirtszellen führt. Dieser Prozess hat die Induktion von Apoptose zur Folge (REYRAT *ET AL*., 1999; GALMICHE *ET AL*., 2000) und trägt somit zur Schädigung des Magenepithels bei. Einige Bakterien dringen bis zum Magenepithel vor und heften sich mit der Unterstützung verschiedener Adhäsine an die Epithelzellen an. Adhärente Bakterien, sind in der Lage das Protein CagA über das T4SS in die Epithelzellen zu injizieren, was zu vielfältigen Prozessen der Signal-

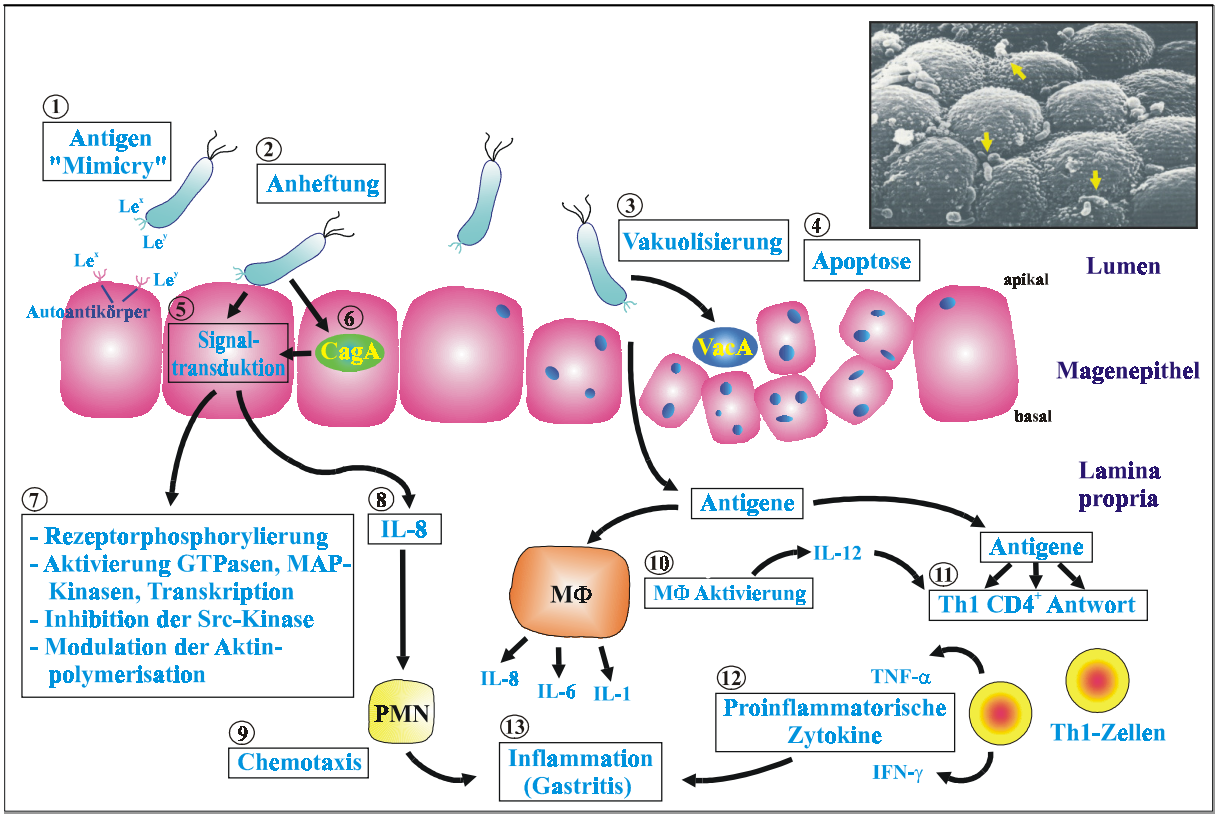


Abb. 5.1: Induktion von Entzündung und Gewebeschäden der Magenschleimhaut durch Infektion mit *H. pylori*.
(1) Während der Infektion mit *H. pylori* befinden sich die Bakterien im Magenlumen. Da das *H. pylori*-Lipopolysaccharid die Blutgruppen-Antigene Le^x und Le^y enthält, kann *H. pylori* durch Antigen-Mimikry die Bildung von Autoantikörper gegen Le^x und Le^y durch Epithelzellen induzieren. (2) Anschließend kommt es zum Kontakt zwischen Bakterien und Epithelzellen, indem Typ I Stämme, die die *cag*-PAI enthalten, eine (5) Signaltransduktionskaskade, durch (6) Injektion von CagA in den Epithelzellen, induzieren. (8) Daraufhin sekretieren die Epithelzellen IL-8, welches chemotaktisch auf Zellen der angeborenen Immunantwort wirkt und zur (9) Infiltration von PMNs und Makrophagen führt. (3) Der Kontakt zum Epithel führt ebenfalls zur Freisetzung von *H. pylori*-Virulenzfaktoren, z.B. VacA, das für die Bildung großer Vakuolen in den Epithelzellen verantwortlich ist und somit die Apoptose (4) und Schädigung der Epithelzellen auslöst. In Folge dessen können weitere *H. pylori*-Antigene die Epithelschicht passieren und (10) Makrophagen aktivieren, die ihrerseits proinflammatorische Zytokine, wie IL-8, IL-6, IL-1 und IL-12 freisetzen.(11) Diese IL-12-Sekretion führt zur Polarisierung der Th1 $CD4^+$ - Antwort und Th1-Zellen. *H. pylori*-Antigene können auch direkt eine spezifische Th1-Antwort auslösen. (12) Die Th1-Zellen sind in der Lage proinflammatorische Zytokine, wie TNF-α und IFN-γ freizusetzen, die eine Entzündung in der Lamina propria bewirken und zur Ausbildung einer Gastritis führen (abgewandelt nach TELFORD *ET AL.*, 1997).

transduktion führt. Adhärente *H. pylori* stimulieren die Epithelzellen zur Sekretion einer ganzen Reihe von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Insbesondere ist eine verstärkte Expression der Chemokine Interleukin-8 (IL-8), GRO-α, RANTES, MIP-1α und MIP-1β beschrieben worden (YAMAOKA *ET AL.*, 1998). Dabei spielt IL-8 als starkes Chemoattraktant und Aktivator von polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) eine entscheidende Rolle. Durch die Induktion der proinflammatorischen Zytokine und Chemokine durch *H. pylori* wandern PMNs und Makrophagen in die Magenmukosa. Diese Zellen sind in der Lage reaktive

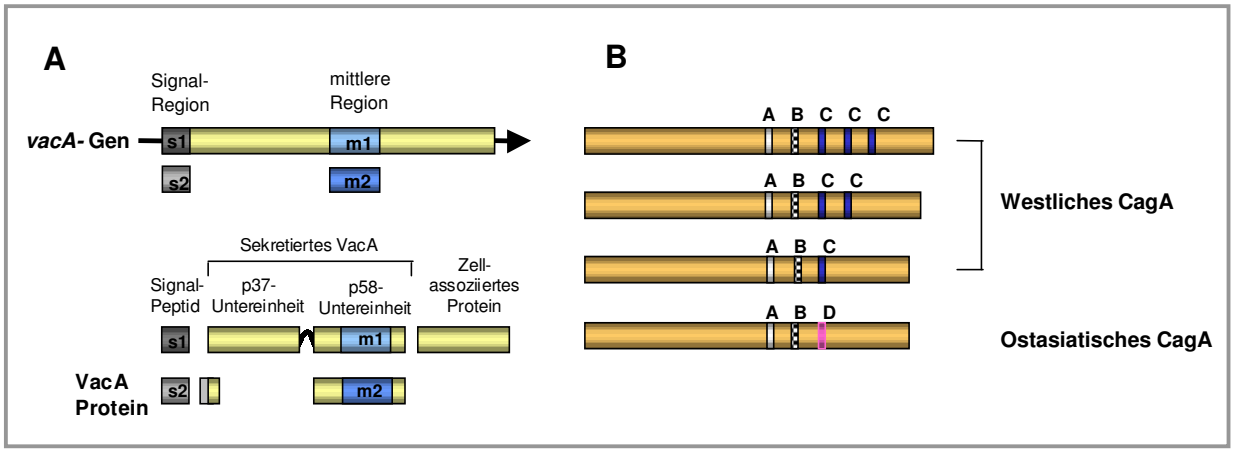


Abb. 5.2: Struktur von VacA und CagA.
(A) VacA-Polymorphismus. Das Gen *vacA* ist ein polymorphes Mosaik mit zwei möglichen Signalregionen, s1 und s2, und zwei möglichen Mittelregionen, m1 und m2. Das translatierte Protein ist ein Autotransporter mit N-und C-terminalen Funktionen während der bakteriellen Sekretion. Die s1-Signalregion ist voll aktiv, während die s2-Region für ein Protein mit unterschiedlicher Signalpeptid-Schnittstelle kodiert, woraus eine kurze N-terminalen Verlängerung resultiert, die die vakuolisierende Aktivität blockiert und die porenformende Aktivität abschwächt. Die Mittelregion kodiert für eine Zellbindungsstelle, während der m2-Typ *in vitro* an einige Zelllinien bindet und diese vakuolisiert. (BLASER UND ATHERTON, 2004). (B) Diversität der Tyrosinphoshorylierungsstellen des CagA. Die Tyrosinphosphorylierung von CagA erfolgt durch Src-Kinase am EPIYA-Motiv. Es gibt vier verschiedene EPIYA-Stellen, bezeichnet als EPIYA-A, -B, -C und -D, basierend anhand der Sequenz um EPIYA-Motiv herum. Westliche *H. pylori* Stämme exprimieren CagA, die EPIY-A- und EPIYA-B-Stellen enthalten, gefolgt von 1-3 Wiederholungen von EPIYA-C-Stellen. Ostasiatische Stämme exprimieren eine Form von CagA, in der die EPIYA-C-Stelle gegen eine EPIYA-D-Stelle ausgetauscht ist (HATAKAYAMA, M., 2004).

Sauerstoff- bzw. Stickstoffverbindungen zu bilden, welche das Magenepithel schädigen können (DALLEGRI UND OTTONELLO, 1997).

H. pylori Stämme, welche die *cag*-PAI besitzen, werden als Typ I-Stämme bezeichnet, wohingegen den Typ II-Stämmen der entsprechende Abschnitt des Bakterienchromosoms fehlt. Mehrere Studien haben gezeigt, dass *H. pylori* Stämme, welche die *cag*-PAI besitzen, häufiger Erkrankungen wie Gastritis, Magengeschwüre und Magenkrebs auslösen, als Stämme, denen die Pathogenitätsinsel fehlt (BLASER *ET AL.*, 1995; KUIPERS *ET AL.*, 1995; PEEK *ET AL.*, 1995; IKENOUE *ET AL.*, 2001; NOMURA *ET AL.*, 2002). Darüber hinaus spielt die Modifikation der Tyrosinphosphorylierungsstelle des CagA-Proteins eine wichtige Rolle für die biologischen Aktivität von *cagA*-positiven *H. pylori* Stämmen. CagA besitzt Variationen an der SHP2-Bindungsstelle, die auf Sequenzunterschiede basieren und wonach es in zwei Haupttypen unterteilt wird: ostasiatisches CagA und westliches CagA (Abb.5.2B). Das ostasiatische CagA zeigt eine stärkere SHP2-Bindung und größere biologische Aktivität als westliches CagA, und so kommt es in ostasiatischen Ländern, wo eine endemische Zirkulation von *H.*

pylori Stämmen vorherrscht, die die biologisch aktivere Form von CagA besitzen, zum erhöhten Risiko des Auftretens von Magenkarzinomen (HATAKAYAMA, M., 2004). Darüber hinaus unterscheiden sich Typ I- und Typ II-Stämme auch in einer Reihe anderer Gene, die außerhalb der Pathogenitätsinsel liegen. Es tragen Typ I-Stämme häufig das s1-Allel des *vacA* Gens, welches das aktive vakuolisierende Zytotoxin VacA kodiert (ATHERTON *ET AL*., 1995). Typ II-Stämme besitzen dagegen meist das s2-Allel von *vacA*, dessen Genprodukt kaum zytotoxisch wirkt (Abb.5.2A). Somit sind *H. pylori* Stämme, die *s1/m1 vacA*-Allele aufweisen, stärker assoziiert mit schwereren Erkrankungen des Magens, als die mit s2/m2 *vacA* Stämme (MONTECUCCO UND RAPPUOLI, 2001; PEEK UND BLASER; 2002). Außerdem exprimieren Typ I-Stämme häufiger die Adhäsine BabA und SabA und können daher besser an die Wirtszellen adhärieren als Typ II-Stämme (ILVER *ET AL*., 1998; MAHDAVI *ET AL*., 2002).

Diese Beobachtungen haben zu der allgemeinen Vorstellung geführt, dass die klinische Manifestation einer *H. pylori*-Infektion entscheidend vom Typus des jeweiligen Stammes abhängt (BLASER UND BERG, 2001). Somit sind Typ I-Stämme pathogener, denn sie adhärieren direkt an ihre Wirtszellen und schädigen das Magengewebe durch Pathogenitätsfaktoren wie beispielsweise VacA. Im Gegensatz dazu, halten sich Typ II-Stämme eher in der Schleimschicht und nicht in direktem Kontakt zum Magenepithel auf und erzeugen nur in geringerem Maße Entzündungen und Gewebeschäden (GURUGE *ET AL*., 1998; ILVER *ET AL*., 1998; GERHARD *ET AL*:, 1999; BLASER UND BERG, 2001).

5.2 Das angeborene Immunsystem

5.2.1 Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs)

Das menschliche Immunsystem eliminiert Krankheitserreger durch das Zusammenspiel der angeborenen und der adaptiven Immunantwort. Das angeborene Immunsystem ist phylogenetisch sehr alt und vermutlich in allen mehrzelligen Organismen vertreten, während das adaptive Immunsystem sich in der Evolution erst vor weniger als 500 Millionen Jahren entwickelt hat, und ausschließlich bei Vertebraten vorkommt. Beide Systeme nutzen unterschiedliche Mechanismen für die Infektabwehr (MEDZHITOV UND JANEWAY JR, 2000).

Die angeborenen Immunantworten richten sich, anders als die adaptiven Immunantworten, nicht spezifisch gegen ein bestimmtes Pathogen. Das angeborenen Immunsystem stützt sich neben phagozytierenden Zellen, auch auf Proteine, die konservierte mikrobielle Strukturen erkennen können. Diese Strukturen werden als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) und Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die direkt mit den PAMPs interagieren, werden als *pattern-recognition receptors* (PRRs) bezeichnet (MEDZHITOV UND JANEWAY JR, 2000). Die Familie der Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) ist die bisher am besten charakterisierte Klasse von PRRs in Säugetieren.

Das erste Mitglied der Toll-Rezeptor-Familie wurde in *Drosophila* identifiziert. Das Transmembranprotein Toll ist in *Drosophila* sowohl für die Ausbildung der dorsoventralen Polarität in Fliegenembryonen, aber auch an der Resistenz erwachsener Fliegen gegen Pilzinfektionen beteiligt. Das Toll-Gen besteht aus einer extrazellulären Domäne mit leuzinreichen Wiederholungen und einer zytoplasmatischen Region Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne oder TIR-Domäne. (HASHIMOTO *ET AL.*, 1988; GAY *ET AL.*, 1991) und weist Homologien zu den TLRs der Säugetiere auf (MEDHITOV *ET AL.*, 1997; ROCK *ET AL.*, 1997).

In Säugetierspezies konnten 10-15 TLRs identifiziert werden, die mit vielen unterschiedlichen PAMPs (TAKEDA *ET AL.,* 2003), wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS; detektiert durch TLR4), bakteriellen Lipoproteinen (Erkennung durch TLR2), Flagellin (TLR5), unmethylierter CpG-DNA von Bakterien und Viren (TLR9) bzw. doppelsträngiger viraler RNA (detektiert durch TLR7) (HEIL *ET AL.,* 2004; DIEBOLD *ET AL.*, 2004; LUND *ET AL.*, 2004) interagieren können. Die TLR1, 2, 4, 5 und 6 scheinen hauptsächlich auf die Erkennung von Produkten bakteriellen Ursprungs spezialisiert zu sein, und sind in der Lage „fremd“ bzw. „nicht selbst“ von „selbst“ zu unterscheiden. Im Vergleich dazu sind die TLR3, 7, 8 und 9 auf die Erkennung von Nukleinsäuren spezialisiert, die nicht nur mikrobiellen oder viralen Ursprungs sind, sondern auch im Wirt vorkommen. In diesem Fall wird die „Selbst“ und „Nicht-Selbst“-Erkennung nicht nur durch die Struktur der Liganden, sondern auch durch ihre Zugänglichkeit zu den TLRs vermittelt. Diese TLRs sind in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert (HEIL *ET AL.*, 2003; LEE *ET AL.*, 2003; MATSUMOTO *ET AL.*, 2003) und erkennen Nukleinsäuren in der späten Phase der Endosomen-Lysosomen-Kompartimente (DIEBOLD *ET AL.*, 2004; LUND *ET AL.*, 2004; LUND *ET AL.*, 2003).

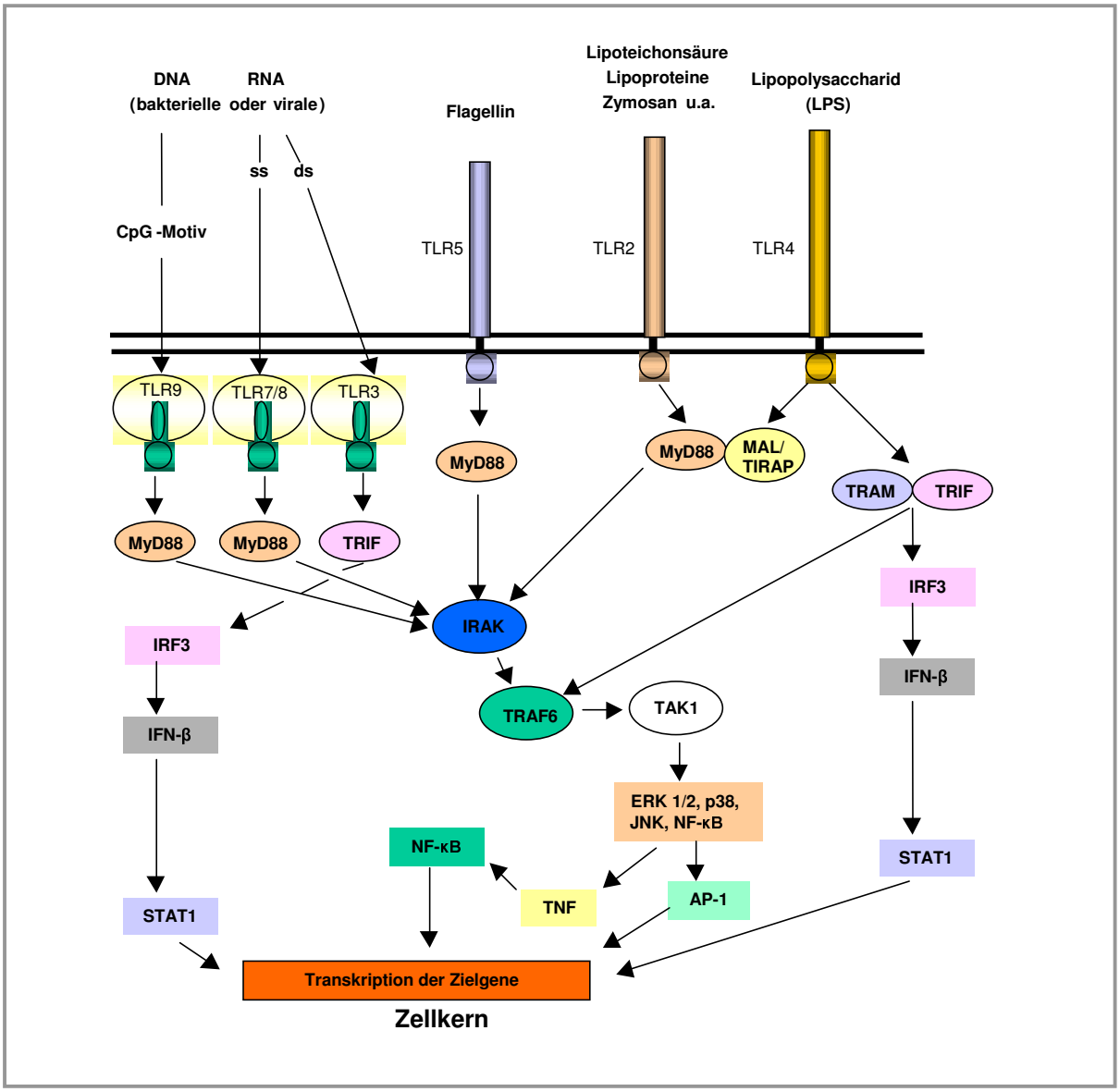


Abb. 5.3: Aktivierung der TLR-Signalwege durch Erkennung der verschiedenen PAMPs.
Die jeweiligen TLRs werden durch ihre Liganden aktiviert, die daraufhin an die Adapterproteine MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*; TLR2, 5, 7, 8, 9); MAL/TIRAP (*MyD88-adaptor-like/TIR-associated protein*; TLR4); TRIF (*Toll-receptor-associated activator of interferon*; TLR3, 4) und TRAM (*Toll-receptor-associated molecules*; TLR4) binden, was zur Autophosphorylierung von IRAK (*IL-1R-associated kinase*) und zur Anlagerung eines weiteren Adaptorproteins TRAF6 (*TNFR-activated factor*) führt. TRAF6 bindet und aktiviert wiederum die MAP-Kinase-Kinase TAK1 (*TGF-β-activated kinase 1*). Über mehrere Zwischenschritte führt die TAK1-Aktivierung zur Freisetzung von NF-κB. Über weitere MAP-Kinasen (ERK und JNK) aktiviert TAK1 außerdem die Mitglieder der AP-1 Transkriptionsfaktorfamilie. Sie bewirken gemeinsam mit NF-κB, die Transkription von Genen, die an der Entzündungsantwort beteiligt sind (IL-6 und IL-8). Die TLR3, 4 benutzen einen MyD88-unabhängigen Signalweg, der über IRF3 (*IFN regulatory factor 3*) und IFN-β (Interferon-β) zur Transkription der Zielgene führt (abgewandelt nach BEUTLER, B.; 2004).

Da die Nukleinsäure des Wirts zu diesen Kompartimenten nicht zugänglich ist, kann sie keine TLR-Antwort auslösen. Aber dennoch kann die Wirt-Nukleinsäure durch außergewöhnliche Bedingungen, wie z.B. unzureichende Beseitigung apoptotischer

Zellen, zur Aktivierung der TLRs führen, was eine Autoimmunantwort auslösen kann (LEADBETTER *ET AL.*, 2002).

Ebenso wie die Mitglieder der *Drosophila*-Toll-Familie werden unterschiedliche TLRs in Menschen als Antwort auf verschiedene Liganden aktiviert (Abb.5.3). Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten und Epithelzellen besitzen TLRs auf ihrer Oberfläche und die Aktivierung dieser Rezeptoren stimuliert die Expression von Molekülen wie Zytokine, Lipid-Signalmediatoren z.B. Prostaglandine, die eine Entzündungsreaktion auslösen und dabei die adaptive Immunantwort induzieren (ALBERTS *ET AL.*, 2004).

5.2.2 Die Rolle von polymorphkernigen Leukozyten (PMNs)

Neben Proteinen, die konservierte Merkmale von Krankheitserregern erkennen und schnell aktiviert werden können um Pathogene zu eliminieren, sind phagozytierende Zellen (professionelle Phagozyten) ein weiterer essentieller Bestandteil des angeborenen Immunsystems, denn sie tragen durch Phagozytose, zum Teil mit Antikörpern und Komplement, wesentlich zur Elimination von Mikroorganismen bei (JANEWAY JR. UND MEDZHITOV, 2002). Zu der Gruppe der Phagozyten zählen die Monozyten, Makrophagen und Granulozyten. Die Granulozyten sind kurzlebige Zellen, die im Knochenmark laufend neu ersetzt werden. Sie machen einen hohen Anteil der im Blut zirkulierenden Leukozyten (60-70%) aus und sind durch einen gelappten Kern und zahlreiche zytoplasmatische Granula gekennzeichnet. Aufgrund ihrer Anfärbbarkeit werden die sie in Neutrophile (PMNs), Eosinophile und Basophile unterteilt (KELLER; 1994). Die PMNs sind dabei die wichtigsten Effektoren der akuten Entzündung und tragen durch Sekretion von Zytokinen auch zum afferenten Schenkel der Immunantwort bei (RICEVUTI, 1997). PMNs, die annähernd 90% der Granulozyten bilden, zirkulieren im Blut und kommen nicht im normalem gesunden Gewebe vor. Sie sind kurzlebige Zellen, denn ihre Halbwertzeit beträgt während der Zirkulation im Blut etwa sieben Tage und während der Migration ins Gewebe beträgt ihre Lebensdauer 2-3 Tage (HAEN, 1995).

Wenn ein Pathogen in ein Gewebe eindringt, ruft es fast immer eine Entzündungsreaktion hervor. Charakteristisch dafür sind Schmerzen, Rötung, Hitze und Schwellung am Ort der Infektion. Die Gesamtheit dieser Symptome werden durch Veränderungen in lokalen Blutgefäßen ausgelöst, die sich erweitern und für

Flüssigkeit und Proteine durchlässig werden. Dadurch schwillt das umliegende Gewebe und es sammeln sich Blutproteine (beispielsweise die Komponenten der Komplementkaskade) an, die bei der Immunverteidigung helfen. Gleichzeitig werden die Endothelzellen, die die Blutgefäße auskleiden, stimuliert Zelladhäsionsproteine zu exprimieren (ALBERTS *ET AL.*, 2004). Demzufolge können die Neutrophilen, infolge von Adhäsion (über CD11b/CD18 auf Neutrophilen und ICAM-1, ICAM-2 bzw. E-Selektin auf Endothelzellen) und transendotheliale Migration entlang eines chemotaktischen Gradienten (z.B. IL-8) rasch und in großer Zahl ins entzündliche Gewebe gelangen (KELLER, R.; 1994). Dieser Prozess der Migration bzw. Infiltration von Leukozyten aus dem Blutgefäß ins Gewebe wird als Extravasation bezeichnet und dieser Vorgang ist in Abb.5.4 schematisch dargestellt.

Im Gewebe angekommen besitzen Leukozyten vielfältige Zelloberflächenrezeptoren, wie den Mannose-Rezeptor, Komplementrezeptoren in aktivierten Zellen und den Fc-Rezeptor, die es ihnen ermöglichen, Pathogene zu erkennen und zu phagozytieren (ALLEN ET AL., 1995; ALLEN ET AL., 1996). Wenn an einen dieser Rezeptoren ein Ligand bindet, kommt es im Bereich der Pathogenanheftung zur Aktinpolymerisation. Danach schließt der Phagozyt seine Plasmamembran um den Erreger und nimmt ihn in ein großen membranbegrenzten Phagosom auf. Sobald das Pathogen phagozytiert wurde, kann er durch einen sauerstoffunabhängigen oder sauerstoff-abhängigen Mechanismus zerstört werden. Während des sauerstoffunabhängigen Mechanismus wird der Erreger durch Freisetzung von Enzymen, wie Lysozyme, Hydrolasen und Defensinen eliminiert (WITKO-SARSAT *ET AL.*, 2000). Der Phagozyt ist in der Lage an der Phagosomenmembran einen NADPH-Oxidase Komplex zu bilden, der die Herstellung von mehreren hochtoxischen Sauerstoffverbindungen, wie Superoxid (O_2^-), Hypochlorit (OCl^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale ($OH^\cdot$) und Stickstoffmonoxid (NO) katalysiert, die auf Pathogene toxisch wirken (ROOS *ET AL.*, 2003). Während der Produktion dieser Substanzen steigt der Sauerstoffverbrauch der Zellen vorrübergehend an und deshalb wird dieser Prozess als sauerstoffabhängiger Mechanismus oder respiratorischer Burst bezeichnet (DE CHATELET *ET AL.*, 1982; DE LEO *ET AL.*, 1996).

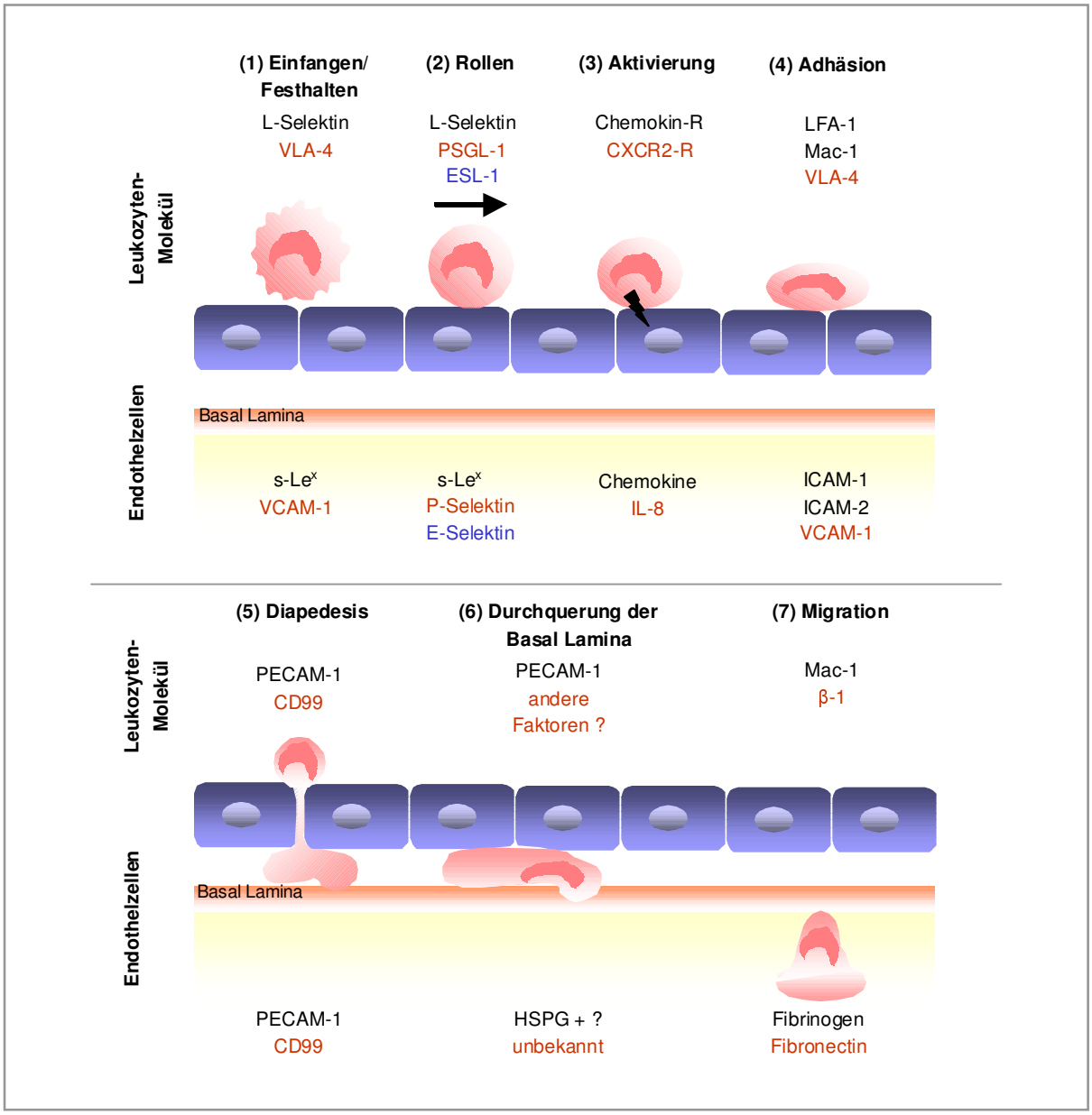


Abb. 5.4: Extravasation von PMNs aus dem Blutgefäß ins Gewebe.
(1) Das initiale Festhalten von PMNs durch die Endothelzellen wird hauptsächlich durch die Interaktion von Selektinen mit ihren Liganden vermittelt. Dabei interagiert das L-Selektin, der Leukozyten, mit s-Le^x-Liganden, der Endothellzellen und vermittelt das Entlangrollen der PMNs auf den Endothelzellen (MC EVER, 2002). (2) Parallel unterstützt auch *P-selectin glycoprotein Ligand-1* (PSGL-1) der Leukozyten das Entlangrollen der PMNs auf den Zellen, indem es mit dem P-Selektin/ E-Selektin der Endothelzellen in Wechselwirkung tritt (MC EWER UND CUMMINGS, 1997). (3 und 4) Der nächste Schritt der Leukozyten-Extravasation ist die Adhäsion der PMNs auf der Oberfläche der aktivierten Endothelzellen, durch die Interaktion der Leukozyten-Integrine LFA-1 (CD11a/CD18) und CR3 (CD11b/CD18, auch Mac-1 genannt) mit Molekülen des Endothelgewebes: *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) (BARREIRO *ET AL.*, 2002). Dabei verursachen IL-8 oder andere Chemokine eine Konformationsänderung von LFA-1 und CR3 auf den rollenden Leukozyten, was die Adhäsionskapazität erhöht und die PMNs festhält und das Entlangrollen stoppt. (5) Anschließend durchqueren die PMNs die Endothelzellschicht. In diesem Prozess sind LFA-1/Mac-1, sowie die Adhäsionsmoleküle PECAM oder CD31 involviert. Diese Moleküle werden sowohl von Leukozyten als auch von Endothelzellen exprimiert. Die Interaktion zwischen den Molekülen ermöglicht den Phagozyt sich zwischen den Endothelzellen durchzudrängen. (6) Das Eindringen durch die Basal Lamina ins Gewebe wird mit Hilfe von proteolytischen Enzymen ermöglicht (JANEWAY *ET AL.*, 1999). (7) Im letzten Schritt bewegt sich der Phagozyt entlang eines Chemokingradienten zum Ort der akuten Entzündung (abgewandelt nach MUELLER *ET. AL.*, 2002).

5.3 Zielstellung der Arbeit

Detaillierte Kenntnisse zur Wechselwirkung von Mikroorganismen mit der gastrointestinalen Schleimhaut sollen es ermöglichen innovative Strategien zur Früherkennung, wie auch neue Therapieansätze zu entwickeln. Dabei stehen besonders die Untersuchungen über die Expression von bakteriellen Genen pathogener Mikroorganismen im Vordergrund, die während der Infektion des Wirtes reguliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die bidirektionale Interaktion zwischen *H. pylori* und dem humanen Organsystem untersucht werden.

1.) Zielsetzung war zunächst die Genexpression und Modulation genetisch verschiedener *H. pylori* Stämmen, isoliert aus Patienten mit Gastritis, Ulkus oder Magenkarzinom, während der Interaktion mit humanen Zielzellen (Magenepithelzellen und PMNs) zu analysieren. Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR sollte die mRNA-Expression von bekannten *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren nach Kontakt mit den Zielzellen detektiert und quantifiziert werden.

2.) Da *H. pylori* auf ungewöhnliche Weise mit den Komponenten des angeborenen Immunsystems interagiert, sollten im zweiten Teil der Arbeit anhand der Infektionsmodelle (AGS-Zellen und PMNs) die Expression von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) auf Transkriptions-Ebene durch Verwendung der Echtzeit-PCR und auf Protein-Ebene anhand von Western Blot-Analysen untersucht werden.

3.) PMNs sind Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie spielen bei der Immunantwort eine wichtige Rolle, denn sie sind in der Lage Pathogene durch Phagozytose abzutöten. Im dritten Teil der Arbeit sollte die Expression von PMN-spezifischen Oberflächenmolekülen (Selektine, Adhäsionsproteine und Chemokin-Rezeptoren), die Freisetzung PMN-spezifischer Mediatoren, sowie die Regulation weiterer Faktoren, die eine Entzündungsreaktion induzieren, während der Wechselwirkung mit genetisch verschiedenen *H. pylori* Stämmen bzw. *H. pylori* Mutanten untersucht werden.

6. Material und Methoden

6.1 Chemikalien, Antibiotika, Oligonukleotide und Enzyme

Zur Herstellung von Nährmedien und Puffern wurde bidestilliertes Wasser aus einer Milli-Q-Anlage (Milli-Pore GmbH, Eschborn) verwendet. Für PCR-Ansätze, Verdünnung von Primern und Sonden wurde steriles Aqua *ad iniectabila* (Delta Select GmbH, Pfullingen) eingesetzt.
Soweit nicht anders vermerkt, waren die verwendeten Chemikalien und Antibiotika von p.a.-Qualität und wurden von Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe) oder Fluka/ Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.
Die Synthese von Oligonukleotiden und Sonden wurden von MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt.
Von Qiagen (Hilden) wurde die *Taq*-Polymerase und von Amersham Biosciences (Buckinghamshire, England) wurde der Ribonuklease-Inhibitor verwendet.

6.2 Mikroorganismen

6.2.1 Herkunft der *Helicobacter pylori*-Stämme

In unserem Institut wurden aus eingesendeten Bioptaten *H. pylori* isoliert und zur Bestimmung der Antibotika-Resistenz verarbeitet. Die daher stammenden *Helicobacter pylori* Stämme P284, P303, P1280, P1288, P1303 und P1321 sind klinische Isolate von Patienten mit *H. pylori*-assozierten Krankheiten. Die Stämme P1, P12, und G27 sind ebenfalls klinische Isolate, die bereits früher beschrieben wurden (SCHMITT UND HAAS, 1994; CENSINI *ET AL.*, 1996; ALM *ET AL.*, 1999). Darüber hinaus wurden für einige Experimente *knockout*-Mutanten von *H. pylori* (Tabelle 6.1) verwendet. Die Mutanten wurden nach dem Prinzip der Kassettenmutagenese durch Austausch des definierten DNA-Abschnitts gegen eine Kanamycin- oder Chloramphenicolkassette generiert. Die Mutante, der die gesamte Pathogenitätsinsel fehlt (Δ*cag*PAI), sowie die P12Δ*vacA*- und P1Δ*alpA/B*-Mutanten wurden von Dr. Rainer Haas (Max von Pettenkofer-Institut, München) zur Verfügung gestellt

Tabelle 6.1: Verwendete *knockout H. pylori* Stämme

Stamm	Gen*	Resistenz
P1Δ*cagA*	HP0547	Cam^R
P1Δ*virB4*	HP0544	Cam^R
P1Δ*virB11*	HP0525	Cam^R
P1Δ*virD4*	HP0524	Cam^R
P1Δ*vacA*	HP0887	Km^R
P1Δ*napA*	HP0243	Cam^R
P1Δ*ureA*	HP0073	Cam^R
P1Δ*katA*	HP0875	Cam^R
P1Δ*rlx1*	HP0996	Cam^R
P1Δ*rlx2*	HP1004	Cam^R
P1Δ*helikase*	HP0548	Cam^R
P1Δ*flaA*	HP0601	Cam^R
P1Δ*alpA/B*	HP0512-13	Km^R
P12Δ*cag*PAI	HP0520-48	Km^R
P12Δ*vacA*	HP0887	Km^R
P12Δ*ggt*	HP1118	Cam^R
P12Δ*napA*	HP0243	Km^R
P12ΔPkC	HP0432	Cam^R
G27Δ*babA*	HP1243	Km^R
G27Δ*sabA*	HP0725	Cam^R

*TIGR Nomenklatur (TOMB *ET AL.*, 1997)

(SCHMITT UND HAAS, 1994; ODENBREIT *ET AL.*, 1999). Alle weiteren P1-, P12- und G27-Mutanten wurden von Dr. Steffen Backert generiert.

6.2.2 Herkunft der *E. coli*-Stämme

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurden chemokompetente One Shot® TOP10-Zellen vom TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

6.3 Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien

6.3.1 *Helicobacter*-Platten

Die Kultivierung von *H. pylori* erfolgte wurde auf Platten mit 36 g/l GC-Agar-Base (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England), 15 g/l Peptose Pepton (Difco/Becton Dickenson, Maryland, USA), 1% Vitaminmix, 10% Pferdeserum (Biochrom AG, Berlin), 0,1% Vancomycin, denen nach dem Autoklavieren in Abhängigkeit des Stammes 4-8 µg/ml Chloramphenicol oder 8-15 µg/ml Kanamycin zugegeben wurde.

- **Herstellung des Vitaminmix**

Es wurden 2 Lösungen getrennt hergestellt:

Lösung 1 (500 ml in dd. H_2O)

Dextrose (D+Glucose)	100 g
L-Glutamin	10 g
L-Cystein	26 g
Cocarboxylase	100 mg
$Fe(NO_3)_3$	20 mg
Thiamin-HCl (Vitamin B1)	3 mg
p-Aminobenzoesäure	13 mg
NAD	250 mg
Vitamin B12	10 mg

Lösung 2 (300 ml in dd. H_2O +15 ml HCl)

L-Cystine	1,1 g
Adenine	1 g
Guanin-Cl	30 mg
L-Arginin	150 mg
Uracil	0,5 g

Beide Lösungen wurden komplett gelöst, vereinigt, auf 1000 ml aufgefüllt und sterilfiltriert.

6.3.2 *Helicobacter*-Flüssigmedium

Zur Herstellung der *Helicobacter*-Flüssigkultur wurde steriles *Brain Heart Infusion*-Medium (BHI-Medium; Becton Dickenson, Maryland, USA) mit 10% Fötalem Kälberserum (FCS; Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) oder Pferdeserum, 1% Vitaminmix und 0,1% Vancomycin versetzt.

6.3.3 Selektive *Luria Broth*-Platten (LB-Platten)

LB-Agar-Platten (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) wurden mit 32 g/l angesetzt, denen nach dem Autoklavieren 30 mg/l Kanamycin oder 100 mg/l Ampicillin, 120 mg/l IPTG (Roth, Karlsruhe) und 80 mg/l X-Gal (Roth, Karlsruhe) zugegeben wurde.

6.3.4 *Luria Broth*-Medium (LB-Medium)

Das flüssige LB-Medium (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) wurde mit 25 g/l hergestellt und nach dem Autoklavieren mit 30 mg/l Kanamycin oder 100 mg/l Ampicillin versetzt.

6.4 Aktivatoren

Die während der Arbeit verwendeten Aktivatoren zur Stimulation von polymorphkernigen Leukozyten (PMNs) sind in der Tabelle 6.2 dargestellt. Die Stimuli wurden von Orpegen Pharma (Heidelberg) und Sigma (Steinheim) bezogen.

Tabelle 6.2: Verwendete Aktivatoren

Name	Stammlösung	Endkonzentration	Funktion
Phorbol12-myristat-13-acetat (PMA)	8,1 nM	0,162 nM	Proteinkinase C-Ligand; starker Stimulus für den oxidativen Burst
N-formyl-MetLeuPhe (fMLP)	5 nM	0,1 nM	bakterielles chemo-taktisches Peptid; schwacher Stimulus für den oxidativen Burst
Natriumfluorid (NaF)	1 µM	20 nM	aktiviert niedrig-molekulare G-Proteine

6.5 Inhibitoren

Im Rahmen der Dissertation verwendete Inhibitoren sind in der Tabelle 6.3 dargestellt und wurden von den Firmen Calbiochem (Schwalbach) und Sigma (Steinheim) verwendet.

Tabelle 6.3: Verwendete Inhibitoren

Name	Stammlösung	Endkonzentration	Funktion
Genistein	100 mM	100 µM	Tyrosin-Proteinkinasen-Inhibitor
MG-132	10 mM	30 µM	NF_KB-Inhibitor
PD-98059	100 mM	50 µM	MAPKinasen-Inhibitor
SB-203580	10 mM	50 µM	p38-Inhibitor
SP-600125	25 mM	50 µM	JNK-Inhibitor
Vanadat	50mM	300µM	Phosphatase-Inhibitor

6.6 PCR-Oligonukleotide

6.6.1 Oligonukleotide zur Typisierung von *H. pylori*

16S rRNA-Gen (390 bp): *forward* 5‘-GGAGGATGAAGGTTTTAGGATTG-3‘
reverse 5‘-TCGTTTAGGGCGTGGACT-3‘
(ROKBI *ET AL*, 2001)

ureA-Gen (160 bp): *forward* 5‘-AAACGCAAAGAAAAAGGC -3‘
reverse 5‘-CCATCCATCACATCATCC -3‘
(ROKBI *ET AL*, 2001)

katA-Gen (120 bp): *forward* 5‘-AGAGGTTTTGCGATGAAGT -3‘
reverse 5‘-CGTTTTTGAGTGTTGATGAA -3‘
(ROKBI *ET AL*, 2001)

alpA-Gen (304 bp): *forward* 5‘-ACGCTTTCTCCCAATACC -3‘
reverse 5‘-AACACATTCCCCGCATTC- 3‘
(ROKBI *ET AL*, 2001)

cagA-Gen (183 bp):	*forward* 5‘-TTGACCAACAACCACAAACCGAAG-3‘
	reverse 5‘-CTTCCCTTAATTGCGAGATTCC -3‘
	(VAN DOORN *ET AL*, 1998)
vacAs1/2-Gen (176/ 203 bp):	*forward* 5’-ATGGAAATACAACAAACACAC-3’
	reverse 5’-CCTGARACCGTTCCTACAGC-3’
	(VAN DOORN *ET AL*, 1998)
vacAm1/2-Gen (401/ 476 bp):	*forward* 5’-CACAGCCACTTTCAATAACGA-3’
	reverse 5’-CGTCAAAATAATTCCAAGGG-3’
	(VAN DOORN *ET AL*, 1998)
iceA1-Gen (246 bp):	*forward* 5‘-GTGTTTTTAACCAAAGTATC-3‘
	reverse 5‘-CTATAGCCASTYTCTTTGCA-3‘
	(VAN DOORN *ET AL*, 1998)
iceA2-Gen (229/ 334 bp):	*forward* 5‘-GTTGGGTATATCACAATTTAT -3‘
	reverse 5‘-TTRCCCTATTTTCTAGTAGGT-3
	(VAN DOORN *ET AL*, 1998)
vacAs1/2-Gen (259/ 286 bp):	*forward* 5‘-ATGGAAATACAACAAACACAC -3‘
	reverse 5‘-CTGCTTGAATGCGCCAAA C -3‘
	(STROBEL ET *AL*, 1998)
vacAs1 a-Gen (190 bp):	*forward* 5‘-ATGGAAATACAACAAACACAC -3‘
	reverse 5‘-GTCAGCATCACACCGCAAC-3‘
	(STROBEL *ET AL*, 1998)
vacAs1 b-Gen (187 bp):	*forward* 5‘-ATGGAAATACAACAAACACAC -3‘
	reverse 5‘-AGCGCCATACCGCAAGAG-3‘
	(STROBEL *ET AL*, 1998)
vacAm1-Gen (290 bp):	*forward* 5‘-GGTCAAAATGCGGTCATGG-3‘
	reverse 5‘-CCATTGGTACCTGTAGAAAC-3‘
	(STROBEL *ET AL*, 1998)
vacAm2-Gen (352 bp):	*forward* 5‘-GGAGCCCCAGGAAACATTG-3‘
	reverse 5‘-CATAACTAGCGCCTTGCAC-3‘
	(STROBEL *ET AL*, 1998)
napA-Gen (370 bp):	*forward* 5‘-TGCAAGCGGATGCGATCGTGTT-3‘
	reverse 5‘-GCAACTTGGCCAATTGATCGTCCGC-3
	(LEAKEY *ET AL*, 2000)

Die dargestellten Primer wurden sowohl zur Typisierung des *H. pylori*-Genoms als auch zur Quantifizierung der *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren durch Echtzeit-PCR eingesetzt.

6.6.2 Standard-Fingerprint-(RAPD)-PCR-Primer

186 *forward:* 5'-GAGCGGCCAAAGGGAGCAGAC-3'

187 *forward:* 5'-CCGGATCCGTGATGCGGTGCG-3'

188 *forward:* 5'-GGTTGGGTGAGAATTGCACG-3'

(AKOPYANZ *ET AL*., 1992)

6.6.3 Oligonukleotide zur Amplifikation von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs)

TLR2 (65 bp): *forward* 5'-CCAGCAAATTACCTGTGTG-3'
reverse 5'-AGGCGGACATCCTGAACCT-3'

TLR4 (67 bp): *forward* 5'-GCAGTGAGGATGATGCCAGGAT-3'
reverse 5'-GCCATGGCTGGGATCAGAGT-3'

TLR9 (151 bp): *forward* 5'-GGACCTCTGGTACTGCTTCCA-3'
reverse 5'-AAGCTCGTTGTACACCCAGTCT-3'

6.6.4 Oligonukleotide zur Amplifikation des Haushaltgens GAPDH

GAPDH *forward:* 5'-TGAGAAGTATGACAACAGCC-3'

GAPDH *reverse:* 5'-TGAGTCCTTCCACGATACC-3'

(ROKBI *ET AL*, 2001)

6.6.5 CpG-DNA-Oligonukleotide

Diese Oligonukleotide wurden synthetisiert durch TIB MOLBIOL (Berlin) in einer Phosphothioat-geschützten Form und wurden in einer Konzentration von jeweils 2µM zu den Ansätzen dazugegeben.

<u>Aktivierendes Oligonukleotid (CpG):</u>

5'-TsCsgsTsCsgsTsTsTsTsgsTsCsgsTsTsTsTsgsTsCsgsTsT

<u>Nicht-aktivierendes Oligonukleotid (GpC):</u>

5'-TsgsCsTsgsCsTsTsTsTsgsTsgsCsTsTsTsTsgsTsgsCsTsT

(BAUER *ET AL*., 2001)

6.7 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

6.7.1 Kultivierung von Magenkarzinomzellen (AGS-Zellen)

AGS-Zellen (ATCC CRL 1739; eine Zelllinie aus einem Adenokarzinom des menschlichen Magens) wurden mit RPMI-1640 Medium (Invitrogen, Karlsruhe), 10% FCS und 1% Antibiotik-Antimykotik-Lösung (Sigma, Steinheim) in einem CO_2-Inkubator (5% CO_2/95% wassergesättigter Luftatmosphäre) kultiviert. Alle 2-3 Tage nach Erreichen einer Konfluenz von 70-90% wurden die Zellen passagiert und zu Infektionszwecken in neue Gewebekulturflaschen bzw. -schalen (Greiner, Frickenhausen) überführt.

6.7.2 Isolierung von polymorphkernigen Leukozyten (PMNs)

PMNs sind kurzlebige Zellen und wurden deshalb frisch aus Heparin behandeltem Blut von freiwilligen Spendern isoliert. Die Separation der PMNs von anderen Blutzellen wurde mittels Polymorphprep™ (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norwegen) nach dem Prinzip der Gradientenzentrifugation durchgeführt. Dabei wurden 5 ml Polymorphprep™-Lösung mit 5 ml anti-koagglutiniertem Blut überschichtet und bei 450-500 x g für 30-35 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden zwei Leukozyten-enthaltene Banden sichtbar, wobei die obere Bande Monozyten und Lymphozyten und die untere Bande PMNs enthielt. Die untere Bande wurde isoliert, in DPBS (Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien) gewaschen und anschließend in Kulturmedium überführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte am Coulter Micro-Diff-II. PMNs wurden in Gewebekulturschalen mit RPMI-1640 Medium und 10% FCS bei 37°C und 5%CO_2/95% wassergesättigter Luftatmosphäre für ca. 60 min inkubiert.

6.7.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

Das Prinzip der Transfektion beruht auf dem Transfer von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen, wobei ein Polykation verwendet wird, um polyanionische DNA zu komplexieren. Als Transfektionsreagenz wurde Gene-Jammer Transfection Reagent® (Stratagene, La Jolla, CA, USA) nach Anweisungen des Herstellers eingesetzt. Die Komplexe werden dem Kulturmedium zugegeben, adsorbieren an die Zelloberfläche, werden durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen und im Endosomen eingeschlossen. Ist die Lebensdauer der aufgenommenen DNA nur auf wenige Tage beschränkt, spricht man von der transienten Transfektion. Drei Stunden

nach der Transfektion erfolgte die Zugabe von frischen Medium, und die Zellen wurden für weitere 24-72h bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert.

6.8 Mikrobiologische Methoden

6.8.1 Infektion von Zelllinien mit *H. pylori*

H. pylori wurde aus -70°C Glyzerinkulturen (BHI-Medium mit 20% Glyzerol) auf *Helicobacter*-Platten ausgestrichen und für 2 Tage bei 37°C im Anaerobiertopf (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) mit 5% O_2-, 10% CO_2-, und 85% N_2-Atmosphäre (Campygen, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) inkubiert. Anschließend wurden die *H. pylori* Stämme für weitere zwei Tage auf neue *Helicobacter*-Platten amplifiziert und unter gleichen Bedingungen kultiviert.

Für die Infektion mit *H. pylori* wurden die Zellen in 6 well-Gewebekulturschalen mit 2 ml Medium und 10% FCS eingesät und für 2 Tage bis zum Erreichen von 70-80% Konfluenz im CO_2-Schrank inkubiert.

H. pylori wurde mit sterilen Wattestäbchen (Raucotupf, Lohmann & Rauscher, Rengsdorf) von der Agarplatte geerntet und in 2 ml BHI-Medium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien wurde photometrisch über die optische Dichte der Suspension bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt. Wenn nichts anderes angegeben wurden die Zellen mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 100 infiziert. Zu den uninfizierten Zellen wurde dasselbe Volumen DPBS ohne Bakterien gegeben. Nach der Inkubation im CO_2-Inkubator für ca. 6h wurden die infizierten Zellen an einem Phasenkontrast-Mikroskop (Olympus, Japan) analysiert.

6.8.2 Infektion von PMNs mit *H. pylori*

Die Anzucht von *H. pylori* für die Infektion von PMNs erfolgte wie im Kapitel 6.8.1 beschrieben. PMNs wurden vor der Infektion, wie in Kapitel 6.7.2 beschrieben, frisch isoliert und in Gewebekulturschalen mit RPMI-1640 und 10% FCS überführt. Innerhalb von 60 min im CO_2-Inkubator konnten sich die Zellen adhärieren und wurden mit 100 Bakterien pro Zelle infiziert. Die Inkubationszeit der Infektion war abhängig von der anschließenden Analyse.

6.8.3 Lebendzellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der lebenden Mikroorganismen während der Infektion mit humanen Zellen wurde die Methode der Lebendzellzahlbestimmung eingesetzt. Dazu wurden die jeweiligen Zellen, wie in den Kapiteln 6.8.1 und 6.8.2 beschrieben, infiziert und inkubiert. Danach erfolgte das Anlegen von Verdünnungsreihen im Verhältnis 1:10 (10^{-1}), 1:100 (10^{-2}), 1:1000 (10^{-3}) und 1:10000 (10^{-4}) in DPBS, welche auf *Helicobacter*-Platten ausgestrichen und für 3-4 Tage bei 37°C im Anaerobiertopf unter Campygen-Atmosphäre (5% O_2, 10% Co_2 und 85% N_2) kultiviert wurden. Nach Beendigung der Inkubation erfolgte die Bestimmung der kolonienbildenden Einheiten/ml (cfu; *colony forming units*) der einzelnen Verdünnungsstufen.

6.8.4 Mikroskopische Methoden

Für die Phasenkonstrastmikroskopie wurden Zellen direkt in ihren jeweiligen Zellkulturgefäßen unter einem inversen Phasenkontrastmikroskop betrachtet und mit einer Digitalkamera fotografiert.

6.9 Molekularbiologische Methoden

6.9.1 DNA-Isolierung

Für die Isolierung genomischer DNA, wurde *H. pylori* mit einem DPBS befeuchteten, sterilen Wattestäbchen von der Platte geerntet, in DPBS suspendiert und pelletiert. Anschließend erfolgte die Isolierung der DNA mit Hilfe des QIAamp™ DNA-Mini-Kits nach Anweisungen des Herstellers (Qiagen, Hilden).

6.9.2 RNA-Isolierung

Vor der Durchführung der RNA-Isolierung wurde die totale Menge an RNA, durch die direkte Zugabe von 2 Volumen RNAprotectBacteria™-Reagenz (Qiagen, Hilden) zum Infektionsansatz, stabilisiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension zentrifugiert. Die Bakterien wurden durch die Zugabe von 0,5 ml TE-Puffer mit 20mg/ml Lysozym (Roche Diagnostics, Mannheim) aufgeschlossen und die RNA mit dem RNeasy™-Midi-Kit nach Angaben des Herstellers isoliert (Qiagen, Hilden). Verunreinigungen an DNA konnten durch DNaseI-Behandlung (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) entfernt werden.

Die Überprüfung der Reinheit bzw. die Bestimmung der Konzentrationen von RNA/DNA erfolgte am BioPhotometer (Eppendorf).

- TE-Puffer:10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 8,0

6.9.3 Agarose-Gelelektrophorese

DNA wurde durch Elektrophorese in horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Zur Gelherstellung wurde Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf) in Konzentrationen von 0,8-2% (w/v) in 0,5 x TBE-Puffer durch Erhitzen gelöst und mit 0,1 µg/ ml Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) versetzt. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde die Lösung in entsprechende Gelkammern (BioRad, München) gegossen. Alle DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen von sechsfach konzentriertem Probenpuffer versetzt. Die Elekrophorese lief 60-120 min bei konstanter Spannung von 90-150 V. Zur Bestimmung von DNA-Fragmentgrößen wurde ein DNA Molecular Weight Marker XIV™ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Die DNA-Banden wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht visualisiert. Die Dokumentation und Digitalisierung eines DNA-Gels wurde durch ein Komplettsystem (Lumi Imager F-1, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) mittels Computergesteuerter CCD-Kamera und anschließender Auswertung durch spezielle Software ermöglicht.

- TBE-Puffer: 44,5 mM Tris-Base; 44,5 mM Borsäure; 1mM EDTA, pH 8,0
- 6 x Probenpuffer: 40% (w/ v) Saccharose, 0,25% (w/ v) Bromphenolblau

6.9.4 Polymerase-Kettenreaktion (Standard-PCR)

In dieser Arbeit wurde die PCR zur Genotypisierung unterschiedlicher *H. pylori* Stämme, zur Untersuchung von Genexpressionen nach Infektionsansätzen sowie zur Überprüfung von Plasmidkonstrukten nach der Klonierung verwendet. Die PCR-Reaktionsansätze wurden wie in Tabelle 6.4 angegeben, pipettiert.

Die PCR wurde mit Hilfe eines Alpha Unit™ Block -Systems (Biozym Technik GmbH, Hess. Oldendorf) durchgeführt. Üblicherweise wurde folgendes PCR-Programm verwendet: Erste Denaturierung bei 94°C für 5 min, 30-40 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 1 min, Hybridisierung der Primer bei Temperaturen T_m -5 für 1 min und

Elongation bei 72°C für 1 min. Nach dem letzten Zyklus wurde ein zehnminütiger Polymerisationsschritt bei 72°C angeschlossen.

Tabelle 6.4: Einzelne Komponenten einer PCR-Reaktion

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
DNA-Matrize	2,5 µl	1pg -100ng
Reaktionspuffer, 15 mM $MgCl_2$	5 µl	1 x, 1,5 mM $MgCl_2$
$MgCl_2$ (25 mM)	1 µl	0,5 mM
dNTPs (5 mM)	4 µl	0,4 mM
Primer *forward* (100 µM)	0,5 µl	1 µM
Primer *reverse* (100 µM)	0,5 µl	1 µM
Taq-Polymerase (100 U/µl)	0,25 µl	2,5 U
Aqua dest.	auf 50 µl auffüllen	

6.9.5 Fingerprint-(RAPD)-PCR

Die Methode der RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) *fingerprinting* PCR (AKOPYANZ *ET AL.*, 1992) wurde eingesetzt, um die DNA-Sequenz-Diversität der verschiedenen klinischen *H. pylori*-Isolate zu detektieren. Für die RAPD-PCR wurden 20 ng genomische DNA von *H. pylori*, 3mM $MgCl_2$, 20 pmol Primer (186F, 187F, 188F), 1U *Taq* DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden) und 250 µM dNTP's eingesetzt.
Im PCR-Programm wurden folgende Parameter verwendet: 4 Zyklen [94°C, 5 min; 40°C, 5 min und 72°C, 5 min], 30 Zyklen [94°C, 1 min; 55°C, 1 min und 72°C, 2 min] und 72°C für 10 min. Anschließend wurden Aliquots des PCR-Ansatzes auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei 75°V aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der Gene Ruler™ 1kb DNA-Leiter (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

6.9.6 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

In dieser Arbeit wurde isolierte RNA aus Infektionsansätzen mit Hilfe der RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Das Prinzip der RT-PCR beruht darauf, dass eine cDNA-Erststrangsynthese mit RNA als Matrize durchgeführt wird und anschließend eine PCR erfolgt, in der die zuvor gebildete cDNA als Matrize dient. Zur cDNA-Erststrangsynthese wurde das Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) RT-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet. Wie in Tabelle 6.5

angegeben erfolgte die RT-PCR mit Hilfe eines Oligo $(dt)_{12-18}$ Primers, der im Bereich des Poly (A)-Schwanzes am 3'-Ende der eukaryotischen mRNA hybridisierte, und aus der Gesamt-RNA alle mRNA-Moleküle in cDNA umschrieb. Genspezifische Primer wurden bei der bakteriellen RNA verwendet, um selektiv das gewünschte Transkript in cDNA zu erhalten.

Tabelle 6.5: Einzusetzende Mengen der einzelnen Komponenten einer RT-PCR

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
RNA-Matrize	20 µl	1 ng –5 µg
Oligo $(dt)_{12-18}$ Primer oder Genspezifischer Primer (0,5 µg)	1 µl	25 µM 1 µM
dNTPs (5mM)	5 µl	1,25 mM
5 x First strand Puffer	4 µl	1 x
DTT (0,1 M)	5 µl	25 mM
Ribonuklease-Inhibitor (170 U/µl)	0,3 µl	2,6 U
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl	10 U
DEPC-H_2O	auf 20 µl auffüllen	

6.9.7 Quantitative Echtzeit-PCR

Zur Untersuchung von mRNA-Expressionen in *H. pylori* bzw. in Wirtszellen wurde die quantitative Echtzeit-PCR eingesetzt. PCR-Produkte werden bei der Echtzeit-PCR durch Messung von Fluoreszenz nachgewiesen. Die Messung erfolgt dabei während jedes PCR-Zyklus eines Laufs, so dass Fluoreszenzanstiege, die sich parallel zum Anstieg der Menge der PCR-Produkte verhalten, detektiert werden können. Bei spezifischen Detektionssystemen z.B. dem in der Arbeit verwendeten TaqMan®-Prinzip werden, zusätzlich zu den zwei Primern, Sonden verwendet, die nur an DNA-Stücke mit komplementärer Basensequenz binden. Das 5'-Ende der Sonde ist mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (6-Carboxyfluorescein, FAM) markiert, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin, TAMRA) trägt. Zwischen den beiden Farbstoffen entsteht ein Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET), wobei eine Übertragung der Anregungszustände

von Elektronen zweier Fluorophore in hoher räumlicher Nähe stattfindet. Das Prinzip beruht darauf, dass die Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sonden zunächst an den komplementären Zielstrang zwischen den Primerbindungsstellen binden. Bei der Synthese des zweiten Stranges während der Kettenverlängerungsphase der PCR wird die Hybridisierungssonde durch die 3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase in kleine Fragmente geschnitten, und diese Bruchstücke werden aus dem Zielstrang freigesetzt. Dadurch werden Reporter- und Quenchermolekül räumlich getrennt und die Unterdrückungsfunktion des „Quenchers" aufgehoben. Die Zunahme der Fluoreszenz des Reportermoleküls wird gemessen. Entsprechend der Akkumulation der PCR-Produkte steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR-Zyklus an. Die Veränderung der Fluoreszenz kann mit Hilfe des ABI PRISM 5700 Sequence Detection Systems™ detektiert und Online verfolgt werden.

- **Sonden-Design**

Die fluorogene Sonde beeinflusst in großem Maße den Erfolg der Echtzeit-PCR. Diese Sonde besteht aus einem Oligonukleotid-Fragment, mit einem Reporter-Farbstoff am 5'-Ende und einem Quencher Farbstoff am 3'-Ende. Durch einen Phosphatrest am 3'-Ende wird die Verlängerung der Sonde verhindert. Die Sonde befindet sich zwischen den beiden Primern-Zielsequenzen. Das 5'-Ende der Sonde sollte relativ nah beim 3'-Ende des Primers liegen.

Tabelle 6.6: Sequenzen der verwendeten Sonden

Name der Sonde	Sequenz
16S rRNA-Sonde:	FAM-5'-TCCGTGCCAGCAGCCGC-3'-TAMRA
ureA-Sonde:	FAM-5'-AAGCGAGAGCTGGTAAGAAAAGTGCGG-3'-TAMRA
katA-Sonde	FAM-5'-GCCTGTTTTCTTTATCCGTGATGCGAT-3'-TAMRA
napA-Sonde	FAM-5 -TTTATCCGAAGCGATCAAACTCACTCGTG-3'-TAMRA
cagA-Sonde:	FAM-5'-CGGCTTTTAACCCGCAGCAATTTATCA -3'-TAMRA
vacAs1/2-Sonde:	FAM-5'-TGATCATTCCAGCCATTGTTGG-3'-TAMRA
TLR2-Sonde:	FAM-5'-TCCATCCCATGTGCGTGGCC-3'-TAMRA
TLR4-Sonde:	FAM-5'-TGTCTGCCTCGCGCCTGGC-3'-TAMRA
TLR9-Sonde:	FAM-5'-ACGATGCCTTCGTGGTCTTCGACAAA-3'-TAMRA

Damit es zum Sondenschnitt durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA-Polymerase kommen kann, muss die Sonde zuvor stabil an die Zielsequenz gebunden haben. Um dies zu erreichen, sollte der GC-Gehalt der Sonde etwa 50 % betragen. Bei der Sonde sollte es keine Komplementarität zu den beiden PCR-Primern geben, um eine Primer-Dimer Bildung zu verhindern. Die Sonde enthält eine Länge von ca. 20-30 bp. Die optimale Länge der Sonde liegt zwischen 24-30 Nukleotiden. Um diese Aspekte zu berücksichtigen wurde zum Sonden-Design die Primer Design Software Primer Express (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) verwendet. Die in der Arbeit verwendeten Sonden sind in der Tabelle 6.6 dargestellt. Bei der Echtzeit-PCR verwendete Primer sind im Kapitel 6.6.1 und 6.6.3 dargestellt.

- **Reaktionsansätze und Bedingungen der Echtzeit-PCR**

Zur Bestimmung der mRNA-Expression der Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori* durch Real-time PCR wurde das QuantiTectProbe™ RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Dieses RT-PCR Kit enthält 2 x QuantiTectProbe RT-PCR Mastermix (HotStarTaq™DNA-Polymerase, QuantiTectProbe RT-Puffer, dNTPs (einschließlich dUTP), ROX, 8 mM $MgCl_2$), QuantiTect RT-Mix (Omniscript™ Reverse Transkriptase, Sensiscript™Reverse Transkriptase) und RNase-freiem H_2O. Durch die Verwendung dieser Komponenten erfolgte die Reverse Transkription von RNA in cDNA und anschließender PCR in einem Reaktionsgefäß. Die Reaktionsansätze und - bedingungen der Echtzeit-PCR werden in den Tabellen 6.7 und 6.8 erläutert.

Tabelle 6.7: Reaktionsansätze mit QuantiTectProbe™ RT-PCR Kit

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
2 x RT-PCR Mastermix	25 µl	1 x
Primer *forward* (10 µM)	2 µl	0,4 µM
Primer *reverse* (10 µM)	2 µl	0,4 µM
TaqMan-Sonde (10 µM)	2 µl	0,4 µM
RT-Mix	0,5 µl	0,5 µl/Reaktion
RNA-Matrize	5 µl	1pg – 500ng/Reaktion
RNase-freies H_2O	auf 50 µl auffüllen	

Die verwendete Annealing-Temperatur/Zyklenanzahl war abhängig von Primer und Sonde des zu amplifizierenden PCR-Produktes: so wurden 45 Zyklen für *16SrRNA,*

katA, ureA und 50 Zyklen für *napA, vacA, cagA* verwendet, und 50°C Annealing für *ureA*, 55°C für *katA* und 60°C für *16SrRNA, napA, vacA, cagA* eingesetzt.
Zur Quantifizierung eukaryotischer mRNA wurde in dieser Arbeit die RNA unabhängig von der PCR, wie in Kapitel 6.9.6 beschrieben in cDNA umgewandelt.

Tabelle 6.8: Amplifikationsbedingungen mit QuantiTectProbe™ RT-PCR Kit

	Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenanzahl
RT	Reverse Transkription	30 min	50°C	1
PCR	Initiale Aktivierungsschritt	15 min	95°C	1
	Denaturierung	15 s	94°C	45-50
	Annealing/Extension	1 min	50-60 °C	45-50

Zur Amplifikation von PCR-Produkten wurde ein TaqMan Universal PCR Master Mix® (Applied Biosytems/Roche, Branchburg, NJ, USA) verwendet. In der Tabelle 6.9 sind die Reaktionsansätze dargestellt. Die Reaktionsbedingungen für die Amplifikation von DNA waren: die initiale Aktivierung der *Taq*-Polymerase für 2 min bei 50°C, die initiale Denaturierung für 10 min bei 95°C und 45 Zyklen: Denaturierung für 15 s bei 95°C und Annealing/Extension der Primer und Sonde für 1 min bei 60°C.

Tabelle 6.9: Reaktionsansätze mit Universal-PCR Master Mix®

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
2 x Universal-Mix	25 µl	1x
Primer *forward* (10 µM)	2 µl	0,4 µM
Primer *reverse* (10µM)	2 µl	0,4 µM
TaqMan-Sonde (10µM)	2 µl	0,4 µM
DNA-Matrize	5 µl	10-100 ng
H_2O	auf 50 µl auffüllen	

- **Verwendung von Matrizen-DNA als Standard**

In dieser Arbeit wurde parallel zur Ziel-DNA eine bekannte Template-DNA-Menge mit amplifiziert. Das Prinzip der Echtzeit-PCR beruht darauf, dass durch die unterschiedlich eingesetzten Matrizen-Mengen unterschiedliche Fluoreszenzsignale, demzufolge unterschiedliche C_T-Werte entstehen. Trägt man den ermittelten C_T-Wert

gegen den Logarithmus der anfangs eingesetzten DNA-Menge auf, erhält man eine Standardkurve, die es erlaubt, aus den C_T-Werten der Versuchsansätze die jeweils ursprüngliche vorhandene DNA-Menge zu ermitteln. Als Matrizen wurden Plasmide eingesetzt, welche die Sequenz der Ziel-DNA enthielten und wo die Kopienzahlen bekannt waren. Die unterschiedlichen Mengen der Plasmide ließen sich durch Verdünnungen im Verhältnis von 1:10 in den Verdünnungsstufen 10^9-10^1 Kopien/µl herstellen.

6.9.8 Klonierung von PCR-Produkten

In dieser Arbeit wurden PCR-Produkte kloniert, um Referenz-DNA für die Echtzeit-PCR herzustellen. Die Klonierung wurde mit TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Statt einer Ligase wird hier ein mit Topoisomerase I „aktivierter“ TA-Vektor verwendet.

Das zu klonierende PCR-Produkt wurde mit dem PCR Purification Kit® (Qiagen, Hilden) nach Anweisungen des Herstellers gereinigt. Eine typische TOPO® Cloning Reaktion enthielt 1 µl pCR® 4-TOPO-Vektor, 1 µl Salt Solution und 4 µl PCR-Produkt. Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transformation erfolgte in chemisch kompetente TOP 10 *E. coli*-Zellen. Es wurden 2 µl Ligationsansatz zu den Zellen gegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 s bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und danach für 10 min auf Eis abgekühlt. Es erfolgte die Zugabe von 250 µl SOC-Medium zu den Top 10-Zellen und anschließender Inkubation für 1h bei 37°C und 200 U/min. Der komplette Ansatz wurde auf zwei LB-Agarplatten mit Ampizillin, IPTG und X-Gal ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Durch die Verwendung von 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-$_D$-galactopyranosid (X-Gal) als β-Galaktosidasesubstrat und Isopropylthiogalaktosid (IPTG) als Induktor, erscheinen positive Klone weiß und negative Klone blau. Die weiß-gefärbten Klone wurden in je 5 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C und 200 U/min inkubiert. Anschließend erfolgte die Plasmidisolierung mit Hilfe des QIAspin Mini Prep™ Kit nach Anweisungen des Herstellers (Qiagen, Hilden).

6.9.9 Präparation des externen Standards für die Echtzeit-PCR

Nach der Plasmidisolierung wurde die DNA-Konzentration bei 260 nm nach der Standardmethode bestimmt. Anschließend erfolgte die Berechnung der Kopienzahl

des Plasmids nach folgender Formel nach Anweisungen der Firma Roche, Technisches Datenblatt Nr. LC 11/2000:

$$\frac{6 \times 10^{23}\ [\text{Kopien}/\mu l] \times \text{DNA-Konzentration}\ [g/\mu l]}{\text{Molekulargewicht}\ [g/mol]} = \text{Menge}\ [\text{Kopien}/\mu l]$$

Molekulargewicht = [Größe des Vektors in bp + Größe des PCR-Produktes in bp] x 660 Da/bp = x [da]
1 mol = x [da] = x [g]
1 mol = 6×10^{23} Moleküle (= Kopien)

Die Plasmid-DNA konnte nun als Template-DNA in Verdünnungsstufen zusätzlich zur Ziel-DNA eingesetzt werden, um die absoluten mRNA-Kopienzahl des gemessenen Gens zu erhalten.

6.10 Biochemische Methoden

6.10.1 SDS-PAGE

Die Extraktion der Proteine aus den Proben erfolgte durch die Zugabe von heißem 1x konzentriertem SDS-Probenpuffer.

Proteine wurden durch diskontinuierliche Natrium-Dodezyl-Sulfat (SDS) Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgrund ihres Molekulargewichtes während ihrer Wanderung durch die Gelmatrix in Richtung Anode getrennt. Dazu wurde das Mini-Protean Gelsystem von Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA) verwendet. Zunächst wurden 8-12%ige Trenngele gegossen und und nach der Polymerisation mit Sammelgel überschichtet. Die Zusammensetzung der Gele erfolgte wie beschrieben in SAMBROCK *ET AL.* (1998).

Die Gele wurden in der Gelkammer mit Gellaufpuffer versetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 5 min bei 95°C gekocht. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde der Proteingrößenstandard Page RulerPrestained™ Protein-Leiter (MBI Fermentas, St.Leon-Roth) verwendet.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit CBB-Färbelösung (*Coomassie Brilliant Blue*) gefärbt und anschließend zur Detektion von Proteinen mit Entfärbelösung entfärbt oder auf Polyvinylidendifluoridmembranen (PVDF; Roth, Karlsruhe) transferiert.

- SDS-Probenpuffer: 100mM Tris-HCl, pH 6,8; 5% DTT; 5% SDS; 0,2% Bromphenolblau; 20% Glyzerin
- 1 x Gellaufpuffer: 3 g Tris-Base; 14,4 g Glyzin; 1 g SDS
- CBB-Färbelösung: 50% Methanol; 10% Essigsäure; 0,05 % Serva-Blue R-250
- Entfärbelösung: 5% Methanol; 12,5% Essigsäure

6.10.2 Western Blot

Der Transfer der durch SDS-PAGE getrennten Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte durch die *semi-dry* Blot-Apparatur (Roth, Karlsruhe) unter Verwendung von Transferpuffer. Der Transfer erfolgte bei 200 mA für 2h bei Raumtemperatur. Die auf die Membran transferierten Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurden die Membranen zunächst für eine Stunde in 3% Rinderserum-Albumin Fraktion V (Sigma, Steinheim) oder in 5% Milchpulver (Roth, Karlsruhe) in 1 x TBST geblockt. Anschließend wurden die Membranen für 1 bis 2h mit dem primären Antikörper in 1 x TBST inkubiert. Die dabei verwendeten monoklonalen und polyklonalen Antikörper sind in der Tabelle 6.10 dargestellt.

- Transferpuffer: 25 mM Tris-Base; 192 mM Glyzin**;** 0,1 % (v/ v) 10 %iger SDS-Lösung; 20 % (v/ v) Methanol)
- 1 x TBST: 140 mM NaCl; 25 mM Tris-Base, pH 7,4

Nach Inkubation mit den Primärantikörpern wurde die Membran dreimal mit 1 x TBST für 10 min gewaschen und anschließend für 60 min mit dem jeweiligen Sekundärantikörper inkubiert. Die Meerrettich-Peroxidase gekoppelten anti-Maus beziehungsweise anti-Kaninchen-Immunglobulin Sekundärantikörper wurden von der Firma DAKO Cytomation (Glostrup, Dänemark) bezogen.
Nach erneutem dreimaligem Waschen in 1 x TBST wurden die Proteine durch Chemilumineszenz unter Verwendung des ECL Plus Western Blotting Detection Reagents™ (Amersham Biosciences, Buckinghamshire. England) visualisiert.
Um auf derselben Blotmembran nacheinander verschiedene Antigene nachzuweisen, wurden die an die Membran gebundenen Antikörper entfernt. Dazu wurde die getrocknete Membran kurz mit Methanol permeabilisiert und anschließend für 30 min bei 50°C in *Stripping*-Puffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1 x

TBST wurde die Membran erneut blockiert und das nächste Antigen konnte nachgewiesen werden.

- *Stripping*-Puffer: 62,5 mM Tris, pH 6,7; 100 mM β-Mercaptoethanol; 2% SDS

Tabelle 6.10: Verwendete Antikörper

	Firma	Verdünnung
monoklonale Antikörper		
α-TLR9	Imgenex, San Diego, USA	1:250
α-GAPDH	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	1:500
α-pTyr	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	1:1000
polyklonale Antikörper		
α-TLR 5	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	1:500
α-CagA	Austral Biologicals, San Ramon, USA	1:2000
α-Src (pY^{418})	Biosource, Camarillo, USA	1:1000
α-Src (pY^{529})	Biosource, Camarillo, USA	1:1000

6.11 Immunologische Methoden

6.11.1 ELISA

Für die Bestimmung der IL-8 Konzentration im Zellüberstand wurde ein Enzym-gekoppelter Immunoadsorptions-Assay (*enzym-linked immunosorbent assay*, ELISA) durchgeführt. Dazu wurde das OptEIA™ Human IL-8 Set (Pharmingen, San Diego, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Von jeder Probe wurden jeweils drei Parallelansätze gemessen.

6.11.2 FACS-Analyse

Durch eine Analyse mit einem „Fluorescence Activated Cell Sorter“ (FACS) kann eine Vielzahl von Zellen einzeln auf ihre Fluoreszenzeigenschaften hin untersucht werden. In einem FACS-Gerät werden durch einen Laserstrahl an Antikörper

gekoppelte bzw. in Nukleinsäuren interkalierende Farbstoffe oder exprimierte fluoreszierende Proteine zur Emission angeregt und diese Fluoreszenz mit Detektoren erfasst und an einen Computer weitergeleitet. Als wichtige primäre Parameter werden die Größe der Zellen durch das sogenannte Vorwärts-Streulicht (FSC), d.h. die Ablenkung des Lasers nach vorne, und die Granularität durch das Seitwärts-Streulicht (SSC), d.h. die Streuung des Lasers zur Seite, erfasst. Die so ermittelten Daten können als Histogramme oder als Punkt-Plots in der Auswertungs- und Aufnahme-Software dargestellt werden. Mit den Informationen der Größe und Granularität der Zellen kann eine homogene Zellpopulation zur Auswertung ausgewählt werden, die möglichst frei von Zellbruchstücken, Zelldubletten, mehrkernigen Riesenzellen, apoptotischen Zellen oder ähnlichen Störfaktoren ist. In der so bestimmten Population werden die Fluoreszenzeigenschaften einzelner Zellen gemessen und nach unterschiedlichen Kriterien, wie Gesamt-Fluoreszenz oder Fluoreszenz-Verteilung, ausgewertet.
Mit dem zur Verfügung stehenden FACS-Calibur™ (Becton Dickenson**)** können neben fluoreszierenden Proteinen, wie GFP, YFP, DsRed und mRFP1, auch eine Vielzahl von Fluorochromen (FITC, Cy3, PE, Propidium-Iodid oder ähnliche) angeregt und detektiert werden.

- **FACS-Färbung**

Im Rahmen der Dissertation wurde die FACS-Analyse zur Bestimmung von Oberflächenmarkern an *H. pylori* infizierten PMNs eingesetzt. Zunächst wurden frisch isolierte PMNs mit *H. pylori* wie in Kapitel 5.8.2 beschrieben infiziert und inkubiert.
Anschließend werde der 1 ml Inkubationsansatz abzentrifugiert, 750 µl des Überstandes entfernt und das Zellpellet in der Restflüssigkeit resuspendiert. Anschließend wurden 100 µl der Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt und mit je 5 µl Antikörper-Lösung versetzt. Hierbei erfolgte eine Doppelfärbung, dabei wurden die Zellen mit CD11B-FITC/PE anti-human fMLP-R oder mit CD62L-FITC/PE-anti human IL-8RB (CXCR2) inkubiert. PE-fMLP-R und PE-CXCR2 wurden von der Firma Pharmingen (San Diego, USA) bezogen und CD62L-FITC und CD11B-FITC wurden von Becton Dickensen (San Jose, CA, USA) verwendet. Die Zellen wurden für mindestens 15 min bei 4°C im Dunkeln mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert. Anschließend wurde die Zell-Antikörper-Suspension mit BD FACS Lysing Solution™ versetzt und für 10 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Dabei

erfolgte die Lyse von Erythrozyten, die während der Isolierung von PMNs vorhanden waren. Anschließend wurde der Ansatz abzentrifugiert und 2 x mit CellWash™ (Becton Dickenson, San Jose, CA, USA) gewaschen. Danach erfolgte die FACS-Messung. Grundsätzlich wurden vor einer Serie von Experimenten am FACS-Gerät Zellen vorbereitet, die als Nullkontrolle (ohne Infektion) zur Einstellung der Detektor-Sensitivität und der Kompensationen der Fluoreszenzkanäle dienten. Je nach Dichte der Zellsuspension wurden die Zellen mit FACSFlow™ (Becton Dickenson, San Jose, CA, USA) verdünnt oder unverdünnt in PBS analysiert. Für eine typische Analyse wurden mindestens 5×10^5-1×10^6 Zellen verwendet.

- **Auswertung von FACS-Experimenten**

Bei der Auswertung der aus FACS-Analysen gewonnenen Daten kam es bei den durchgeführten Experimenten auf die Stärke von grüner und roter Fluoreszenz in der homogenen Zellpopulation an. Dazu wurde der jeweilige Median der roten und der grünen Fluoreszenzstärken ermittelt. Für die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) wird der geometrische Mittelwert (Mn (x) oder GeoMean) herangezogen. Die Daten einer typischen Fluoreszenzanalyse werden durch die Software Cell Quest dargestellt.

6.12 Statistische Analyse

Die statistische Evaluierung der Daten erfolgte mit dem *Student's Test* des Sigma-Stat Statistik 2.0 Programms. P-Werte $< 0{,}05$ sind statistisch signifikant.

7. Ergebnisse

7.1. Genotypisierung von klinischen *H. pylori* Stämmen

Da die genomische DNA von *H. pylori* extrem heterogen ist, und die DNA-Sequenz, die Anordnung der Gene auf dem Chromosom und die Expression von Pathogenitätsfaktoren von Stamm zu Stamm variieren, wurden mehrere klinischen Isolate von *H. pylori* zu Beginn der Arbeiten molekulargenetisch typisiert.
Aus den verschiedenen Möglichkeiten von DNA-basierenden Identifizierungen individueller Isolate von *H. pylori* wurde die Methode der RAPD-PCR gewählt. Diese PCR-basierende DNA Fingerprint-Analyse ermöglichte die Detektion der DNA-Sequenzdiversität der einzelnen Isolate (AKOPYANZ *ET AL*., 1992). In der Abb. 7.1 sind die Ergebnisse der DNA-Analyse von acht *H. pylori* Stämmen dargestellt. Alle acht Stämme zeigten ein unterschiedliches RAPD-PCR-Muster (Abb. 7.1).

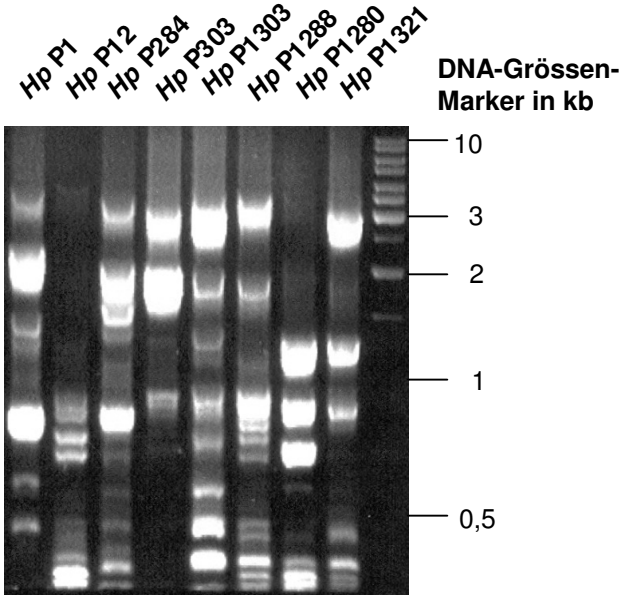


Abb. 7.1: RAPD-PCR-Analyse von acht klinischen Isolaten von *H. pylori.*
Die *H. pylori* Stämme P1, P12, P284, P303, P1303, P1288, P1280 und P1321 zeigen signifikante genomische DNA-Variationen, die mittels PCR unter Verwendung des Oligonukleotides F186 analysiert wurden. Der Marker ist ein 1kb Größenstandard.

Anschließend erfolgte die Amplifikation von *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren aus der genomischen DNA der acht Isolate unter Verwendung von spezifischen Primern mittels Standard-PCR. In der Tabelle 7.1 sind die Ergebnisse der PCR dargestellt und entsprechend der Typ I- und Typ II-Nomenklatur bzw. nach den Endoskopiebefunden der *H. pylori*-infizierten Patienten angeordnet. Aus der DNA aller acht Stämme konnten die Pathogenitätsfaktoren *ureA, katA, alpA* und *napA*

Tabelle 7.1: Genotypisierung der *H. pylori* Stämme durch PCR

			Analysierte Gene*												
Status	**Stamm**	**Endoskopie**	*ureA*	*katA*	*alpA*	*vacAs1*	*vacAs2*	*vacAs1a*	*vacAs1b*	*vacAm1*	*vacAm2*	*cagA*	*iceA1*	*iceA2*	*napA*
Typ I	P1	Dyspepsie	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
	P12	Ulkus duodeni	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
	P284	Ulkus duodeni	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
	P303	Magenkarzinom	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
Typ II	P1280	kein Befund	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
	P1288	Gastritis	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
	P1303	Gastritis	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
	P1321	Gastritis	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

*positives PCR-Signal (+); kein-PCR-Signal (-)

amplifiziert werden, während die jeweiligen *vacA*-Allele und *iceA1* nur frequentiert in allen acht *H. pylori* Stämmen vorkam. Indessen war *cagA* nur in den Stämmen P1, P12, P284 und P303 vorhanden.

Das *cagA*-Gen von *H. pylori* stellt einen Marker für das Vorhandensein der *cag*-PAI dar, welche für die Virulenz des Bakteriums gegenüber dem Wirt eine entscheidende Rolle spielt (BLASER UND BERG, 2001). Der *cag*-PAI-Status der in der Arbeit verwendeten klinischen Isolate von *H. pylori* wurde durch DNA-Microarray-Analyse genauer untersucht. Die Ergebnisse sind in der Abb. 7.2 dargestellt. Die *cagA*-positiven Stämme P1, P12 und P303 besitzen die offenen Leserahmen (ORF) für die Gene der *cag*-PAI, die für Proteine des T4SS kodieren, während die *cagA*-negativen Stämme P1280, P1288, P1303 und P1321 diese ORFS überwiegend nicht besitzen (Abb. 7.2). Eine Ausnahme bildet allerdings der *H. pylori*-Stamm P1280, bei dem die ORFs 520-526 identifiziert werden konnten, die für die VirD4- und VirB11-Proteine kodieren, die ebenfalls Komponenten des T4SS darstellen (Abb. 7.2).

Diese acht Stämme, mit unterschiedlichen genetischen Hintergrund, wurden zur Untersuchung verschiedener molekularer Mechanismen im Rahmen dieser Dissertationsarbeit verwendet.

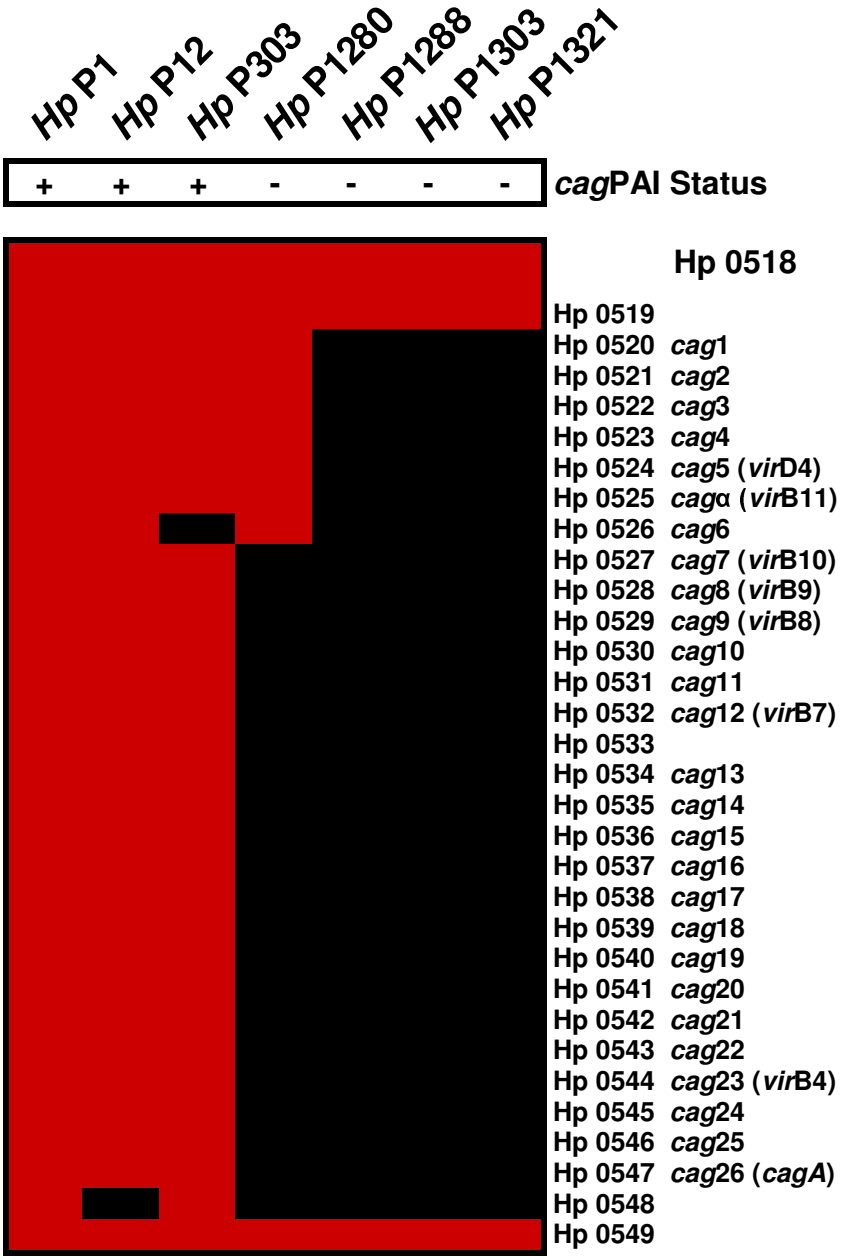


Abb. 7.2: DNA-Microarray-Analyse von verschiedenen *H. pylori*-Stämmen.
Die *H. pylori*-Stämme P1, P12 und P303 zeigen die ORFs für die Gene, die für das T4SS kodieren (roten Felder), während in den Stämmen P1280, P1288, P1303 und P1321 diese ORFs überwiegend nicht identifiziert werden konnten (schwarzen Felder). Der Stamm P284 wurde nicht in die Untersuchungen mit einbezogen. Die Analyse dieser Gene erfolgte mit einem Oligo-basierenden auf GlasMicroarray und wurde im Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin durchgeführt (GRESSMANN *ET AL.*, 2005).

7.2 Charakterisierung der Genregulation von *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren

7.2.1 Optimierung der Echtzeit-PCR am TaqMan

Die Untersuchung der Genregulation der Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori* erfolgte durch Echtzeit-PCR. Dabei wurden die Kopienzahlen der mRNA entsprechender Gene unter standardisierten Bedingungen ermittelt. Die Echtzeit-PCR wurde nach dem TaqMan-Prinzip durchgeführt, indem zusätzlich zu den beiden Standardprimern, eine fluoreszenzmarkierte Sonde zum Einsatz kam. Aus diesem Grund wurden zu Beginn der Arbeit Sonden entworfen, deren Sequenz innerhalb der Sequenzen des Primerpaares lag (Kapitel 10.1). Anschließend wurden die Bedingungen der Echtzeit-.PCR, wie Hybridisierungs-Temperatur der Primer bzw. der TaqMan-Sonden, sowie die PCR-Zyklenanzahl für die Amplifikation der Virulenz-assoziierten Gene optimiert. Um die absoluten mRNA-Kopienzahl der einzelnen Genen zu bestimmen, wurde ein externer Standard benötigt. Zur Herstellung dieser Standards wurden Plasmide generiert, in denen durch Standard-PCR amplifiziertes PCR-Produkt eines Virulenz-assoziierten Gens einkloniert und in *E. coli* vermehrt wurde. Dieser Standard wurde parallel zu den Proben in Verdünnungsstufen von 10^8-10^1 Kopien/µl während der Echtzeit-PCR mitgeführt. Auf Grund der unterschiedlichen Standard-Konzentrationen konnten unterschiedliche Fluoreszenzsignale und demzufolge unterschiedliche C_T-Werte detektiert werden. Daraus konnte eine Standardkurve ermittelt werden, mit deren Hilfe die absolute mRNA-Kopienzahl des gesuchten Gens analysiert werden konnte. In der Abb. 7.3 ist eine Standardkurve der internen Kontrolle der *16SrRNA* von *H. pylori* dargestellt.

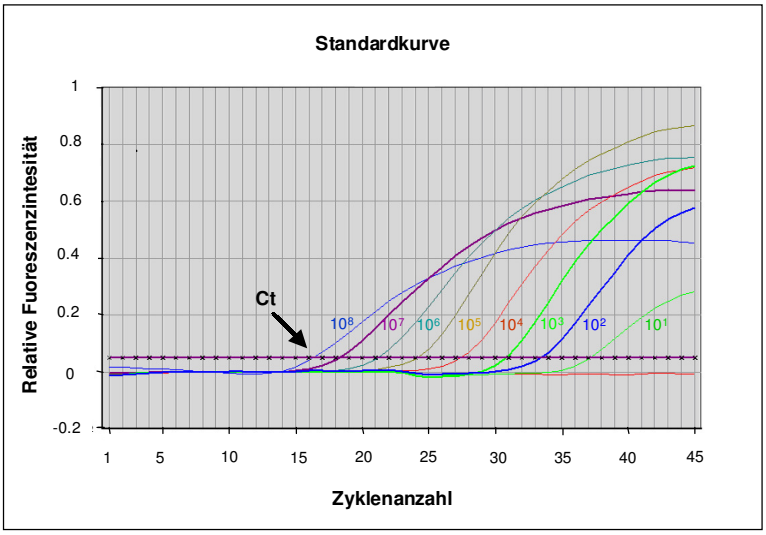


Abb. 7.3: Standardkurve der *16SrRNA* von *H. pylori* analysiert durch quantitative Echtzeit-PCR.
Darstellung der Verdünnungsreihe von 10^8-10^1 Kopien/µl der 16SrRNA-Plasmid-DNA, amplifiziert mittels ABI Prism 5700 Detection System.

7.2.2 Genexpression von *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren während der Kultivierung mit Magenepithelzellen

Um die Gene, die in *H. pylori* während einer Infektion mit Zielzellen unterschiedlich reguliert werden zu identifizieren, wurden diese in dieser Studie mit der Regulation der Gene in Abwesenheit der eukaryotischen Zellen unter den gleichen Bedingungen verglichen. Dazu wurden Magenkarzinom-Epithelzellen (AGS) mit je einem der acht klinischen Isolate von *H. pylori* mit einer MOI von 100 infiziert. Parallel wurden die Bakterien allein unter den gleichen Bedingungen im Kontrollmedium kultiviert. Nach einer Inkubation über eine Zeitspanne von 1, 3 und 6 Stunden nach der Infektion wurden die Bakterien (+/- AGS-Zellen) geerntet, die totale RNA isoliert und für die anschließende Echtzeit-PCR am TaqMan vorbereitet. Die Quantität und Qualität der bakteriellen und eukaryotischen RNA wurde durch konventionelle Methoden, wie PCR und Agarosegelelektrophorese analysiert. Dabei konnte in den RNA-Proben, die nicht mit der Reversen Transkriptase behandelt wurden, nach der Amplifikation keine kontaminierende DNA detektiert werden.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die beobachtete Genregulation nicht auf der Vermehrung oder dem Absterben der Bakterien während der Infektion beruht, wurden die mRNA-Kopienzahlen eines internen Referenz-Gens, der *16SrRNA*, über die Zeit von 6 Stunden bestimmt. In der Abb. 7.4A ist ein repräsentatives Beispiel für die nicht regulierte *16SrRNA* dargestellt. Auch in den anderen sieben Stämmen konnte keine Änderung in der Kopienzahl der *16SrRNA* beobachtet werden (Tabelle 7.2). Diese Daten zeigten zusammen mit den kolonienbildenden Einheiten (*cfu*), dass die Bakterien zu jedem Zeitpunkt vital waren und sich nicht innerhalb der Infektionszeit vermehrt hatten. Anschließend erfolgte die Amplifikation der mRNA der Virulenz-assoziierten Gene *ureA, katA, cagA, vacAs1, vacAs2* und *napA* von *H. pylori* allein und von *H. pylori*/AGS Co-Kultur durch Echtzeit-PCR. Die Gesamtergebnisse sind in der Tabelle 7.2 und repräsentative Beispiele sind in der Abbildung 7.4 dargestellt. Die übrigen Orginaldaten sind im Anhang (Kapitel 10.3) in Form von Abbildungen demonstriert.

Die Daten fassen die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten, wobei ein Gen als hoch- bzw. herunter reguliert betrachtet wurde, wenn das entsprechende Gen keine Regulation in der Kontrolle ohne Zellen zeigte oder die mRNA-Kopienzahlen des Gens sich während der Infektion änderte.

Tabelle 7.2: TaqMan-Analyse von *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren während der Inkubation mit AGS- Zellen

		Regulation von*						
Status	**Stamm**	*16S rRNA*	*ureA*	*katA*	*cagA*	*vacAs1*	*vacAs2*	*napA*
Typ I	P1	●	neg.	+**	+**	neg.	neg.	-
	P12	●	+**	neg.	-	●	neg.	neg.
	P284	●	+	+	neg.	+	neg.	●
	P303	●	●	-	+	neg.	+	●
Typ II	P1280	●	neg.	+	neg.	neg.	neg.	+
	P1288	●	●	●	neg.	neg.	+	●
	P1303	●	●	+	neg.	neg.	neg.	●
	P1321	●	+	+	neg.	neg.	+	+

*●, keine Regulation; +, Hochregulation; -, Runterregulation; neg., kein PCR-Produkt
** Gene zeigen eine zeitliche Regulation während der Infektion (siehe Text)

Da alle acht *H. pylori*-Isolate unterschiedliche mRNA-Expressionsprofile zeigen, liegt der Schluss nahe, dass die Regulation der entsprechenden Gene in einer stammabhängigen Art und Weise erfolgte (Tabelle 7.2). Zu ergänzen wäre die Beobachtung, dass keine der untersuchten Gene in den Stämmen übereinstimmend hoch- oder herunter reguliert wurde. Interessanterweise war die Anzahl der hochregulierten Gene in der Gruppe der Typ II-Stämme, denen die *cagPAI* fehlt, signifikant höher, und es konnte keine Herunterregulation der Gene detektiert werden. In der Gruppe der Typ I-Stämme wurde dagegen die Hoch- und Herunterregulation einer ganzen Reihe von Genen beobachtet. Zum Beispiel, das *napA*-Gen wurde in zwei Typ II-Stämmen hochreguliert (Tabelle 7.2; Bsp. in Abb. 7.4C), während es in einem Typ I Stamm herunter reguliert wurde (Tabelle 7.2, Bsp. in Abb. 7.4D). Jedoch zeigte die Regulation von *napA* keine Änderung in vier anderen Stämmen. Hinzufügend konnten eine Änderung in der Genexpression von *katA* detektiert werden. Sowohl in drei Typ II-Stämmen, als auch in zwei Typ I-Stämmen wurde *katA* überreinstimmend hochreguliert (Tabelle 7.2; Bsp. in Abb. 7.4E und 7.4F). Währenddessen zeigte der Typ I-Stamm (P303) eine Herunterregulation des *katA*-Gens während der Infektion mit AGS-Zellen (Tabelle 7.2). Im Gegensatz dazu wurden die *vacA*-Allele in zwei Stämmen jeder Gruppe hochreguliert (Tabelle 7.2; Beisp. Abb. 7.4B). Nach dem Vergleich der TaqMan-Ergebnisse der mRNA von *ureA*, wurde eine signifikante Hochregulation dieses Gens in drei Stämmen (Tabelle

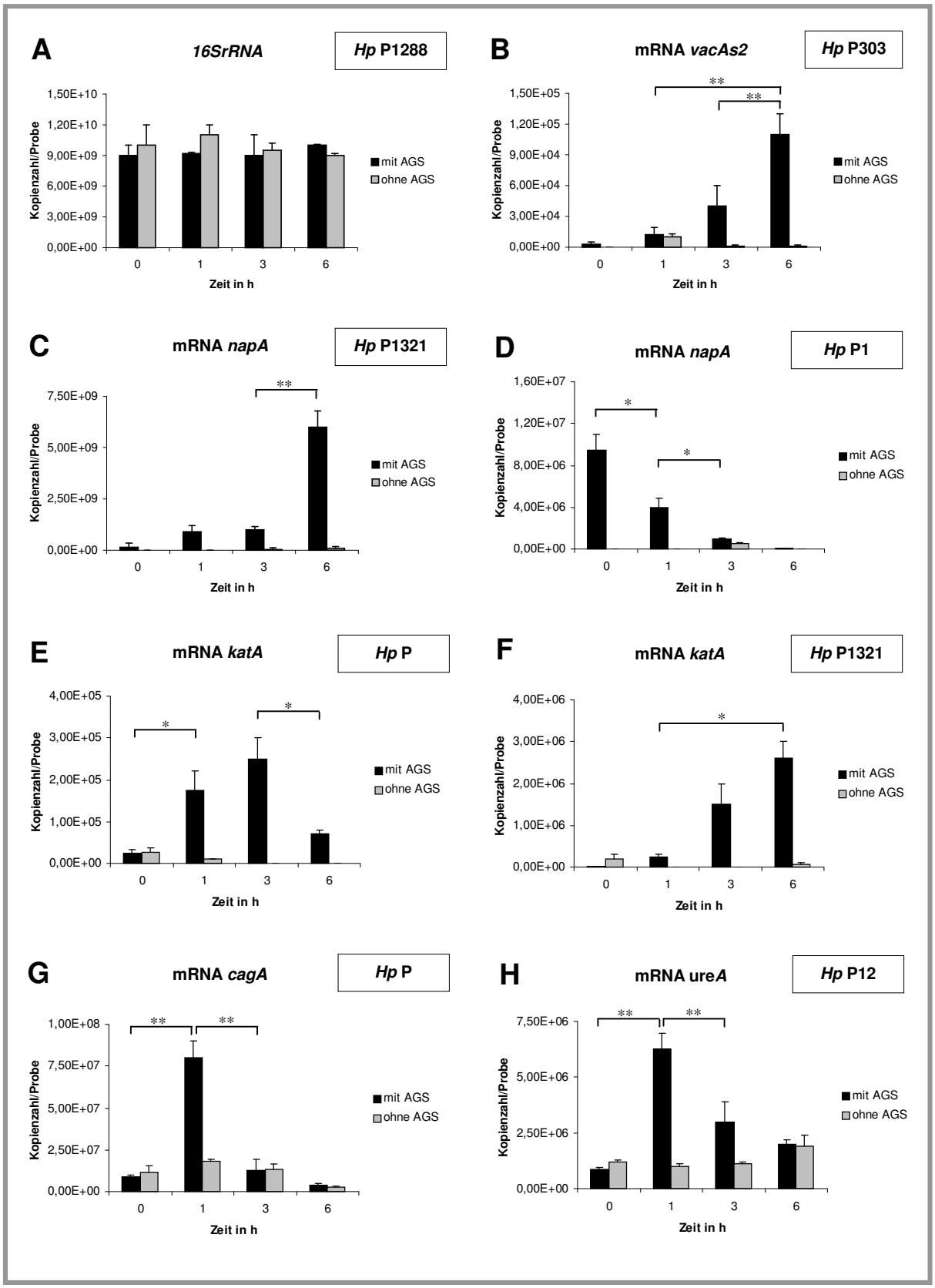


Abb. 7.4: Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl der regulierten Gene in *H. pylori* während der Infektion mit AGS-Zellen durch Echtzeit-PCR. Darstellung der Expression von *16SrRNA* (A), *vacAs2* (B), *napA* (C), *katA* (E-F), *cagA* (G) und *ureA* (H) während 1, 3 und 6 Stunden nach der Infektion. Die schwarzen Balken zeigen die Regulation der Gene während der Kultivierung mit AGS-Zellen, während die grauen Balken die Kontrolle, Bakterien allein, darstellen. Die mRNA-Kopienzahlen wurden durch TaqMan-PCR ermittelt. Die Daten sind Ergebnisse aus drei unterschiedlichen Experimenten. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet, (* $p < 0{,}05$, ** $< 0{,}005$).

7.2; Bsp. in Abb. 7.4H) beobachtet, während keine Regulation in drei anderen Stämmen detektiert werden konnte (Tabelle 7.2).

Überraschenderweise konnte die Hochregulation von *cagA* in nur zwei Typ I-Stämme analysiert werden (Tabelle 7.2; Bsp. in Abb. 7.4G). In den übrigen zwei Typ I-Stämmen wurde *cagA* herunter reguliert (Tabelle 6.2), trotz der Tatsache das *cagA* ein Effektorprotein des T4SS darstellt, welches von der *cagPAI* kodiert wird und eine wichtige Rolle in der *H. pylori* induzierten Pathogenese darstellt (COVACCI ET AL., 1999; MONTECUCCO UND RAPPUOLI, 2001; PEEK und BLASER, 2002).

Zusätzlich zur kontinuierlichen Hoch- und Herunterregulationen der Gene, wurde auch eine Veränderung der Gen-Expression innerhalb der Infektionszeit beobachtet. Zum Beispiel zeigte der Stamm P12 in der frühen Phase der Infektion (1 Stunde) eine hohe *ureA*-Expression, wohingegen die Expression anschließend abnahm (Abb. 7.4H). Das *katA*-Gen im Stamm P1 wurde während der ersten drei Stunden der AGS-Infektion hoch reguliert und anschließend konnte eine Abnahme der Expression beobachtet werden (Abb. 7.4E). Auch das *cagA*-Gen des Stammes P1 wurde während der frühen Phase der Infektion (1 Stunde) hoch reguliert, und anschließend wieder herunter reguliert.

Die Ergebnisse zeigten ebenfalls, das einige Gene die ursprünglich im Genom von *H. pylori* vorhanden sind, während der Wechselwirkung mit AGS-Zellen innerhalb dieses Infektionsmodells nicht quantifiziert werden konnten (Tabelle 7.2). Diese Tatsache ist darauf möglicherweise darauf zurückzuführen, das die mRNA dieser Gene zu diesem Zeitpunkt so gering exprimiert wurde, dass sie mittels Echtzeit-PCR nicht analysiert werden konnte.

Zusammenfassend besagen die Ergebnisse, dass genetisch unterschiedliche *H. pylori* Stämme Variationen in der Genregulation, während der Infektion mit AGS-Zellen, in einer zeitabhängigen Art und Weise aufweisen.

7.2.3 Genexpression von *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren während der Kultivierung mit Granulozyten

Zur Überprüfung der Wirtzellspezifität im Zusammenhang mit der Expression bakterieller Pathogenitätsfaktoren, wurde die Transkription derselben Gruppe von Genen während der Kultivierung der Bakterien mit Granulozyten untersucht. Zu diesem Zweck wurden frisch isolierte PMNs mit je einem der acht Stämme mit einer

MOI von 100 über die Zeit von 1, 3 und 6 Stunden inkubiert. Wie bereits für AGS-Zellen beschrieben, erfolgte auch hier die Kultivierung der Bakterien allein, parallel unter den gleichen Bedingungen im Kontrollmedium und anschließender Analyse durch Echtzeit- PCR am TaqMan.

Bei der Bestimmung der mRNA-Kopienzahl der *16SrRNA*-Gene zeigten sechs Stämme keine Regulation, was darauf hindeutete, dass keine Vermehrung bzw. Absterben der Bakterien zur Zeit der Infektion stattfand (Tabelle 7.3; Abb. 7.5A). Es wurden jedoch zwei Ausnahmen detektiert, denn die Stämme P284 und P1288 wiesen eine geringere *16SrRNA*-Expression nach 6 Stunden Infektion auf (Tabelle 7.3). Dieses Ergebnis korrelierte mit den niedrigen *cfu*-Werten zu diesem Zeitpunkt, was höchstwahrscheinlich auf ein Absterben dieser zwei Stämme zurückzuführen war. Als nächstes wurde die mRNA der Virulenz-assoziierten Gene *ureA, katA, cagA, vacAs1, vacAs2* und *napA* von *H. pylori* allein und *H. pylori* in Kontakt mit PMNs durch TaqMan-PCR quantifiziert. Die Menge der bestimmten mRNAs der Stämme P284 und P1288 wurde hierbei mit den entsprechenden *16SrRNA*-Spiegeln standardisiert. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten sind in der Tabelle 7.3 und einige repräsentative Beispiele in der Abb. 7.5 dargestellt. Die übrigen Orginaldaten sind im Anhang (Kapitel 10.4) in Form von Abbildungen demonstriert.

Tabelle 7.3: TaqMan-Analyse von *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren während der Inkubation mit humanen PMNs

		Regulation von*						
Status	**Stamm**	16S rRNA	*ureA*	*katA*	*cagA*	*vacAs1*	*vacAs2*	*napA*
Typ I	P1	●	neg.	●	+	neg.	neg.	+
	P12	●	-	-	●	●	neg.	neg.
	P284	-	-	-	neg.	+**	neg.	●
	P303	●	+**	-	-	neg.	-	-
Typ II	P1280	●	●	-	neg.	neg.	neg.	+**
	P1288	-	-	-	neg.	neg.	+	+**
	P1303	●	-	●	neg.	neg.	neg.	●
	P1321	●	+**	+	neg.	neg.	-	+**

* ●, keine Regulation; +, Hochregulation; -, Runterregulation; neg., kein PCR-Produkt
** Gene zeigen eine zeitliche Regulation während der Infektion (siehe Text)

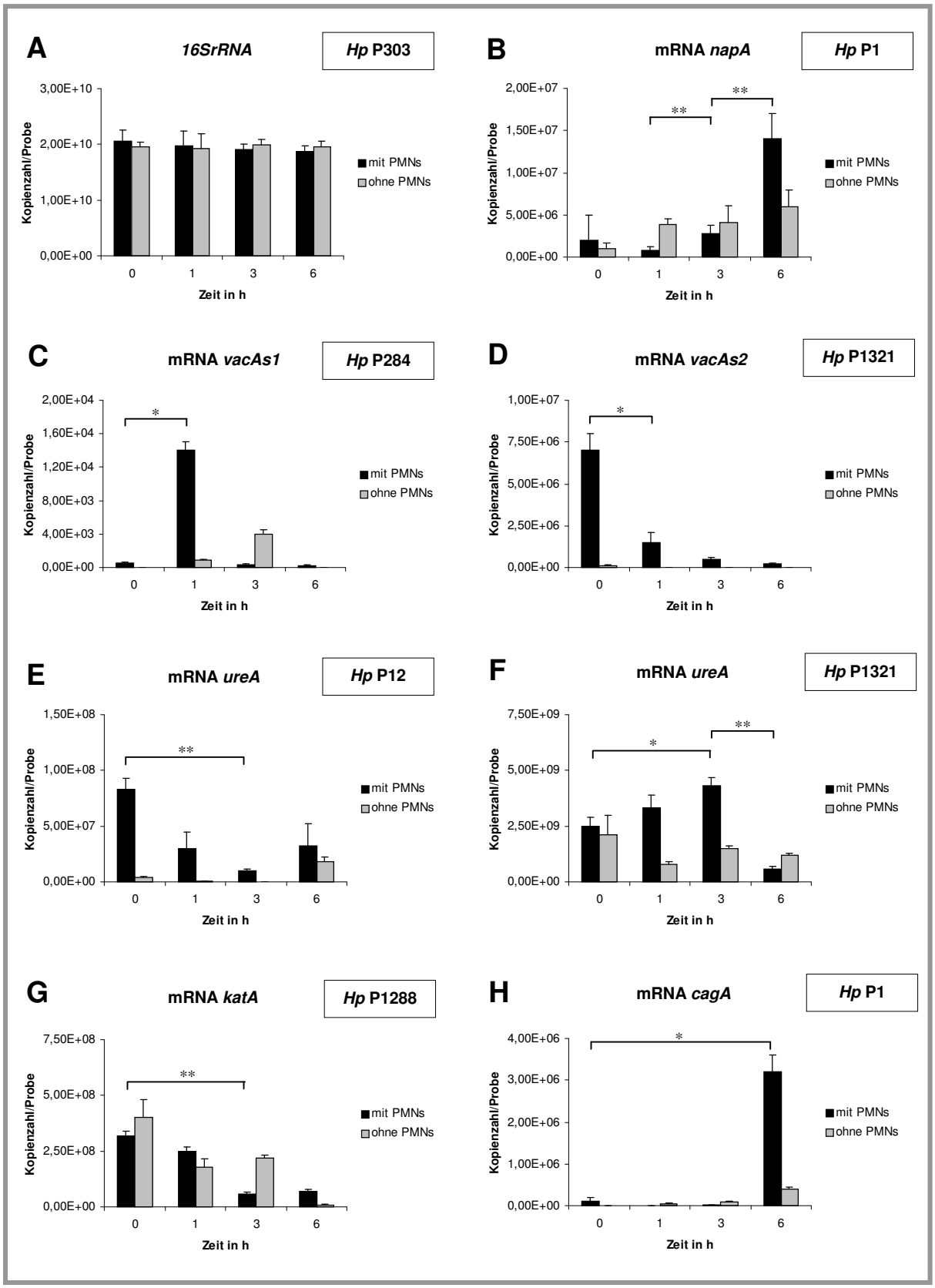


Abb. 7.5: Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl der regulierten Gene in *H. pylori* während der Infektion mit PMNs durch Echtzeit-PCR.
Darstellung der Expression von *16SrRNA* (A), *napA* (B), *vacAs1* (C-D), *ureA* (E-F), *katA* (G) und *cagA* (H) während 1, 3 und 6 Stunden nach der Infektion. Die schwarzen Balken zeigen die Regulation der Gene während der Kultivierung mit PMNs, während die grauen Balken die Kontrolle, Bakterien allein, darstellen. Die mRNA-Kopienzahlen wurden durch TaqMan-PCR ermittelt. Die Daten sind Ergebnisse aus drei unterschiedlichen Experimenten. Die Ergenisse wurden statistisch analysiert, dabei bedeutet * $p < 0{,}05$, ** $< 0{,}005$.

Wie bei der Analyse der Inkubation von *H. pylori* mit AGS-Zellen, konnte bei der Infektion mit PMNs gleichermaßen eine stammspezifische Expression der Gene beobachtet werden. Die überwiegende Mehrheit der Gene von *H. pylori* wurden dennoch herunter reguliert. Zwei interessante Ausnahmen stellten dabei die Stämme P1 und P1321 dar, die zwei beziehungsweise drei Gene hoch regulierten (Tabelle 7.3). Die Gene der übrigen sechs untersuchten Stämme wurden entweder herunter reguliert oder in ihrer Regulation gar nicht beeinflusst. Interessanter Weise wurde das *napA*-Gen, welches für das Neutrophil-aktivierende Protein A (NapA) kodiert, signifikant in vier *H. pylori*-Stämmen hoch reguliert (Tabelle 7.3; Bsp. in Abb. 7.5B).
Gleichzeitig wurde *vacA* in zwei *H. pylori*-Stämmen in einer zeitabhängigen Art und Weise hochreguliert (Tabelle 7.3; Abb. 7.5C) und in nur einem Stamm herunter reguliert (Abb. 7.5D). Anhand der Tatsache, dass *katA*, für Die Katalase kodiert, die ein Schutzmechanismus für *H. pylori* gegen den sauerstoffabhängigen Abtötungsmechanismus der PMNs darstellt (ODENBREIT *ET AL.*, 1996), wurde eine Hochregulation von *katA* während der Kultivierung mit PMNs erwartet. Stattdessen zeigten fünf *H. pylori* Stämme eine Runterregulation von *katA* (Tabelle 7.3; Bsp. in Abb. 7.5G).
Während der Infektion von PMNs mit *H. pylori* über die Zeit von 6 Stunden konnte ebenfalls keine kontinuierliche Hoch- und Herunterregulation bestimmter Gene beobachtet werden. So zeigte zum Beispiel der Stamm P12 eine Abnahme der *ureA*-Expression während der Zeit von 1-3 Stunden nach der Infektion, während die Expression des Genes nach 6 Stunden wieder leicht zunahm (Tabelle 7.3; Abb. 7.5E). In Ergänzung dazu wurde das *ureA*-Gen des Stammes P1321 in der frühen Phase der Infektion (1-3 Stunden) exprimiert, während die Expression des Genes nach 6 Stunden drastisch abnahm (Tabelle 7.3; Abb. 7.5F). Eine ähnliche Regulation konnte anhand des *ureA*-Gens des Stammes P303 beobachtet werden, welches ebenfalls in der frühen Phase der Infektion (1 Stunde) hoch reguliert wurde und die Expression anschließend abnahm (Tabelle 7.3). Das *vacA*-Gen des Stammes P284 wurde ebenfalls nach einer Stunde Infektion hoch reguliert, und anschließend signifikant herunter reguliert (Abb. 7.5C). Zusätzlich wurde das *napA*-Gen der Stämme P1280, P1288 und P1321 in der frühen Phase der Infektion (1 Stunde) hoch reguliert, während die Expression von *napA* anschließend wieder abnahm (Tabelle 7.3).

Die Ergebnisse zeigten auch innerhalb des Infektionsmodells mit PMNs, dass einige Gene die ursprünglich im Genom von *H. pylori* vorhanden sind, nicht quantifiziert werden konnten (Tabelle 7.3), was möglicherweise auf die geringe mRNA dieser Gene zu diesem Zeitpunkt zurück zuführen ist.

Zusammenfassend demonstrieren diese Daten, dass genetisch diverse *H. pylori* Stämme ein stammspezifisches und zeitabhängiges Genregulationsmuster nicht nur während der Infektion mit Magenepithelzellen, sondern auch während der Infektion mit Granulozyten aufweisen.

7.3 Die Rolle der Magenkarzinom-Epithelzellen während der Interaktion mit *H. pylori*

7.3.1 Infektion von AGS-Zellen mit klinischen *H. pylori* Stämmen

Ein bedeutender Virulenzfaktor der *H. pylori* Typ I-Stämme ist eine Pathogenitätsinsel (*cagPAI*), die das Effektor-Protein CagA kodiert, welches in die AGS-Zelle über das T4SS eingeschleust wird und Veränderungen des Aktinzytoskeletts der Zelle bewirkt, wie z.B. die Ausbildung des Elongationsphänotyps (ODENBREIT *ET AL*., 2000; STEIN *ET AL*., 2000; ASAHI *ET AL*., 2000; SEGAL *ET AL*:, 1999; SELBACH *ET AL*., 2003). Im Rahmen dieser Untersuchung sollten die Auswirkungen der acht genetisch unterschiedlichen Isolate von *H. pylori* auf die phänotypischen Veränderungen der AGS-Zellen analysiert werden. Demzufolge wurden AGS-Zellen mit jeweils einem der acht Stämme mit einer MOI von 100 für 6 Stunden infiziert. Als Kontrolle wurden uninfizierte AGS-Zellen unter den gleichen Bedingungen über die Zeit kultiviert. Anschließend erfolgte die Beobachtung der Infektionen am Phasenkontrastmikroskop. Die Ergebnisse sind in der Abb. 7.6 dargestellt.

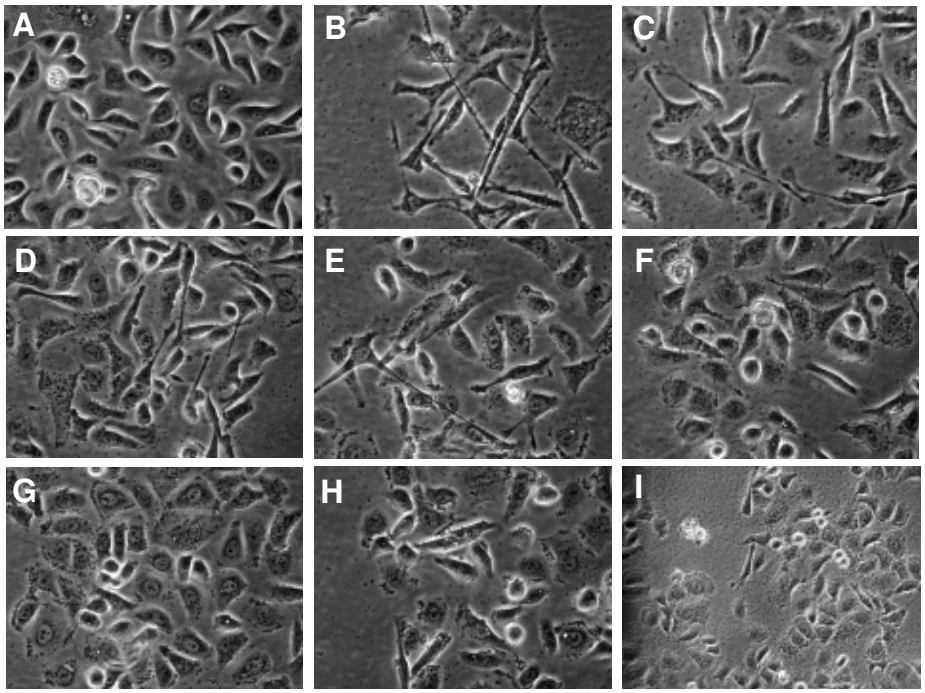


Abb. 7.6: Infektion von AGS-Zellen mit acht klinischen Isolaten von *H. pylori*.
Induktion des Elongationsphänotyps in AGS-Zellen durch die Typ I-Stämme P1 (B), P12 (C), P284 (D) und P303 (E), während in der uninfizierten AGS-Kontrolle (A) und in den Infektionen mit den Typ II-Stämmen P1280 (F), P1288 (G), P1303 (H) und P1321 (I) keine Veränderung des Phänotyps beobachtet werden konnte. Die Analyse erfolgte durch Phasenkontrastmikroskopie mit Digitalkamera.

Während die AGS-Zellen in der Kontrolle nach sechsstündiger Inkubation keine morphologischen Veränderungen aufwiesen (Abb. 7.6A), zeigten dagegen die AGS-Zellen, die mit den vier *cag*PAI-positiven Stämmen P1, P12, P284 und P303 infiziert wurden, die Ausbildung einer spindelförmigen Morphologie, dem sogenannten Elongationsphänotyp (Abb. 7.6B-E). Die Stärke des Elongationsphänotyps unterscheidet sich aber zwischen den einzelnen Typ I-Stämmen, indem P1 den stärksten Phänotyp zeigt. Im Gegensatz dazu konnte bei den *cag*PAI-negativen Stämmen P1280, P1288, P1303 und P1321 keine morphologischen Veränderungen analysiert werden (Abb. 7.6F-I).

7.3.2 Tyrosin-Phosphorylierung des bakteriellen CagA-Proteins durch AGS-Zellen

Die Translokation des bakteriellen CagA Proteins in das Zytoplasma von AGS-Zellen wurde indirekt über die CagA Tyrosin-phosphorylierung untersucht. CagA wird erst in den Wirtszellen Tyrosin-phosphoryliert, daher ist die Detektion von phosphoryliertem CagA ein sicheres Zeichen für die Translokation des Proteins (SEGAL *ET AL.*, 1999; ASAHI *ET AL.*, 2000; BACKERT *ET AL.*, 2000; ODENBREIT *ET AL.*, 2000; STEIN *ET AL.*, 2000). Die Zellen wurden jeweils mit den acht *H. pylori* Stämmen für 6 Stunden infiziert und anschließend gemeinsam mit den adhärenten Bakterien lysiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Tyrosin-Phosphorylierung mit Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpern detektiert (Abb. 7.7A).

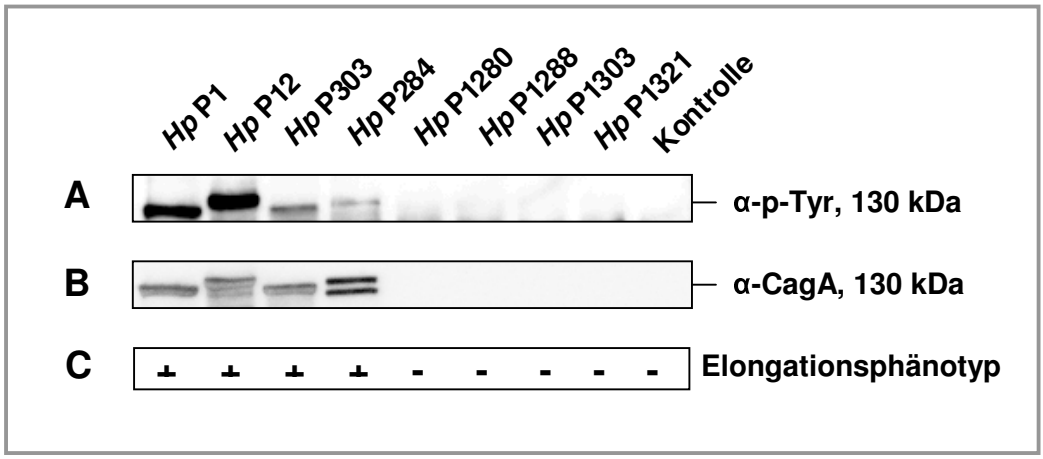


Abb. 7.7: CagA-Translokation von *H. pylori* in AGS-Zellen.
(A) CagA-Translokation wurde durch Detektion des Tyrosinphosphorylierten Proteins durch SDS-PAGE und Färbung mit Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpern (α-p-Tyr) nachgewiesen. (B) Zur Kontrolle wurde die Expression von CagA mit einem CagA-spezifischen Antikörper untersucht (α-CagA).(C) Ausbildung des Elongationsphänotyps ermittelt durch Mikroskopie (Kapitel 7.3.1).

Anschließend wurde die CagA-Expression auf dem gleichen Blot mit CagA-spezifischen Antikörper detektiert (Abb. 7.7B)
Wie erwartet wurde CagA während der Infektion mit P1, P12, P303 und P284 Tyrosin-phosphoryliert, was mit der Ausbildung des Elongationsphänotyps (Kapitel 7.3.1) korreliert (Abb. 7.7C). Die Stämme P1280, P1288, P1303 und P1321 exprimieren kein CagA und daher konnte auch keine Tyrosinphosphorylierung bzw. keine Veränderung des Zytoskelettes von AGS-Zellen beobachtet werden (Abb. 7.7C).

7.3.3 Freisetzung von Interleukin-8 (IL-8) durch AGS-Zellen

Während der Wechselwirkung mit *H. pylori* setzen die Magenepithelzellen IL-8 frei, welches großen Einfluss in der Induktion nachfolgender inflammatorischer Prozesse hat (BODGER UND CRABTREE, 1998; CENSINI *ET AL.*, 2001). Zur Untersuchung der IL-8-Sekretion von AGS-Zellen während der Infektion mit genetisch unterschiedlichen *H. pylori* Stämmen, wurden die Zellen mit je einem der acht klinischen *H. pylori* Stämme über die Zeitspanne von 1, 3 und 6 Stunden infiziert. Uninfizierte AGS Zellen wurden parallel unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Nach der Inkubation wurden die Kulturüberstände der Infektionen entnommen und die IL-8-Konzentration durch ELISA-Analyse bestimmt. Die Ergebnisse, ermittelt von drei unabhängigen Experimenten, sind in der Abb. 7.8 dargestellt.
Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass alle *H. pylori*-infizierten AGS-Zellen eine Zunahme in der IL-8-Sekretion aufweisen. Dabei konnte beobachtet werden, dass die genetisch unterschiedlichen *H. pylori* Stämme unterschiedliche IL-8 Konzentrationen induzieren konnten, während die AGS-Kontrolle einen gleichen IL-8-Spiegel über die Zeit der Infektion zeigte. Die AGS-Zellen, die mit den Typ I-Stämmen P1 und P12 infiziert wurden, sekretierten die höchste Menge an IL-8, wohingegen die Zellen, infiziert mit den anderen beiden Typ I-Stämmen, eine geringere IL-8-Konzentration aufwiesen (Abb. 7.8A). Auch innerhalb der Typ II-infizierten AGS-Zellen waren Unterschiede in der IL-8-Sekretion zu beobachten. Die Stämme P1280 und P1288 bildeten innerhalb ihrer Gruppe die höchsten Mengen an IL-8, während die Stämme P1303 und P1321 nur geringere Konzentrationen an IL-8 induzieren konnten (Abb. 7.8B).

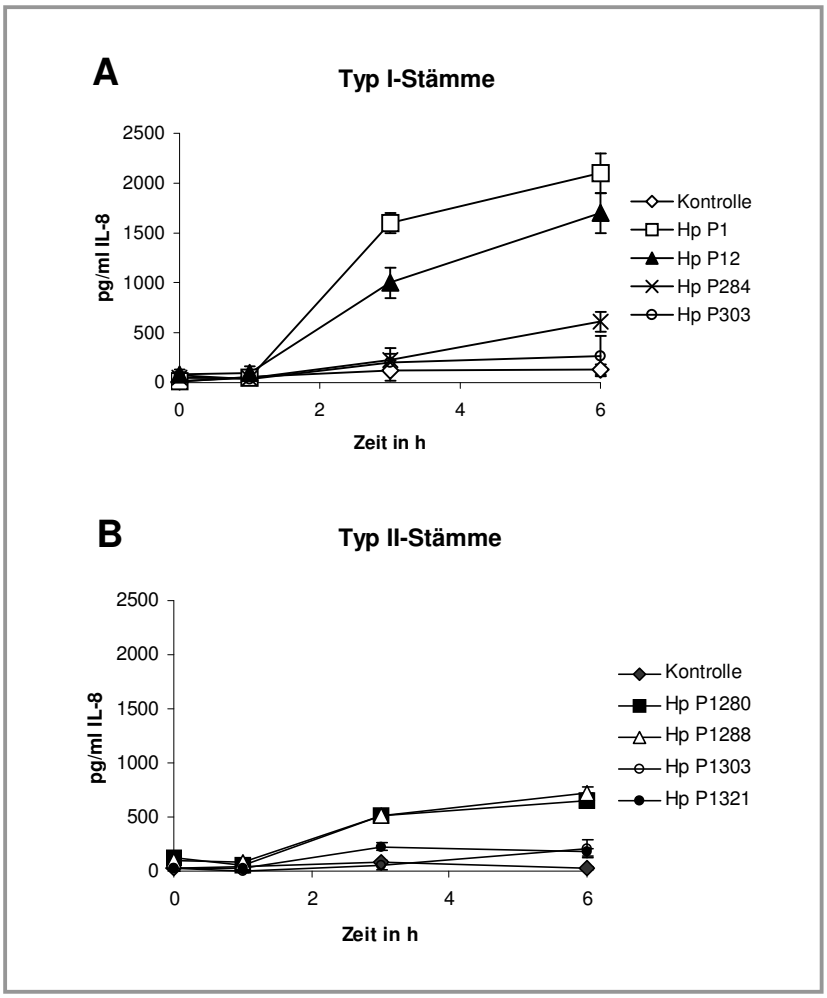


Abb. 7.8: Induktion der IL-8-Sekretion in AGS-Zellen während der Infektion mit *H. pylori.*
(A) IL-8-Freisetzung in AGS-Zellen infiziert mit Typ I-Stämmen und (B) infiziert mit Typ II-Stämmen. Daten wurden durch ELISA-Analyse ermittelt und sind Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

7.3.4 mRNA-Expression von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) in AGS-Zellen

Epithelzellen exprimieren TLRs auf ihrer Oberfläche, die mit konservierten Komponenten von Mikroorganismen interagieren können. Dazu gehören unter anderem die bakteriellen Produkte, wie Lipoproteine (TLR2), Lipopolysaccharid (TLR4) und Flagellin (TLR5), sowie bakterielle CpG-DNA (TLR9) (BÄCKHED UND HORNEF, 2003).

Anhand dieser Studie sollte untersucht werden, inwieweit AGS-Zellen verschiedene TLRs exprimieren und auf welche Art und Weise diese Rezeptoren während der Infektion mit genetisch unterschiedlichen *H. pylori*-Stämmen reguliert werden. Diese Analyse basierte auf der Quantifizierung der mRNA der einzelnen Rezeptoren mit Hilfe der Echtzeit-PCR. Dazu wurden AGS-Zellen mit je einem der acht *H. pylori*

Stämme mit einer MOI von 100 infiziert und über die Zeitspanne von 1, 3 und 6 Stunden inkubiert. Parallel erfolgte die Kultivierung von uninfizierten Zellen unter den gleichen Bedingungen. Nach der Inkubation wurde aus den AGS-Zellen (+/- Bakterien) die totale RNA isoliert. Nach der Überprüfung von Qualität und Quantität durch Standard-PCR und Agarosegelelektrophorese wurde die RNA durch die RT-PCR in cDNA umgeschrieben und für die anschließende Echtzeit-PCR am TaqMan vorbereitet. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Unterschiede in der Expression der TLRs durch Absterben von AGS-Zellen während der Infektion auftraten, wurde aus der cDNA des jeweiligen Inkubationszeitpunktes die GAPDH durch PCR amplifiziert. Dabei konnte eine gleichmäßige Expression der GAPDH sowohl in infizierten und nicht infizierten AGS-Zellen detektiert werden. Anschließend wurden die mRNA-Kopienzahlen der TLR2, TLR4 und TLR9 durch Echtzeit-PCR unter Verwendung von externen Standards analysiert. Als externe Standards wurden Plasmide generiert, die das jeweilige TLR-Amplifikat enthielten und die in Verdünnungsstufen, parallel zu den Proben, durch Echtzeit-PCR amplifiziert wurden.
Die Ergebnisse sind in der Tabelle 7.4 und einige repräsentative Ergebnisse sind in der Abb. 7.9 dargestellt. Die übrigen Orginaldaten sind im Anhang (Kapitel 10.5) in Form von Abbildungen demonstriert. Die Daten sind Resultate aus drei unterschiedlichen Experimenten und die Gene wurden als hoch oder herunter reguliert betrachtet, wenn das entsprechende Gen keine Regulation in der uninfizierten AGS-Kontrolle zeigte oder wenn während der Infektion eine signifikante Änderung der mRNA-Kopienzahl des Gens zu beobachten war.
Zusammenfassend konnte in dieser Studie beobachtet werden, dass die Rezeptoren TLR2, 4 und 9 auch ohne *H. pylori*-Kontakt in AGS-Zellen exprimiert werden, und das eine Regulation der TLRs innerhalb dieses Infektionsmodells nur in einigen Fällen beobachtet werden konnte. Dementsprechend zeigten zum Beispiel die AGS-Zellen, infiziert mit den vier *H. pylori* Stämmen P1, P12, P1288 und P1321, eine höhere Kopienzahl von TLR2 als die uninfizierten Kontrollen (Tabelle 7.4; Abb. 7.9A, B). Bei den anderen vier Isolaten von *H. pylori* konnte keine Regulation des TLR2-Gens detektiert werden (Tabelle 7.4). Eine zeitabhängige Regulation des TLR2-Gens über 1, 3 und 6 Stunden Infektion mit *H. pylori* konnte ebenfalls in nur zwei Fällen beobachtet werden. So wurde TLR2 in den AGS-Zellen, die mit den *H. pylori* Stämmen P1288 und P1321 infiziert wurden, über die Zeit bis zu 6 Stunden hoch

Tabelle 7.4: mRNA-Expression von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) auf AGS-Zellen während der Infektion mit *H. pylori* ermittelt durch Echtzeit-PCR

		Regulation von*		
Bezeichnung	Stämme	TLR2	TLR4	TLR9
Typ I	P1	+	●	+
	P12	+	+	-**
	P284	●	●	●
	P303	●	●	●
Typ II	P1280	●	●	●
	P1288	+**	●	●
	P1303	●	●	●
	P1321	+**	●	●

*●, keine Regulation; +, Hochregulation; -, Runterregulation;
** Gene zeigen eine zeitliche Regulation während der Infektion (siehe Text)

reguliert (Tabelle 7.4; Bsp. in Abb. 7.9B).

Parallel konnte in *H. pylori*-infizierten AGS-Zellen keine Regulation von TLR4 beobachtet werden. So zeigten die Zellen, die mit sieben der *H. pylori* Stämme infiziert wurden, die gleiche Anzahl an mRNA-Kopien wie die entsprechenden uninfizierten AGS-Kontrollen (Tabelle 7.4; Abb. 7.9C,D). Eine Regulation des TLR4-Gens über die Zeit konnte nicht beobachtet werden (Tabelle 7.4), wobei allerdings eine Ausnahme die AGS-Zellen, infiziert mit P12, bildeten, die das TLR4-Gen über die Zeit von 6 Stunden hoch reguliert hatten (Abb. 7.9C).

Während der Untersuchung der TLR9-Expression in AGS-Zellen infiziert mit *H. pylori*, zeigten die Zellen infiziert mit sechs der acht *H. pylori* Stämme keine Regulation des TLR9-Gens (Tabelle 7.4). Es konnten aber zwei Ausnahmen detektiert werden, dementsprechend wurde in P1-infizierten Zellen TLR9 über die Zeit von 6 Stunden hoch reguliert (Tabelle 7.4; Abb. 7.9E), wobei in den Zellen, die mit P12 kultiviert wurden, das TLR9-Gen nach einer Stunde Infektion erst hoch reguliert, und dann bis hin zu 6 Stunden herunter reguliert wurde (Tabelle 7.4; Bsp. in Abb. 7.9F). In dieser Studie zeigten nur die Zellen eine Veränderung der TLR9-Expression, die mit den Typ I-Stämmen P1 und P12 infiziert wurden, wohingegen die übrigen sechs Stämme keinen Einfluss auf die Regulation des TLR9-Gens ausübten (Tabelle 7.4).

Als Schlussfolgerung dieser Studie über die Rolle von TLRs während der Infektion mit *H. pylori* können folgende Aussagen gemacht werden: TLR2 spielt offenbar bei

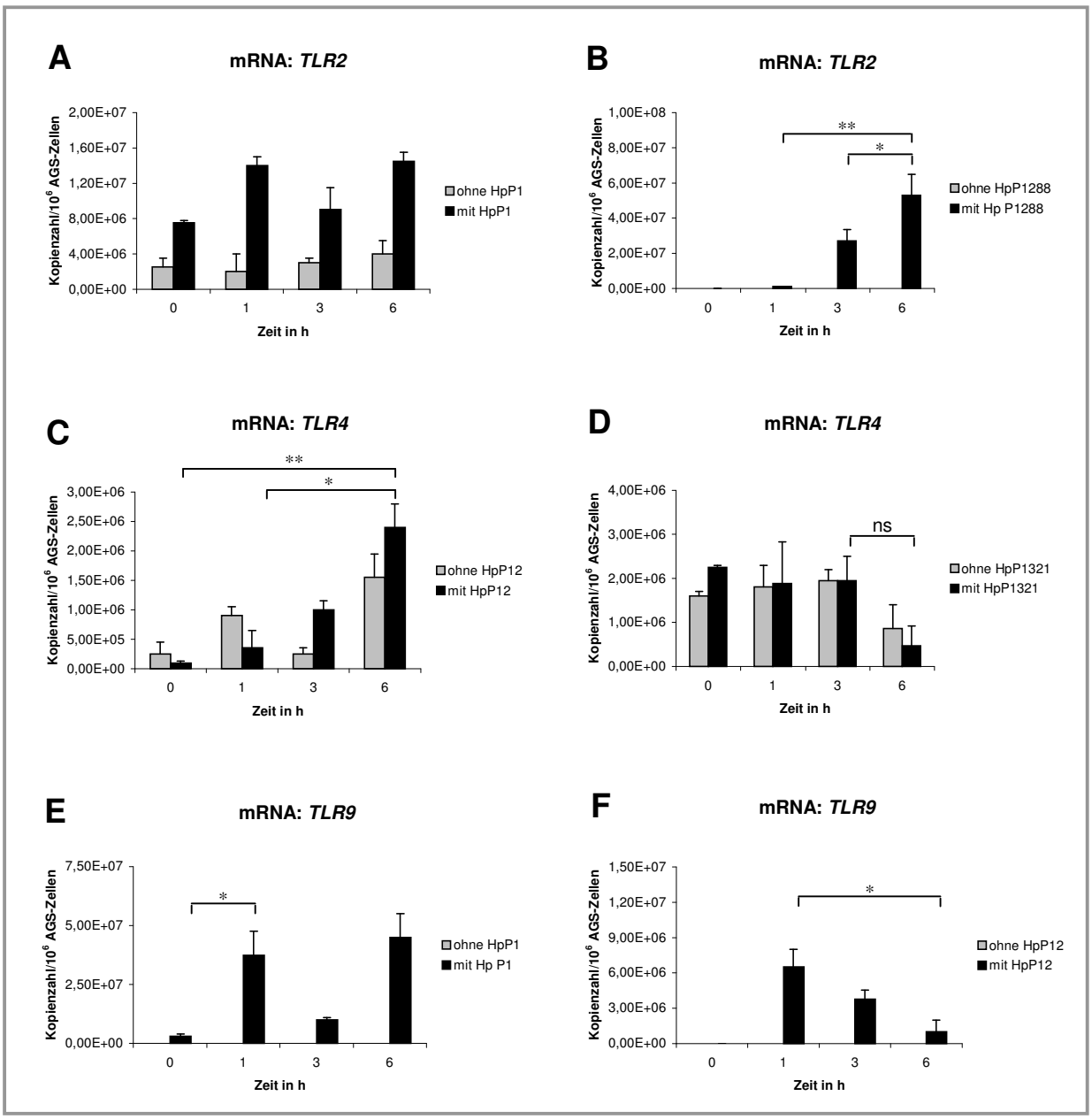


Abb. 7.9: Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) in AGS-Zellen während der Infektion mit *H. pylori* durch Echtzeit- PCR.
Darstellung der Expression von TLR2 (A-B), TLR4 (C-D) und TLR9 (E-F) während der Infektion mit *H. pylori* über die Zeit von 1, 3 und 6 Stunden. Die schwarzen Balken zeigen die Regulation der Gene während der Kultivierung mit *H. pylori*, während die grauen Balken die Kontrolle, ohne Bakterien darstellen. Die mRNA-Kopienzahlen wurden durch TaqMan-PCR ermittelt. Die Daten sind Ergebnisse aus drei unterschiedlichen Experimenten. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet, (* $p < 0,05$, **<0,005, ns = nicht signifikant).

der Interaktion mit *H. pylori* eine Rolle, da TLR2 auf mRNA-Ebene zu jedem Zeitpunkt der Infektion mit vier von acht *H. pylori* hoch reguliert wurde (Tabelle 7.4). Die Interaktion von *H. pylori*-LPS mit TLR4 scheint während der Infektion nur in zwei Ausnahmefällen eine Rolle zu spielen, bei denen eine Regulation des TLR4-Gens in einer zeitabhängigen Art und Weise beobachtet werden konnte, während die Zellen

infiziert mit den übrigen Stämmen keine Regulation gegenüber der AGS-Kontrolle zeigten (Tabelle 7.4).

Die Wechselwirkung von TLR9 mit *H. pylori* konnte in zwei Infektionen beobachtet werden, so zeigten die Zellen, infiziert mit den zwei Typ I-Stämmen P1 und P12, eine Regulation des TLR9-Gens. Im Gegensatz dazu wurde in den Zellen, infiziert mit den anderen sechs Stämmen, keine Regulation gegenüber der uninfizierten Kontrolle beobachtet (Tabelle 7.4).

Die Verwendung von Typ I- bzw. Typ II-*H. pylori*-Stämme hatten keinen deutlichen Einfluss auf die Änderung der Expression von TLR2 und TLR4. Nur TLR9 wurde während der Infektion mit zwei Typ I-Stämmen in AGS-Zellen differentiell reguliert.

7.3.5 Einfluß von *H. pylori*-Mutanten auf die Expression von TLR9 und TLR5 in AGS-Zellen

Parallel zur Analyse der Regulation der TLRs auf der Transkriptions-Ebene wurde die Expression von TLRs auch auf Protein-Ebene untersucht. Dazu wurde die Expression von TLR9 in AGS-Zellen während der Infektion mit *H. pylori* durch Western Blot-Analyse bestimmt. Um die Rolle von Typ I- bzw. Typ II-Stämmen auf die Expression von intrazellulärem TLR9 in AGS-Zellen genauer zu untersuchen, wurden AGS-Zellen mit *H. pylori* Stamm P12 und einer definierten P12*Δcag*PAI-Mutante über die Zeitspanne von 1, 3 und 6 Stunden infiziert. Parallel dazu wurde ein synthetisches aktivierendes Oligonukleotid (CpG-Oligonukleotid) als Positivkontrolle und ein synthetisches nicht aktivierendes Oligonukleotid (GpC-Oligonukleotid) als Negativkontrolle verwendet. Beide Nukleotide wurden zu den AGS-Zellen gegeben, und parallel zu den uninfizierten AGS-Zellen unter den gleichen Bedingungen wie die Infektionen inkubiert. Um die Invasion der Bakterien in die Zellen zu steigern, wurden parallel in zwei Ansätzen die Zellen vor der Infektion mit Vanadat behandelt und anschließend ebenfalls mit P12-Wildtyp und P12*Δcag*PAI-Mutante über die Zeitspanne von 1, 3 und 6 Stunden infiziert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in SDS-Probenpuffer aufgenommen und die Proteine im SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran und die Detektion von TLR9 mit einem TLR9-spezifischen Antikörper (Abb. 7.10A). Um auszuschließen, dass Unterschiede in der TLR9-Expression durch unterschiedliche Mengen an AGS-Zellen auftraten, erfolgte ein Abgleich mit dem Haushaltsprotein GAPDH.

Die Ergebnisse sind in der Abb. 7.10B dargestellt und demonstrieren, dass die AGS-Zellen in allen Ansätzen eine annähernd gleichmäßige Expression der GAPDH aufweisen (Abb.7.10B). In den gleichen Proteinproben konnte parallel TLR9 mit einer Größe von 120 kDa detektiert werden.

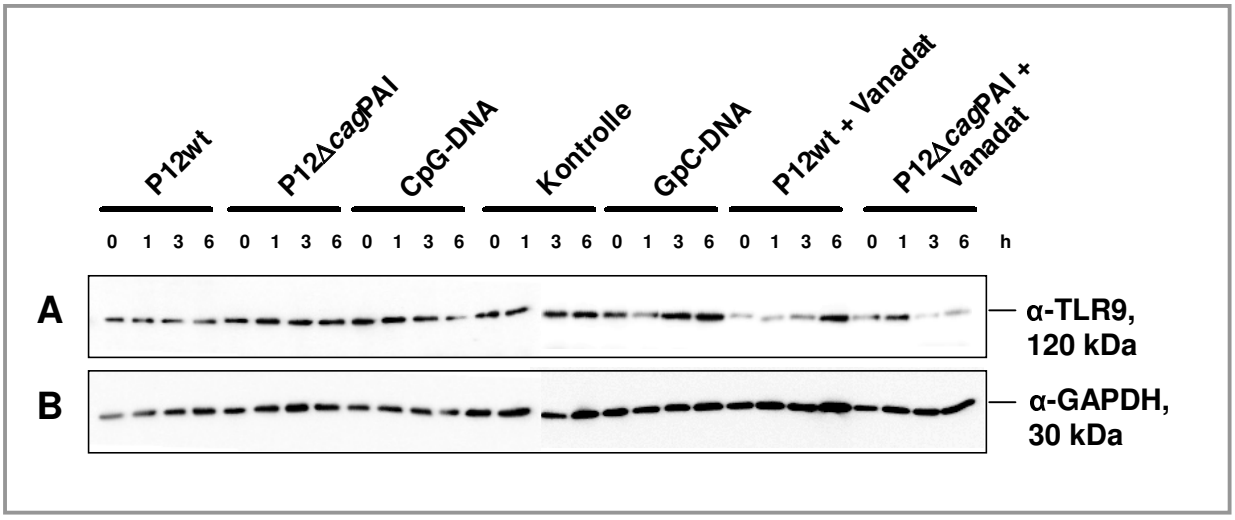


Abb. 7.10: Expression von TLR9 in AGS-Zellen während der Infektion mit *H. pylori*.
(A) Western Blot-Analyse von TLR9 in AGS-Zellen während der Inkubation mit *H. pylori* P12wt, P12Δ*cag*PAI-Mutante, aktivierendes CpG-Oligonukleotid, nichtaktivierendes GpC-Oligonukleotid und Vanadat-behandelte AGS-Zellen infiziert mit P12wt bzw. P12Δ*cag*PAI-Mutante über die Zeit von 1, 3 und 6 Stunden. (B) Western Blot-Analyse des Haushaltsproteins GAPDH in AGS-Zellen während der Infektionen.

Alle Zellansätze zeigen, dass TLR9 während der Inkubation mit den verschiedenen Stimulatoren exprimiert ist. Erstaunlicherweise konnte dabei zwischen der uninfizierten AGS-Kontrolle, dem aktivierenden bzw. nichtaktivierenden Oligonukleotid keine Änderung in der Expression von TLR9 festgestellt werden. Ein geringer Unterschied in der Expression von TLR9 zeigte sich aber zwischen den mit P12-Wildtyp- und P12Δ*cag*PAI-Mutante-infizierten Zellen, wobei die Mutante eine etwas stärkere TLR9-Proteinbande aufwies. Auch in den Zellen, die vor der Infektion mit Vanadat behandelt wurden, damit sich die Invasion der Bakterien in die Zellen steigerte (KWOK *ET AL.*, 2002), zeigten eine eher schwächere TLR9-Expression als die anderen Zellen (Abb.7.10A).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TLR9 bereits ohne *H. pylori* Kontakt in AGS-Zellen exprimiert ist und die Expression offenbar nicht durch die Infektion mit *H. pylori* bzw. synthetischer CpG-DNA beeinflusst wird. Das Invasionsverhalten von *H. pylori*-Wildtyp und P12Δ*cagA*PAI-Mutante in AGS-Zellen über die Zeitspanne von 6 Stunden zeigt nur sehr geringen Einfluss auf die Regulation von TLR9. Eine

Änderung der TLR9-Expression in einer zeitabhängigen Art und Weise während der Inkubation mit den einzelnen Stimulatoren konnte nicht beobachtet werden (Abb. 7.10A). Die Ergebnisse dieser Studie korrelieren nicht mit den Aussagen der Regulation von TLR9 in AGS-Zellen auf der Transkriptionsebene (Kapitel 7.3.4), in denen das TLR9-Gen in den Zellen, infiziert mit *H. pylori*-Stamm P12 gegenüber der uninfizierten Kontrolle deutlich herunter reguliert wurde.

Ein anderer Toll-ähnlicher Rezeptor ist TLR5, der mit bakteriellen Flagellin interagiert. Im Rahmen dieser Studie sollte der Einfluss von *H. pylori* auf die Expression von TLR5 in AGS-Zellen unter Verwendung der Western Blot-Methode analysiert werden. Aus diesem Grund wurden AGS-Zellen mit verschiedenen *H. pylori*-Wildtyp Stämmen und *H. pylori*-Mutanten inkubiert. Bei den Mutanten handelte es sich um Stämme bei denen wichtige Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori*, z. B auch das Flagellin A (*flaA*), funktionsuntüchtig waren. Um die Expression von TLR5 im Zusammenhang mit den verschiedenen *Knockout*-Mutanten zu analysieren, wurden AGS-Zellen für 6 Stunden mit diesen infiziert. Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und anschließend im SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und das TLR5-Protein mittels eines TLR5-spezifischen Antikörper detektiert. Die Ergebnisse sind in der Abb.7.11A dargestellt. Darüber hinaus sollte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in der Expression von TLR5 durch unterschiedliche Mengen an AGS-Zellen auftraten und aus diesem Grund wurde die GAPDH-Expression der Zellen analysiert. Die Ergebnisse sind in der Abb.7.11B dargestellt und zeigen eine gleichmäßige Expression des GAPDH-Proteins in allen Zellansätzen (Abb. 7.11B).
Parallel dazu konnte in den gleichen Proteinproben eine Expression von TLR5 mit einer Größe von ca. 113 kDa detektiert werden (Abb. 7.11A). Die Zellansätze, die mit den Wildtyp-Stämmen P1, P12 und G27 und den jeweiligen Mutanten infiziert wurden, zeigten keine Änderung in der Expression von TLR5 (Abb. 7.11A). Auch die uninfizierte AGS-Zellen exprimierten die gleiche Menge an TLR5, wie die infizierten Zellen. Die Bande, die unterhalb der TLR5-Bande detektiert werden konnte, stellt ein unbekanntes bakterielles Protein dar, welches mit dem TLR5-Antikörper interagiert (Abb. 7.11A).

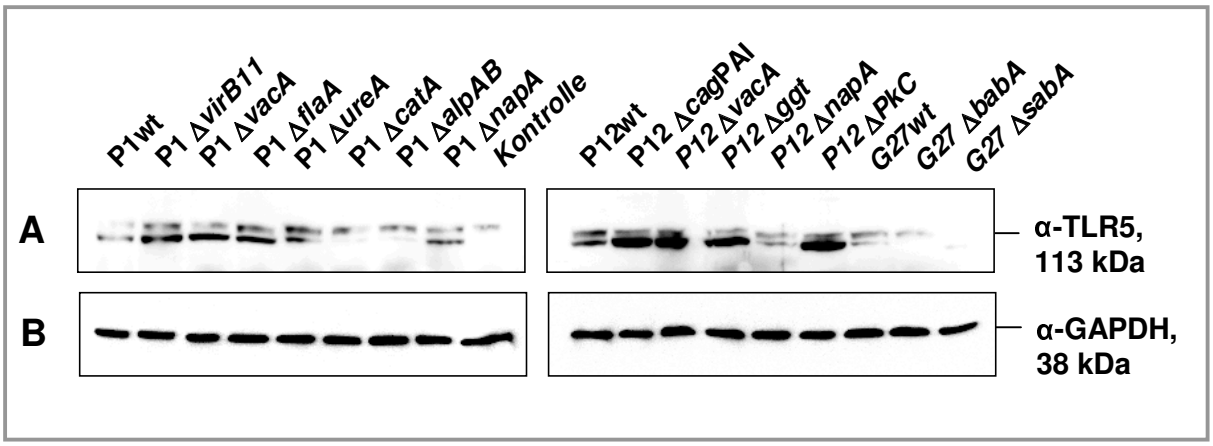


Abb. 7.11: Expression von TLR5 in AGS-Zellen während der Infektion mit *H. pylori.*
(A) Western Blot-Analyse von TLR5 in AGS-Zellen während der Inkubation mit *H. pylori.* bzw. definierten *H. pylori*-Mutanten. über die Zeit von 6 Stunden. (B) Kontrolle der GAPDH in AGS-Zellen.
*, TLR5-Antikörper interagiert mit unbekannten bakteriellen Protein.

Obwohl in der Literatur bakterielles Flagellin als Ligand für TLR5 beschrieben wird, konnte interessanterweise sogar in den Zellen die mit der die Flagellin-Mutante (P1*ΔflaA*) infiziert wurde, eine Expression von TLR5 beobachtet werden. Zusammenfassend besagen die Ergebnisse, dass Flagellin allein offenbar als Ligand für TLR5 während der *H. pylori*-Infektion keine Rolle spielt.

In der Signaltransduktionskaskade der Toll-ähnlichen Rezeptoren spielen MAPKinasen, JNKinasen, p38 und NF-$_K$B eine Rolle (BEUTLER, 2004). In dieser Studie erfolgte die Untersuchung, inwieweit die Inhibierung dieser Komponenten der Signaltransduktion einen Einfluss auf die Expression von TLR, am Beispiel von TLR5, ausübt. Aus diesem Grund wurden AGS-Zellen mit Substanzen versetzt, die diese speziellen Komponenten inhibieren. Es erfolgte eine Inkubation der Zellen mit MG132 (NF-$_K$B-Inhibitor), PD98059 (MAPK-Inhibitor), SB203580 (p38-Inhibitor), SP600125 (inhibiert JNK) und Genistein (Phosphotyrosin-Kinase-Inhibitor) für 45 min und anschließend wurden die Zellen in Parallelansätzen mit P1-Wildtyp und P1Δ*flaA*-Mutante für 6 Stunden infiziert. Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet, mit SDS-Probenpuffer versetzt und die Zellproteine anschließend in einem 10%igem SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran, erfolgte die Detektion von TLR5 mit einem TLR5-spezifischem Antikörper. Die Ergebnisse sind in der Abb. 7.12A dargestellt. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Unterschiede in der TLR5-Expression auf unterschiedliche Mengen an AGS-Zellen beruhen, wurde die Expression des Zellproteins GAPDH analysiert. Das

Ergebnis ist in der Abb. 7.12B dargestellt und alle Proben zeigen eine gleichmäßige Expression der GAPDH.

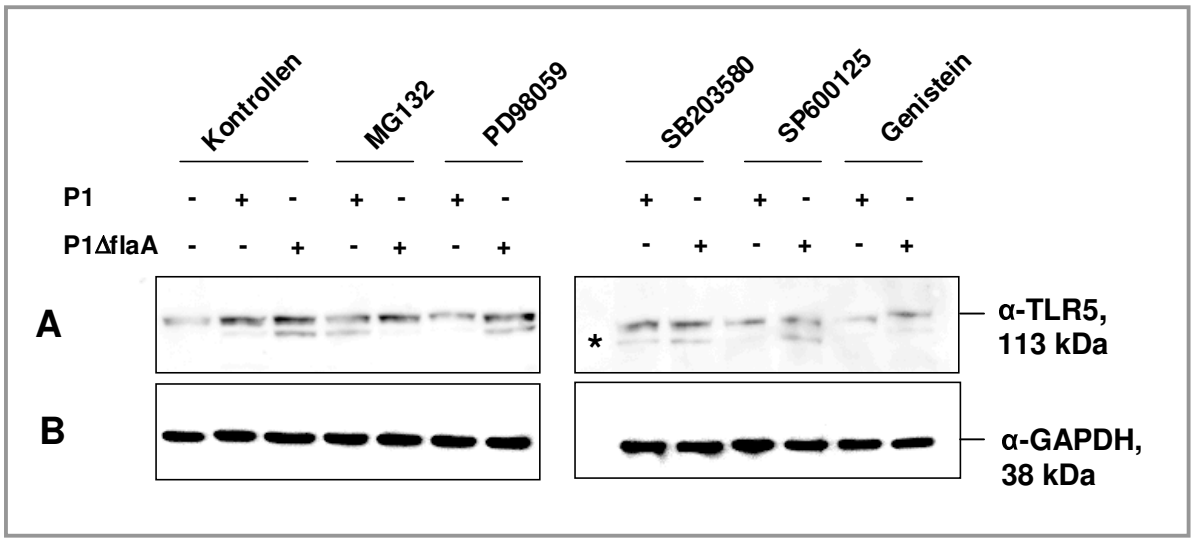


Abb. 7.12: Expression von TLR5 in AGS-Zellen .
(A) Western Blot-Analyse von TLR5 in AGS-Zellen während der Präinkubation mit Inhibitoren für 45 min und anschließender Postinkubation mit *H. pylori*-Wildtyp und *H. pylori-flaA* Mutante für 6 Stunden. (B) Western Blot-Analyse des Haushaltsproteins GAPDH. *, TLR5-Antikörper interagiert mit unbekannten bakteriellen Protein.

In den gleichen Proteinproben konnte das TLR5-Protein mit einer Größe von ca. 113 kDa detektiert werden (Abb. 7.12A). In dieser Studie zeigen die AGS-Zellen, während der Infektion mit *H. pylori*-Wildtyp und *H. pylori*-Flagellin-Mutante keine signifikanten Unterschiede in der TLR5-Expression. Ebenso konnte beobachtet werden, dass die AGS-Zellen, die mit den Inhibitoren präinkubiert und anschließend mit P1 und P1Δ*flaA* für 6 Stunden infiziert wurden, keine Änderung in der TLR5-Expression (Abb. 7.12A) zeigten. Zusammenfassend lässt sich sagen, das die Inhibierung der Faktoren der Sigaltransduktionskaskade von TLR5 keinen Einfluss auf die Expression von TLR5 ausübt.

Innerhalb dieser TLR-Studien lassen sich folgende Aussagen zusammenfassen: Die TLR2, 4, 5 und 9 sind in Magenkarzinomzellen bereits ohne *H. pylori* Kontakt exprimiert. Veränderungen in der Expression von TLR2, 4 und 9 während der Infektion mit *H. pylori* konnte nur auf mRNA-Ebene beobachtet werden (Kapitel 7.3.4). Im Gegensatz dazu zeigten die Analysen der TLR-Expression auf Protein-Ebene, am Beispiel von TLR5 und TLR9, keine Änderungen gegenüber den mitgeführten Kontrollen (Kapitel 7.3.5). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, das diese Rezeptoren nach der Interaktion mit bakteriellen Komponenten in der Immunantwort offenbar nur eine untergeordnete Rolle spielen.

7.4 Die Rolle von Granulozyten während der Interaktion mit *H. pylori*

7.4.1 Charakterisierung der Infektion von PMNs mit *H. pylori*

Die PMNs sind Zellen des Immunsystems, die im Rahmen der angeborenen Immunantwort von großer Bedeutung sind (JANEWAYJR UND MEDZHITOV, 2002), weil sie ohne Unterstützung durch die adaptive Immunantwort zahlreiche Krankheitserreger erkennen, aufnehmen und abtöten können. Während dieser Studie sollten die Auswirkungen der acht genetisch unterschiedlichen *H. pylori*-Stämme auf die Immunantwort der PMNs untersucht werden. Als erstes erfolgte die mikroskopische Untersuchung der Infektion. Dazu wurden PMNs frisch isoliert und mit je einem der acht Isolate von *H. pylori* mit einer MOI von 100 für 6 Stunden infiziert. Parallel wurden uninfizierte PMNs im Kontrollmedium unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Nach der Inkubation wurden die Infektionen am Phasenkontrastmikroskop analysiert (Abb. 7.13).

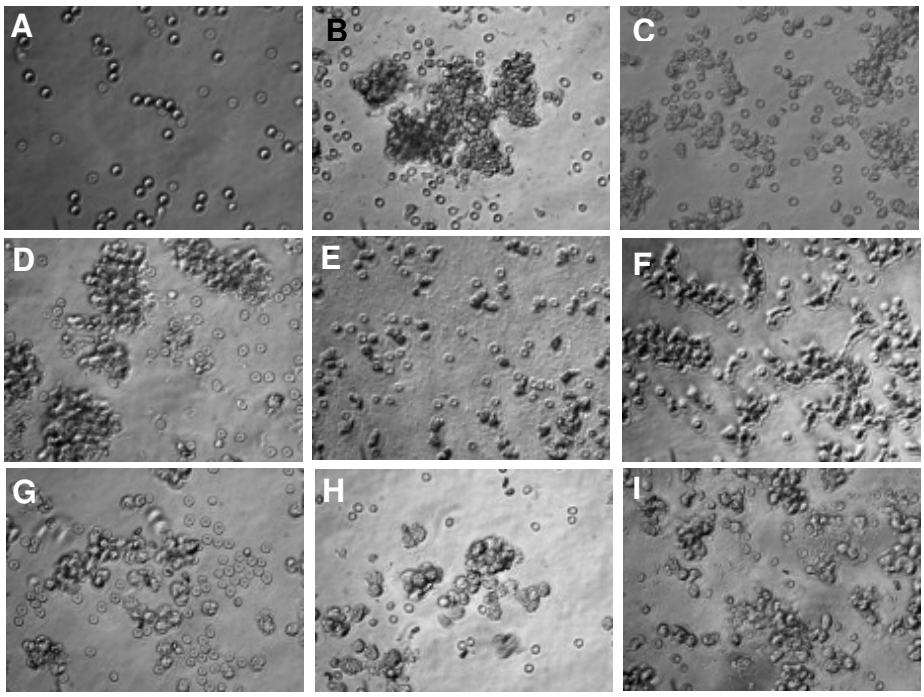


Abb. 7.13: Infektion von PMNs mit acht genetisch unterschiedlichen *H. pylori* Stämmen.
Ausbildung von PMN-Zellaggregate induziert durch die Infektion mit folgenden *H. pylori* Stämmen: P1 (B), P12 (C), P284 (D) und P303 (E), P1280 (F), P1288 (G), P1303 (H) und P1321 (I), im Vergleich zur uninfizierten PMN-Kontrolle (A). Die Untersuchung der Infektionen erfolgte durch Phasenkontrastmikroskopie und die Bilder wurden mit einer Digitalkamera aufgenommen.

Während der Inkubation von PMNs ohne *H. pylori* Kontakt konnten nach sechs Stunden Inkubation einzelne Zellen beobachtet werden (Abb. 7.13A). Im Gegensatz dazu zeigten die PMNs infiziert mit den acht *H. pylori* Stämmen, die Ausbildung von großen homotypischen Zellaggregaten (Abb. 7.13B-I). Dieses Phänomen wurde schon an U937-Zellen (Makrophagen-ähnliche Zellen) beobachtet und die Bildung dieser Zellaggregate korrelierte mit der Expression von ICAM-1 und dessen Interaktionspartner LFA-1 und war abhängig von der Anwesenheit der *cag*-PAI (MOESE *ET AL.*, 2002). Unsere Untersuchung zeigen, das die infizierten PMNs, unabhängig von *cag*PAI-positiven bzw. *cag*PAI-negativen *H. pylori* Stämmen die Aggregate ausbilden (Abb.7.13B-I), wobei jedoch die Zellen die mit *cag*PAI-positiven Stämmen infiziert wurden die Bildung stärkerer Zellaggregate zeigen (Abb.7.13B,D).

7.4.2 Die Rolle des bakteriellen CagA-Proteins in PMNs

Wie in Kapitel 7.3.2 erläutert, wird bakterielles transloziertes CagA im Zytoplasma von AGS-Zellen Tyrosin-phosphoryliert. In dieser Studie sollte untersucht werden, ob CagA ebenfalls in PMNs transloziert wird. Dazu wurden frisch isolierte PMNs parallel mit P12-Wildtyp und P12*ΔcagA* über eine Zeitspanne von 15, 30, 60 und 120 Minuten infiziert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Tyrosin-Phosphorylierung von CagA durch PMNs wurde mit Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpern detektiert (Abb. 7.14). Anschließend wurde die CagA-Expression auf dem gleichen Blot mit CagA-spezifischen Antikörpern detektiert (Abb. 7.14).

Während der Infektion von PMNs mit *H. pylori* P12-Wildtyp konnte kein Tyrosin-phosphoryliertes CagA in der Größe von ca. 130 kDa detektiert werden. Interessanterweise konnten aber mehrere CagA-Fragmente detektiert werden, was bedeutet, dass CagA offenbar während der Inkubation mit PMNs mehrmals geschnitten wird (Abb. 7.14A). Dabei konnte ein Tyrosin-phosphoryliertes 35 kDa großes CagA-Fragment identifiziert werden, welches zum Zeitpunkt 30 Minuten nach der Infektion am stärksten Tyrosin-phosphoryliert war (Abb.14B). Parallel dazu konnte ein weiteres Tyrosin-phosphoryliertes Protein in der Größe von 60 kDa detektiert werden, welches durch spezifische Antikörper, als phosporylierte Src-Kinase identifiziert werden konnte (Abb. 7.14A,B).

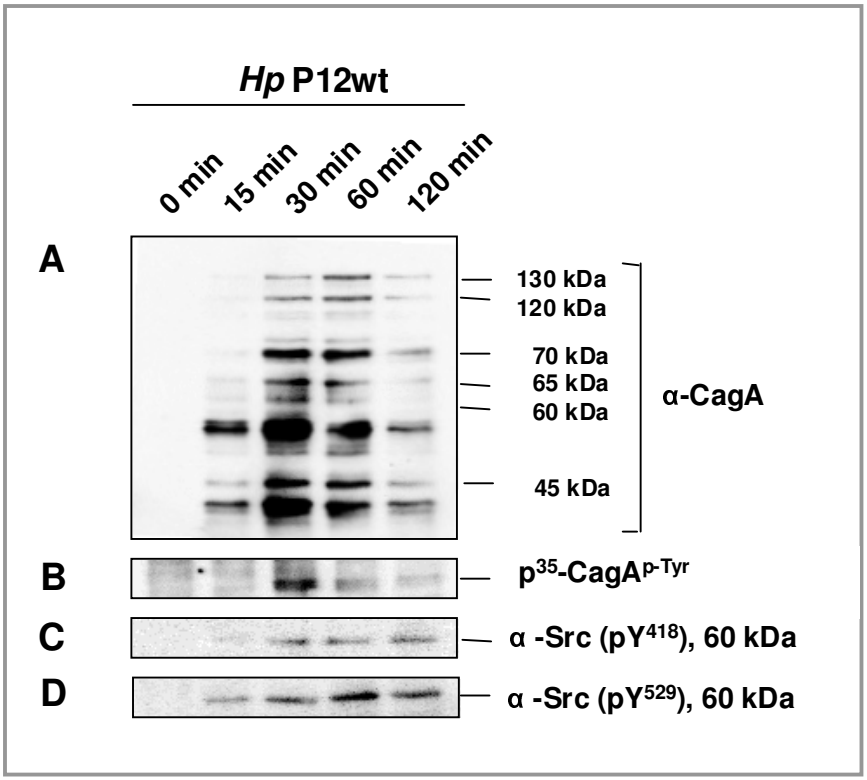


Abb. 7.14: Die Rolle von bakteriellem CagA in PMNs.
(A) Die Expression von CagA wurde durch Western Blot mit einem CagA-spezifischen Antikörper untersucht (α-CagA). (B) Die Tyrosin-Phosphorylierung eines 35 kDa großen CagA-Fragments wurde mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper nachgewiesen. (C und D) Die Phosphorylierung des Tyrosin 418 und 529 der Src-Kinase wurden durch spezifische Phospho-Src-Antikörper detektiert.

7.4.3 IL-8-Sekretion durch PMNs

Wie in Kapitel 7.3.3 erläutert, wird IL-8 von Epithelzellen als Folge einer Stimulation mit *H. pylori* produziert und wirkt dann chemotaktisch auf PMNs, die so an den Ort der Infektion gelockt werden. Während dieser Untersuchung erfolgte die Beobachtung, dass PMNs auch selbst IL-8 freisetzen können. Die Analyse der IL-8-Sekretion erfolgte, indem PMNs mit je einem der acht genetisch verschiedenen *H. pylori* Stämme mit einer MOI von 100 für 6 Stunden infiziert wurden. Als Kontrolle wurden parallel uninfizierte PMNs unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Nach der Inkubation wurden die Kulturüberstände entnommen und die IL-8- Konzentration mittels ELISA-Analyse ermittelt. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten sind in der Abb. 7.15 dargestellt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass alle acht *H. pylori* Stämme die IL-8-Sekretion in PMNs induzieren (Abb. 7.15A,B). Dabei wurden aber unabhängig der Typ I- bzw. Typ II-Zugehörigkeit der Stämme, die Freisetzung nahezu ähnlicher IL-8-Mengen, ca. 2000 pg/ml im Gegensatz zur uninfizierten PMN-Kontrolle ermittelt.

Dieses Resultat lässt darauf schließen, dass das Vorhandensein von *cag*-PAI auf die IL-8-Sekretion von PMNs keine Rolle spielt (Abb. 7.15AB). Nur in der Kinetik der IL-8-Freisetzung konnten zum Zeitpunkt von 3 Stunden Infektion mit genetisch verschiedenen *H. pylori* Stämmen, geringe Unterschiede in der IL-8-Konzentration detektiert werden (Abb. 7.15A,B).

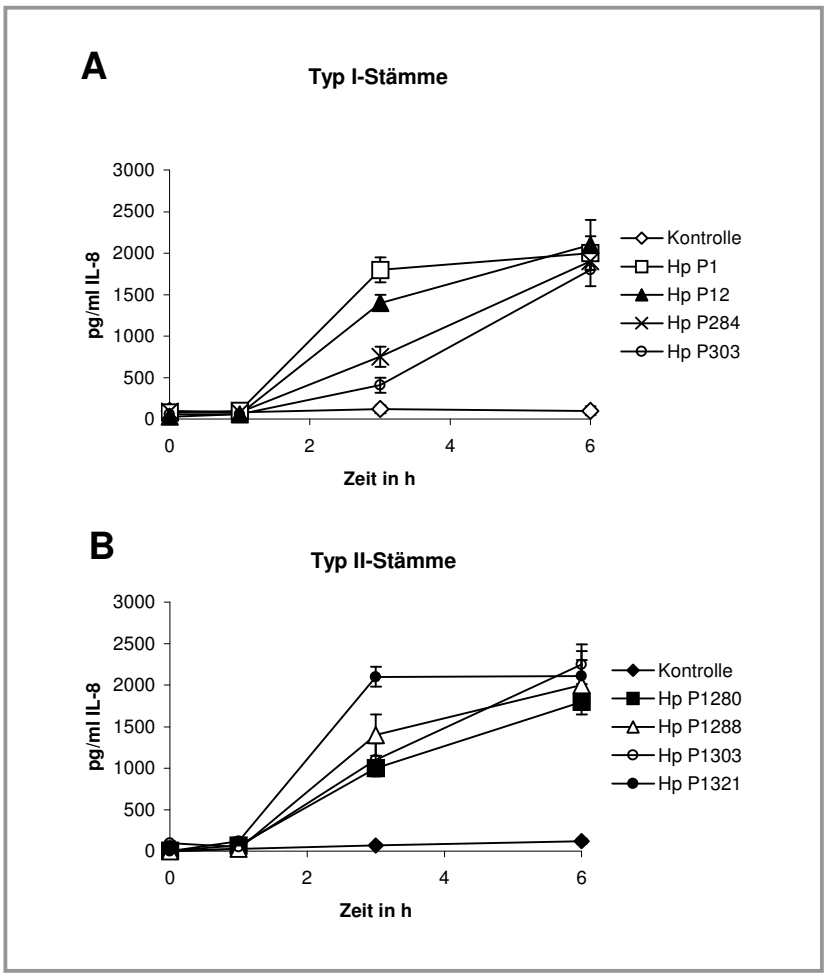


Abb. 7.15: Induktion der IL-8-Sekretion in PMNs während der Infektion mit *H. pylori.*
(A) IL-8-Freisetzung in PMNs infiziert mit den Typ I-Stämmen P1, P12, P284 und P303 und (B) infiziert mit Typ II-Stämmen P1280, P1288, P1303 und P1321. Die Daten wurden durch ELISA-Analyse ermittelt und sind Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

7.4.4 mRNA-Expression von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) in PMNs

In dieser Studie erfolgte die Untersuchung der Expression bzw. Regulation von TLRs an Granulozyten während der Infektion mit *H. pylori*. Wie bereits für AGS-Zellen beschrieben (Kapitel 7.3.4.), basierte die Analyse der Regulation der TLRs auf Quantifizierung der mRNA durch Echtzeit-PCR. Dazu wurden frisch isolierte PMNs

mit je einem der acht Isolate von *H. pylori* mit einer MOI von 100 über die Zeit von 1, 3 und 6 Stunden infiziert. Uninfizierte PMNs wurden als Kontrolle parallel unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Wie bereits für AGS-Zellen beschrieben, erfolgte nach der Inkubation die Aufarbeitung der Ansätze bzw. die Überprüfung der Qualität und Menge der RNA durch Standard-PCR und Agarosegelelektrophorese. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Unterschiede in der Expression der TLR's durch Absterben bzw. Vermehrung der Zellen während der Infektionen auftraten, wurde aus der cDNA der PMNs das Haushaltsgen *GAPDH* durch Standard-PCR amplifiziert. Dabei konnte eine gleichmäßige Expression der *GAPDH* in den Ansätzen über die Zeit von 6 Stunden beobachtet werden. Anschließend wurden die mRNA-Kopienzahlen der TLR2, 4 und 9 durch Echtzeit-PCR am TaqMan ermittelt, und die Berechnung der absoluten Kopienzahlen resultierten aus der Verwendung von externen Standardreihen.

Die Ergebnisse der Echtzeit-Analyse sind in der Tabelle 7.5 und einige repräsentative Beispiele sind in der Abb. 7.16 aufgeführt. Die übrigen Orginaldaten sind im Anhang (Kapitel 10.6) in Form von Abbildungen demonstriert.

Tabelle 7.5: mRNA-Expression von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) in PMNs während der Infektion mit *H. pylori* ermittelt durch Echtzeit-PCR

		Regulation von*		
Bezeichnung	**Stämme**	**TLR2**	**TLR4**	**TLR9**
Typ I	P1	●	●	+**
	P12	+	●	+**
	P284	●	●	●
	P303	-**	●	●
Typ II	P1280	+**	●	●
	P1288	+**	●	●
	P1303	+**	●	●
	P1321	●	●	●

*●, keine Regulation; +, Hochregulation; -, Runterregulation;
** Gene zeigen eine zeitliche Regulation während der Infektion (siehe Text)

Die Daten sind Resultate aus drei unabhängigen Experimenten, und die Gene wurden als hoch bzw. herunter reguliert betrachtet, wenn das entsprechende Gen

keine Regulation in der uninfizierten Kontrolle aufwies bzw. während der Infektion eine signifikante Änderung der mRNA-Kopienzahl des Gens zu beobachten war.
Die Ergebnisse demonstrieren, dass die Toll-ähnlichen Rezeptoren genau wie in AGS-Zellen auch in Granulozyten ohne *H. pylori*-Infektion bereits exprimiert sind. Dabei konnte beobachtet werden, dass die TLRs der PMNs während der Stimulation mit *H. pylori* Unterschiede in der Expression aufwiesen und nur in einigen Fällen reguliert wurden. So zeigten zum Beipiel die PMNs, infiziert mit den Stämmen P12, P303, P1280, P1288 und P1303, eine Zunahme der mRNA-Kopienzahl von TLR2 im Gegensatz zur uninfizierten Kontrolle (Tabelle 7.5; Abb. 7.16A,B). Dagegen konnte bei den Granulozyten infiziert mit den anderen drei Isolaten von *H. pylori* keine Änderung in der Expression des TLR2-Gens detektiert werden (Tabelle 7.5). Dabei zeigten die mit P303-, P1280-, P1288-, und P1303-infizierten PMNs eine Regulation des TLR2-Gens in einer zeitabhängigen Art und Weise. Es konnte eine signifikante Erhöhung der mRNA-Kopienzahl von TLR2 während der Zeit der Infektion mit den Stämmen P1280, P1288 und P1303 beobachtet werden (Bsp. in Abb. 7.16B). Im Vergleich dazu, wurde das TLR2-Gen in den Granulozyten, infiziert mit P303 über die Zeit von 6 Stunden herunter reguliert (Bsp. in Abb. 7.16A). Die genetische Heterogenität der *H. pylori*-Stämme bezüglich der *cag*-PAI spielt offenbar bei der Regulation von TLR2 keine Rolle, da in den Granulozyten, unabhängig der Infektion mit Typ I- bzw. Typ II-Stämmen, unterschiedliche Expressionsmuster auftraten.
Im Gegensatz dazu konnte in den Granulozyten keine Regulation des TLR4-Gens während der Infektion mit den acht klinischen *H. pylori* Stämmen nachgewiesen werden (Tabelle 7.5). Der Vergleich zwischen den mRNA-Kopienzahlen von TLR4 der uninfizierten Kontrolle mit denen der *H. pylori*-stimulierten PMNs zeigte keine signifkanten Unterschiede (Abb. 7.16C,D).
Parallel konnte in den PMNs, die mit den Stämmen P1 und P12 infiziert wurden, eine höhere mRNA-Kopienzahl von TLR9 im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle beobachtet werden (Tabelle 7.5; Abb. 7.16E,F). Während der Infektion mit den beiden Stämmen erfolgte in den Granulozyten eine Regulation von TLR9 in einer zeitabhängigen Art und Weise, denn in beiden Ansätzen wurde das TLR9-Gen über den Zeitraum von 6 Stunden Infektion hoch reguliert. Im Gegensatz dazu zeigten die PMNs keine Regulation des TLR9-Gens während der Infektion mit den anderen sechs Isolaten von *H. pylori* (Tabelle 7.5).

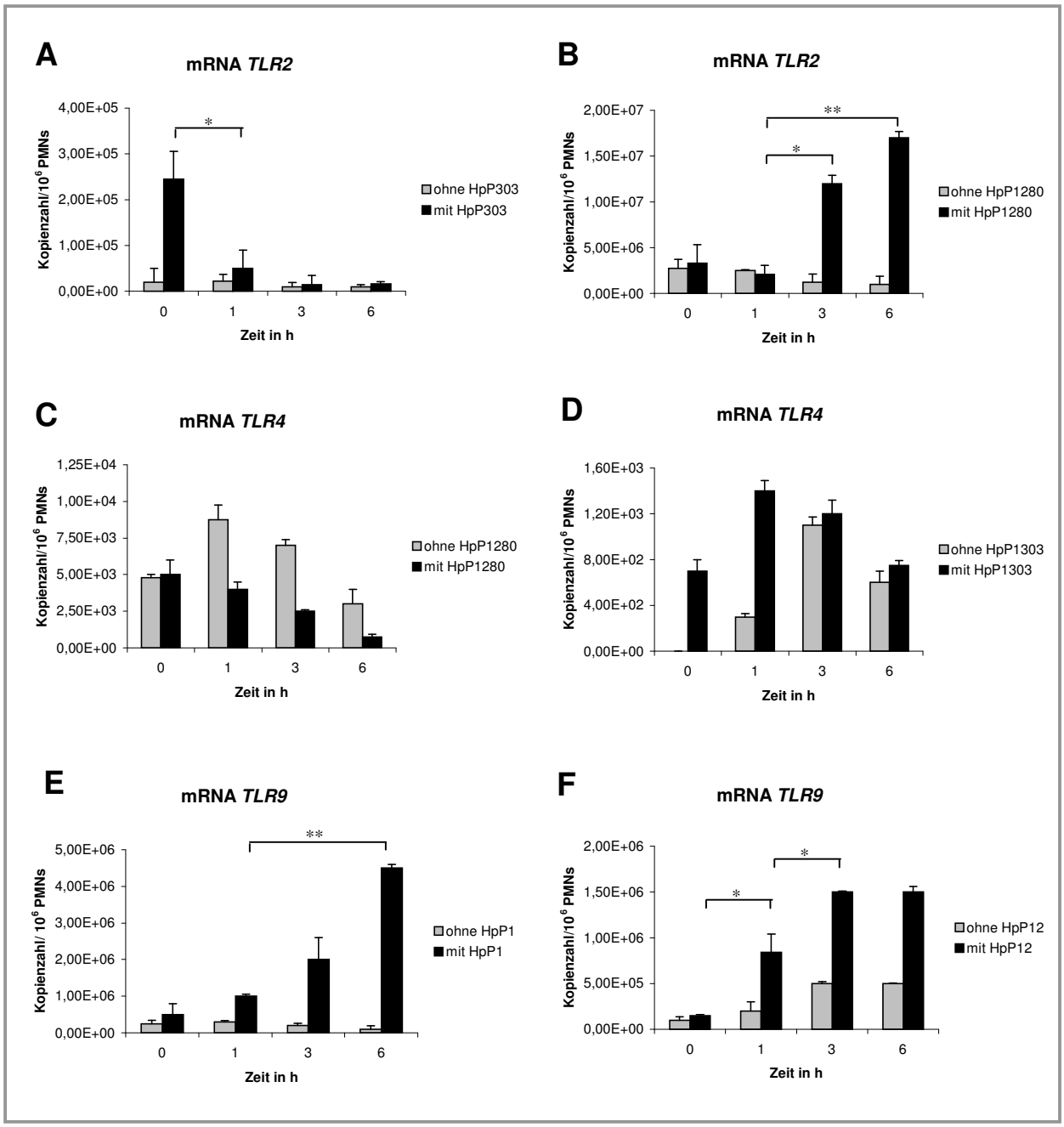


Abb. 7.16: Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) in PMNs während der Infektion mit *H. pylori* durch Echtzeit-PCR.
Darstellung der Expression von *TLR2* (A-B), *TLR4* (C-D) und *TLR9* (E-F) während der Infektion mit verschiedenen *H. pylori* Stämmen über die Zeit von 1, 3 und 6 Stunden. Die schwarzen Balken zeigen die Regulation der Gene während der Kultivierung mit *H. pylori*, während die grauen Balken die Kontrolle, ohne Bakterien darstellen. Die mRNA-Kopienzahlen wurden durch TaqMan-PCR ermittelt. Die Daten sind Ergebnisse aus drei unterschiedlichen Experimenten. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet, (* $p < 0,05$, **<0,005).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse der mRNA-Expression von TLR2, 4 und 9 von PMNs während der Infektion mit *H. pylori* mit den Resultaten der TLR-Analyse von *H. pylori*-infizierten AGS-Zellen korrelieren (Kapitel 7.3.4). Ebenso wie in AGS-Zellen, wurde TLR2 in PMNs während der Interaktion mit *H. pylori* im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle hoch reguliert. Wobei auch hier der

die Verwendung von Typ I- bzw. Typ II-Stämmen bei der Regulation von TLR2 offenbar keine Rolle spielt.

Die TLR4-Regulationen in PMNs während der Infektion mit *H. pylori* zeigen Parallelen zu den Resultaten der AGS-Infektionen. TLR4 wurde in beiden Zellarten nach Infektion mit den verschiedenen *H. pylori* Stämmen, verglichen mit den uninfizierten Kontrollen, nicht signifikant reguliert.

Die TLR9-Regulation in PMNs während der Inkubation mit *H. pylori* korrelieren mit den Ergebnissen der AGS-Infektionen. So zeigten die PMNs, infiziert mit den beiden Typ I-Stämmen P1 und P12, Parallelen zu den AGS-Infektionen, indem TLR9 über die Zeit der Infektionen reguliert wird (Kapitel 7.3.4). In beiden Zellarten, infiziert mit den anderen *H. pylori* Stämmen, konnten keine Veränderung der mRNA-Expression von TLR9 beobachtet werden.

7.5 Infektion von PMNs mit *H. pylori* und Poststimulation mit verschiedenen Agonisten

7.5.1 Expression von Oberflächenmolekülen auf PMNs nach Präinkubation mit *H. pylori* und Postinkubation mit fMLP, PMA und NaF

PMNs besitzen eine Reihe weiterer Oberflächenmoleküle, die bei der Zell-Zell-Interaktion und Migration während der angeborenen Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Dazu gehören z. B. Selektine, vaskuläre Adressine, Integrine und Proteine der Immunglobulin (IG)-Superfamilie (KELLER, 1994). Nachdem die PMNs aus der Blutbahn zum Ort der Infektion gelangt sind, werden z. B. Bakterien und andere Pathogene phagozytiert und durch einen sauerstoffabhängigen (oxidativer Burst) bzw. einen sauerstoffunabhängigen Mechanismus abgetötet (WITKO-SARSAT *ET AL*., 2000; ROOS *ET AL*., 2003; DE CHATELET *ET AL*., 1982; DE LEO *ET AL*., 1996).

Da Integrine, wie z. B. CD11b, Selektine, wie z. B. CD62L, der Chemokin-Rezeptor CXCR2 und der fMLP-Rezeptor von PMNs, sowohl an der Interaktion, ihrer zellulären Verteilung und Bindung zu entsprechenden Liganden während der adhäsiven Interaktion beteiligt sind, wurde im Rahmen dieser Studie die Expression dieser Oberflächenmoleküle während der Infektion mit genetisch verschiedenen *H. pylori* Stämmen untersucht. Dabei wurden die Oberflächenmoleküle mit fluoreszierenden Antikörpern markiert und die Expression dieser Oberflächenmarker durch FACS-

Analyse untersucht. Für die Analyse wurden frisch isolierte PMNs mit verschiedenen *H. pylori*-Wildtypstämmen, die sowohl der Typ I- bzw. Typ II-Nomenklatur zugeordnet werden konnten, und verschiedenen definierten *H. pylori*-Mutanten, in denen wichtige Pathogenitätsfaktoren in ihrer Funktion ausgeschaltet waren, mit einer MOI von 100 infiziert. Nach 10minütiger Infektion erfolgte jeweils die Zugabe von spezifischen Aktivatoren, wie den Protein Kinase C Liganden Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), als starken Stimulus für den oxidativen Burst von PMNs, das chemotaktische Peptid N-formyl-MetLeuPhe (fMLP) als physiologisch schwacher Stimulus und den Aktivator von niedrigmolekularen G-Proteinen Natriumfluorid (NaF). Zur Untersuchung des Einflusses von *H. pylori* bzw. der Aktivatoren auf die Expression von Oberflächenmarkern, wurden folgende Kontrollen parallel mitgeführt: (i) unbehandelte PMNs als Nullkontrolle bzw. als 100 Minuten-Kontrolle, (ii) uninfizierte PMNs, die mit den jeweiligen Stimuli versetzt wurden und (iii) infizierte PMNs, die nicht mit den Aktivatoren nachstimuliert wurden (PBS-Ansätze). Nach 90minütiger Postinkubation mit den jeweiligen Aktivatoren wurde die Zellen geerntet und ein Teil dieser Zellen wurde für die FACS-Färbung vorbereitet.

Zur Detektion des Integrins CD11b und des fMLP-Rezeptors wurden die Zellen parallel mit den rot- bzw. grün-fluoreszierenden Antikörpern CD11B-FITC/PE-anti human fMLP-Rezeptor gefärbt, während die PMNs im Parallelansatz zur Analyse des Selektins CD62L und des CXCR2-Rezeptors mit den rot- bzw. grün-fluoreszierenden Antikörpern CD62L-FITC/PE-anti human IL-8RB (CXCR2) inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen fixiert und gewaschen und hinsichtlich ihrer Fluoreszenzmarkierung am FACS-Gerät parallel analysiert. Die Ergebnisse der Fluoreszenzintensität der einzelnen Oberflächenmoleküle sind in der Tabelle 7.6 dargestellt und einige ausgewählte Beispiele der Infektion von PMNs mit einem Typ I-Stamm (P1), mit P1303 als Typ II-Stamm, sowie mit der *napA*-, *vacA*- und *virB11*-Mutante sind in der Abb. 7.17 demonstriert. Die Ergebnisse zeigen Daten aus mehreren parallel durchgeführten Experimenten, und die jeweiligen Oberflächenrezeptoren galten als hoch- bzw. herunter reguliert, wenn sich die Fluoreszenzintensität der einzelnen Rezeptoren gegenüber der Null- bzw. 100 Minuten-Kontrolle, der uninfizierten bzw. der infizierten Kontrolle (+/- Stimuli) signifikant änderte. Die Ergebnisse zeigen, dass alle vier Oberflächenmoleküle CD11b, CD62L, fMLP-Rezeptor und CXCR2-Rezeptor auf PMNs exprimiert sind und dass sich die Expression dieser Rezeptoren nach der Infektion mit *H. pylori* und der

Nachstimulation mit fMLP, PMA und NaF verändert (Tabelle 7.6). Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass eine Änderung in der Fluoreszenzintensität der jeweiligen Rezeptoren nach der Infektion mit *H. pylori* zu verzeichnen war, wohingegen aber die Verwendung von genetisch verschiedenen *H. pylori* Stämmen auf die Expression der Rezeptoren keinen Einfluss ausübte. Auch innerhalb der einzelnen Ansätze, die mit fMLP, PMA und NaF nachstimuliert wurden, konnten Variationen in der Fluoreszenzintensität der Oberflächenrezeptoren gegenüber den unstimulierten PMNs detektiert werden.

Das Integrin CD11b wurde in PMNs, die nur mit den *H. pylori* Stämmen, allein, infiziert wurden (ohne Stimuli) und die PMNs, die erst infiziert und anschließend mit NaF inkubiert wurden, gegenüber den oben genannten Kontrollen hoch reguliert (Tabelle 7.6; Abb. 7.17A). Im Gegensatz dazu konnte in den PMNs, infiziert mit den verschiedenen *H. pylori* Stämmen und Postinkubation mit fMLP bzw. PMA keine Änderung in der Fluoreszenzintensität von CD11b beobachtet werden (Tabelle 7.6; Tabelle 7.17A). Eine Änderung der Fluoreszenzintensität von CD11b in Abhängigkeit vom verwendeten *H. pylori* Stamm konnte nicht detektiert werden, denn nur die Infektion mit *H. pylori* bzw. das Zusammenspiel von *H. pylori* und des Aktivators NaF hatten einen Einfluss auf die Regulation von CD11b (Tabelle 7.6; Abb. 7.17A).

Parallel dazu, wurde das Selektin CD62L von PMNs während der Infektion mit den verschiedenen *H. pylori* Stämmen allein und der Poststimulation mit NaF im Vergleich mit den jeweiligen Kontrollen herunter reguliert, während die PMNs nach der Inkubation mit fMLP bzw. PMA keine Regulation von CD62L zeigten (Tabelle 7.6; Abb. 7.17B). Auch bei der Analyse der CD62L-Expression auf PMNs hatte die Verwendung von genetisch unterschiedlichen *H. pylori* Stämmen keinen Einfluss, auch hier hatten *H. pylori* allein oder *H. pylori* und NaF zusammen eine Auswirkung auf die CD62L-Expression (Tabelle 7.6; Abb. 7.17B).

In gleicher Weise wurde der CXCR2-Rezeptor von PMNs während der Infektion mit den verschiedenen *H. pylori* Stämmen allein und in Ansätzen mit anschließender Postinkubation mit NaF bzw. fMLP herunter reguliert. Im Infektionsansatz stimuliert mit PMA konnte keine Änderung in der Fluoreszenzintensität von CXCR2 beobachtet werden (Tabelle 7.6; Abb. 7.17C). Auch in dieser Studie wurden keine Unterschiede in der Expression des CXCR2-Rezeptors durch PMNs, während der Infektionen mit verschiedenen *H. pylori* Stämmen detektiert. Nur *H. pylori* allein, unabhängig von der Art des Stammes, und dem Zusammenwirken von *H. pylori*/NaF bzw. *H. pylori*/fMLP

hatten Einfluß auf die Expression des CXCR2-Rezeptors (Tabelle 7.6; Abb. 7.17C). Im Vergleich dazu zeigte die Untersuchung des fMLP-Rezeptors von PMNs, das dieser, nach der Infektion mit den unterschiedlichen Isolaten von *H. pylori* allein und in den Ansätzen postinkubiert mit NaF und teilweise auch stimuliert mit fMLP, hoch reguliert wurde.

Tabelle 7.6: Expressionsstudien von PMN-spezifischen Oberflächenmolekülen während der Infektion mit *H. pylori* für 10 min und der Postinkubation mit fMLP, PMA und NaF für 90 min ermittelt durch FACS-Analyse

	Integrin: CD11b				**Selektin: CD62L**				**CXCR2-Rezeptor**				**fMLP-Rezeptor**			
Stämme	+ PBS	+ fMLP	+ PMA	+ NaF	+ PBS	+ fMLP	+ PMA	+ NaF	+ PBS	+ fMLP	+ PMA	+ NaF	+ PBS	+ fMLP	+ PMA	+ NaF
P1280	+	●	●	+	-	●	●	●	-	-	-	-	+	+	●	+
P1288	+	●	●	+	-	●	●	-	-	-	-	-	+	+	●	+
P1303	+	●	●	+	-	●	●	-	-	-	-	-	+	+	●	+
P1321	+	●	●	+	-	●	●	-	-	-	-	-	+	+	●	+
P1	+	●	●	+	-	●	●	-	-	-	●	-	+	+	●	+
P1*ΔnapA*	+	●	●	+	-	●	●	-	-	-	●	-	+	●	●	+
P1*ΔvacA*	+	●	●	+	-	●	●	-	-	●	●	-	+	+	●	+
G27*ΔbabA*	+	●	●	+	-	●	●	-	-	-	●	-	+	●	●	+
P1*ΔalpA/B*	+	●	●	+	-	●	●	-	-	●	●	-	+	+	●	+
G27*ΔsabA*	+	●	●	+	-	●	●	-	-	-	●	-	+	●	●	+
P1*ΔvirB7*	+	●	●	+	-	●	●	-	-	●	●	-	+	+	●	+
P1*ΔureA*	+	●	●	+	-	●	●	-	-	●	●	-	+	+	●	+
P1*ΔcagA*	+	●	●	+	-	●	●	-	-	-	●	-	+	+	●	+
P1*Δrlx2*	+	●	●	+	-	●	●	-	-	-	●	-	+	●	●	+
P1*ΔvirD4*	+	●	●	+	-	●	●	-	-	-	●	-	+	●	●	+
P1*ΔvirB11*	+	●	●	+	-	●	●	-	-	-	●	-	+	●	●	+
P1*Δhelicase*	+	●	●	+	-	●	●	-	-	-	●	-	+	●	●	+
P1*ΔflaA*	+	●	●	+	-	●	●	-	-	-	●	-	+	●	●	+
P1*Δrlx1*	+	●	●	+	-	●	●	-	-	-	●	-	+	●	●	+
P1*ΔcatA*	+	●	●	+	-	●	●	-	-	-	●	-	+	●	●	+

*●, keine Regulation; +, Hochregulation; -, Runterregulation

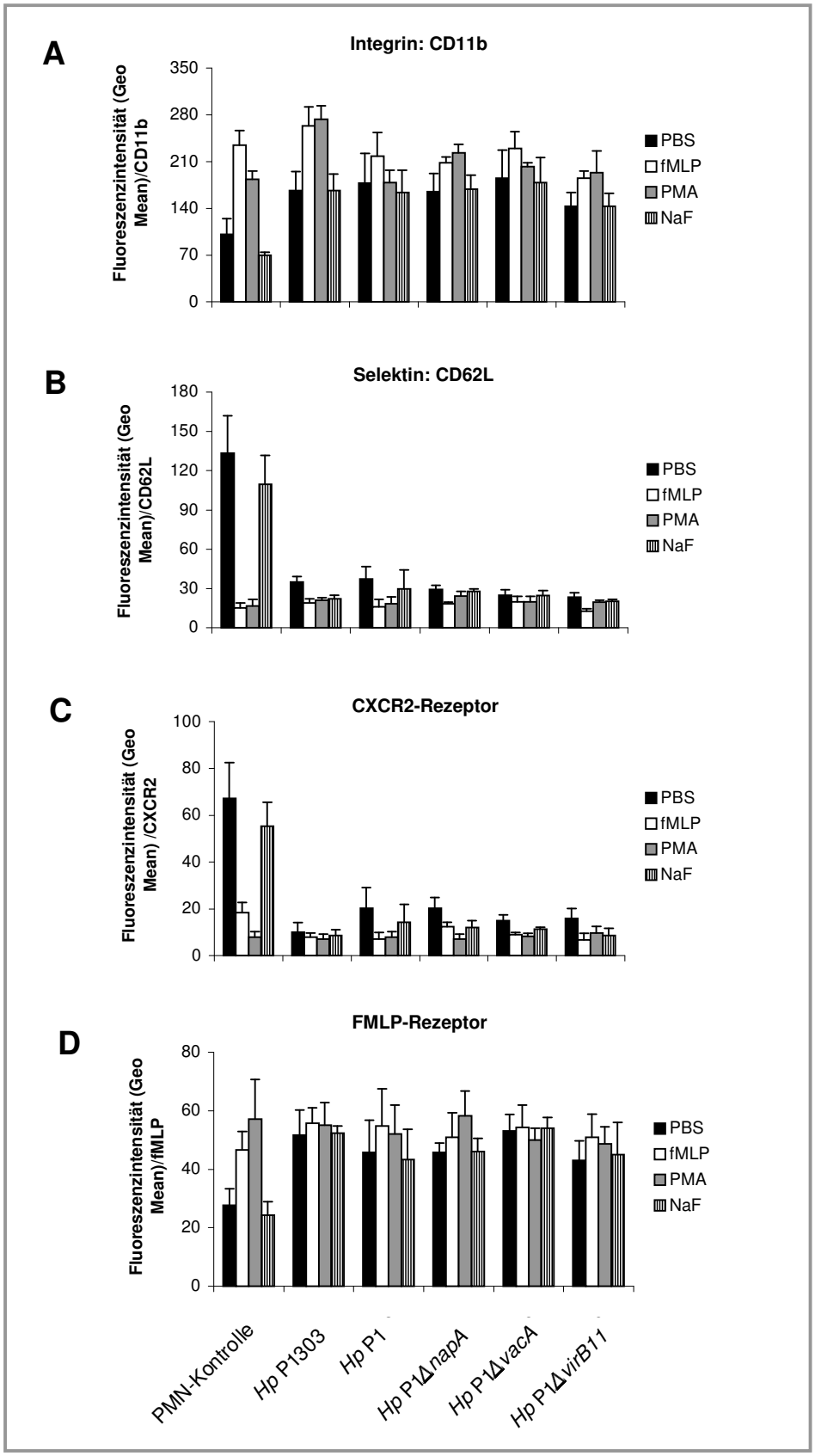


Abb. 7.17: Expression von Oberflächenmolekülen auf PMNs während der Infektion mit H. pylori und der Nachstimulation mit FMLP, PMA und NaF ermittelt durch FACS-Analyse.
(A) Expression von Integrin CD11b, (B) von Selektin CD62L, (C) CXCR2-Rezeptor und (D) fMLP-Rezeptor auf PMNs während der Infektion mit P1303, P1, P1Δ*napA,* P1Δ*vacA* und P1Δ*virB11* für 10 min und Postinkubation mit FMLP, PMA und NaF für 90 min. Ergebnisse sind Daten aus mehreren parallel durchgeführten Experimenten.

Im Gegensatz dazu konnte keine Änderung in der Expression des fMLP-Rezeptors bei der Infektion von PMNs mit *H. pylori* und anschließender Nachstimulation mit PMA beobachtet werden (Tabelle 7.6; Abb. 7.17D). Die Verwendung von genetisch unterschiedlichen *H. pylori* Stämmen hatte keinen Einfluss auf die Expression des fMLP-Rezeptors, denn nur *H. pylori* allein oder das Zusammenwirken von *H. pylori* und NaF spielten bei der Regulation des fMLP-Rezeptors eine Rolle (Tabelle 7.6; Abb. 7.17D).

Zusammenfassend konnte in dieser Studie beobachtet werden, das das Adhäsionsmolekül CD11b und der fMLP-Rezeptor während der Infektion mit *H. pylori* hoch reguliert und das L-Selektin CD62L und der CXCR2-Rezeptor nach der Inkubation mit *H. pylori* herunter reguliert wurden. Durch die Zugabe der verschiedenen Stimuli zeigten sich Änderungen in der Expression der vier Oberflächenmoleküle. So wurden die Oberflächenmarker nach Infektion mit *H. pylori* allein und in den Ansätzen *H. pylori*/NaF hoch- bzw. herunter reguliert, während sich die Expression der Rezeptoren in den Ansätzen *H. pylori*/fMLP bzw. *H. pylori*/PMA nicht veränderte.

Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass *H. pylori* allein und die Kombination mit dem Aktivator NaF die Expression dieser Oberflächenmoleüle stimuliert. Die anderen Stimuli spielen keine Rolle.

7.5.2 Mediatorenfreisetzung von PMNs nach Infektion mit *H. pylori* und Postinkubation mit fMLP, PMA und NaF

Analog zur Studie der Expression von Oberflächenmolekülen von PMNs während der Preinkubation mit *H. pylori* und der Postinkubation mit fMLP, PMA und NaF erfolgte die Analyse der Sekretion von Interleukin-8 (IL-8) und die Freisetzung biologisch aktiver Faktoren, wie Leukotrien B4 (LTB_4) und Prostaglandin E2 (PGE_2) aus den gleichen oben beschriebenen Ansätzen. Dazu wurden nach Beendigung der Inkubationszeit die Kulturüberstände der Infektionen entnommen und die Konzentrationen an freigesetztem IL-8, LTB_4 und PGE_2 durch ELISA-Analyse ermittelt. Die Ergebnisse sind Daten aus mehreren parallel durchgeführten Experimenten und einige Resultate sind an ausgewählten Beispielen in der Abb. 7.18 dargestellt.

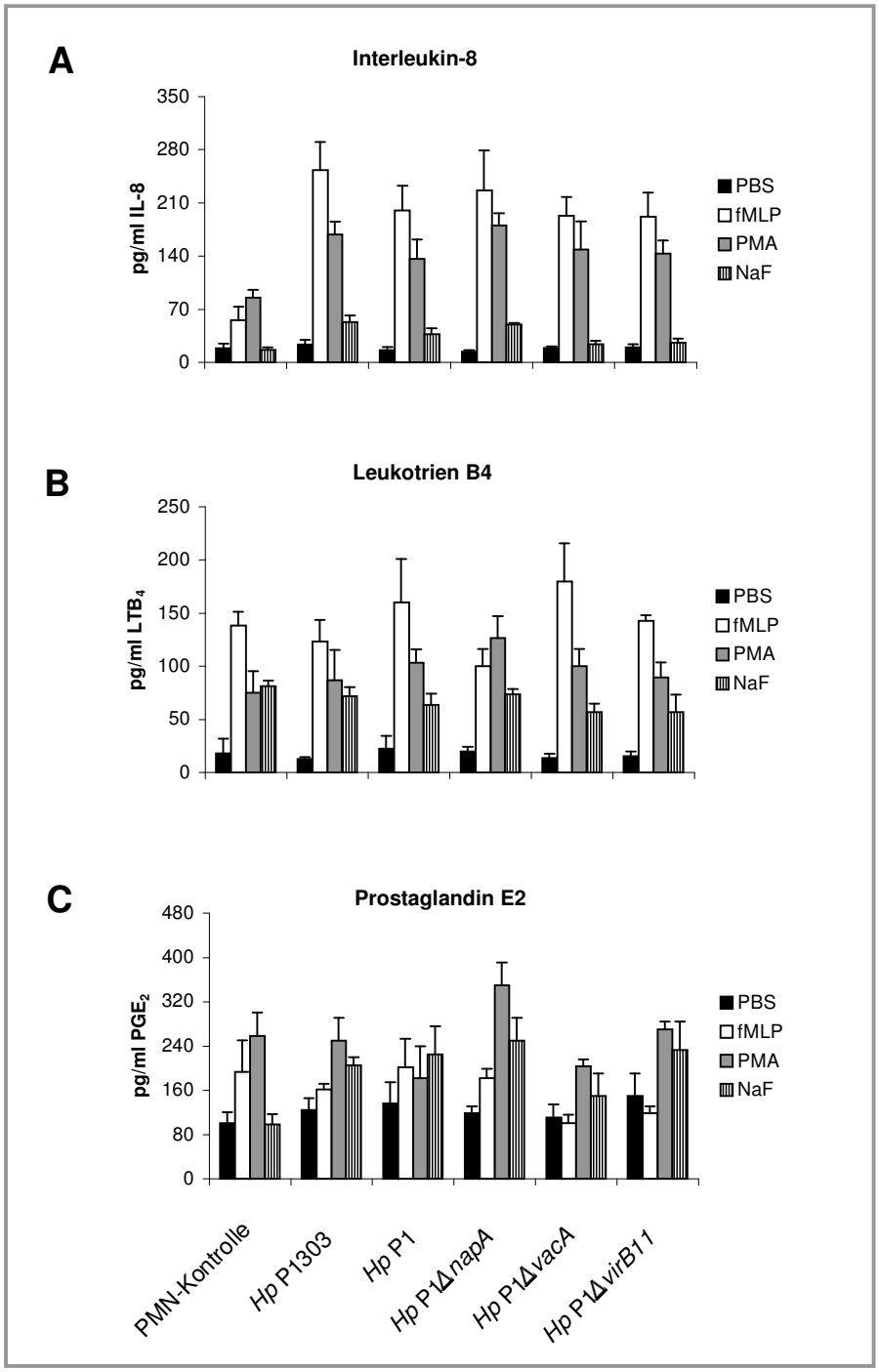


Abb. 7.18: Sekretion von verschiedenen Mediatoren von PMNs während der Infektion mit *H. pylori* und der Poststimulation mit fMLP, PMA und NaF.
(A) Freisetzung von IL-8, (B) Leukotrien B4 und (C) Prostaglandin E2 durch PMNs während der Infektion mit P1303, P1, P1Δ*napA,* P1Δ*vacA* und P1Δ*virB11* für 10 min und Postinkubation mit fMLP, PMA und NaF für 90 min. Ergebnisse sind Daten aus mehreren parallel durchgeführten Experimenten.

Die Untersuchungen zur Freisetzung von IL-8, LTB_4 und PGE_2 durch PMNs während der Infektion mit den verschiedenen *H. pylori*-Stämmen und der Postinkubation mit den verschiedenen Stimuli zeigten ein einheitliches Muster in allen Ansätzen, so dass hier nur einige Resultate stellvertretend für alle in der Abb. 7.18 dargestellt sind.

Anhand der Bestimmung der IL-8-Konzentration während der Stimulation der PMNs mit *H. pylori* bzw. mit den verschiedenen Aktivatoren erfolgte die Beobachtung, das die Menge an freigesetztem IL-8 in den Ansätzen *H. pylori*/fMLP bzw. *H. pylori*/PMA am höchsten war verglichen mit den Ansätzen *H. pylori* allein bzw. *H. pylori*/NaF und den uninfizierten Kontrollen (Abb. 7.18A). Dabei hatten die *H. pylori* Stämme P1303, P1, P1Δ*napA*, P1Δ*vacA* und P1Δ*virB11* mit unterschiedlichen genetischen Hintergrund keinen Einfluss auf die IL-8-Sekretion (Abb. 7.18A).

Parallel dazu konnte in der Analyse der LTB_4-Sekretion durch PMNs in den Ansätzen, die sowohl mit *H. pylori* bzw. fMLP, PMA und NaF stimuliert wurden, verglichen mit der uninfizierten Kontrolle keine signifikante Änderung in der Freisetzung von LTB4 detektiert werden (Abb. 7.18B). Es zeigten sich aber innerhalb der einzelnen Ansätze Unterschiede in den freigesetzten LTB_4-Konzentrationen, so setzten PMNs stimuliert mit *H. pylori*/fMLP die größte Menge an LTB_4 frei, gefolgt von den PMNs stimuliert mit *H. pylori*/PMA und *H. pylori*/NaF. Die Konzentration der LTB_4-Sekretion in den PMNs infiziert mit *H. pylori* allein fiel dagegen sehr gering aus (Abb. 7.18B). Die genetisch verschiedenen *H. pylori* Stämme P1303, P1, P1Δ*napA*, P1Δ*vacA* und P1Δ*virB11* hatten keinen Einfluss auf die LTB_4-Freisetzung von PMNs (Abb. 7.18B).

Im Vergleich dazu konnte in der Untersuchung der PGE_2-Sekretion durch PMNs, die sowohl mit *H. pylori* bzw. fMLP, PMA und NaF stimuliert wurden, keine signifikante Änderung in der Freisetzung von PGE_2 detektiert werden (Abb. 7.18C). Geringere Unterschiede in der Menge von freigesetzten PGE_2 zeigten sich in den einzelnen Ansätzen. So bildeten PMNs stimuliert mit *H. pylori*/PMA die größeren Mengen an PGE_2, als die PMNs stimuliert mit *H. pylori*/fMLP, *H. pylori*/NaF bzw. die PMNs infiziert mit *H. pylori* allein (Abb. 7.18C). Auch in dieser Studie hatten genetisch verschiedene *H. pylori* Stämme P1303, P1, P1Δ*napA*, P1Δ*vacA* und P1Δ*virB11* keinen Einfluss auf die PGE_2-Sekretion von PMNs (Abb. 7.18C).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, das eine *H. pylori*-induzierte Freisetzung von IL-8 während dieser Studie nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu, ist die Sekretion von LTB_4 und PGE_2 von der Infektion mit *H. pylori* bzw. die Anwesenheit der Stimuli unabhängig.

7.5.3 Expression anderer Faktoren während der Infektion mit *H. pylori* und der Nachstimulation mit fMLP, PMA und NaF

Analog zu den Untersuchungen der Expression von Oberflächenmolekülen und der Mediatorfreisetzung wurden im Rahmen dieser Studie weitere Faktoren, die bei der Phagozytose der PMNs eine wichtige Rolle spielen, analysiert. Dazu gehören, die NADPH-Oxidase, Cyclooxygenase 2 und Lipidmediatoren.

Um die Expression dieser Faktoren während der Infektion von PMNs mit *H. pylori* und Nachstimulation mit fMLP, PMA und NaF auf PCR-Ebene zu untersuchen, wurde die totale RNA aus den stimulierten PMNs isoliert. Die RNA wurde anschließend durch Reverse Transkriptase-PCR in cDNA umgeschrieben. Nach der Überprüfung der Qualität bzw. Quantität der cDNA wurden die verschiedenen Untereinheiten der NADPH-Oxidase ($p22^{phox}$, $p47^{phox}$ und $p67^{phox}$), Cox2 und 5-Lipoxygenase mit den entsprechenden Primern (Kapitel 10.2) durch Standard-PCR amplifiziert und quantifiziert. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass Expressionsunterschiede durch ungleiche Mengen an cDNA in den Proben auftraten, wurde ein Abgleich mit der *GAPDH* als Haushaltsgen durchgeführt. Die Ergebnisse sind Daten aus zwei Experimenten und die Gene der zu untersuchenden Faktoren gelten als hoch bzw. herunter reguliert, wenn sich die gemessene Lichtintensität der PCR-Bande im Vergleich mit den oben beschriebenen Kontrollen signifikant verändert.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Expression der NADPH-Oxidase zeigen, dass alle drei Untereinheiten exprimiert waren und die Gene aller drei Untereinheiten in den Stimulationsansätzen verglichen mit den unbehandelten PMN-Kontrollen (Null-Kontrolle bzw. 100 Minuten-Kontrolle) hoch reguliert wurden (Abb. 7.19). Innerhalb der Ansätze zeigten die uninfizierten PMNs inkubiert mit den Stimuli bzw. die PMNs inkubiert mit *H. pylori* und fMLP, PMA und NaF ein einheitliches Expressionsmuster der einzelnen Untereinheiten $p22^{phox}$, $p47^{phox}$ und $p67^{phox}$ der NADPH-Oxidase. In den Zellen, inkubiert den einzelnen Stimuli und mit genetisch unterschiedliche *H. pylori* Stämme, konnten keine Unterschiede in der Expression detektiert werden (Abb. 7.19 A,B,C).

Im Vergleich dazu wurde Cox2 in PMNs während der Infektion mit *H. pylori* leicht hochreguliert (Abb.7.20). Aber auch zwischen den Ansätzen, inkubiert mit verschiedenen Stimuli bzw. unterschiedlichen *H. pylori* Stämme, konnte keine Expressionsänderung von Cox2 beobachtet werden (Abb.7.20).

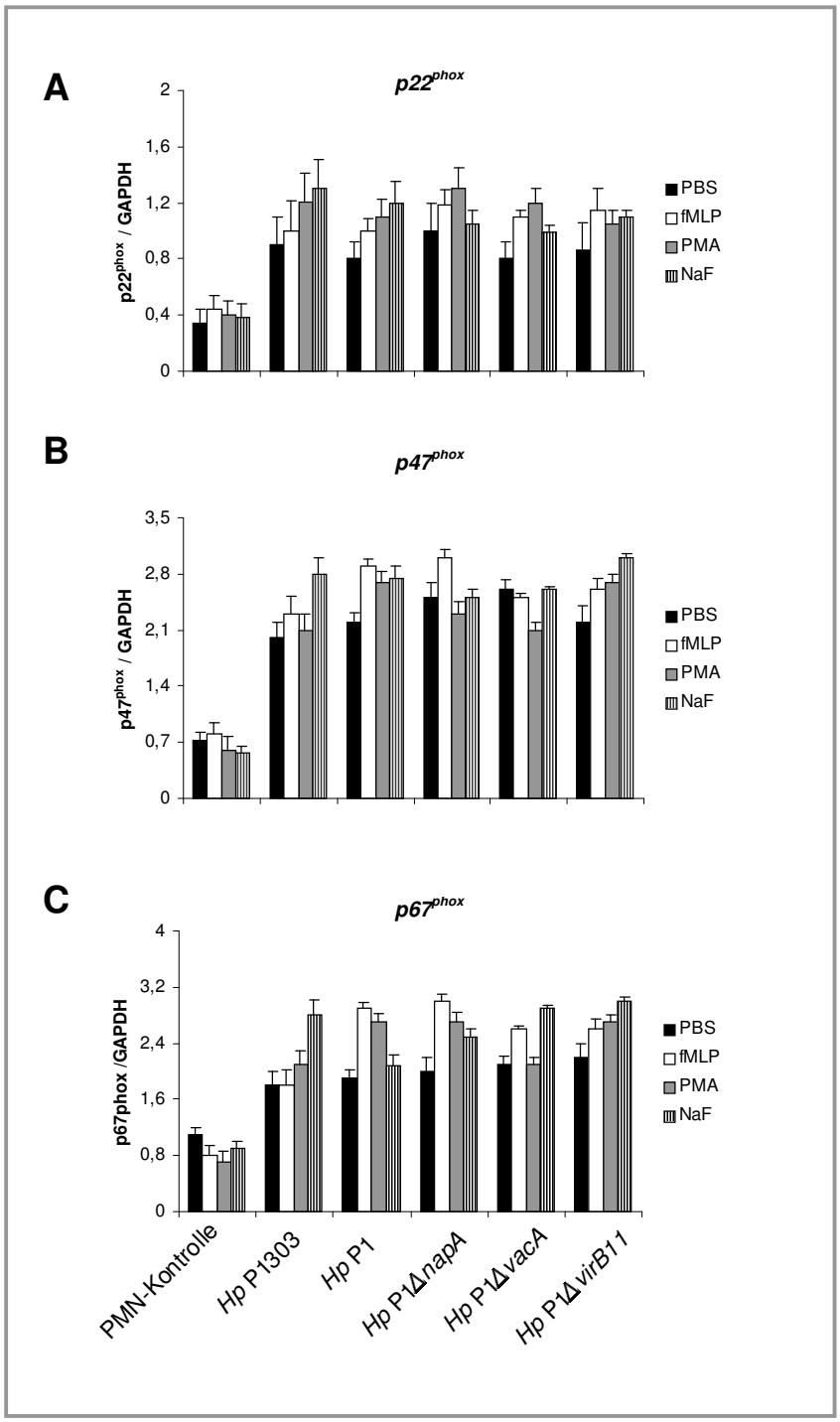


Abb. 7.19: Expression der Untereinheiten der NADPH-Oxidase in PMNs während der Infektion mit *H. pylori* und der Poststimulation mit fMLP, PMA und NaF.
(A) Expression von *p22*^{phox}, (B) *p47*^{phox} und (C) *p67*^{phox} durch PMNs während der Infektion mit P1303, P1, P1Δ*napA,* P1Δ*vacA* und P1Δ*virB11* für 10 min und Postinkubation mit fMLP, PMA und NaF für 90 min. Ergebnisse sind Daten aus zwei parallel durchgeführten Experimenten.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Expression der 5-Lipoxygenase (5-LO) in PMNs während der Stimulation mit *H. pylori* bzw. fMLP, PMA und NaF zeigen eine leichte Hochregulation der 5-LO (Abb. 7.21). Während dieser Analyse konnten keine

Unterschiede in der Expression der 5-LO in den PMNs, die mit den verschiedenen Stimuli bzw. genetisch unterschiedlichen *H. pylori* Stämmen inkubiert wurden, detektiert werden (Abb. 7.21).

Die Ergebnisse zeigen das die untersuchten Gene in PMNs nach der Stimulation mit *H. pylori* bzw. den Aktivatoren hoch reguliert wurden, die Expression der entsprechenden Gene aber unabhängig von den verwendeten Stimuli war.

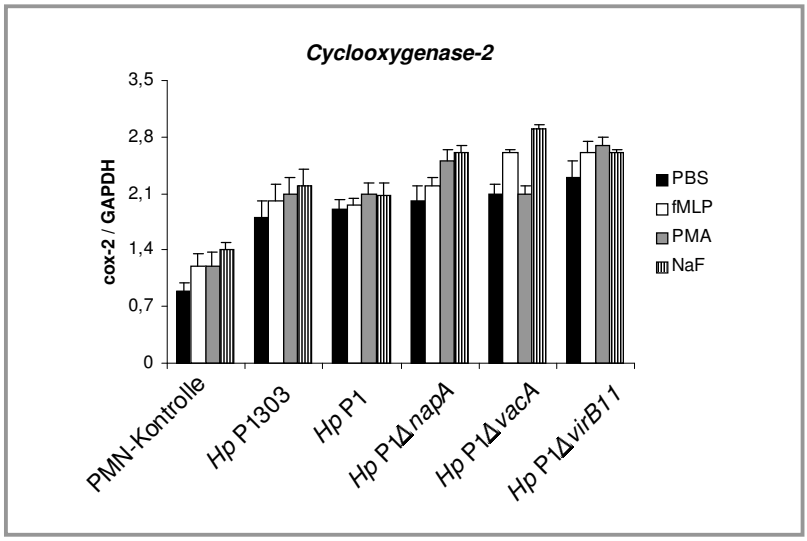


Abb. 7.20: Expression der *Cyclooxygenase-2* in PMNs während der Infektion mit *H. pylori* und der Poststimulation mit fMLP, PMA und NaF. Expression von *cox-2* durch PMNs während der Infektion mit P1303, P1, P1Δ*napA,* P1Δ*vacA* und P1Δ*virB11* für 10 min und Postinkubation mit fMLP, PMA und NaF für 90 min. Ergebnisse sind Daten aus zwei parallel durchgeführten Experimenten.

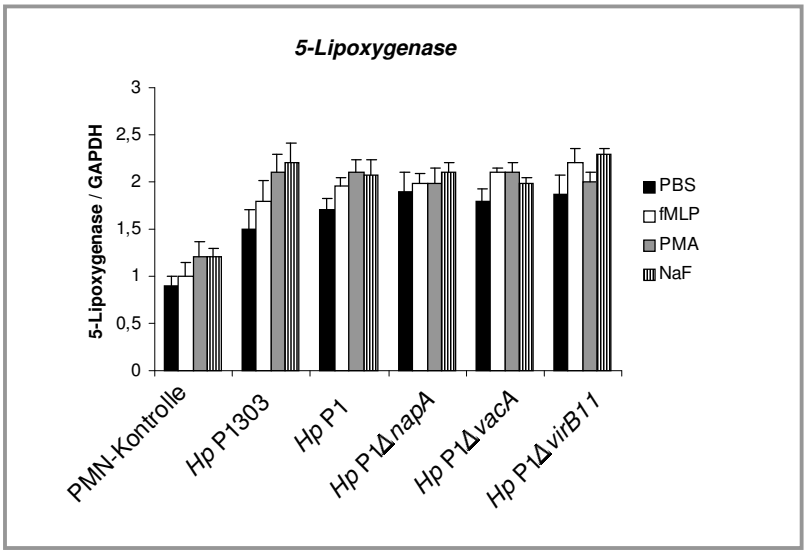


Abb. 7.21: Expression der *5-Lipoxygenase* in PMNs während der Infektion mit *H. pylori* und der Poststimulation mit fMLP, PMA und NaF. Expression von *5-LO* durch PMNs während der Infektion mit P1303, P1, P1Δ*napA,* P1Δ*vacA* und P1Δ*virB11* für 10 min und Postinkubation mit fMLP, PMA und NaF für 90 min. Ergebnisse sind Daten aus zwei parallel durchgeführten Experimenten.

8. Diskussion

8.1 Genregulation der *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren

Eines der Hauptziele von Genexpressionsstudien an pathogenen Mikroorganismen ist die Identifizierung von Genen, die während der Interaktion mit dem Wirt unterschiedlich reguliert werden. Solche Gene ermöglichen einem Pathogen entweder Virulenzfaktoren zu exprimieren oder sich an die wirtspezifischen Umweltbedingungen zu adaptieren. Vermutlich sind mehrere verschiedene Gruppen von regulatorischen Genen in *H. pylori* beteiligt, um die Kolonisationseffizienz des menschlichen Magens zu optimieren. In cDNA-Microarray-Studien von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden die RNA-Expression der Wirtszellen während der Infektion mit *H. pylori* bereits charakterisiert (CHION *ET AL*., 2001; COX *ET AL*., 2001; MAEDA *ET AL*., 2001, BACH *ET AL*., 2002; SEPULVEDA *ET A*L., 2002; GUILLEMIN *ET AL*., 2002; LIM *ET AL*., 2003; BACKERT *ET AL*, 2005) und Änderungen in der Transkription bakterieller Gene des Pathogens identifiziert (GRAHAM *ET AL*., 2002; MERRELL *ET AL*., 2003; THOMPSON *ET AL*., 2003; ANG *ET AL*., 2001; MC GOWAN *ET AL*., 2003; WEN *ET AL*., 2003; VAN VLIET *ET AL*., 2004; KIM *ET AL*., 2004).

In dieser Studie wurden Magenkarzinomepithelzellen (AGS) und polymorphkernige Leukozyten (PMNs) als ein *in vitro* Infektionsmodell verwendet, um die Expressionsprofile einiger ausgewählter Virulenz-assoziierter Gene von klinischen Isolaten von *H. pylori* durch Echtzeit-PCR zu analysieren. Die Untersuchungen demonstrieren, dass die Echtzeit-PCR am TaqMan eine sehr hilfreiche Methode darstellt, um die Genexpression von *H. pylori* in einem Infektionsmodell zu detektieren und zu quantifizieren. Außerdem zeigen unsere Daten, dass die beobachteten Veränderungen in der Genexpression während der Infektion mit Wirtszellen reproduzierbar sind.

Während die Charakterisierung der Virulenzfaktoren von *H. pylori* bereits zahlreiche interessante Erkenntnisse erbracht hat, ist unser Wissen bezüglich der Regulation der Expression dieser Pathogenitätsfaktoren noch sehr beschränkt. Die Sequenzierung der Genome zweier *H. pylori*-Isolate, 26695 und J99 (ALM *ET AL*., 1999; TOMB *ET AL*., 1997), die durchschnittlich etwa 1500 offene Leserahmen (ORFs) enthalten, zeigte außerdem, dass dieser Organismus nur eine geringe Anzahl an Genen besitzt, die für Faktoren mit Homologien zu Proteinen mit bekannter regulatorischer Funktion kodieren. So enthalten die Sequenzannotationen nur 17

ORFs, deren Produkten eine direkte Rolle in der Transkriptionsregulation zugeschrieben werden kann und die hauptsächlich zur Klasse der Transkriptions-Initiationsfaktoren (σ-Faktoren), der Zweikomponenten-Systeme und Transkriptions-Repressorproteine gehören (BEIER *ET AL.*, 2000).

Das Genom von *H. pylori* kodiert lediglich drei σ-Faktoren, den vegetativen σ-Faktor σ^{80} (RPOD), σ^{54} (RpoN) und einen alternativen σ^{28} (FliA). Sowohl σ54 und σ^{28} sind in *H. pylori* an der Regulation der Flagellenexpression beteiligt (SPOHN UND SCARLATO, 1999; JOSENHANS ET AL., 2002). Homologien von alternativen σ-Faktoren, die unter Stressbedingungen die Genregulation regulieren, wie RpoS in der stationären Phase, oder σ^{32} unter Hitzeschock-Bedingungen, sind interessanterweise nicht vorhanden (BEIER, D.; 2001).

Zweikomponenten-Systeme sind bakterielle Signaltransduktionssysteme, die es den Mikroorganismen ermöglichen, ihre Genexpression sich verändernden Umweltbedingungen anzupassen. Bestandteil dieser Zweikomponenten-Systeme ist zum einen ein Sensorprotein, das über seine N-terminalen *Input*-Domäne Umweltstimuli wahrnehmen kann, was die Autophoshorylierung eines konservierten Histidin-Restes seiner Transmitterdomäne zu Folge hat. Durch anschließende Phosphatgruppenübertragung auf das *Response*-Regulatorprotein, welches das eigentliche Effektormolekül darstellt und häufig als Transkriptionsfaktor wirkt, wird der wahrgenommene Umweltstimulus in ein zelluläres Signal umgewandelt. Mit vier Histidin-Kinasen und sechs *Response*-Regulatoren enthält *H. pylori* nur eine sehr geringe Anzahl solcher Zweikomponenten-Systeme (ALM *ET AL.*, 1999; TOMB *ET AL.*, 1997), während beispielsweise *E. coli* etwa 30 dieser Signaltransduktionssysteme besitzt (MIZUNO *ET AL.*, 1997).

Eisenabhängige Genregulation wird in *E. coli* und anderen kommensalen und pathogenen Bakterien durch das Fur-Repressorprotein vermittelt, das in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Fe^{2+}-Konzentration Eisen-Ionen als Corepressor bindet und durch Interaktion mit spezifischen Sequenzmotiven in den Promotorregionen Eisen-regulierter Gene deren Expression unterbindet. Im Genom von *H. pylori* konnte ebenfalls ein *fur*-Gen identifiziert werden (ALM *ET AL.*, 1999; TOMB *ET AL.*, 1997), dass in der Lage ist, eine *fur*-negative Mutante von *E. coli* zu wildtypischer, eisenabhängiger Regulation der *fhuF*- und *fiu*-Promotoren zu komplementieren (BERESWILL *ET AL.*, 1999). Ein weiteres bereits gut charakterisiertes Transkriptions-Repressorprotein von *H. pylori* ist HspR, das Homologien zum

gleichnamigen Hitzeschock-Repressor aus *Streptomyces* spp. aufweist (BUCCA *ET AL*., 1999). In *H. pylori* ist HspR ebenfalls an der Regulation der Chaperon-Gene beteiligt und bindet an die Promotoren der *groESL*-, *cbpA*- und *dnak*-Operone, was zur Repression der Operonregulation führt (SPOHN UND SCARLATO, 1999).

Das Vorhandensein von einer relativ geringen Anzahl regulatorischer Gene im Genom von *H. pylori* wurde als extreme Anpassung an den menschlichen Magen als einzige bekannte Nische von *H. pylori*, in der das Bakterium zudem nicht mit anderen Mikroorganismen konkurrieren muss, interpretiert. Die Existenz weniger Transkriptionsregulatoren bedeutet jedoch nicht notwendigerweise, dass genregulatoische Prozesse in *H. pylori* auf ein Minimum reduziert sind. Es könnten beispielsweise Regulationsmechanismen in den Bakterien vorherrschen, die nicht auf transkriptionelle Ebene wirken, wie es am Beispiel der Modulation der mRNA-Stabilität bei der Expression des Urease-Genclusters beschrieben wurde (AKADA *ET AL*., 2000). Weiterhin ist denkbar, dass Restriktions-Modifikations-Systeme (BEIER, D., 2001), die im *H. pylori* Genom in extrem großer Zahl kodiert sind, durch Veränderungen der Interaktion regulatorischer Proteine mit modifizierter Promotor-DNA an der Transkriptionsregulation beteiligt sind. So liegen in den *H. pylori* Stämmen 26695 und J99 die Gene für neun TypII-Methyltransferasen konserviert vor, während Gene für zugehörige Restriktionsenzyme fehlen (ALM *ET AL*., 1999; TOMB *ET AL*., 1997). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass sich unter den im Genom identifizierten ORFs unbekannter Funktion, die für *H. pylori* spezifisch sind (23% des Genoms), Gene befinden, deren Produkte Proteine mit neuartiger regulatorischer Funktion darstellen.

In diesem Zusammenhang stehen die Beobachtungen unserer Studie, in der die genetisch unterschiedlichen *H. pylori*-Stämme unterschiedliche Genexpressions-profile zeigen, die stammspezifisch, zeitabhängig und wirtzellabhängig sind.

Einer der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori* stellt das vakuolisierende Zytotoxin VacA dar. Dieses Toxin, das von einigen *H. pylori*-Stämme exprimiert wird, wird aktiv sezerniert und zeigt im Hinblick auf Epithel- und Immunzellen vielfältige Effekte. Es verdankt seinen Namen der Bildung großer Vakuolen im Zytoplasma von Epithelzellen. Zudem hemmt es die T-Zellaktivierung (GEBERT *ET AL*., 2003; BONCRISTIANO *ET AL*., 2003; SUNDRUD *ET AL*., 2004), bewirkt die Auflockerung von Kontaktstellen (*Tight junctions*) zwischen den Epithelzellen (MONTECUCCO UND RAPPUOLI, 2001; PEEK UND BLASER, 2002) und induziert Apoptose (GALMICHE *ET AL*.,

2000). In Übereinstimmung mit diesen wichtigen Funktionen von VacA, konnten wir eine Zunahme der Expression der *vacA*-Gene in vier von acht Stämmen während der Inkubation mit AGS-Zellen beobachten. Diese Ergebnisse korrelieren mit einer Reihe anderer Studien, die ebenfalls eine Steigerung der *vacA*-Expression während der Wechselwirkung mit Epithelzellen zeigen konnten (MERRELL *ET AL*., 2003; SZCZEBARA *ET AL*., 1999; VAN AMSTERDAM *ET AL*., 2003). Ähnliche Ergebnisse konnten wir während der Infektion mit PMNs beobachten, in denen zwei von acht *H. pylori*-Stämmen höhere Mengen an *vacA*-mRNA produzierten (Kapitel 7.2.3; Tabelle 7.3). Inwieweit die erhöhte Expression einzelner *vacA*-Allele einen Einfluss auf die Signaltransduktion infizierter PMNs ausübt, bleibt aber noch zu klären.

Der wahrscheinlich bestcharakterisierte Virulenzfaktor von *H. pylori* ist das Protein CagA, welches das einzig bekannte Effektorprotein des *H. pylori*-T4SS darstellt (MONTECUCCO UND RAPPUOLI, 2001; PEEK AND BLASER, 2002; COVACCI *ET AL*., 1999; BACKERT *ET AL*., 2002; BACKERT UND SELBACH, 2005; CASCALES UND CHRISTIE, 2003). Trotz der signifikanten Effekte von transloziertem CagA in Wirtszellen, ist bisher sehr wenig über die Regulation des *cagA*-Gens auf der Transkriptionsebene bekannt. Die Regulation anderer Gene der *cag*-PAI sind ebenso wenig untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass die *cagA*-mRNA in einem *H. pylori*-Stamm während der Interaktion mit AGS-Zellen hoch reguliert und in zwei anderen Stämmen herunter reguliert wurde. Ferner wurde *cagA* im Stamm P1 während der Infektion von AGS-Zellen herunter reguliert, aber während der Inkubation mit PMNs hoch reguliert. Der Grund für diese interessante Variation des Genexpressionsmusters ist unklar. Dennoch scheint das Phänomen mit der Tatsache zusammenzuhängen, dass verschiedene regulatorische Regionen in der *cag*-PAI vorhanden sind, die sich in ihrer Promotoraktivität stark unterscheiden. Dieses Faktum konnte anhand einer Studie der Expression des UreB-Fusionsproteins-genutzten Reportersystems gezeigt werden (JOYCE *ET AL*., 2001). Ergebnisse anderer Gruppen deuten darauf hin, das *cagA* möglicherweise konstitutiv exprimiert ist. So zeigen beispielsweise zweidimensionale Gele, das die Expression des CagA-Proteins in *H. pylori* sehr hoch ist, selbst in Abwesenheit vom Wirtszellkontakt (JUNGBLUT *ET AL*., 2000; BACKERT *ET AL*., 2005).

Das *H. pylori* NapA-Protein hat seinen Namen, durch die Fähigkeit die Adhäsion von PMNs an Endothelzellen zu fördern, erhalten (EVANS *ET AL*., 1995), und es wurde als eines der Hauptantigene in der Immunantwort des Menschen gegen *H. pylori*

beschrieben (SATIN *ET AL*., 2000). Anhand der Fähigkeit von *NapA*, welches Mäuse durch orale Gabe vor einer späteren Kolonisation mit *H. pylori* schützt, wird dem Protein eine Rolle bei der *H. pylori* Vaccinationstherapie zu gedacht (SATIN *ET AL*., 2000; DEL GIUDICE *ET AL*., 2001). Interessanterweise wurden kürzlich in *H. pylori*-Genexpressionsstudien Eisen-regulierte Gene, einschließlich *cagA*, *vacA* und *napA* identifiziert (MERRELL *ET AL*., 2003) und die Akkumulation von NapA ist in der Tat durch Fur beeinflusst (COOKSLEY *ET AL*., 2003). Unsere Studien zeigen, dass *napA* (neben *vacA*) ein weiterer Hauptpathogenitätsfaktor darstellt, da es in einigen Stämmen während der Infektion mit AGS-Zellen und PMNs hoch reguliert wurde. Diese Beobachtungen unterstreichen die Wichtigkeit des Proteins, für die *H. pylori*-induzierte Pathogenese. In einer weiteren Studie wurde NapA als Faktor beschrieben, der die endotheliale Migration von PMNs induziert (BRISSLERT *ET AL*., 2005).

Urease, zusammen mit den fünf bekannten Urease-assoziierten Proteinen (UreI, UreE, UreF, UreG und UreH), stellt einen weiteren wichtigen Kolonisationsfaktor für *H. pylori* dar. Die Neutralisation der physiologischen Bedingungen durch das Enzym, erlaubt *H. pylori* das Überleben im menschlichen Magen (MONTECUCCO UND RAPPUOLI, 2004; PEEK UND BLASER, 2002; HA *ET AL*., 2001). Wir beobachteten, das *ureA* in drei *H. pylori*-Stämmen während der Wechselwirkung mit AGS-Zellen hoch reguliert und während der Inkubation mit PMNs überwiegend herunter reguliert wurden. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Beobachtungen überein, dass die Aktivität der Urease für die initiale Kolonisation des Magens in Tiermodellen notwendig ist (EATON *ET AL*., 1991; TSUDA *ET AL*., 1994; KAVERMANN *ET AL*., 2003).

Ein anderer Virulenz-assoziierter Faktor, KatA, übt die putative Funktion des Schutzes von *H. pylori* gegen den sauerstoffabhängiges Abtötungsprozess durch PMNs aus (ODENBREIT *ET AL*., 1996; LOEWEN *ET AL*., 2004). Aus diesem Grund war eine Zunahme der Transkription von *katA* während der Interaktion von *H. pylori* mit PMNs zu erwarten. Doch die Ergebnisse zeigen, das die *katA*-Expression während der Infektion mit PMNs abnimmt und im Gegensatz dazu, die Expression von *katA* während der Wechselwirkung mit AGS-Zellen zunimmt. Diese pathophysiologischen Befunde müssen durch weiterführende Experimente noch näher geklärt werden.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass sowohl die genetische Diversität als auch die Umweltbedingungen des Wirtes die Genexpression in *H. pylori* beeinflusst. Die signifikanten Variationen in den Genexpressionsprofilen in einer

stammspezifischen und zellspezifischen Art und Weise ist die Ursache einer hochgradigen Adaptation an die ökologische Nische des Wirtes und die Kombination dieser Eigenschaften befähigt *H. pylori* zu einer persistierenden Kolonisation der Magenschleimhaut des Menschen, die Jahrzehnte andauern kann.

8.2 Morphologische Veränderungen an humanen Zellen während der *H. pylori*-Infektion

8.2.1 Induktion des Elongationsphänotyps an AGS-Zellen

Einer der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren während der Wechselwirkung von *H. pylori* mit Wirtszellen stellt das CagA-Protein dar, welches über ein T4SS in die Wirtszelle injiziert wird und zur Ausbildung eines Elongationsphänotyps der Wirtszelle führt (MONTECUCCO UND RAPPUOLI, 2001; PEEK AND BLASER, 2002; COVACCI *ET AL*., 1999; BACKERT *ET AL*., 2002). Bisher ist noch nicht eindeutig geklärt, welche zellulären Signaltransduktionsprozesse an der Entstehung des Phänotyps beteiligt sind. Ebenfalls ist unbekannt, welche Rolle die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von bisher nicht identifizierten Wirtszellproteinen spielt und wie sie zustande kommen. SELBACH und Mitarbeiter (2003; 2004) konnten zwei dephosphorylierte Wirtszellproteine, das Cortactin und Ezrin, identifzieren. Es wurde beobachtet, das das CagA-Protein, welches durch *H. pylori* in die Wirtszelle injiziert wird (Abb.8.1), von Kinasen der Src-Familie an der EPIYA-Sequenz phosphoryliert wird (SELBACH *ET AL*., 2003). Src besteht aus einer SH3-, SH2- und einer Kinase-Domäne, und ist am N-Terminus mit der Plasmamembran assoziiert. In der aktiven Konformation ist das Tyrosin 418 der Src-Kinase phosphoryliert, und aktives Src ist in der Lage das Aktinbindende Protein Cortactin zu phosphorylieren. Zu einem Zeitpunkt der *H. pylori*-Infektion, wo sich phosphoryliertes CagA in den Zellen angesammelt hat, wird die Aktivität von Src inhibiert. Dafür ist die Phosphorylierung der für die Src-Aktivität wichtigen Tyrosine 418 und 527 verantwortlich. Intramolekulare Wechselwirkungen stabilisieren zusätzlich die inaktive Form von Src, wodurch inaktives Src nun nicht mehr in der Lage ist, Cortactin zu phosphorylieren und das Protein wird nun von zellulären Phosphatasen (PTPasen) dephosphoryliert. Dadurch verändern sich die Eigenschaften von Cortactin und Ezrin, was wahrscheinlich eine Rolle in der

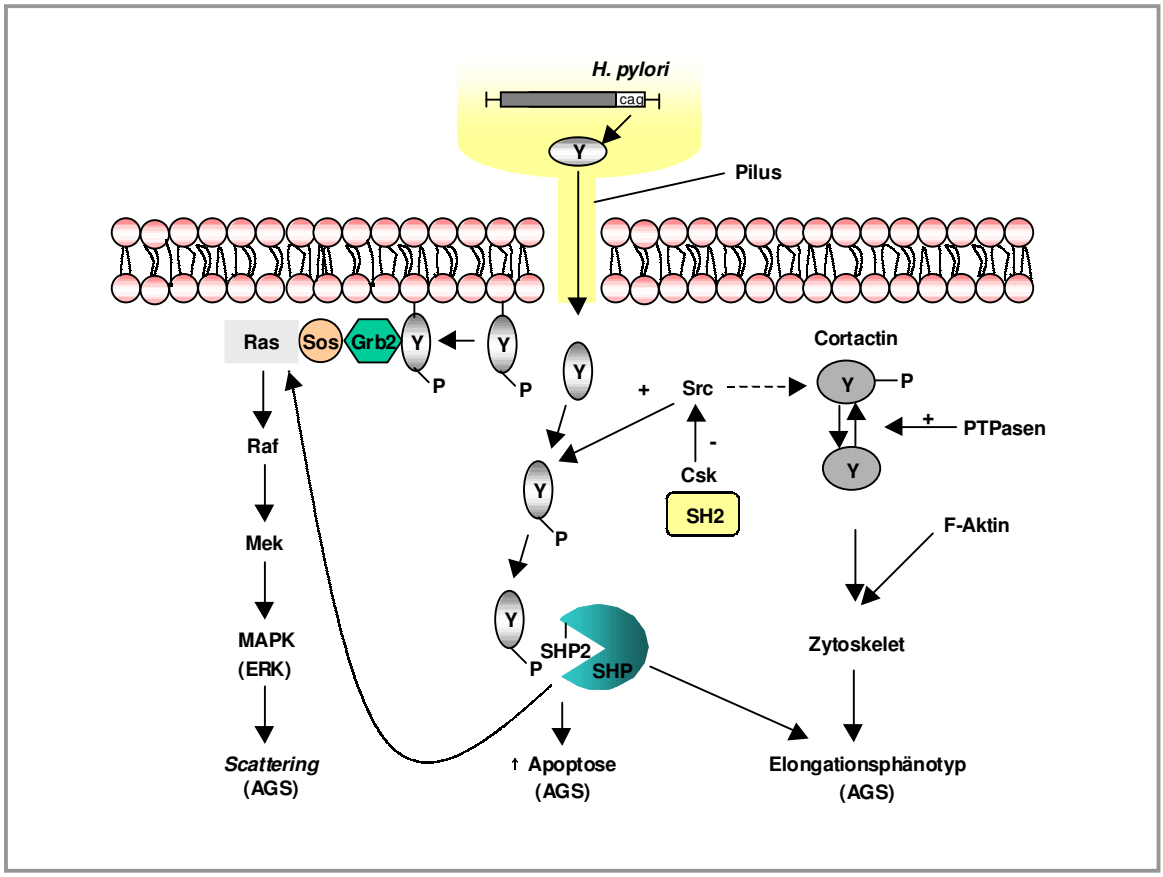


Abb. 8.1: Interaktion von CagA mit Epithelzellen nach BLASER UND ATHERTON (2004).
H. pylori mit intakter *cag*-PAI und eines aktiven T4SS besitzen einen Pilus mit vorherrschenden CagY-proteinen. Das CagA-Produkt wird ins Zytoplasma der Wirtszelle injiziert, wo Tyrosin (Y) nahe des COOH-Terminus phosphoryliert wird. Phosphotyrosin-CagA interagiert mit verschiedenen Signaltransduktionswegen der Wirtszelle, woraus die Ausbildung des Phänotyps, der Proliferation und der Apoptose resultiert (BLASER UND ATHERTON, 2004).

Entstehung des Elongationsphänotyps spielt (BACKERT *ET AL.*, 2001; SELBACH *ET AL.*, 2002; SELBACH *ET AL.*, 2003; SELBACH *ET AL.*, 2004).

In unserer Studie wurden anhand von Infektionen an AGS-Zellen mit acht genetisch unterschiedlichen klinischen Isolaten von *H. pylori* die Ausbildung des Elongations-phänotyps untersucht. Wir erwarteten, dass die Zellen, die mit den vier *cag*PAI-positiven *H. pylori* Stämmen infiziert wurden, den Phänotyp ausbilden. Diese Vermutung konnte durch die Beobachtung der Infektionen bestätigt werden (Kapitel 7.3.1; Abb. 7.6). Die AGS-Zellen, inkubiert mit den *cag*PAI-negativen Stämme zeigten, wie erwartet, keine Induktion des Phänotyps. Die Ausbildung des Elongationsphänotyps während der Infektion mit *cag*PAI-positven Stämmen korreliert mit der Tyrosin-Phosphorylierung von transloziertem CagA in AGS-Zellen (Kapitel 7.3.2; Abb. 7.7A).

Obwohl eine Ausbildung des Elongationsphänotyps *in vivo* nicht beobachtet wurde, übt CagA vielfältige Effekte auf die Magenepithelzellen aus. Aktuelle Forschungs-

ergebnisse weisen daraufhin, dass das CagA-Protein selbst an der Tumorentstehung beteiligt sein kann, und es wird daher auch als bakterielles Onkoprotein bezeichnet. *H. pylori* Stämmen, denen die *cag*-PAI fehlt oder bei denen sie inaktiv ist, sind signifikant weniger mit Folgekrankheiten assoziiert als *cag*-positive Stämme (BLASER *ET AL*., 1995; KUIPERS *ET AL*., 1995; PEEK *ET AL*., 1995; IKENOUE *ET AL*., 2001; NOMURA *ET AL*., 2002). Diese Aussage korreliert zum Teil mit den *H. pylori*-assoziierten Erkrankungen der Patienten, aus denen die *H. pylori* Stämme isoliert wurden und die während unseren Untersuchungen eingesetzt wurden (Kapitel 7.1; Tabelle 7.1).

8.2.2 Ausbildung homotypischer Zellaggregate durch PMNs

Die Rolle von CagA und dessen Phosphorylierung durch Immunzellen ist noch nicht vollständig geklärt. In der Arbeit konnte gezeigt werden, das PMNs das CagA-Protein in mehrere Fragmente schneidet, und das das Tyrosin 418 und 529 der Src-Kinase während der Infektion mit einem *cag*PAI-positiven Stamm in einer relativ kurzen Zeit phosphoryliert wird (Kapitel ;Abb. 7.14).

PMNs zeigen in unserer Studie nach der Infektion mit genetisch unterschiedlichen *H. pylori* Stämmen, die Ausbildung homotypischer Zellaggregate (Kapitel 7.4.1; Abb. 7.13). Die Bildung von Zellaggregaten wurde ebenfalls an U937-Zellen (Makrophagen-ähnlichen Zellen) beschrieben (MOESE *ET AL*., 2002), und die Ausbildung der U937-Zellaggregate war abhängig von der Infektion mit *cag*PAI-positiven Stämmen. Diese Resultate korrelieren nicht mit den Ergebnissen unserer Untersuchung an infizierten PMNs, die die homotypischen Zellaggregate unabhängig von der Wechselwirkung mit *H. pylori* TypI- bzw. Typ II-Stamm ausbildeten. Die Zellspezifität dieser *cag*PAI-unabhängige Interaktion mit PMNs ist in zukünftigen Untersuchungen aufzuklären.

Die Bildung homotypischer Aggregate hängt offenbar mit der Aktivierung von B-Zellen, T-Zellen, Monozyten und Neutrophilen zusammen, aber der molekulare Mechanismus ist nicht vollständig geklärt (BJORCK *ET AL*., 1993; ISOBE UND NAKASHIMA, 1991). Untersuchungen von Biopsieproben *H. pylori*-infizierter Patienten haben gezeigt, das ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule1*) in den Zellen, als bekanntes Adhäsionsmolekül, während der Endzündungsreaktion hochreguliert wird. Analysen durch Blockierungs-Experimente mit anti-ICAM-1- und LFA-1-Antikörpern zeigten, das die Bildung dieser homotypischen Aggregate über ICAM-1 und LFA-1 abläuft

(MOESE *ET AL*., 2002). Die ICAM-1-Expression ist ebenfalls erhöht während der Entzündung des Magens *in vivo* (HATZ *ET AL*., 1997; HIGUCHI *ET A*L., 1997; OHARA *ET AL*., 2001), was vermutlich zur regulierten Zell-Zell-Interaktion beiträgt und eine Entzündungsantwort auslöst. *H. pylori* induziert die Expression von ICAM-1, was nach der Zellrekrutierung dazu führt, das die Zellen am Ort der Endzündung verbleiben. Die Rolle des resultierenden Phänotyps *in vivo* (z.B. die Modulation der Phagozytose oder anderer Vorgänge), sowie die Interaktion von PMNs mit Epithelzellen und deren Verbleib am Entzündungsherd muss noch näher untersucht werden.

8.3 Interleukin-8 (IL-8)-Sekretion

IL-8 ist ein Chemokin, welches von stimuliertem Gewebe freigesetzt wird, und die Polarisation von spezifischen Leukozyten bewirkt, damit diese an den Ort der Entzündung gelangen (ALBERTS *ET AL.,* 2004). Dabei spielt der Transkriptionsfaktor NF-κB während der Entzündungsantwort eine zentrale Rolle, indem er die mRNA-Expressionen von Chemokinen und Adhäsionsmolekulen hochreguliert. Es ist bekannt, dass eine *H. pylori*-Infektion die mRNA-Transkription und Proteinproduktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie (IL)-1β und Chemokinen, wie IL-8 und MCP-1 auslöst, was zur Ausbildung einer chronischen Gastritis führen kann (WEE *ET AL*., 1992; CROWE *ET AL*., 1995; NOACH *ET AL*., 1994; GIONCHETTI *ET AL*., 1994; MOSS *ET AL*., 1994; CRABTREE *ET AL*., 1995; PEEK *ET AL*., 1995; YAMAOKA *ET AL*., 1996; ANDO *ET AL*., 1996; YAMAOKA *ET AL*., 1997; SHIMOYAMA *ET AL*., 1998).

In den letzten Jahren wurden mehrere Hypothesen postuliert, welche zellulären oder bakteriellen Faktoren für die *H. pylori*-induzierte IL-8-Freisetzung verantwortlich sind.

Es wurde vermutet, das die *pattern-recognition-receptors* (PRRs), die spezifische Komponenten von Pathogenen, wie LPS, Peptidoglykan, unmethylierte CpG-DNA-Motife, Flagellin und Lipoteichonsäure, erkennen können, und durch resultierende NF-κB-Aktivierung, die Freisetzung von IL-8 induzieren (MEDZHITOV, 2001; AKIRA, 2003; BEUTLER, 2004). Eine zweite Klasse zusätzlich zu den PRRs, stellen die *intracellular-pathogen-recognition-molecules* dar, wie Nod1 und Nod2, die für die intrazelluläre Erkennung bakterieller Produkte verantwortlich sind, und darüber IL-8-Sekretion induzieren (GIRARDIN *ET AL*., 2002; VIALA *ET AL*., 2004; KIM *ET AL*., 2002). Zusätzlich zu den zellulären Faktoren spielen auch bakterielle Proteine bei der Induktion von IL-8 eine

Rolle. Welche *H. pylori*-spezifischen Proteine daran beteiligt sind, ist noch nicht eindeutig geklärt. Lange Zeit wurde vermutet, dass CagA, als einzigstes *H. pylori* T4SS-Effektorprotein, welches die Veränderung des Aktinzytoskellets von AGS-Zellen bewirkt (HIGASHI *ET AL*., 2001; MIMURO *ET AL*., 2002; AMIEVA *ET AL*., 2003; SELBACH *ET AL*., 2003), keine Rolle bei der IL-8-Freisetzung spielt. Die Beobachtungen, dass *cagA*-Mutanten sehr oft beträchtliche Mengen von IL-8 induzieren, weisen darauf hin, dass CagA sehr wohl an der Induktion von Entzündungsprozessen beteiligt ist (CRABTREE *ET AL*., 1995; SHARMA *ET AL*., 1998; CENSINI *ET AL*., 1996; FISCHER *ET AL*., 2001).

In unserer Studie erfolgte die Untersuchung der IL-8-Freisetzung von AGS-Zellen und PMNs während der Infektion mit genetisch verschiedenen *H. pylori* Stämmen. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die *cag*PAI-positiven Stämme P1 und P12 die größten Mengen an IL-8 in AGS-Zellen induzieren (Kapitel 6.3.2; Abb. 6.6A). Im Vergleich dazu produzieren die AGS-Zellen, die mit den *cag*PAI-positiven Stämmen P284 und P303 inkubiert wurden, geringere Mengen an IL-8, die annähernd mit den gebildeten Mengen der Typ-II-Stämme-infizierten AGS-Zellen übereinstimmen (Kapitel 6.3.3; Abb. 6.6A;B). Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Untersuchungen überein, die zeigen konnten, das klinische Stämme, isoliert aus Patienten mit Gastritis, Ulkuskrankheit und Magenkrebs, mit einer funktionstüchtigen *cag*-PAI verschiedene Variationen in ihrer Fähigkeit IL-8 zu induzieren, aufweisen (BRANDT *ET AL*., 2005). Diese analysierten Bakterien wurden in Stämme, die große Mengen an IL-8 induzieren (>2000 pg/ml) und in Stämme, die geringe Mengen an IL-8 induzieren (<1000 pg/ml) eingeteilt. Diese Fähigkeit der IL-8-Induktion zeigte sich auch in den vier *cagA*-positiven *H. pylori* Stämmen, die während unserer Untersuchungen verwendet wurden.

Während die IL-8-Freisetzung in AGS-Zellen *cagA*-abhängig ist, zeigten PMNs, die mit den genetisch verschiedenen *H. pylori* Stämmen infiziert wurden, eine cagA-unabhängige Induktion von IL-8. Die Zellen, infiziert mit allen acht H. pylori Stämmen, zeigten nahezu identische Mengen an IL-8-Sekretion (~2000 pg/ml). Dies weist daraufhin, dass andere unbekannte bakterielle Faktoren in der IL-8 Induktion beteiligt sind, oder das zelluläre Faktoren der angeborenen Immunantwort involviert sind. Dies bleibt in zukünftigen Experimenten zu klären.

8.4 Erkennung von bakteriellen Strukturen mittels Toll-ähnlicher Rezeptoren (TLRs)

In den letzten Jahren konnte klar gezeigt werden, dass die Reaktion des Immunsystems der wichtigste Kofaktor in der Induktion der *H. pylori*-assoziierten Krankheiten darstellt. Wie das Bakterium die Immunantwort initiiert, ist noch nicht vollständig geklärt und möglicherweise sind mehrere Faktoren involviert (STOICOV *ET AL.*, 2004). Verschiedene Arbeitsgruppen vermuten, dass *pattern recognition receptors* (PRRs), wie die TLRs, bei der initialen Immunantwort gegen die *H. pylori*-Kolonisation eine Rolle spielen, obwohl kontrovers diskutiert wird, welcher Rezeptor der Gruppe und welcher Zelltyp, der die Rezeptoren exprimiert, die zentrale Rolle in der Antigen-Erkennung übernimmt (STOICOV *ET AL.*, 2004).

In unserer Studie wurde das *in vitro* Infektionsmodell (AGS-Zellen bzw. PMNs in Wechselwirkung mit genetisch verschiedenen *H. pylori*-Stämmen) genutzt, um die Expression der verschiedenen TLRs, die an der Erkennung von bakteriellen Strukturen partizipiert sind, an diesen Zielzellen durch Echtzeit-PCR zu untersuchen. Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass die Echtzeit-PCR eine Methode darstellt, um die Expressionsprofile der TLR2, 4 und 9 in infizierten AGS-Zellen bzw. in PMNs zu detektieren und zu quantifizieren.

8.4.1 Die Rolle von TLR2 und TLR4

TLR2 wird als Rezeptor beschrieben, der verschiedene Zellwand-Strukturen von Gram-positiven Bakterien erkennt, wie Peptidoglykan, Lipoproteine und Lipoteichonsäuren, die Bestandteile der Zellwand von Gram-positiven Bakterien darstellen. Verschiedene Studien konnten jedoch zeigen, dass TLR2 in der Lage ist mit einer ganzen Reihe verschiedener Proteine von einer Vielzahl diverser Pathogener zu interagieren (Tabelle 8.1), z.B. von *Mycoplasmen*, die keine Zellwand besitzen (TAKEUCHI *ET AL.*, 2000); Lipoarabinomannan von *Mycobakterium tuberculosis* (GLICKMANN *ET AL.*, 2001; UNDERHILL *ET AL.*, 1999) und LPS von *Porphyromonas* und *Spirocheten* (HIRSCHFELD *ET AL.*, 2001; WERTS *ET AL.*, 2001). Weitere *in vitro* Expressionsstudien konnten demonstrieren, dass ein Grund für die Erkennung der verschiedenen bakteriellen Produkten durch TLR2, mit der Fähigkeit einhergeht Heterodimere mit anderen TLRs zu bilden. Es wurde beobachtet, dass dominant-negative Formen von TLR2 oder TLR6 die TNFα-Expression inhibieren, während eine Koexpression von TLR2 mit TLR6 zur NF-κB-Aktivierung und zur

Tabelle 8.1: TLR2 und TLR4 und ihre Liganden

TLRs	bakteriellen Strukturen	Liganden	Referenzen
TLR2	Gram-positive Bakterien	Lipoproteine	YOSHIMURA *ET AL.*, 1999 UNDERHILL *ET AL.*, 1999
		Peptidoglykan	TAKEUCHI *ET AL.*, 1999 SCHWANDNER *ET AL.*, 1999
		(TLR2/6 oder TLR2/X)	OZINSKY *ET AL.*, 2000 TAKEUCHI *ET AL.*, 2001
		Lipoteichonsäure	SCHWANDNER *ET AL.*, 1999 OPITZ *ET AL.*, 2001
	Staphylococcus	Modulin	HAJJAR *ET AL.*, 2001
	Bakterien	Lipopeptide (TLR2/X)	OZINSKY *ET AL.*, 2000 TAKEUCHI *ET AL.*, 2001
	Mycoplasmen, Mycobakterien, Spirocheten	Lipoproteine, Liopopeptide	ALIPRANTIS *ET AL.*, 1999; BRIGHTBILL *ET AL.*, 1999 ; HIRSCHFELD *ET AL.*, 1999 ; LIEN *ET AL.*, 1999
	Mycoplasmen	MALP-2 (TLR2/6)	TAKEUCHI *ET AL.*, 2000 TAKEUCHI *ET AL.*, 2001
	Spirocheten	Glykolipide	OPITZ *ET AL.*, 2001
	Mycobakterien	Lipoarabinomannan	UNDERHILL *ET AL.*, 1999 MEANS *ET AL.*, 1999 MEANS *ET AL.*, 1999
	Porphyromonas, Spinocheten	LPS	HIRSCHFELD *ET AL.*, 2001; WERTS *ET AL.*, 2001
	Hefen	Zymosan	OZINSKY *ET AL.*, 2000 UNDERHILL *ET AL.*, 1999
	Klebsiellen	*outer membrane proteinA* (OMP-A)	JEANNIN *ET AL.*, 2000
	Neisseria menigitidis	lösliche Faktoren (TLR1/2)	WYLLIE *ET AL.*, 2000
TLR4	Gram-negative Bakterien	LPS	POLTORAK *ET AL.*, 1998; QURESHI *ET AL.*, 1999; HOSHINO *ET AL.*, 1999
	Gram-positive Bakterien	Lipoteichonsäure	TAKEUCHI *ET AL.*, 1999
	Pflanzen	Taxol	KAWASAKI *ET AL.*, 2000
	RSV	F-Protein	KURT-JONES *ET AL.*, 2000
	Wirt	HSP60	OHASHI *ET AL.*, 2000 VABULAS *ET AL.*, 2001
		Fibronektin EDA Domäne	OKAMURA *ET AL.*, 2001

Zytokinproduktion führte (OZINSKY *ET AL.*, 2000). WYLLIE und Mitarbeiter (2000) konnten zeigen dass eine Heterodimer-Bildung mit TLR1 stattfindet, der zur Erkennung der Faktoren von *Neisseria menigitidis* führt, und ebenso die Bildung des TLR2/TLRX-

Heterodimers, der differenzierte Formen von Lipoproteinen, wie MALP2, erkennen kann (TAKEUCHI *ET AL*., 2001).

Lipopolysaccharid (LPS) bildet die Hauptkomponente der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien und ist der am besten charakterisierte *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP). Schon 1998 konnten genetische Studien zeigen, dass TLR4 ein Rezeptor zur Erkennung von LPS darstellt (POLTORAK *ET AL*., 1998; QURESHI *ET AL*., 1999).

Während der Untersuchung wurde beobachtet, dass die Zielzellen (AGS bzw. PMNs) TLR2 bereits ohne *H. pylori*-Infektion exprimieren. Nach der Inkubation von AGS-Zellen mit je acht genetisch verschiedenen *H. pylori*-Stämmen, zeigten vier Zellansätze eine Zunahme der TLR2-Expression, während in den anderen vier Zellansätzen keine Änderung der TLR2-Expression beobachtet werden konnte (Kapitel 7.3.4; Tabelle 7.4). Ähnliche Ergebnisse konnten während der Infektion mit PMNs beobachtet werden, in denen TLR2 in vier Ansätzen hoch reguliert und in den übrigen drei Infektionsansätzen keine Änderung in der TLR2-Expression zeigte. Desweiteren wurde das TLR2-Gen in einem Ansatz herunter reguliert (Kapitel 7.4.4; Tabelle 7.5).

In unserer Studie exprimierten die Zielzellen (AGS bzw. PMNs) TLR4 unabhängig von der *H. pylori*-Infektion. Nach der Wechselwirkung von AGS-Zellen mit sieben der acht *H. pylori*-Stämme wurde keine Regulation in der TLR4-Expression beobachtet (Kapitel 7.4.4; Tabelle 7.5). Eine Ausnahme bildeten die Zellen, infiziert mit P12, die eine Zunahme der TLR4-Expression zeigten (Kapitel 7.4.4; Tabelle 7.4; Abb. 7.16C). Ähnliche Ergebnisse wurden an infizierten PMNs beobachtet, die während der Wechselwirkung mit allen acht Stämmen keine Regulation in der TLR4-Expression aufwiesen (Kapitel 7.4.4;Tabelle 7.5).

Die Rolle von TLR2 und TLR4 in der Erkennung von *H. pylori*-spezifischen PAMPs wird sehr kontrovers diskutiert. Die während dieser Arbeit analysierten Ergebnisse der TLR2-Regulation bzw. des nicht regulierten TLR4 stehen zum Teil im Zusammenhang mit den bisherigen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen. Es ist bekannt, dass *Helicobacter* sehr wenig LPS produziert, welches zehntausendmal weniger aktiv ist, als das LPS von anderen Gram-negativen Bakterien, wie z.B. *E.coli* (MUOTIALA *ET AL.,* 1992; BLISS *ET AL*., 1998). Obwohl klar gezeigt wurde, dass LPS von Gram-negativen Bakterien, wie *E. coli*, überwiegend die angeborene Immunantwort über TLR4 stimuliert, aktiviert LPS von Gram-negativen Organismen,

wie *Poryphorymonas gingivalis*, auch TLR2 (MARTIN *ET AL*., 2001). Die Daten bezüglich des *H. pylori*-LPS sind durch Beobachtungen der Aktivierung von TLR4 (KAWAHARA *ET AL*., 2001 a,b) und TLR2 in Magenepithelzellen (SMITH *ET AL*., 2003) widersprüchlich. Dieser Gegensatz bezüglich der Detektion des TLR2-Signals könnten durch Unterschiede in den bakteriellen Stämmen, unterschiedlich eingesetzte Bakterien-Konzentrationen oder Kontaminationen während der LPS-Präparation erklärt werden (STOICOV *ET AL.,* 2004).

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass die funktionell unterschiedlichen Zielzellen nach Infektion mit *H. pylori* TLR2 ähnlich regulieren, während TLR4 von beiden Zelltypen nicht reguliert wird. Es wurde beschrieben, dass Magenepithelzellen TLR2 auf ihrer Oberfläche exprimieren (KAWAHARA *ET AL.,* 2001 b), aber sie exprimieren kein TLR4 (ORTEGA-CAVA *ET AL*., 2003). Jedoch zeigen *in vitro* Arbeiten, das TLR 2 und TLR4 sehr wohl exprimiert sein könnten (SMITH *ET AL*., 2003). MANDELL und Mitarbeiter (2004) zeigten, dass intakte *Helicobacter*-Bakterien (*H. pylori, Helicobacter hepaticus, Helicobacter felis*) die Immunantwort durch TLR2 aktivieren, nicht aber durch TLR4 und vermuten, dass das Zusammenspiel verschiedener Komponenten des Bakteriums (LPS, Proteine, Flagellen) viele Mitglieder der TLR-Familie aktivieren könnten. In der Tat konnte gezeigt werden, dass die TLR2-Expression des Menschen auf intakte Bakterien reagiert, während TLR4 nicht reagiert. Dabei könnten *cag*PAI-Gene die Aktivierung der TLR2-Agonisten durch *H. pylori* modulieren, indem *cagA*-positive Bakterien aktiver gegenüber den Zellen sind, im Vergleich zu *cagA*-negativen Bakterien, gemessen an der IL-8 Sekretion (MANDELL *ET AL*., 2004). Im Gegensatz dazu, konnte in Makrophagen von Wildtyp und TLR4-defizienten Mäusen, die mit intakten *Helicobacter*-Bakterien stimuliert wurden, eine gleichmäßige Zytokinsekretion (IL-6 und MCP1) beobachtet werden, während bei den Makrophagen von TLR2-defizienten Mäusen die Sekretion von Zytokinen abnimmt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch geringe Quantität und Aktivität von *H. pylori*-LPS die Beteiligung von TLR4 in klinischen Krankheiten bisher ungeklärt ist und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien klar zeigen, dass TLR2 den dominanten Immunrezeptor für die Erkennung von gastrointestinalen *Helicobacter*-Spezies darstellt (MANDELL *ET AL*., 2004).

8.4.2 Die Rolle von TLR5 und TLR9

Viele Bakterien produzieren einen löslichen Faktor, das Flagellin, welches eine monomere Untereinheit der Flagellen darstellt. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Flagellin ein starkes proinflammatorische Potential besitzt, indem es die IκB-Degradation, NF-κB-Aktivierung und Expression von IL-8 und NO-Synthase in intestinalen Zellen induziert (STEINER *ET AL*., 2000; EAVES-PYLES *ET AL*., 2001). *H. pylori* benötigt die Flagellen und deren Beweglichkeit während des Infektionsprozesses und dabei kommt *H. pylori*-Flagellin in Kontakt mit der zellulären Umgebung der Magenmukosa (EATON *ET AL*., 1996; KAVERMANN *ET AL.,* 2003). Wildtyp-*H. pylori* produzieren zwei verschiedene Flagelline, FlaA und FlaB, jedes formt einen bestimmten Teil des Flagella-Filaments und beide sind essentiell für die Fähigkeit des Bakteriums im Magengewebe zu überleben (EATON *ET AL*., 1996; KOSTRZYNSKA *ET AL*., 1991). *In vitro* Expressionsstudien von TLR5 konnten zeigen, dass dieser Rezeptor Flagellin-Proteine als PAMP erkennt, aber die Rolle von TLR5 in der *Helicobacter* Erkennung ist noch nicht geklärt.

In unserer Studie wurde die Expression von TLR5 an AGS-Zellen während der Inkubation mit verschiedenen *H. pylori*-Wildtyp Stämmen bzw. verschieden *H. pylori*-Mutanten auf Protein-Ebene durch Western Blot-Analyse untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass TLR5 bereits ohne *H. pylori*-Infektion in AGS-Zellen exprimiert ist und nach der Inkubation mit den verschieden *H. pylori*-Wildtyp Stämmen bzw. -Mutanten keine Änderung in TLR5-Expression beobachtet werden konnte. Interessanterweise wurde TLR5 auch in AGS-Epithelzellen exprimiert, die mit der P1*ΔflaA*-Mutante infiziert wurden. Diese Ergebnisse korrelieren mit Daten einer anderen Arbeitsgruppe, die zeigen konnten, dass TLR5 in uninfizierten Epithelzellen exprimiert ist, und das die TLR5-Expression höchstwahrscheinlich durch *H. pylori* moduliert werden kann, aber die beiden *H. pylori*-Flagelline (FlaA und FlaB) kein immunstimulatorisches Potential gegenüber humane Magenzellen besitzen (LEE *ET AL*., 2003 a,b; SMITH *ET AL*., 2003). Im Gegensatz dazu waren Hek293-Zellen, die mit TLR5 transfiziert wurden, in der Lage auf partielles gereinigtes Flagellin von *H. pylori* zu reagieren (SMITH *ET AL*., 2003).

Die in unserer Studie durchgeführten Blockierungsexperimente der Signaltransduktion von TLR5 in AGS-Zellen durch Inhibition der MAP-Kinasen, JNKinasen, p38 und NF-κB, und anschließender Infektion mit P1wt und P1*ΔflaA*-Mutante, zeigten keine Expressionsänderung von TLR5 in den Zellen. Dies ist ein

Hinweis, das TLR5 in der Erkennung von *H. pylori*-Flagellin offenbar nicht beteiligt ist.

Zusammen mit Zellwandkomponenten kann bakterielle DNA ebenfalls die Funktion eines PAMP erfüllen. Dies wurde ursprünglich durch TOKUNAGA *ET AL.*, 1984 demonstriert, die eine immunstimulatorische Aktivität in *bacillus Calmette Guerin* (BCG) beobachteten, die auf den Effekt von DNA zurückzuführen war. Die Aktivität betraf speziell unmethylierte CpG-Motive der DNA, die nur in bakterieller DNA vorhanden sind und in Vertebraten DNA kaum auftreten. TLR9 ist im Zytoplasma lokalisiert und ist in der Lage CpG-Moleküle zu erkennen und bakterielle DNA von Vertebraten-DNA zu unterscheiden (KRIEG *ET AL.*, 1995).
In der Arbeit wurde die Expression von TLR9 in AGS-Zellen und in PMNs, während der Infektion mit den acht genetisch verschiedenen *H. pylori* Stämmen, auf Transkriptionsebene durch Verwendung der Echtzeit-PCR untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die AGS-Zellen, die mit P1 und P12 infiziert wurden eine Regulation von TLR9 aufweisen. Die Zellen hingegen, die mit den übrigen *H. pylori* Stämmen infiziert wurden zeigten keine Änderung in der TLR9-Expression. Ähnliche Resultate wurden in den Experimenten mit PMNs beobachtet in denen ebenfalls in den Zellen, die mit P1 und P12 infiziert wurden, eine Regulation von TLR9 beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu konnten die anderen Stämme keine Änderung in der TLR9-Expression an PMNs induzieren.
In einer weiteren Analyse wurde die TLR9-Expression in AGS-Zellen auf Protein-Ebene durch Western Blot-Analyse untersucht. Die Regulation von TLR9 in AGS-Zellen wurde während dieser Analyse durch Inkubation mit P12wt, P12*Δcag*PAI, einem aktiven CpG-Oligonukleotid, einem nicht-aktiven GpC-Oligonukleotid und uninfizierten AGS-Zellen durchgeführt. Alle Zellen zeigten zu den untersuchten Zeitpunkten eine ähnliche Expression von TLR9. Es traten geringe Unterschiede zwischen Wildtyp-infizierten und Mutante-infizierten Zellen auf. Die Zellen, die mit Vanadat vorbehandelt wurden, zeigten nach der Infektion mit P12wt und P12*Δcag*PAI keine eindeutige Regulation von TLR9. Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass TLR9 sehr wahrscheinlich auf Transkriptionsebene reguliert wird, während man auf Proteinebene kaum eine Änderung der TLR9-Expression detektieren konnte. Die Rolle von TLR9 während der Induktion des Endzündungsprozesses *in vivo* ist noch nicht vollständig geklärt. Dennoch sprechen

keine direkten Daten dafür, dass *H. pylori*-CpG-DNA über TLR9 eine Immunantwort induziert. Dafür ist eine Beteiligung von TLR9 in der Pathogenese von *H. pylori*-assoziierten Erkrankungen höchstwahrscheinlich, denn die CpG-Oligonukleotide können durch Antigen-presentierende Zellen (APCs) phagozytiert oder direkt ins Zytoplasma durch das T4SS injiziert werden. Die Interaktion von TLR9 mit CpG-Molekülen im Zytoplasma rekrutiert das MyD88-Adapterprotein und führt zur starken Th1-Immunantwort (LATZ *ET AL*., 2004). Eine Th1-Immunantwort ist assoziiert mit einer schweren Zerstörung der Magenschleimhaut (RAGHAVAN *ET AL*., 2003). In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine orale Gabe von CpG-Oligonukleotiden einhergehend mit einer *H. pylori*-Infektion in einem Mausmodell, die *H. pylori* Kolonisation beschränkt (RAGHAVAN *ET AL*., 2003). Eine intragastrische Gabe einer Einzeldosis von CpG-Oligonukleotiden zeigte eine Zunahme der Produktion von lokalen Chemokinen und Zytokinen (MIP-1α, MIP-1β, RANTES und IFNγ-induzierbares Protein) im Gewebe, die den Entzündungsprozess einleiten.

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass *H. pylori* mit Komponeneten des Immunsystems interagiert, aber für die Erkennung zuständigen Rezeptoren, wie TLR2, 4, 5 und 9 eine untergeordnete bis gar keine Rolle spielen (BACKHED *ET AL*., 2003; MAEDA *ET AL*., 2003; SMITH *ET AL*., 2003; KIM *ET AL*., 2004; GEWIRTZ *ET AL*., 2004). Es wird angenommen, dass andere Faktoren für die Erkennung in Frage kommen. So stimulieren *cag*PAI-positive *H. pylori* Stämme das angeborenen Immunsystem über intrazelluläre Rezeptoren (z.B. Nod1), die durch Peptidoglykanfragmente aktiviert werden, was letztendlich auch die IL-8-Sekretion induziert (VIALA *ET AL*., 2004).

8.5 Die Rolle von PMN-spezifischen Oberflächenmolekülen während der Infektion mit *H. pylori*

Professionelle Phagozyten einschließlich PMNs, Monozyten und Makrophagen, bilden die erste Barriere der wirtspezifischen Abwehr gegen die Konfrontation mit verschiedenen invasiven Mikroorganismen. In früheren Studien wurde beobachtet, dass *H. pylori* eine chemotaktische Antwort durch Monozyten und PMNs aktiviert, was eine vermehrte Adhäsion an Endothelzellen zur Folge hatte (NIELSEN *ET AL*., 1992; RAUTELIN *ET AL*., 1993; YOSHIDA *ET AL*., 1993). Als Reaktion auf den Gradienten eines

chemotaktischen Faktors regulieren Leukozyten ihre Adhäsionsrezeptoren hoch und migrieren aus dem Blutgefäß zum Ort der Infektion (ERNST UND GOLD, 2000; ALLEN, 2000), wo sie dann in großer Zahl auftreten und eine chronische Entzündung induzieren (ERNST UND GOLD, 2000). Für diese transendotheliale Migration der PMNs sind eine Reihe von Oberflächenrezeptoren, wie Selektine, Chemotaktische Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle notwendig.

Im Rahmen dieser Studie wurden frisch isolierte PMNs als *in vitro* Infektionsmodell verwendet, um die Expression einiger ausgewählter PMN-spezifischer Oberflächen-rezeptoren nach der Präinkubation mit verschiedenen *H. pylori* Stämmen und einer Postinkubation mit fMLP, PMA und NaF durch FACS-Analyse zu untersuchen. Die Verwendung der drei Substanzen, die in der Lage sind PMNs zu aktivieren, sollten einen Hinweis liefern, welche Signaltransduktionskaskade in PMNs bei der Expression von Oberflächenmolekülen durch Infektion mit *H. pylori* induziert wird. Es ist bekannt, das fMLP, ein bakterielles Peptid, als chemotaktischen Faktor fungiert, und einen schwachen Stimulus für den oxidativen Burst von PMNs darstellt (PATCHA *ET AL.*, 2004). PMA dagegen aktiviert direkt die Protein Kinase C und fungiert als starker Stimulus für den oxidativen Burst von PMNs (CHRISTIANSEN *ET AL.*, 1986; COCHET *ET AL.*, 1986). Der Einsatz von NaF wird dadurch belegt, dass Fluorid-Ionen G-Proteine aktivieren können (KÖNIG UND KÖNIG, 1991).

8.5.1 L-Selektin CD62L

Die drei bekannten Selektine, Leukozyten (L)-Selektin, Endothelzell (E)-Selektin und Plättchen (P)-Selektin tragen zum binden von Leukozyten an Endothelzellen in Endzündungsherden bei und sind neben anderen Faktoren für das Erkennen, Entlangrollen und Eintreten von zirkulierenden Leukozyten in sekundäre lymphatische Organe verantwortlich. Selektine setzen sich aus drei unterschiedlichen Domänen zusammen, einer Lektin-bindenen und einer Epidermis-Wachstumsfaktor-ähnlichen Domäne sowie einer Region, die den C-bindenen Proteinen ähnlich ist (KELLER, 1994).

In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass das L-Selektin CD62L in der PMN-Kontrolle exprimiert ist und während der Infektion mit *H. pylori* ohne nachfolgende Stimulation mit den Aktivatoren herunter reguliert wird. Die PMNs, die mit *H. pylori* und fMLP bzw. PMA inkubiert wurden, zeigten keine Änderung in der

CD62L-Expression, während die PMNs infiziert mit *H. pylori* und stimuliert mit NaF ebenfalls CD62L runterregulieren.

Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte den Effekt von wasserlöslichen Membranproteinen (WSP) von *H. pylori*, *Helicobacter felis* und anderen Bakterien auf PMN-spezifischen Oberflächenmolekülen und konnten zeigen, dass weder WSP von *H. pylori* noch von *H. felis* CD62L-Expression induzieren (ENDERS *ET AL*., 1995). Unsere Ergebnisse zeigen im Vergleich dazu eine signifikante Herunterregulation von CD62L nach der Infektion mit intakten *H. pylori*-Bakterien und der Postinkubation mit fMLP, PMA und NaF.

ENDERS und Mitarbeiter (1995) vermuten, da die CD62L-Expression nicht durch WSP von *H. pylori* beeinflusst wird, während CD11b hochreguliert wird, dass *H. pylori*-WSP eine Hauptquelle die für die lokale Entzündung während der Typ B-Gastritis darstellt.

8.5.2 Chemokinrezeptor CXCR2

PMNs spielen eine Hauptrolle in der Pathogenese von *H. pylori*, denn sie schützen nicht nur den Wirt vor dem Bakterium, sondern sie vermitteln die Ausbildung einer Gastritis bzw. Zerstörung der Magenmukosa (ERNST *ET AL*., 1997; ISRAEL UND PEEK, 2001; SHIMOYAMA UND CRABTREE; 1998). Während der *H. pylori*-induzierten Gastritis exprimieren die Lamina propia bzw. die Epithelzellen die Chemokine IL-8 und Gro-α, welche die Migration von PMNs vom Blut ins Magenepithel regulieren (ECK *ET AL*., 2000). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Aktivität der Gastritis, vermittelt durch PMNs, mit der Erhöhung des IL-8-und Gro-α-Spiegels assoziiert ist (CRABTREE *ET AL*., 1994; PEEK *ET AL*., 1995; SHIMOYAMA UND CRABTREE; 1998; YAMAOKA *ET AL*., 1996; YAMAOKA *ET AL.,* 1997; YAMAOKA *ET AL*., 1998). PMNs werden chemotaktisch durch diese beiden Chemokine angelockt sofern sie den entsprechenden Rezeptor exprimieren. IL-8 aktiviert PMNs über den CXCR1- und CXCR2-Rezeptor, dabei bindet CXCR1 IL-8 mit hoher Affinität, während CXCR2 eine Reihe von CXC Chemokinen bindet, einschließlich IL-8 und Gro-α (HOLMES *ET AL*., 1991; LEE *ET AL*., 1992; SCHUMACHER *ET AL.,* 1992).

In der Arbeit konnten wir demonstrieren, dass CXCR2 bereits in der PMN-Kontrolle exprimiert ist und während der Infektion mit *H. pylori*, ohne nachfolgende Stimulation mit den Aktivatoren, herunter reguliert wird. Die PMNs, die mit *H. pylori* und fMLP bzw. PMA inkubiert wurden, zeigten keine Änderung in der CXCR2-Expression,

während die PMNs infiziert mit *H. pylori* und stimuliert mit NaF ebenfalls CXCR2 herunter regulieren.

Die Herunterregulation von CXCR2 durch *H. pylori* in unserer Studie korreliert mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die darstellen konnten, dass die Expression von CXCR1 und CXCR2 an PMNs durch *H. pylori* runterreguliert wird (SCHMAUSSER *ET AL*., 2004). *In vitro* Studien konnten zeigen, dass die Aktivierung und Migration durch zwei verschiedenen Wege der CXCR1-und CXCR2-Modulation reguliert wird: einen Tyrosinkinase-unabhängigen Weg, induziert durch IL-8 und einen Tyrosinkinase-abhängigen Mechanismus, induziert durch proinflammatorische Zytokine, wie TNFα und bakterielles LPS (KHANDAKER *ET AL*., 1998; KHANDAKER *ET AL*., 1999). Der Mechanismus der CXCR1- und CXCR2-Regulation durch *H. pylori* ist noch nicht geklärt, und die CXCR1/2-Regulation scheint nicht unter dem Einfluss einer bekannten Rezeptorregulation, wie IL-8, TNFα und LPS zu stehen. Ein anderer noch unbekannter Mechanismus, induziert von *H. pylori*, scheint für die Regulation dieser zwei Chemokinrezeptoren wahrscheinlich verantwortlich zu sein.

8.5.3 Integrin CD11b

Der Hauptadhäsionsrezeptor an PMNs ist das Leukozyten-Integrin CD11/CD18 oder β_2-Integrin. Unter den vier verschiedenen β_2-Integrinen, CD11a/CD18 (LFA-1) und CD11b/CD18 (Mac-1), die von PMNs exprimiert werden, ist CD11b/CD18 der dominantere Subtyp (PATCHA *ET AL*., 2004).

In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die CD11b-Untereinheit des Integrins von PMNs während der Infektion mit *H. pylori* ohne nachfolgende Stimulation mit den Aktivatoren hoch reguliert wird. Die PMNs, die mit *H. pylori* und fMLP bzw. PMA inkubiert wurden, zeigten keine Änderung in der CD11b-Expression, während die PMNs infiziert mit *H. pylori* und stimuliert mit NaF CD11b ebenfalls hoch regulieren.

Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen zweier Arbeitgruppen. ENDERS und Mitarbeiter (1995) konnten darstellen, das die WSP von *H. pylori* ebenfalls eine Hochregulation von CD11b in PMNs induzieren, und die Untersuchungen einer anderen Gruppe demonstrieren ebenfalls, dass Überstände von *H. pylori* eine Zunahme in der β_2-Integrin-Expression in PMNs stimulieren (KIM *ET AL*., 1998). Die Gründe der Regulation von CD11b wurden als Resultat der Wechselwirkung mit Kohlenhydrat-Determinanten wie CD15 auf Granulozyten beschrieben, die eine

höhere CD11b-Expression induzieren (KERR UND STOCKS, 1992; LUND-JOHANSEN *ET AL.*, 1992; STOCKS *ET AL.*, 1990; STOECKEL *ET AL.*, 1993). Ebenso spielen Lektin-ähnliche Moleküle von Bakterien eine Rolle, die mit Kohlenhydrat-Determinanten interagieren (ENDERS *ET AL.*, 1995). Welcher dieser Komponenten auf der Oberfläche von *H. pylori* an Granulozyten bindet, wurde noch nicht gezeigt.

8.5.4 fMLP-Rezeptor

Der fMLP-Rezeptor (*N-formyl peptide receptor*) ist G-Protein-gekoppelt und vermittelt anti-entzündliche Reaktionen in humanen Neutrophilen und anderen Geweben (BECKER *ET AL.*, 1998), sowie die Produktion von reaktiven Sauerstoffderivaten durch Stimulation mit fMLP. Erste Erkenntnisse von menschlichen fMLP-Rezeptoren wurden in den frühen neunziger Jahren publiziert (BOULEY *ET AL.*, 1990; MURPHY UND MCDERMOTT, 1991). Zwei intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden in der Rezeptor-vermittelten Produktion von O_2^- in aktivierten PMNs wurden beschrieben (DEWALD *ET AL.*, 1988). Der klassische Weg, der aus der Zunahme der intrazellulären Konzentration von freien Calcium (Ca^{2+}), durch Aktivierung der Phospholipase C und der Akkumulation von Inositol-1,4,5-Triphosphat, resultiert,. Der Abbau von extrazellulären Ca^{2+} führt zur Abschwächung der O_2^- -Produktion (DEWALD *ET AL.*, 1988). Der andere Weg der Sauerstoffmetabolit-Produktion beinhaltet die PI 3-Kinase, welche die D-3-Position des Inositol-Ringes von Phosphoinosiden phosporyliert (WHITMAN *ET AL.*, 1988) und durch heterotrimere G-Protein-βγ-Untereinheit aktiviert wird, im Fall der Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, wie dem fMLP-Rezeptor (OKADA *ET AL.*, 1996; KUROSU *ET AL.*, 1997; STEPHENS *ET AL.*, 1997).

In der Arbeit konnten wir zeigen, dass der fMLP-Rezeptor von PMNs während der Infektion mit *H. pylori* ohne nachfolgende Stimulation mit den Aktivatoren hoch reguliert wird. Die PMNs, die mit *H. pylori* und fMLP bzw. PMA inkubiert wurden, zeigten keine Änderung in der fMLP-Rezeptor-Expression, während die PMNs infiziert mit *H. pylori* und stimuliert mit NaF ebenfalls den fMLP-Rezeptor hoch regulieren.

Es wurde durch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen beschrieben, das *H. pylori* in der Lage ist die Produktion von Sauerstoffradikalen in humanen PMNs zu induzieren (SUZUKI *ET AL.*, 1994; YOSHIDA *ET AL.*, 1996; DANIELSSON AND JURSTRAND, 1998), was durch die Bindung von *H. pylori*-eigenen fMLP zum fMLP-Rezeptor hervorgerufen wird (NAGANO *ET AL.,* 2001).

8.6 Die Rolle von IL-8 und Lipidmediatoren während der Infektion von PMNs mit *H. pylori*

Im Rahmen dieser Studie wurde die Freisetzung von IL-8 und einigen Lipidmediatoren, wie LTB_4 und PGE_2 nach der Präinkubation mit verschiedenen *H. pylori* Stämmen und anschließender Postinkubation mit fMLP, PMA und NaF bestimmt.

Die Sekretion von IL-8 variiert in den verschiedenen Ansätzen. So war die Menge an gebildeten IL-8 in PMNs inkubiert mit *H. pylori* und postinkubiert mit fMLP und PMA am höchsten, was daraufhin deutet, dass fMLP und PMA mit *H. pylori* zusammen in der Lage sind PMNs stärker zu aktivieren als *H. pylori* allein. Untersuchungen von KIM und Mitarbeiter (1998) konnten zeigen, das *H. pylori*-Produkte Neutrophile aktivieren und ihre IL-8-mRNA und Proteinexpression hoch reguliert wird.

Das Zusammenwirken von *H. pylori* und den PMN-Aktivatoren fMLP und PMA in unserer Studie verstärkt den Prozess der Sekretion von IL-8 zusätzlich.

Man nimmt an, dass *H. pylori*-induzierte Rekrutierung von Neutrophilen durch IL-8, exprimiert von Neutrophilen, Magenepithelzellen, Endothelzellen und Monozyten/Makrophagen, vermittelt wird.

Die lokale Ansammlung aktivierter PMNs in der Magenmukosa kann verschiedene Reaktionen zur Folge haben. Durch die in der Plasmamembran aktivierten PMNs kommt es zur Spaltung von Membranphospholipiden, woraus u.a. Arachidonsäure gebildet wird, die der Vorläufer biologisch aktiver Produkte, wie 5-HETEs (Hydroxy-eicosatetraensäuren), Leukotriene, Prostaglandine und Throboxane darstellt (Abb. 8.2) (KELLER, 1994). Diese biologischen Stoffe und das komplexe Zusammenspiel löslicher und zellulärer Komponenten von vasoaktiven Stoffen, Lysozym, Granula-Proteinen, Defensinen, Enzymen, Zytokinen, Komplement, spezifischer Antikörper, Phagozytose, intrazellulärem Abtöten und Abbau, erlaubt in vielen Fällen die Ausschaltung der eingedrungenen Mikroorganismen und die Rückbildung bzw. Heilung von entstandenen Gewebeschäden. Wenn die Elimination der die Endzündung auslösenden Stoffe nicht gelingt, so führt die anhaltende Einwanderung von PMNs und die Exsudation von Plasmaproteinen zur Apoptose und möglicherweise zur Bildung eines Abszesses (KELLER; 1994).

In unserer Studie wurde während der Infektion von PMNs mit *H. pylori* im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle keine Änderung in der LTB_4-Sekretion beobachtet.

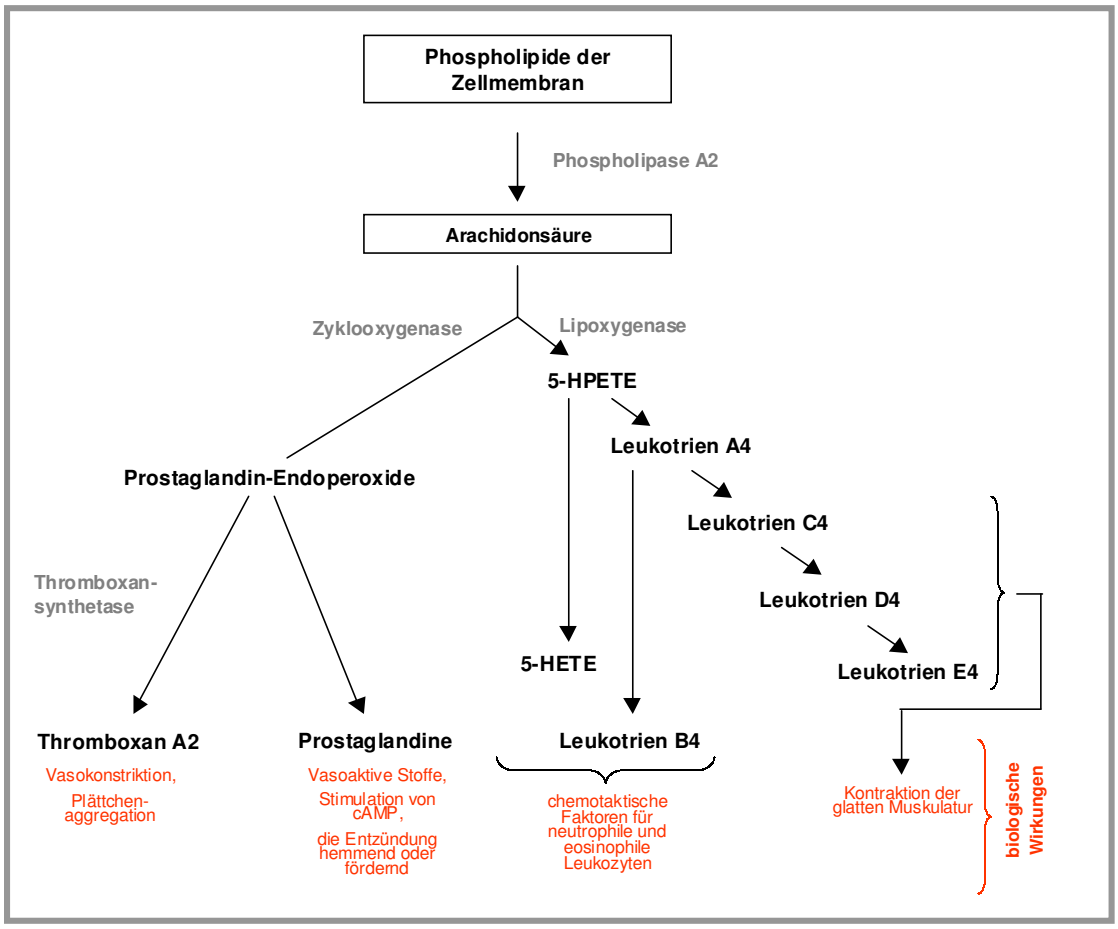


Abb. 8.2: Biosynthese von Lipidmediatoren infolge Abbaus von Phospholipiden der Zellmembran durch Phospholipase A2 nach KELLER (1994).

Die Sekretion von PGE_2 zeigte ebenfalls keine Änderungen zwischen infizierten und uninfizierten PMNs. Warum keine Änderung in der Lipidmadiator-Freisetzung zu identifizieren war, bleibt zukünftig noch zu untersuchen. Andere Gruppen haben die Sekretionen von Lipidmediatoren im Mausmodell untersucht, und konnten zeigen das stammspezifische Unterschiede in der Induktion von PGE_2 vorherrschen (PADOL UND HUNT, 2005).

Die Gene der Zyklooxygenase (Cox2) und der 5-Lipoxygenase, die als Enzyme an der Biosynthese von Lipidmediatoren beteiligt sind, wurden in unseren Untersuchungen leicht hochreguliert, was darauf hinweist, dass *H. pylori* +/- Aktivatoren PMNs zur Synthese von biologisch aktiven Molekülen induziert.

Phagozytose von *H. pylori* durch PMNs

Aktivierte PMNs sind in der Lage Mikroorganismen aufzunehmen und abzutöten. Während der Aktivierung der PMNs wird die Bildung des NADPH-Oxidase-Komplexes stimuliert und der respiratorische Burst ausgelöst. Die NADPH-Oxidase verbleibt in unaktivierten PMNs in ihren Untereinheiten und ist daher nicht aktiv, während bei Stimulation die im Zytosol vorhandenen Komponenten $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ und Rac2 zur Membran transloziert werden, und das Cytochrom b558 ($gp91^{phox}/p22^{phox}$) binden, wodurch das Enzym in der Lage ist aus molekularen Sauerstoff, Superoxid-Anionen und Wasserstoffperoxid zu generieren (ALLEN, 2001). Die Oxidase-Aktivierung wird durch Rezeptor-Liganden-Interaktion ausgelöst und die Struktur des Rezeptors vermittelt die Art der Sauerstoffmetabolit-Produktion (DeLEO *ET AL*., 1999). Spezifische, lösliche Stimuli, wie fMLP und PMA, fördern die Bildung des Oxidase-Komplexes an der Plasmamembran und die Sekretion von Sauerstoffradikalen in das extrazelluläre Milieu (DeLEO *ET AL*., 1999).

Im Rahmen unserer Studie wurde die Gen-Expression der Untereinheiten der NADPH-Oxidase ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p22^{phox}$) von PMNs, die mit verschiedenen *H. pylori* -Stämmen und -Mutanten preinkubiert und anschließend mit fMLP, PMA und NaF postinkubiert wurden, durch Standard-PCR untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Gene aller drei Untereinheiten der NADPH-Oxidase hochreguliert wurden. Die Expression der Gene ist dabei unabhängig von der Verwendung genetisch unterschiedlicher Stämme und der Stimulation mit den Aktivatoren fMLP, PMA und NAF. Sowohl *H. pylori* allein als auch das Zusammenwirken von *H. pylori* mit den verschiedenen Stimuli führt zur Aktivierung der NADPH-Oxidase in PMNs.

Unsere Daten korrelieren mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, dass *H. pylori* einen schnellen und starken respiratorische Burst verursacht (RAUTELIN *ET AL*., 1994) und es daher vorstellbar ist, dass reaktive Sauerstoff-metabolite, die durch aktivierte PMNs gebildet werden, signifikant zur Gewebeschädigung während der *H. pylori*-Infektion beisteuern. Andere Untersuchungen zeigen, dass die Aktivierung des oxidativen Abtötungsmechanismus durch PMNs stammabhängig ist. So scheinen Typ I- *H. pylori* Stämme PMNs zu stimulieren und Typ II-Stämme nicht (TENEBERG *ET AL*., 2000; DANIELSSON *ET AL*., 2000). Typ I-Stämme nutzen entweder Sialicylsäure-abhängige oder -unabhängige Adhäsine zur Bindung an PMNs (MILLER-PODRAZA *ET AL*., 1999) und die Stämme verwenden diese Adhäsine zur Aktivierung der Zellen (TENEBERG *ET AL*., 2000). Diese

Beobachtungen korrelieren nicht mit unseren Ergebnissen, die eine Aktivierung der PMNs durch Bildung der NADPH-Oxidase unabhängig vom Typ I/II-Stamm zeigen.
In vergleichbaren Studien konnte beobachtet werden, dass sialicylierte Oligosaccharide die PMN-Aktivierung inhibieren, vermutlich durch Blockierung der *H. pylori*-Anheftung und der Phagozytose (TENEBERG *ET AL*., 2000). Weitere Untersuchungen zeigen, dass gereinigetes Hp-NAP die NADPH-Oxidase-Aktivität in PMNs fördert (DeLEO *ET AL*., 1999) und das eine unidentifiziertes Komponente (NAC), die vom HP-NAP unabhängig ist und außerhalb der *cag*-PAI lokalisiert ist, zur Aktivierung des Phagozyten besteuert (LEAKEY *ET AL*., 2000: DANIELSSON *ET AL.,* 2000; SYRAK *ET AL*., 1999). Die Inkubation von PMNs mit Typ II-*H. pylori* Stämmen zeigen deshalb keine Aktivierung des respiratorischen Burst, weil sie Defizite in relevanten Adhäsinen, HP-NAP und NAC aufweisen (TENEBERG *ET AL*., 2000).
Da *H. pylori* ein Leben lang im menschlichen Magen persistieren kann, hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass die Eliminierung des Bakteriums durch Phagozytose ineffektiv ist und Ergebnisse von verschiedenen *in vitro* Studien vermuten lassen, dass die Phagozytose nur vollständig abläuft, wenn PMNs im Überschuss gegenüber den Bakterien vorkommen (ANDERSEN *ET AL*., 1993; CHMIELA ET AL., 1995; PRUUL ET AL., 1987). Die Beweise einer *in vivo* Phagozytose von *H. pylori* liegen noch nicht vor, aber Ultrastruktur-Analysen demonstrierten eine aktive Phagozytose von *H. pylori* durch PMNs in der Mukosa-Schicht in 82% der untersuchten Biopsie-Proben (ZU *ET AL*., 2000). Die Ergebnisse von zwei Arbeitsgruppen zeigen, dass Typ I-Stämme die Phagozytose verzögern können, indem Phagosomen-Phagosomen-Fusionen induziert werden und lebende Bakterien bis zu 24 h in den Megasomen persistieren können (ALLEN, L.-A.H. *ET AL*., 2000; RAMARAO *ET AL*. 2000). Im Vergleich dazu induzieren Typ II-Stämme keine Megasomen-Formation, sie werden schnell phagozytiert und abgetötet (ALLEN, L.-A.H. *ET AL*., 2000). RAMARAO und Mitarbeiter (2000) vermuten, das lebende und metabolisch aktive Typ II-Stämme die Phagozytose modulieren und das das T4SS eine Rolle spielt.
In den letzten Jahren sind Fortschritte in Aufklärung der *H. pylori*-PMNs-Interaktionen erzielt worden, aber viele Fragen bleiben noch unbeantwortet. In zukünftigen Untersuchungen müssen die Identitäten von NAC und anderen Rezeptoren, die die Phagozytose von *H. pylori* modulieren, geklärt werden, und die Rolle von T4SS und der Megasomen charakterisiert werden. Die Aufklärung des Mechanismus, der

verhindert, das *H. pylori* durch die Immunantwort des Wirtes eliminiert wird, ist der essentielle erste Schritt in der Entwicklung neuer Therapien zur Behandlung der Ulkuskrankheit.

9. Literaturverzeichnis

Akada, J.K., Shirai, M., Takeuchi, H., Tsuda, M. und Nakazawa, T. (2000) Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and ist control by mRNA decay in response to pH. *Mol. Microbiol*. **36***,* 1071-1084.

Akira, S. (2003) Mammalian Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol*. **15**, 5-11.

Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., Kresovich, S. und Berg, D.E. (1992) DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **20**, 5137-5142.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (2004) Molekularbiologie der Zelle. 4. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA.

Aliprantis, A.O., Yang, R.B., Mark, M.R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J.D., Klimpel, G.R., Godowski, P. und Zychlinsky, A. (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* **285**, 736-739.

Allen, L.H. und Aderem, A. (1995) A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagozytosis by macrophages. *J. Exp. Med.* **182**, 829-840.

Allen, L.H. und Aderem, A. (1996) Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med*. **184**, 627-637.

Allen, L.-A.H. (2000) Modulating phagocyte activation: the pros and cons of *Helicobacter pylori* virulence factors. *J. Exp. Med.* **191**, 1451-1454.

Allen, L.-A.H., Schlesinger, L.S. und Kang, B. (2000) Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *J. Exp. Med*. **191**, 115-127.

Allen, L.-A.H. (2001) The role of the neutrophil and phagocytosis in infection caused by *Helicobacter pylori*. *Curr. Opin. Infect. Dis*. **14**, 273-277.

Alm, R.A., Ling,L.-S.L., Moir, D.T., King, B.L., Brown, E:D:, Doig, P:C:, Smith, D:R:, Noonan, B., Guild, B.C., deJonge, B.L.,Carmel, G., Tummino, P.J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D.M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S.D., Jiang, Q., Taylor, D.E., Vovis, G.F. und Trust, T.J. (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397**, 176-180.

Amieva, M.R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L.S., Nelson, W.J. und Falkow, S. (2003) Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* **300**, 1430-1434.

Andersen, L.P., Blom, J. und Nielsen, H. (1993) Survival and ultrastructural changes of *Helicobacter pylori* after Phagocytosis by human polymorphonuclear phagocytes and monocytes. *APMIS* **101**, 61-72.

Ando, T., Kusugami, K., Ohsuga, M, Shinoda, M., Sakakibara, M., Saito, h., Fukatsu, A., Ichiyama, S. und Ohta, M. (1996) Interleukin-8 activity correlates with histologically correlates with histological severity in *Helicobacter pylori*-associated antral gastritis. *Am. J. Gastroenterol*. **91**, 1150-1156.

Ang, S., Lee, C.Z., Peck, K., Sindici, M., Matrubutham, U., Gleeson, M.A. und Wang, J.T. (2001) Acid-induced gene expression in *Helicobacter pylori*: study in genomic scale by microarray. *Infect. Immun.* **69**, 1679-1686.

Asahi, M., Azuma, T., Ito, S., Ito, Y., Suto, H., Nagai, Y., Tsubokawa, M., Tohyama, Y., Maeda, S., Omata, M., Suzuki, T. und Sasakawa, C. (2000) *Helicobacter pylor*i CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J. Exp. Med.* **191**, 593-602.

Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M. Jr, Tummuru, M.K., Blaser, M.J. und Cover, T.L. (1995) Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration*. J. Biol. Chem*. **270**, 17771-17777.

Bach, S., Makristathis, A., Rotter, M. und Hirschl, A. M. (2002) Gene expression profiling in AGS cells stimulated with *Helicobacter pylori* isogenic strains (*cagA* positive or *cagA* negative). *Infect. Immun*. **70**, 988-992.

Backert, S., Ziska, E., Brinkmann, V., Zimny-Arndt, U., Fauconnier, A., Jungblut, P.R., Naumann, M. und Meyer, T.F. (2000) Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell. Microbiol*. **2**, 155-164.

Backert, S., Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V. und Meyer, T.F. (2001) Phosphorylation of tyrosine 972 of *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **42**, 631-644.

Backert, S., Churin, Y. und Meyer, T. F. (2002) *Helicobacter pylori* type IV secretion host cell signalling and vaccine development. *Keio J. Med.* **51**, 6-14.

Backert, S., Gressmann, H., Kwok, T., Zimny-Arndt, U., König, W., Jungblut, P. R. und Meyer, T. F. (2004) Gene expression and protein profiling of AGS gastric epithelial cells upon infection with *Helicobacter pylori*, Proteomics (accepted).

Backert, S., Kwok, T., Schmidt, M., Selbach, M., Moese, S., Peek, R. M., König, W., Meyer, T.F. und Jungblut, P.R. (2005) Subproteomes of soluble and structure-bound *Helicobacter pylori* proteins analysed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Proteomics **5**, 1331-1345.

Backert, S. und Selbach, M. (2005) Tyrosine-phosphorylated bacterial effector proteins: the enemies within. *Trends Microbiol*. 13, 476-484.

Bäckhed, F. und Hornef, M. (2003) Toll-like receptor 4-mediated signaling by epithelial surfaces: necessity or threat ?. *Microbes Infect*. **5**, 951-959.

Bäckhed, F., Rokbi, B., Torstensson, E.,Zhao, Y., Nilsson, C., Seguin, D., Normark, S., Buchan, A.M.J. und Richter-Dahlfors, A. (2003) Gastric mucosal recognition of *Helicobacter pylori* is independent of Toll-like-receptor 4. *J. Infect. Dis*. **187**, 829-836.

Bauer, S., Kirschning, C.J., Häcker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. und Lipford, G.B. (2001) Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9237-9242.

Barreiro, O., Yáñez-Mó, M., Serrador, J.M., Montoya, M.C., Vicente-Manzanares, M. Tejedor, R., Furthmayr, H. und Sánchez-Madrid, F. **(**2002) Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in anovel endothelial structure for adherent leukocytes. *J. Cell. Biol.* **157**, 1233-1245.

Becker, E.L., Forouhar, F.A., Grunnet, M.L., Bouley, F., Tardif, M., Bormann, B.J., Sodja, D., Ye, R.D., Woska, jr., J.R. und Murphy, P.M. (1998) Broad immunocytochemical localization of the formylpeptide receptor in human organs, tissues, and cells. *Cell Tissue Res*. **292**, 129-135.

Beier, D. und Frank R. (2000) Molecular characterization of two-component systems of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol*. **182**, 2068-2076.

Beier, D. (2001) Genregulatorische Mechanismen in *Helicobacter pylori*. *Wissenschaftliche Beiträge der Fachgruppen-FG Mikrobielle Pathogenität, Hygiene und Mikrobiologie* **1**, 11-16.

Bereswill, S., Lichte, F., Greiner, S., Waidner, B., Fassbinder, F. und Kist, M. (1999) The ferric uptake regulator (Fur) homologue of *Helicobacter pylori*: functional analysis of the coding gene and controlled production of the recombinant protein in *Escherichia coli. Mol. Microbiol. Immunol*. **188**, 31-40.

Beutler, B. (2004) Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* **430**, 257-263.

Bjorck, P., Elenstrom-Magnusson, C., Rosen, A., Severinson, E. und Paulie, S. (1993) CD23 und CD21 function as adhesion molecules in homotypic aggregation of human B lymphocytes. *Eur. J. Immunol*. **23**, 1771-1775.

Blaser, M.J., Perez-Perez, G.I., Kleanthous, H., Cover, T.L., Peek, R.M., Chyou, P.H., Stemmermann, G.N. und Nomura, A. (1995) Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*. **55**, 2111-2115.

Blaser, M.J. (1999) Hypothesis: the changing relationship of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. *J. Infect. Dis.* **179**, 1523-1530.

Blaser, M.J. und Berg, D.E. (2001) *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J. Clin. Invest*. **107**, 767-773.

Blaser, M.J. und Atherton, J:C. (2004) *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J. Clin. Invest*., **113**, 321-333.

Bodger, K und Crabtree, J.E. (1998) *Helicobacter pylori* and gastric inflammation. *Br. Med. Bull.* **54**, 139-150.

Boncristiano, M., Paccani, S.R., Barone, S., Ulivieri, C., Patrussi, L., Ilver, D., Amedei, A., D'Elios, M.M., Telford, J.L. und Baldari, C.T. (2003) The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J. Exp. Med*. **198**, 1887-1897.

Boulay, F., Tardif, M., Brouchon, L. und Vignais, P. (1990) The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry* **29**, 11123-11133.

Brandt, S., Kwok, T., Hartig, R., König, W. und Backert, S. (2005) NF-*κ*B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 9300-9305.

Brightbill, H.D., Libraty, D.H., Krutzik, S.R., Yang, R.B., Belisle, J.T., Bleharski, J.R., Maitland, M., Norgard, M.V., Plevy, S.E., Smale, S.T., Brennan, P.J., Bloom, B.R., Godowski, P.J. und Modlin, R.L. (1999) Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* **285**, 732-736.

Brisslert, M., Enarsson, K., Lundin, S., Karlsson, A., Kusters, J.G., Svennerhol, A-M., Backert, S. und Quiding-Järbrink, M. (2005) *Helicobacter pylori* induce neutrophil transendothelial migration: Role of bacterial HP-NAP. *FEMS Microbiol.* **249**, 95-103.

Bucca, G., Farina, G., Puglia, A.M. und Smith, C.P. (1995) The *dnaK* operon of *Streptomyces coelicolor* encodes a novel heat shock protein which binds to the promotor region of the operon. *Mol. Microbiol*. **17**, 663-674.

Bumann, D., Meyer, T.F. und Jungblut, P.R. (2001) Proteome analysis of the common human pathogen *Helicobacter pylori*. *Proteomics* **1**, 473-479.

Cascales, E. und Christie, P. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nature Rev. Microbiol*. **1**, 137-148.

Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R. und Covacci, A. (1996) *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes typeI-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14648-14653.

Censini, S., Stein, M. und Covacci, A. (2001) Cellular responses induced after contact with *Helicobacter pylori*. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 41-46.

Chiou, C.C., Chan, C.C., Sheu, D.L., Chen, K.T., Li, Y.S. und Chan, E.C. (2001) *Helicobacter pylori* infection induced alteration of gene expression in human gastric cells. *Gut* **48**, 598-604.

Chmiela, M., Paziak-Domanska, B. und Wadstrom, T. (1995) Attachment, ingestion, and intracellular killing of *Helicobacter pylori* by human peripheral blood mononuclear leukocytes and mouse peritoneal inflammatory macrophages. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. **10**, 307-316.

Christiansen, N.O., Larsen, V.S., Juhl, H. und Esman, V. (1986) Membrane-associated protein kinases in phorbol ester-activated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Biophys. Acta* **884**, 54-59.

Cochet, C., Keramidas, M., Souvigrat, C. und Chambaz, E.M. (1986) Phorbol-ester-induced alteration of PKC catalytic properties occurs at the membrane level and is not reproduced by physiological stimuli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**, 1283-1290.

Cooksley, C., Jenks, P.J., Green, A., Cockayne, A., Logan, R.P. und Hardie, K.R. (2003) NapA protects *Helicobacter pylori* from oxidative stress damage, and its production is influenced by the ferric uptake regulator. *J. Med. Microbiol*. **52**, 461-469.

Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca,R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N. und Rappuoli, R. (1993) Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5791-5795.

Covacci, A., Telford, J.L., Del Giudice, G., Parsonnet; J. und Rappuoli, R. (1999) *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* **284**, 1328-1333.

Cover, T.L., Dooley, C.P. und Blaser, M.J. (1990) Characterization of human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatans with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect. Immun*. **58**, 603-610.

Cox, J.M., Clayton, C.L., Tomita, T., Wallace, D.M., Robinson, P.A. und Crabtree, J.E. (2001) cDNA array analysis of *cag* pathogenicity island-associated *Helicobacter pylori* epithelial cell response genes. *Infect. Immun.* **69**, 6970-6980.

Crabtree, J.E., Wyatt, J.I., Trejdosiewicz, L.K., Peichl, P., Nichols, P.H., Ramsey, N., Primrose, P.N. und Lindley, I.J. (1994) Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori*, normal and neoplastic gastroduodenal mucosa. J*. Clin. Pathol*. **47**, 61-66.

Crabtree, J.E., Covacci, A., Farmery, S.M, Xiang, Z., Tompkins, D.S., Perry, S., Lindley, I.J. und Rappuoli, R. (1995) *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J. Clin. Pathol*., **48**, 41-45.

Crabtree, J.E., Xiang, Z., Lindley, I.J., Tompkins, D.S., Rappuoli, R. und Covacci, A. (1995) Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a cagA negative isogenic mutant of Helicobacter pylori. *J. Clin. Pathol*. **48**, 967-969.

Crowe, S.E., Alvarez, L., Dytoc, M., Hunt, R.H., Muller, M., Sherman, P., Patel, J., Jin, Y und Ernst, PB (1995) Expression of interleukin 8 and CD54 by human gastric epithelium after *Helicobacter pylori* infection *in vitro.* Gastroenterology **108**, 65-74.

Cussac, V., Ferrero, R.L. und Labigne, A. (1992) Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions. *J. Bacteriol.* **174**, 2466-2473.

Dallegri, F. und Ottonello, L. (1997) Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm. Res*. **46**, 382-391.

Danielsson, D. und Jurstrand, M. (1998) Nonopsonic activation of neutrophils by *Helicobacter pylori* is inhibited by rebamipide. *Dig. Dis. Sci.* **43**, 167-173.

Danielsson, D., Farmery, S:M., Blomberg, B., Perry, S., Rautelin, H. und Crabtree, J.E. (2000) Co-expression in *Helicobacter pylori* of *cagA* and non-opsonic neutrophil activation enhances the association with peptic ulcer disease. *J. Clin. Pathol*. **53**, 318-321.

DeChatelet, R.L., Long, G.D., Shirley, P.S., Bass, D.A., Thomas, M.j., Henderson, F.W. *et al.* (1982) Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *J. Immunol*. **129**, 1589-1593.

DeLeo, F.R., Allen, L.-A.H.; Apicella, M. und Nauseef, W.M. (1999) NADPH oxidase activation and assemly during phagocytosis. *J. Immunol*. **163**, 6732-6740.

Del Giudice, G., Covacci, A., Telford, J.L., Montecucco, C. und Rappuoli, R. (2001) The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Annu. Rev. Immunol*. **19**, 523-563.

Dewald, B., Thelen, M. und Baggiolini, M. (1988) Two transduction sequences are necessary for neutrophil activation by receptor agonists. *J. Biol. Chem*. **263**, 16179-16184.

Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. und Reis, E.S.C. (2004) Innate antiviral responses by means of TLR-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-1531.

Eaton, K.A., Brooks, C.L., Morgan, D.R. und Krakowka, S. (1991) Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun*. **59**, 2470-2475.

Eaton, K.A., Suerbaum, S., Josenhans, C. und Krakowka, S. (1996) Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect. Immun.* **64**, 2445-2448.

Eaves-Pyles, T., Murthy, K., Liaudet, L., Virag, L., Ross, G., Soriano, F.G., Szabo, C. und Salzman, A.L. (2001) Flagellin, a novel mediator of Salmonella-induced epithelial activation and systemic inflammation: I kappa B alpha degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction. *J. Immunol*. **166**, 1248-1260.

Eck, M., Schmaußer, B., Scheller, K., Toksoy, A., Kraus, M., Menzel, T., Müller-Hermelink, H.K. und Gillitzer, R. (2000) CXC chemokines Gro-α/IL-8 und IP-10/MIG in *Helicobcater gastritis*. *Clin. Exp. Immunol*. **22**, 192-199.

Enders, G., Brooks, W., von Jan, N., Lehn, N., Bayerdörffer und Hatz, R. (1995) Expression of adhesion molecules on human granulocytes after stimulation with *Helicobacter pylori* membrane proteins: comparison with membrane proteins from other bacteria. *Infect. Immun*. **63**, 2473-2477.

Ernst, P.B., Crowe, S.E. und Reyes, V.E. (1997) How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage ? The inflammatory response. *Gastroenterology* **113**, 35-42.

Ernst, P.B. und Gold, B.D. (2000) The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 615-640.

Evans, Jr., D.J., Evans, D.G., Takemura, T., Nakano, H., Lampert, H.C., Graham, D. Y., Granger, D.N. und Kvietys P.R. (1995) Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil activating protein. *Infect. Immun*., **63**, 2213-2220.

Feldman, R.A., Eccersley, A.J.P. und Hardie, J.M. (1997) Transmission of *Helicobacter pylori*. *Curr. Opin. Gastroenterol*. **13S1**, 8-12.

Fischer, W., Puls, J., Buhrdorf, R., Gebert, B., Odenbreit, S. und Haas, R. (2001) Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol. Microbiol*. **42**, 1337-1348.

Galmiche, A., Rassow, J., Doye, A., Cagnol, S., Chambard, J.C., Contamin, S., de Thillot, V., Just, I., Ricci, V., Solcia, E., Van Obberghen, E. und Boquet, P. (2000) The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J.* **19**, 6361-6370.

Gay, N.J. und Keith, F.J. (1991) *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* **351**, 355-356.

Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hoffmann, R. und Haas, R. (2003) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* **301**, 1099-1102.

Gerhard, M., Lehn, N, Neumayer, N., Boren, T., Rad, R., Schepp, W., Miehlke, S., Classen, M. und Prinz, C. (1999) Clinical relevance of *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12778-12783.

Gewirtz, A.T., Yu, Y., Krishna, U.S., Israel, D.A., Lyons, S.L. und Peek, Jr., R.M. (2004) *Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *J. Infect. Dis*. 189, 1914-1920.

Gionchetti, P., Vaira, D., Campieri,M, Holton, J., Menegatti, M., Belluzzi, A., Bertinelli, E., Ferretti, M., Brignola, C., Miglioli, M. *et al.* (1994) Enhanced mucosal interleukin-6 and –8 in *Helicobacter pylori*-positive dyspeptic patients. *Am. J. Gastroenterol*. **89**, 883-887.

Girardin, S.E., Sansonetti, P.J. und Philpott, D.J. (2002) Intracellular vs extracellular recognition of pathogens--common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol*. **10**, 193-199.

Glickmann, M.S. und Jacobs Jr., W.R. (2001) Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell* **104**, 477-485.

Graham, J.E., Peek Jr., R.M., Krishna, U. und Cover, T.L. (2002) Global analysis of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. *Gastroenterol*. **123**, 1637-1648.

Gressmann, H., Linz, B., Ghai, R., Pleissner, K.P., Schlapbach, R., Yamaoka, Y., Kraft, C., Suerbaum, S., Meyer, T.F. und Achtman, M. (2005) Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*. *PloS Genet*. **1**, 43-47.

Guillemin, K., Salama, N.R., Tompkins, L.S. und Falkow, S. (2002) *Cag* pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 15136-15141.

Guruge, J.L., Falk, P.G., Lorenz, R.G., Dans, M., Wirth, H.P., Blaser, M.J., Berg, D.E. und Gordon, J.I. (1998) Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3925-3930.

Ha, N.C., Oh, S.T., Sung, J.Y., Cha, K.A., Lee, M.H. und Oh, B.H. (2001) Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 505-509.

Haen, P.J. (1995) Principles of hematology, Dubuque, Iowa: Wm. C. Brown Publishers

Hajjar, A.M., O'Mahony, D.S., Ozinsky, A., Underhill, D.M., Aderem, A., Klebanoff, S.J. und Wilson, C.B. (2001) Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J. Immunol.* **166**, 15-19.

Hashimoto, C. *et al.* (1988) The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**, 269-279.

Hatakeyama, M. (2004) Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 688-694.

Hatz, R.A., Rieder, G., Stolte, M., Bayerdorffer, E., Meimarakis, G., Schildberg, F.W. und Enders, G. (1997) Pattern of adhesion molecule expression on vascular endothelium in *Helicobacter pylori*-associated antral gastritis. *Gastroenterology*, **112**, 1908-1919.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. und Bauer, S. (2004) Species-spezific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-1529.

Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M. und Hatakeyama, M. (2002) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* **295**, 683-686.

Higuchi, k., Arakawa, T., Uchida, T., Nakagawa, K., Nakamura, S., Matsumoto, T., Fukuda, T., Kobayashi, K. und Kuroki, T. (1997) In situ expression of cell adhesion molecules in chronic gastritis with *Helicobacter pylori* infection. *J. Clin. Gastroenterol.* **25**, 215-221.

Hirschfeld, M., Kirschning, C.J., Schwandner, R., Wesche, H., Weis, J.H., Wooten, R.M. und Weis, J.J. (1999) Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J. Immunol.* **163**, 2382-2386.

Hirschfeld, M., Weis, J.J.,Toshchakov, V., Salkowski, C.A., Cody, M.J., Ward, D.C., Qureshi, N., Michalek, S.M. und Vogel, S.N. (2001) Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect. Immun.* **69**, 1477-1482.

Holmes, W.E., Lee, J., Kuang, W.J., Rice, G.C. und Wood, W.I. (1991) Structure and functional expression of human interleukin-8 receptor. *Science* **253**, 1278-1280.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. und Akira, S. (1999) Cutting edge: generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor. *J. Immunol.* **162**, 3749-3752.

Ikenoue, T., Maeda, S., Ogura, K., Akanuma, M., Mitsuno, Y., Imai, Y., Yoshida, H., Shiratori, Y. und Omata, M. (2001) Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the *cag* pathogenicity island. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**, 181-186.

Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I.M., Kersulyte, D., Incecik, E.T., Berg, D.E., Covacci, A., Engstrand, L. und Boren, T. (1998) *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* **279**, 373-377.

Isobe, K. und Nakashima, I. (1991) Homotypic aggregation of murine T lymphocytes induced by anti-Thy-1 monoclonal antibodies. *Immunology* **73**, 159-164.

Israel, D.A. und Peek, R.M. (2001) Pathogenisis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **15**, 1271-1298.

Janeway Jr, C. und Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197-216.

Jeannin, P., Renno, T., Goetsch, L., Miconnet, I., Aubry, J.P., Delneste, Y., Herbault, N., Baussant, T., Magistrelli, G., Soulas, C., Romero, p., Cerottini, J.C. und Bonnefoy, J.Y. (2000) OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway. *Nat. Immunol.* **1**, 502-509.

Josenhans, C, Niehus, E., Amersbach, S., Horster, A, Betz, C., Drescher, B., Hughes, K.T. und Suerbaum, S (2002) Functional characterization of the antagonistic flagellar late regulators FliA und FLgM of *Helicobacter pylori* and their effects on the *H. pylori* transkriptome. *Mol. Microbiol.* **43**, 307-322.

Joyce, E.A., Gilbert, J.V., Eaton, K.A., Plaut, A. und Wright, A. (2001) Differential gene expression from two transcriptional units in the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **69**, 4202-4209.

Jungblut, P.R., Bumann, D., Haas, G., Zimny-Arndt, U., Holland, P., Lamer, S., Siejak, F., Aebischer, A. und Meyer, T. F. (2000) Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **36**, 710-725.

Kavermann, H., Burns, B.P., Angermuller, K., Odenbreit, S., Fischer, W., Melchers, K. und Haas, R. (2003) Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J. Exp. Med.* **197**, 813-822.

Kawahara, T., Kuwano, Y., Teshima-Kondo, S., Sugiyama, T., Kawai, T., Nikawa, T., Kishi, K. und Rokutan, K. (2001a) *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide from type I, but not type II strains, stimulates apoptosis of cultured gastric mucosal cells. *J. Med. Invest.* **48**, 167-174.

Kawahara, T., Teshima, S.,Oka, A., Sugiyama, T., Kishi, K. und Rokutan, K. (2001b) Type I *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide stimulates toll like receptor 4 and activates mitogen oxidase 1 in gastric pit cells. *Infect. Immun.* **69**, 4382-4389.

Kawasaki, K., Akashi, S., Shimazu, R., Yoshida, T., Miyake, K. und Nishijima, M. (2000) Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J. Biol. Chem.* **275**, 2251-2254.

Keller, R. (1994) Immunologie und Immunpathologie. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Kerr, M.A. und Stocks, S.C. (1992) The role of CD15-(Le^x)-related carbohydrates in neutrophil adhesion. *Histochem. J.* **24**, 811-826.

Kim, N., Marcus, E.A., Wen, Y., Weeks, D.L., Scott, D.R., Jung, H.C., Song, I.S. und Sachs, G. (2004) Genes of *Helicobacter pylori* regulated by attachment to AGS cells. *Infect. Immun.* **72**, 2358-2368.

Kim, J.G., Lee, S.J. und Kagnoff, M.F. (2004*)* Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect. Immun.* **72**, 1487-1495.

Kim, J.S., Jung, H.C., Kim, J.M., Song, I.S. und Kim, C.Y. (1998) Interleukin-8 expression by human neutrophils activated by *Helicobacter pylori* soluble proteins. *Scand. J. Gastroenterol.* **33**, 1249-1255.

Khandaker, M.H., Xu, L., Rahimpour, R., Mitchell, G., DeVries, M.E., Pickering, J.G., Singhal, S.K., Feldman, R.D. und Kelvin, D.J. (1998) CXCR1 and CXCR2 are rapidly down-modulated by bacterial endotoxin through a unique agonist-independent, tyrosine kinase-dependent mechanism. *J. Immunol.* **161**, 1930-1938.

Khandaker, M.H., Mitchell, G., Xu, L., Andrews, J.D., Singh, R., Leung, H., Madrenas, J., Ferguson, S.S., Feldman, R.D. und Kelvin, D.J. (1999) Metalloproteinases are involved in lipopolysaccharide- and tumor necrosis factor-alpha-mediated regulation of CXCR1 and CXCR2 chemokine receptor expression. *Blood* **93**, 2173-2185.

Kostrzynska, M., Betts, J.D., Austin, J.W. und Trust, T.J. (1991) Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. *J. Bacteriol.* **173**, 937-946.

König, B. und König, W. (1991) Roles of human peripheral blood leukocyte protein kinase C and G proteins in inflammatory mediator release by isogenic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* **59**, 3801-3810.

Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A. und Klinman, D.M. (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**, 546-549.

Kuipers, E.J., Perez-Perez, G.I., Meuwissen, S.G. und Blaser, M.J. (1995) *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 1777-1780.

Kurosu, H., Maehama, T., Okada, T., Yamamoto, T., Hoshino, S., Fukui, Y., Ui, M., Hazeki, O. und Katada, T. (1997) Heterodimeric phosphoinositide 3-kinase consisting of p85 and p110 is synergistically activated by the βγ-subunits of G-proteins and phosphotyrosyl peptide. *J. Biol. Chem.* **272**, 24252-24256.

Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., Walsh, E.E., Freeman, M.W., Golenbock, D.T., Anderson, L.J. und Finberg, R.W. (2000) Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* **1**, 398-401.

Kwok, T. , Backert, S., Schwarz, H., Berger, J. und Meyer, T.F. (2002) Specific entry of *Helicobacter pylori* into cultured gastric epithelial cells via a zipper-like mechanism. *Infect. Immun.* **70**, 2108-2120.

Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien, E., Nilsen, N.J., Espevik, T. und Golenbock, D.T. (2004) TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* **5**, 190-198.

Leadbetter, E.A., Rifkin, I.R., Hohlbaum, A.M, Beaudett, B.C., Shlomchik, M.J. und Marshak-Rothstein, A. (2002) Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* **416**, 603-607.

Leakey, A., La Brooy, J.und Hirst, R. (2000) The ability of *Helicobacter pylori* to activate neutrophils is determined by factors other than *H. pylori* neutrophil-activating protein. *J. Infect. Dis.,* **182**, 1749-1755.

Lee, J., Horuk, R., Rice, G.C., Bennett, G.L., Camerato, T. und Wood, W.I. (1992) Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. *J. Biol. Chem.* **267**, 16283-16287.

Lee, J., Chuang, T.H., Redecke , V., She, L., Pitha, P.M., Carson, D.A., Raz, E. und Cottam, H.B. (2003) Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 6646-6651.

Lee, S.H., Kim, H.S., Kim, S.Y., Lee, Y.S., Park, W.S., Kim, S.H., Lee, J.Y. und Yoo, N.J. (2003a) Increased expression of FLIP, an inhibitor of Fas mediated apoptosis, in stomach cancer. *APMIS* **111**, 309-314.

Lee, S.K., Stack, A., Katzowitsch, E., Aizawa, S.I., Suerbaum, S. und Josenhans, C. (2003b) *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes Infect.* **5**, 1345-1356.

Lien, E., Sellati, T.J., Yoshimura, A., Flo, T.H., Rawadi, G., Finberg, R.W., Carroll, J.D., Espevik, T., Ingalls, R.R., Radolf, J.D. und Golenbock, D.T. (1999) Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J. Biol. Chem.* **274**, 33419-33425.

Lim, J.W., Kim, H. und Kim, K. H. (2003) Cell adhesion-related gene expression by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial AGS cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **35**, 1284-1296.

Loewen, P.C., Carpena, X., Rovira, C., Ivancich, A., Perez-Luque, R., Haas, R., Odenbreit, S., Nicholls, P. und Fita, I. (2004) Structure of *Helicobacter pylori* catalase, with and without formic acid bound, at 1.6 A resolution, *Biochemistry* **43**, 3089-3103.

Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. und Iwasaki, A. (2003) Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* **198**, 513-520.

Lund, J.M**.,** Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A. und Flavell, R.A. (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 5598-5603.

Lund-Johansen, F., Olweus, F.J., Horejsi, V., Skubitz, K.M., Thompson, J.S., Viilella, R. und Symington, F.W. (1992) Activation of human phagocytes through carbohydrate antigens. *J. Immunol.* **148**, 3221-3229.

Maeda, S., Otsuka, M., Hirata, Y., Mitsuno, Y., Yoshida, H., Shiratori, Y., Masuho, Y., Muramatsu, M., Seki, N. und Omata, M. (2001) cDNA microarray analysis of *Helicobacter pylori*-mediated alteration of gene expression in gastric cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 443-449.

Maeda, S., Akanuma, M., Mitsuno, Y., Hirata, Y., Ogura, K., Yoshida, H., Shiratori, Y. and Omata, M. (2001) Distinct mechanism of *Helicobacter pylori*-mediated NF-κB activation between gastric cancer cells and monocytic cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 44856-44864.

Mahdavi, J., Sonden, B., Hurtig, M., Olfat, F.O., Forsberg, L., Roche, N., Angstrom, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K.A., Altraja, S., Wadstrom, T., Kersulyte, D., Berg, D.E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K.E., Norberg, T., Lindh, F., Lundskog, B.B., Arnquist, A., Hammarstrom, L. und Boren, T. (2002) *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **297**, 573-578.

Mandell, L., Moran, A.P., Cocchiarella, A., Houghton, J., Taylor, N., Fox, L.G., Wang, T.C. und Kurt-Jones, E.A. (2004) Intact Gram-negative *Helicobacter hepaticus, Helicobacter pylori* and *Helicobacter felis* bacteria activate innate immunity via Toll-like receptor-2 not Toll-like receptor 4. *Infect. Immun.* **72**, 6446-6454.

Marshall, B.J. und Warren, J.R. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**, 1311-1315.

Martin, M., Katz, J., Vogel, S.N. und Michalek, S.M. (2001) Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *J. Immunol.* **167**, 5278-5285.

Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A. und Seya, T. (2003) Subcellular localization of toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol*. **171**, 3154-3162.

Mc Ever, R.P. und Cummings, R.D. (1997) Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest.* **100**, 97-103.

Mc Ever, R.P. (2002) Selectins: lectins that initiate adhesion under flow. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14**, 581-586.

McGowan, C.C., Necheva, A.S., Forsyth, M.H., Cover, T.L. und Blaser, M.J. (2003) Promoter analysis of *Helicobacter pylori* genes with enhanced expression at low pH. *Mol. Microbiol*. **48**, 1225-1239.

Means, T.K., Lien, E., Yoshimura, A., Wang, S., Golenbock, D.T. und Fenton, M.J. (1999) The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J. Immunol*. **163**, 6748-6755.

Means, T.K., Wang, S., Lien, E., Yoshimura, A., Golenbock, D.T. und Fenton, M.J. (1999) Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol*. **163**, 3920-3927.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. und Janeway, C.A. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397.

Medzhitov, R. und Janeway Jr, C. (2000) The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends in Microbiol*. **8**, No. 10, 452-456.

Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol*. **1**, 135-145.

Merrell, D.S., Thompson, L.J., Kim, C.C., Mitchell, H., Tompkins, L.S., Lee, A. und Falkow, S. (2003) Growth phase-dependent response of *Helicobacter pylori* to iron starvation. *Infect. Immun*. **71**, 6510-6525.

Miller-Podraza, H., Bergstrom, J., Teneberg, S., Milh, M.A., Longard, M., Olsson, B.M., Uggla, L. und Karlsson, K.A. (1999) *Helicobacter pylori* and neutrophils: sialic acid-dependent binding to various isolated glycoconjgates. *Infect. Immun*. **67**, 6309-6313.

Mimuro, H., Suzuki, T., Tanaka, J., Asahi, M., Haas, R. und Sasakawa, C. (2002) Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol. Cell* **10**, 745-755.

Mitchell; H. und Megraud, F. (2002) Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* **7**, Suppl.1, 8-16.

Mizuno, T (1997) Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli. DNA Res*. **4**, 161-168.

Moese, S., Selbach, M., Meyer T.F. und Backert, S. (2002) *cag*$^{+}$ *Helicobacter pylori* induces homotypic aggregation of macrophage-like cells by upregulation and recruitment of intracellular adhesion molecule 1 to the cell surface. *Infect. Immun.* **70**, 4687-4691.

Montecucco, C und Rappuoli, R. (2001) Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 457-466.

Murphy, P.M. und McDermott, D. (1991) Functional expression of the human formyl peptide receptor in *Xenopus oocytes* requires a complementary human factor. *J. Biol. Chem.* **266**, 12560-12567.

Moss, S.F., Legon, S., Davies, J und Calam, J. (1994) Cytokine gene expression in *Helicobacter pylori* associated antral gastritis. *Gut* **35**, 1567-1570.

Muller, W.A. (2002) Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab. Invest.* **82**, 521-533.

Muotiala, A., Helander, I.M., Pyhala, L., Kosunen, T.U. und Moran, A.P. (1992) Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **60**, 1714-1716.

Nagano, C., Azuma, A., Ishiyama, H., Sekiguchi, K., Imagawa, K. und Kikuchi, M. (2001) Rebamipide suppresses formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)-induced superoxide production by inhibiting fMLP-receptor binding in human neutrophils. *J. Pharm. Exp. Ther.* **297**, 388-394.

Nielsen, H. und Andersen, L.P. (1992) Activation of human phagocyte oxidative metabolism by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **103**, 1747-1753.

Nomura, A.M., Stemmermann, G.N., Po-Huang, C., Perez-Perez, G.I. und Blaser, M.J. (1994) *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Ann. Inter. Med.* **120**, 977-981.

Noach, L.A, Bosma, N.B., Jansen, J., Hoek, F.J., van Deventer, S.J. und Tytgat, G.N. (1994) Mucosal tumor necrosis factor-α, interleukin-1β and interleukin-8 produktion in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand. J. Gastroenterol.* **29**, 425-429.

Nomura; A.M., Perez-Perez, G.I., Lee, J., Stemmermann, G.N. und Blaser, M.J. (2002) Relation between *Helicobacter pylori cagA* status and risk of peptic ulcer disease. *Am. J. Epidemiol.* **155**, 1054-1059.

Odenbreit, S., Wieland, B. und Haas, R. (1996) Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* catalase and construction of a catalase-deficient mutant strain. *J. Bacteriol.* **178**, 6960-6967.

Odenbreit, S., Till, M., Hofreuter, D., Faller, G. und Haas, R. (1999) Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol. Microbiol.* **31**, 1537-1548.

Odenbreit, S., Püls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W. und Haas, R. (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* **287**, 1497-1500.

Odenbreit, S., Faller, G. und Haas, R. (2002) Role of the AlpAB proteins and lipopolysaccharide in adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**, 247-256.

Ohara, T., Arakawa, T., Higuchi, K. und Kaneda, K. (2001) Overexpression of co-stimulatory molecules in peripheral mononuclear cells of *Helicobacter pylori*-positive peptic ulcer patients: possible difference in host responsiveness compared with non-ulcer patients. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 11-18.

Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S. und Kolb, H. (2000) Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J. Immunol.* **164**, 558-561.

Okada, T., Hazeki, O., Ui, M. und Katada, T. (1996) Synergistic activation of PtdIns 3-kinase by tyrosine-phosphorylated peptide and βγ-subunits of GTP-binding proteins. *Biochem. J.* **317**, 475-480.

Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E.S., Young, D.W., Ishizaka, S.T., Rose, J., Chow, J.C. und Strauss, J.F. (2001) The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* **267**, 10229-10233.

Opitz, B., Schroder, N.W., Spreitzer, I., Michelsen, K.S., Kirschning, C.J., Hallatschek, W., Zahringer, U., Hartung, T., Gobel, U.B. und Schumann, R.R. (2001) Toll-like receptor-2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J. Biol. Chem.* **27*6***, 22041-22047.

Ortega-Cava, C.F., Ishihara, S., Rumi, M.A., Kawashima, K., Ishimura, N., Kazumori, H., Udagawa, J., Kadowaki, Y. und Kinoshita, Y. (2003) Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J. Immunol.* **170**, 3977-3985.

Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L. und Aderem, A. (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13766-13771.

Padol, I.T. und Hunt, R.H. (2005) Host-specific differences in the physiology of acid secretion related to prostaglandins may play a role in gastric inflammation and injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* **288**, 1110-1117.

Parsonnet, J., Friedman, G.D., Van-Dersteen, D.P., Cgang, Y., Vogelman, J.H., Orentreich, N. und Sibley, R.K. (1991) *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1127-1131.

Patcha, V., Wigren, J., Winberg, M.E., Rasmusson, B., Li, J. und Särndahl, E. (2004) Differential inside-out activation of β_2-integrins by leukotriene B_4 and fMLP in human neutrophils. *Exp. Cell. Res.* **300**, 308-319.

Peek, R.M., Miller, G.G., Tham, K.T., Perez-Perez, G.I., Zhao, X., Atherton, J.C. und Blaser, M.J. (1995) Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to cag$^+$ *Helicobacter pylori* strains. *Lab. Invest.* **73**, 760-770.

Peek, R.M., Thompson, S.A., Donahue, J.P., Tham, K.T., Atherton, J.C., Blaser, M.J. und Miller, G.G. (1998) Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. *Proc. Assoc. Am. Phys.* **110**, 531-544.

Peek, R.M. und Blaser, M.J. (2002) *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 28-37.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Huffel, C.V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi Castagnoli, P., Layton, B. und Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088.

Pruul, H., Lee, P.C., Goodwin, C.S. und McDonald, P.J. (1987) Interaction of *Campylobacter pyloridis* with human immune defense mechanisms. *J. Med. Microbiol.* **23**, 233-238.

Qureshi, S.T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K.J., Gros, P. und Malo, D. (1999) Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4) *J. Exp. Med.* **189**, 615-625.

Raghavan, S., Nystrom, J., Fredriksson, M., Holmgren, J. und Harandi, A.M. (2003) Orally administered CpG oligodeoxynucleotide induces production of CXC and CC chemokines in the gastric mucosa and suppresses bacterial colonization in a mouse model of *Helicobacter pylori* infection. *Infect. Immun.* **71**, 7014-7022.

Rautelin, H., Blomberg, B., Fredlund, H., Jarnerot, G. und Danielsson, D. (1993) Incidence of *Helicobacter pylori* strains activating neutrophils in patients with peptic ulcer disease. *Gut* **34**, 599-603.

Rautelin, H., von Bonsdorff, CH, Blomberg, B. und Danielsson, D. (1994) Ultrastructural study of two pattern in the interaction of *Helicobacter pylori* with neutrophils. *J. Clin. Pathol.* **47**, 667-669.

Ramarao, N., Gray-Owen, S.D., Backert, S. und Meyer, T.F. (2000) *Helicobacter pylori* inhibits phagocytosis by professional phagocytes involving type IV secretion components. *Mol. Microbiol.* **37**, 1389-1404.

Reyrat, J.M., Pelicic, V., Papini, E., Montecucco, C., Rappuoli, R. und Telford, J.L. (1999) Towards deciphering the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Mol. Microbiol.* **34**, 197-204.

Ricevuti, G. (1997) Host tissue damage by phagocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **832**, 426-448.

Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R. und Bazan, F.J. (1997) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 558-592.

Rokbi, B., Seguin, D., Guy, B., Mazarin, V., Vidor, E., Mion, F., Cadoz, M. und Quentin-Millet, M.J. (2001) Assessment of *Helicobacter pylori* gene expression within mouse and human gastric mucosae by real-time reverse transcriptase PCR. *Infect. Immun*. **69**, 4759-4766.

Roos, D., Van Bruggen, R. und Meischl, C. (2003) Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* **5**, 1307-1315.

Rothenbacher, D., Blaser, M.J., Bode, G. und Brenner, H. (2000) Inverse relationship between gastric colonization of *Helicobacter pylori* and diarrheal illnesses in children: results of a population-based cross-sectional study. *J. Infect. Dis.* **182**, 1446-1449.

Sambrook, J. Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory Manual **3**, second edition; *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Satin, B., Del Giudice, G., Della Bianca, V., Dusi, S., Laudanna, C., Tonello, F., Kelleher, D., Rappuoli, R., Montecucco, C. und Rossi, F. (2000) The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J. Exp. Med*. **191**, 1467-1476.

Schaußer, B., Josenhans, C., Endrich, S., Suerbaum, S., Sitaru, C., Andrulis, M., Brändlein, S., Rieckmann, P., Müller-Hermelink, K.M. und Eck, M. (2004) Downregulation of CXCR1 und CXCR2 expression on human neutrophils by *Helicobacter pylori*: a new pathomechanism in *H. pylori* Infection? *Infect. Immun.* **72**, 6773-6779.

Schmitt, W. und Haas, R. (1994) Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol*. **1**2, 307-319.

Schumacher, C., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. und Moser, B. (1992) High-and low-affinity binding of GRO alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10542-10546.

Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. und Kirschning, C.J. (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem*. **274**, 17406-17409.

Segal, E.D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S. und Tompkins, L.S. (1999) Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14559-14564.

Selbach, M., Moese, S., Hauck, C.R., Meyer, T.F. und Backert, S. (2002) Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **277**, 6775-6778.

Selbach, M., Moese, S., Hurwitz, R., Hauck, C.R., Meyer, T.F. und Backert, S. (2003) The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephoshorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J.* **22**, 515-528.

Selbach, M., Moese, S., Backert, S., Jungblut, P.R. und Meyer, T.F. (2004) The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephoshorylation of ezrin. *Proteomics* **4**, 2961-2968.

Sepulveda, A.R., Tao, H., Carloni, E., Sepulveda, J., Graham, D.Y. und Peterson, L.E. (2002) Screening of gene expression profiles in gastric epithelial cells induced by *Helicobacter pylori* using microarray analysis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16**, 145-157.

Sharma, S.A., Tummuru, M.K., Blaser, M.J. und Kerr, L.D. (1998) Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. *J. Immunol.* **160**, 2401-2407.

Shimoyama, T., Everett, S.M., Dixon, M.F, Axon, A.T. und Crabtree, J.E. (1998) Chemokine mRNA expression in gastric mucosa is associated with *Helicobacter pylori cagA* positivity and severity of gastritis. *J. Clin. Pathol.* **51**, 765-770.

Shimoyama, T. und Crabtree, J.E. (1998) Bacterial factors and immune pathogenesis in *Helicobacter pylori* infection. *Gut* **43** (Suppl. 1) 2-5.

Smith Jr., M.F., Mitchell, A., Li, G., Ding, S., Fitzmaurice, A.M., Ryan, K. und Goldberg, S. (2003) Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 32552-32560.

Spohn, G. und Scarlato, V. (1999) Motility of *Helicobacter pylori* is coordinately regulated by the transcriptional activator FlgR, an NtrC homolog. *J. Bacteriol.* **181**, 593-599.

Spohn, G. und Scarlato, V. (1999) The autoregulatory HspR repressor protein governs chaperone gene transcription in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **34**, 663-674.

Stein, M., Rappuoli, R. und Covacci, A. (2000) Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after *cag*-driven host cell translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 1263-1268.

Steiner, T.S., Nataro, J.P., Poteet-Smith, C.E., Smith, J.A. und Guerrant, R.L. (2000) Enteroaggregative Escherichia coli expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **105**, 1769-1777.

Stephens, L.R., Eguinoa, A., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Cooke, F., Coadwell, J., Smrcka, A.S., Thelen, M., Cadwallader, K., Tempst, P., Hawkins, P.T. (1997) the βγ sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* **89**, 105-114.

Stocks, S.C., Albrechtsen, M. und Kerr, M.A. (1990) Expression of the CD15 differentiation antigen (3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine, Le^x) on putative neutrophil adhesion molecules CR3 and NCA-160. *Biochem. J.* **268**, 275-285.

Stoeckel, J., Majdic, O., Rosenkranz, A., Fiebiger, E., Kniep, B., Stockinger, H. und Knapp, W. (1993) Monoclonal antibodies to the carbohydrate structure $Lewis^x$ stimulate the adhesive activity of leukocyte integrin CD11b/CD18 on human granulocytes. *J. Leukocyte Biol.* **53**, 541-549.

Stoicov, C., Saffari, R., Cai, X., Hasyagar, C. und Houghton, J.M. (2004) Molecular biology of gastric cancer: *Helicobacter* infection and gastric adenocarcinoma: bacterial and host factors responsible for altered growth signaling. *Gene* **341**, 1-17.

Strobel, S., Bereswill, S., Balig, P., Allgaier, P., Sonntag H.G.und Kist, M. (1998) Identification and analysis of a new *vacA* genotype variant of *Helicobacter pylori* in different patient groups in Germany. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 1285-1289.

Suerbaum, S., Josenhans, C. und Labigne, A. (1993) Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin genes and construction of *H. pylori flaA*- and *flaB*- negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J. Bacteriol.* **175**, 3278-3288.

Sundrud, M.S., Torres, V.J., Unutmaz, D. und Cover, T.L. (2004) Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 7727-7732.

Suzuki, M., Miura, S., Mori, M., Kai, A., Suzuki, H., Fukumura, D., Suematsu, M. und Tsuchiya, M. (1994) Rebamipide, a novel anticulcer agent, attenuates Helicobacter pylori induced gastritis mucosal cell injury associated with neutrophil derived oxidans. *Gut* **35**, 1375-1378.

Hansen, S.P., Go, M.F., Varming K., Andersen, L.P., Graham, D.Y. und Nielsen, H. (1999) Proinflammatory activation of neutrophils and monocytes by *Helicobacter pylori* is not associated with *cagA,* vacA or *picB* genotypes. *APMIS* **107**, 1117-1123.

Szczebara, F., Dhaenens, L., Armand, S. und Husson, M. O. (1999) Regulation of the transcription of genes encoding different virulence factors in *Helicobacter pylori* by free iron. *FEMS Microbiol. Lett.* **175**, 165-170.

Takeda, K., Kaisho, T. und Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335-376.

Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. und Akira, S. (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**, 443-451.

Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Muhlradt, P.F. und Akira, S. (2000) Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J. Immunol.* **164**, 554-557.

Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K. und Akira, S. (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* **13**, 933-940.

Telford, J.L., Covacci, A., Rappuoli, R. und Ghiara, P. (1997) Immunobiology of *Helicobacter pylori* infection. *Curr. Opin. Immun.* **9**, 498-503.

Teneberg, S., Jurstrand, M., Karlsson, K.A. und Danielsson, D. (2000) Inhibition of nonopsonic *Helicobacter pylori*-induced activation of human neutrophils by sialylated oligosaccharides. *Glycobiology* **10**, 1171-1181.

Thompson, L.J., Merrell, D.S., Neilan, B.A., Mitchell, H., Lee, A. und Falkow, S. (2003) Gene expression profiling of *Helicobacter pylori* reveals a growth-phase-dependent switch in virulence gene expression. *Infect. Immun.* **71**, 2643-2655.

Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., Sudo, T. *et al.* (1984) Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J. Nat. Cancer Inst.* **72**, 955-962.

Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzegerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D: und Venter, J.C. *et al.* (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**, 539-547.

Tsuda, M., Karita, M., Mizote, T., Morshed, M.G., Okita, K. und Nakazawa, T. (1994) Essential role of *Helicobacter pylori* urease in gastric colonization: definite proof using a urease-negative mutant constructed by gene replacement. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **1**, 49-52.

Tummuru, M.K., Cover, T.L. und Blaser, M.J. (1993) Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect. Immun.* **61**, 1799-1809.

Underhill, D.M., Ozinsky, A., Smith, K.D. und Aderem, A. (1999) Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14459-14463.

Underhill, D.M., Ozinsky, A., Hajjar, A.M., Stevens, A., Wilson, C.B., Bassetti, M. und Aderem, A. (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* **401**, 811-815.

Vabulas, R.M., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C.J., Haecker, H.H. und Wagner, H. (2001) Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 31332-31339.

Van Amsterdam, K., van Vliet, A.H., Kusters, J.G., Feller, M., Dankert, J. und van der Ende, A. (2003) Induced *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin VacA expression after initial colonisation of human gastric epithelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **39**, 251-256.

Van Doorn, L.J., Figueiredo, C., Sanna, R., Pena, S., Midolo, P., Ng, E.K., Atherton, J. C., Blaser, M. J. und Quint, W.G. (1998) Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2597-2603.

Van Vliet, A.H., Kuipers, E.J., Stoof, J., Poppelaars, S.W. und Kusters, J.G. (2004) Acid-responsive gene induction of ammonia-producing enzymes in *Helicobacter pylori* is mediated via a metal-responsive repressor cascade. *Infect. Immun.* **72**, 766-773.

Viala, J., Chaput, C., Boneca, I.G., Cardona, A., Girardin, S.E., Moran, A.P., Athman, R., Memet, S., Huerre, M.R., Coyle, A.J., DiStefano, P.S., Sansonetti, P.J., Labigne, A., Bertin, J., Philpott, D.J. und Ferrero, R.L. (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island. *Nat. Immunol.* **5**, 1166-1174.

Wee, A., The, M. und Kang, J.Y. (1992) Association of *Helicobacter pylori* with HLA-DR antigen expression in gastritis. *J. Clin. Pathol.* **45**, 30-33.

Wen, Y., Marcus, E.A., Matrubutham, U., Gleeson, M.A., Scott, D.R. und Sachs, G. (2003) Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **71**, 5921-5939.

Werts, C., Tapping, R.I., Mathison, J.C., Chuang, T.H., Kravchenko, V., Saint Girons, I., Haake, D.A., Godowski, P.J., Hayashi, F., Ozinsky, A., Underhill, D.M., Kirschning, C.J., Wagner, H., Aderem, A., Tobias, P.S. und Ulevitch, R.J. (2001) Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol.* **2**, 346-352.

Whitman, M., Downes, C.P., Keeler, M., Keller, T. und Cantley, L. (1988) Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholoipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* **334**, 332, 644-646.

Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P. und Halbwachs-Mecarelli, L. (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* **80**, 617-653.

Wotherspoon, A.C., Doglioni, C., Diss, T.C., Pan, L., Moschini, A., de Boni, M. und Isaacson, P.G. (1993) Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori. Lancet* **342**, 575-577.

Wyllie, D.H., Kiss-Toth, E., Visintin, A., Smith, S.C., Boussouf, S., Segal, D.M., Duff, G.W. und Dower, S.K. (2000) Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J. Immunol.* **165**, 7125-7132.

Yamaoka, Y., Kita, M., Kodama, T, Sawai, N. und Imanishi, J. (1996) *Helicobacter pylori cagA* gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. *Gastroenterology* **110**, 1744-1752.

Yamaoka, Y., Kita, M., Kodama, T, Sawai, N., Kashima, K. und Imanishi, J. (1997) Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by *cagA* gene positive *Helicobacter pylori* strains. *Gut* **41**, 442-451.

Yamaoka, Y., Kita, M., Kodama, T., Sawai, N., Tanahashi, T., Kashima, K. und Imanishi, J. (1998) Chemokines in the gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Gut* **42**, 609-617.

Yoshida, N., Granger, D.N., Evans, D.J.J., Evans, D.G., Graham, D.Y., Anderson, D.C. *et al*. (1993) Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology* **105**, 1431-1440.

Yoshida, N., Yoshikawa, T., Iinumuma, S., Arai, M., Takenaka, S., Sakamoto, K., Miyajima, T., Nakamura, Y., Yagi, N., Naito, Y. et al. (1996) Rebamipide protects against activation of neutrophils by *Helicobacter pylori. Dig. Dis. Sci*. **41**, 1139-1144.

Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R.R., Tuomanen, E., Dziarski, R. und Golenbock, D. (1999) Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J. Immunol*. **163**, 1-5.

Zu, Y., Cassai, N.D. und Sidhu, G.S. (2000) Light microscopic ultrastructural evidence of in vivo phagocytosis of *Helicobacter pylori* by neutrophils. *Ultrastruct. Pathol*. **24**, 319-323.

10. Anhang

10.1 Sequenzanalyse der Primer und Sonden für quantitative Echtzeit-PCR

Helicobacter pylori 16SrRNA-Gen (Genbank-Nummer: AY593991)

```
   1 cctagagtttgatcatggctcagagtgaacgctggcggcgtgcctaatacatgcaagtcg
  61 aacgatgaagcttctagcttgctagaagtggattagtggcgcacgggtgagtaacgcata
 121 ggtcatgtgcctcttagtttgggatagccattggaaacgatgattaataccagatactcc
 181 ctacgggggaaagatttatcgctaagagatcagcctatgtcctatcagcttgttggtaag
 241 gtaatggcttaccaaggctatgacgggtatccggcctgagagggtgaacggacacactgg
 301 aactgagacacggtccagactcctacgggaggcagcagtagggaatattgctcaatgggg
 361 gaaaccctgaagcagcaacgccgcgtggaggatgaaggttttaggattgtaaactccttt
 421 tgttagagaagataatgacggtatctaacgaataagcaccggctaactccgtgccagcag
 481 ccgcggtaatacggagggtgcaagcgttactcggaatcactgggcgtaaagagcgcgtag
 541 gcgggatagtcagtcaggtgtgaaatcctatggcttaaccatagaactgcatttgaaact
 601 actattttagagtgtgggagaggtaggtggaattcttggtgtaggggtaaaatccgtaga
 661 gatcaagaggaatactcattgcgaaggcgacctgctggaacattactgacgctgattgcg
 721 cgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgccctaaacgatgga
 781 tgctagttgttggagggcttagtctctccagtaatgcagctaacgcattaagcatcccgc
 841 ctggggagtacggtcgcaagattaaaactcaaaggaatagacggggacccgcacaagcgg
 901 tggagcatgtggtttaattcgaagatacacgaagaaccttacctaggcttgacattgaga
 961 gaatccgctagaaatagtggagtgtctagcttgctagaccttgaaaacaggtgctgcacg
1021 gctgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaacccccct
1081 ttcttagttgctaacaggtcatgctgagaactctaaggatactgcctccgtaaggaggag
1141 gaaggtggggacgacgtcaagtcatcatggcccttacgcctagggctacacacgtgctac
1201 aatggggtgcacaaagagaagcaatactgcgaagtggagccaatcttcaaaacgcctctc
1261 agttcggattgtaggctgcaactcgcctgcatgaagctggaatcgctagtaatcgcaaat
1321 cagccatgttgcggagaatacgttcccgggtcttgtactcaccgcccgtcacaccatggg
1381 agttgtgttgccttaagtcaggatactaaatag
```

Helicobacter pylori Urease A-Untereinheit (*ureA*-Gen) (Genbank-Nummer: AF479027)

```
   1 atgaaactcaccccaaaagagttagacaagttgatgctccactacgctggagaattagct
  61 aaaaaacgcaaagaaaaaggcattaagcttaactatgtggaagcggtacgtttgattagt
 121 gcacatattatggaagaagcgagagctggtaagaaaagtgcggctgaattgatgcaagaa
 181 gggcgcactcttttaaaaccggatgatgtgatggatggtgtggcaagcatgatccatgaa
 241 gtgggtattgaagcgatgtttcctgatgggaccaaactcgtaaccgtgcataccccctatt
 301 gaggctaatggtaaattggttcctggtgagttgttcttaaaaaatgaagacatcactatc
 361 aacgaaggcaaaaaagccgttagcgtgaaagttaaaaacgtgggcgacagacccgttcaa
 421 atcggttcacacttccatttctttgaagtgaatagatgcctagactttgacagagaaaaa
 481 actttcggcaaacgcttagacattgcgagcgggacagcggtaaggtttgagcctggcgaa
 541 gaaaaatccgtagagttgattgacattggcggtaacagaagaatctttggatttaacgcg
 601 ttggttgataggcaagccgataacgaaagcaaaaaaatcgctttacacagagctaaagag
 661 cgtggttttcatggcgctaaaagcgatgacaactatgtaaaaacaattaaggagtaa
```

Helicobacter pylori katA-Gen (Genbank-Nummer: Z70679)

```
   1 agatcttaaaaacatccaacaactctccttaatctaaaaatttaaaaaaataaaaatcaa
  61 aaaaaaatccgttaaaacattgagatagaatagtatgataattattattaaaaccagatt
 121 aaaaataaaattttgtttttaatctttcttatttttattaattgttacgaatagaaatac
 181 ttaagggggtttttattcttaaaaaaaagatttttaaggaaattgaatcttgttagtc
 241 tttgtataacaaattatgtaataatcaccacaagtaatcagattagtgtcagattacgaa
 301 gttttgaaaccaaataaaggaaagaattatggttaataaagatgtgaaacaaaccactgc
 361 ttttggtgctcccgtttgggatgacaacaatgtgattacggctggccctagaggtcctgt
 421 tttattacaaagcacttggtttttggaaaagttagcggcgtttgacagagaaaggatccc
 481 tgaaagagtggtgcatgctaaaggaagcggggcttatggcactttcactgtgactaaaga
 541 catcactaaatacactaaagcgaaaatttctctaaagtgggcaaaaaaaccgaatgctt
 601 tttcagattttccactgtggctggtgaaagaggcagtgcggatgcggtgagagaccctag
 661 aggttttgcgatgaagtattacactgaagaaggtaactgggatttagtagggaacaacac
 721 gcctgttttctttatccgtgatgcgatcaaattccctgattttcatccacactcaaaaacg
 781 agatcctcaaaccaatttgcctaaccacgacatggtgtgggatttttggagtaatgttcc
 841 tgaaagcttataccaagtaacatgggttatgagcgatagaggtattcctaaatctttccg
 901 ccacatggatggttttggcagccacactttcagtctcatcaacgctaaaggcgaacgctt
 961 ttgggtgaaattccactttcacaccatgcaaggcgttaagcacttgactaatgaagaagc
1021 cgcagaaatcagaaagcatgatcctgattccaatcaaagggatttattcgatgcgatcgc
1081 tagaggggattacccaaaatggaaattgagcattcaagtgatgccagaagaggatgctaa
1141 gaagtatcgattccatccgtttgatgtaactaaaatttggtatacccaagattatccgtt
1201 gatggaagtgggcattgtagagttgaataaaaatcctgaaaactatttcgcagaagtgga
1261 gcaagcagcattcactccggctaatgtcgttcctggaattggctatagccctgataggat
1321 gttacaagggcgtttgttctcttacggggacacacaccgctaccgcttaggggttaatta
1381 ccctcaaataccggttaataaaccaagatgcccattccactcttctagcagagatggtta
1441 catgcaaaacggatactacggctctttacaaaactatacgcctagctcattgcctggcta
1501 taaagaagataagagtgcaagggatcctaagttcaacttagctcatattgagaaagagtt
1561 tgaagtgtggaattgggattacagggctgatgatagcgattactacacccaaccaggtga
1621 ttactaccgctcattgccagctgatgaaaaagaaaggttgcatgacactattggagagtc
1681 tttagctcatgttacccataaggaaattgtggataaacaattggagcatttcaagaaagc
1741 tgaccccaaatacgctgagggagttaaaaaagctcttgaaaaacaccaaaaaatgatgaa
1801 agacatgcatggaaaagacatgcaccacacaaaaaagaaaaagtaaccctttctttaag
1861 cgttcttatttttagggacgctttgtctttcaaaatttaggtttttggatactcatcaa
1921 tcctttggtggtgtgtcctactttttcattcattcaacgaatttaaaaattacaataaag
1981 agttatagttatgaaacgaagggatttattaaaacgactgctttaggcgctacaggtgc
2041 tgttttaggagcacagattttgcaggcagaagaaagcaaagggagtgttgcaaaatataa
2101 aatagaagctcaatacagtattgattttgattctgcagaacacacttcacttttcattcc
2161 catgccgagtgttgtagcgagcaatgtgcatttacaaggcaatcatgccagctataaaag
2221 catgctcaattttggagtgccttatttgcaagtggatttttaaaaagcgctcaaaaaaa
2281 gcaagtccatttgtcttatgagatcgctagctatcaattgaatgagcgtttgtttgaaac
2341 gagcgattttgtagcaatggggcgttatgaaagagacgatgcgagcgtggctaacattgc
2401 caaccagctcaagggaacaacccctaaagaaagcgttcgcaatttttatgcgttcatcaa
2461 gcatgacatgcctaagagacagaaggctttagagggtaaagaaaatttgcctaagcgtga
2521 gagtttgccttggtttgcaaccatttcacaagagagcatgtttgtgtccttatgccatgc
2581 gtgtgggattaaaagcgctgaagtgcaaggcttgaaattgggtcaaaacagcgtggtgaa
2641 aaacgctcctagagtggaagtgtatttgaaagattcatttctagcgtttgattttcaaaa
2701 taaccacaaggaagtctttatcccgttgaatcgtcataaagacatgcaattagatactgc
2761 cttattggcgacttttggcgatgcctttgcccttgtggatggtagggatttaggcaatta
2821 cgagagcaaactttttgaaaaaagagtgtcctatacgattgtctaaaggcatgagattta
2881 ggaatattccttgatagcgggctttcctttttagggagagtttgcaaaaagggtttataa
2941 agggttgtttttatgcgagaatttttttaagaaacttggcacagaatacgcttccaagctg
3001 tttttaatttattggcttagatggatgttgagtgcgttggtgatgctgccttttatggag
3061 gtttttttattatttcaattttccgttgtggctcaatcttttcttggggcaaaccattgga
3121 gcggtgatttttttcaagctagacaagttgatttttctaaaaaatgatttttacaagcc
3181 taaaaagccactaagcttttctcactcttaagcttttgtatttcttaagctttttgag
3241 gaattc
```

Helicobacter pylori napA-Gen (Genbank-Nummer: AY714227)

```
  1 atgaaaacatttgaaattttaaaacattgcaagcggatgcgatcgtgttatttatgaaa
 61 gtgcataacttccattggaatgtgaaaggcaccgatttttccatgtgcataaagccact
121 gaagaaatttatgaagaatttgcggacatgtttgatgatctcgctgaaaggattgttcaa
181 ttaggacaccacccattagtcacttatccgaagcgctcaaactcactcgcgtcaaagaa
241 gaaactaaaacaagcttccactctaaagacatctttaaagaaattctaggcgattacaaa
301 cacctagaaaaagaatttaaagagctctctaacaccgctgaaaaagaaggcgataaagta
361 accgtaacttatgcggacgatcaattagccaagttgcaaaaatccatttggatgctagaa
421 gcccatttggcttaa
```

Helicobacter pylori cagA-Gen (Genbank-Nummer: AB190937)

```
   1 atgactaacgaaactattgaccaacaaccacaaaccgaagtggcttttaacccgcagcaa
  61 tttattaataatcttcaggtagcttttcttaagcttgataacgctgtcgcttcatttgat
 121 cctgatcaaaaaccaattgttgataagaatgatagggataacaggcaagcttttgatgga
 181 atctcgcaattaagggaagaatactccaataaagcgatcaaaaatcctaccaaaaagaat
 241 cagtatttttcagactttatcaataagagcaatgatctaatcaacaaagacaatctcatt
 301 gatgtagaatcttccacaaagagctttcagaaatttggggatcagcgttaccgaattttc
 361 acaagttgggtgtcccatcaaaacgatccgtctaaaatcaacacccgatcgatccgaaat
 421 tttatggaaaatatcatacaaccccctatccctgatgacaaagaaaaagcagagtttttg
 481 aaatctgccaaacaatcttttgcaggaatcattatagggaatcaaatccgaacggatcaa
 541 aagttcatgggcgtgtttgatgaatccttgaaagaaaggcaagaagcagaaaaaaatgga
 601 gggcctactggtggggattggttggatatttttctctcgtttatatttgacaaaaaacaa
 661 tcttctgatgtcaaagaagcaatcaatcaagagccagttccccatgtccaaccagatata
 721 gccactaccaccaccgacatacaaggcttaccgcctgaagctagggatttgcttgatgaa
 781 aggggtaatttttctaaattcactcttggcgatatggaaatgttagatgttgagggcgtc
 841 gccgacattgatcctaattacaagttcaatcaattattgattcacaataacgttctgtct
 901 tctgtgttaatagggagtcataatggcatagaacctgaaaaagtttcattattgtatgcg
 961 ggcaatggtggttttggagccaaacacgattggaacgccaccgttggttataaagaccaa
1021 caaggtaacaatgtggctacaataattaatgtgcatatgaaaaacggcagtggcttagtc
1081 atagcaggtggtgagaaagggattaataatcctagtttttatctctacaaagaagaccaa
1141 ctcacaggctcacaacgagcattgagtcaagaagagatccgaaacaaagtagatttcatg
1201 gaatttcttgcacaaaataatgctaaattagacaacttgagcgagaaagagaaagaaaaa
1261 ttccgaactgagattaaggatttccaaaaagactctaaggcttatttagacgccctaggg
1321 aatgatcgtattgcttttgtttctaaaaaagacccaaaacattcagctttaattactgag
1381 tttggtaatggggattttagctacactctcaaagattatgggaaaaaagcagataaagct
1441 ttagatagggagaaaaatgtcactcttcaaggtagcctaaaacatgatggcgtgatgttt
1501 gttgattattctaatttcaaatacaccaacgcctccaagagtcccaataagggtgtaggc
1561 gttacgaatggcgtttcccatttagaagcaggctttaacaaggtagctgtctttaatttg
1621 cctgatttaaataatctcgctatcactagtttcgtaaggcggaatttagaggataaacta
1681 gtcgctaaaggattgtccccacaagaagctaataagctcatcaaagatttttgagcagc
1741 aacaaagaattggttggaaaagctttaaacttcaataaagctgtagctgaagctaaaaac
1801 acaggcaactatgatgaagtgaaaaaagctcagaaagatcttgaaaaatctctaaggaaa
1861 cgagagcatttagagaaagaagtagagaaaaaattggagagcaaaagcggtaacaaaaac
1921 aaaatggaagcaaaatctcaagctaacagccaaaaagatgggatttttatgttgatcaat
1981 aaagaggctaatagagacgcaagagcaatcgcttacgctcagaatcttaaaggcatcaaa
2041 agggaattgtctgataaacttgaaaatgtcaacaagaatttgaaagactttagtaaatct
2101 tttgatgaattcaaaaatggcaaaaataaggatttcagcaaggcagaagaaacactaaaa
2161 gcccttaaaggctcggtgaaagatttaggtatcaatccagaatggatttcaaaagttgaa
2221 aatcttaatgcagctttgaatgacttcaaaaatggcaaaaataaggatttcagcaaggta
2281 acgcaagcaaaaagcgaccttgaaaattccattaaagatgcgatcttcaatcaaaagata
2341 acggataaagttgatgatctcaatcaagcggtatcagtggctaaagcaacgggtgatttc
2401 agtagggtagagcaagcgttagccgatctcaaaaacttctcaaaggagcaattggctcaa
2461 caagctcaaaaaaatgaaagtctcaatgctggaaaaaaatctgaaatataccaatccgtt
2521 aagaatggtgtgaacggaaccctagtcggtaatggattatctggaatagaggccacagct
2581 ctcgccaaaaatttttcggatatcaagaaagaattgaatgagaaatttaaaaatttcaat
```

```
2641 aacaataataatggtctcaaaaacagcacagaacccatttatgctaaagttaataaaaag
2701 aaaacaggacaagtagctagccctgaagaacccatttatactcaagttgctaaaaaggta
2761 actcaaaaaattgaccaactcaatcaagcagcaagtggtttgggtggtgtagggcaagcg
2821 ggcttccctttgaaaaggcatgataaagttgatgatctcagtaaggtagggcgatcggtt
2881 agccctgaacccatttatgctacgattgatgatctcggcggacctttccctttgaaaagg
2941 catgataaagttgatgatctcagtaaggtagggcgatcggttagccctgaacccatttat
3001 gctacgattgatgatctcggcggacctttccctttgaaaaggcatgataaagttgatgat
3061 ctcagtaaggtagggctttcaaggaatcaagaattggctcagaaaattgacaatctcagt
3121 caagcggtgtcagaagctaaagcaggtttctttggcaatctagagcaaacgatagacaag
3181 ctcaaagattctacaaaacacaatcccatgaatctatgggctgaaagtgcaaaaaaagtg
3241 cctgctagtttgtcagcgaaactagacaattacgctactaacagccacacacgcattaat
3301 agcaatgtccaaaatggagcaatcaatgaaaaagcgaccggcatgctaacgcaaaaaaac
3361 cctgagtggctcaagctcgtgaatgataagatagttgcacataatgtgggaagcgttcct
3421 ttgtcagagtatgataaaattggcttcaaccagaagaatatgaaagattattctgattcg
3481 ttcaagttttccaccaagttgaacaatgctgtaaaagacgttaagtctggctttacgcaa
3541 tttttagccaatgcattttctacaggatattactgcttggcgggggaaaatgcggagcat
3601 ggaatcaaaaatgttaataccaaaggtggtttccaaaaatcttaa
```

Helicobacter pylori vacA-Gen (Genbank-Nummer: AY737319)

```
   1 atggaaatacaacaaacacaccgcaaaatcaatcgccctttggtttctcttgctttagta
  61 ggagcgttagtcagcatcacaccgcaacaaagtcatgccgcctttttcacaaccgtgatc
 121 attccagccattgttggggggatcgctacaggcgctgctgtaggaacggtctcagggctt
 181 cttagctgggggctcaaacaagccgaagaagccaataaaaccccagataaacccgataaa
 241 gtttggcgcattcaagcaggaagaggcttcaataatttcctcacaaggaatacgactta
 301 tacaaatccctttatccagtaagattgatggaggctgggattgggggaatgccgctagg
 361 cattattgggtcaaaggcgggcaatggaacaagcttgaagtggatatgaaagacgctgta
 421 gggacttataaactttcaggcctaatcaactttactggtggggatttagatgtcaatatg
 481 caaaaagccactttgcgcttgggccaattcaatggcaattctttcacaagctataaggat
 541 agtgctgatcgcaccacgagagtggatttcaacgctaaaaatatcttaattgataatttt
 601 ttagaaatcaataatcgtgtgggttctggagccgggaggaaagccagctctacggtttta
 661 actttgcaagcttcagaagggatcactagcagtaaaaacgctgaaatttctctttatgat
 721 ggtgccacgctcaatttggcttcaagcagtgttaaattaatgggtaatgtgtggatgggc
 781 cgtttgcaatacgtgggagcgtatctggccccttcatacagcacgataaacacttcaaaa
 841 gtgacaggggaagtgaattttaaccatctcactgtgggcgatcacaacgctgctcaagca
 901 ggcattatcgctagtaacaagactcatattggcacattggatttgtggcaaagcgcgggg
 961 ctaaacattatcgcccctccagaaggcggttataaggataaacctaaggataaacctagt
1021 aacaccacgcaaaataatgctaacaacaaccaacaaaacagcgctcaaaacaataataac
1081 actcaggttattaacccacccaatagcgcgcaaaaaacagaaattcaacccacgcaagtc
1141 attaatgggccttttgctggtggcaaagacacggtggtcaatatcaaccgcatcaacact
1201 aacgctgatggcacgattagagtgggagggtataaagcttctcttaccaccaatgcggct
1261 catttgcatatcggcaaaggcggtatcaatctgtccaatcaagcgagcgggcgttcttta
1321 ttggtggaaaatctaaccgggaatatcaccgttgatgggcctttaagagtgaataaccaa
1381 gtgggtggttatgctcttgcaggatcaaacgcgaattttgagtttaaggctggcacggat
1441 accaaaaacggcacagccacttttaataacgatattagtttgggaagatttgtgaattta
1501 aaagtggatgctcatacagctaattttaaaggtattgatacgggtaatggtggtttcaac
1561 accttggattttagtggcgttacagacaaagtcaatatcaacaagctcatcacagcttcc
1621 actaatgtggccattaaaaacttcaacattaatgaattgttggttaagaccaatggggtg
1681 agtgtgggggaatacactcattttagcgaagatataggcagtcaatcgcgcatcaacacc
1741 gtgcgtttagaaactggcactaggtcaatcttttctgggggtgtcaaatttaaaagcggc
1801 gaaaaattggttatagatgagttttactatagcccttggaattattttgacgctaggaat
1861 attaaaaatgttgaaatcaccagaaaattcgcttcttcaaccccagaaaacccttggggc
1921 acatcaaaactcatgtttaataatctaaccctgggtcaaaatgcggtcatggactatagt
1981 caattttcaaatttaaccattcagggggattttatcaacaatcaaggcactatcaactat
2041 ctggtccgaggcgggaaagtggcaaccttaaatgtaggcaatgcagcagctatgatgttt
2101 aataatgatatagacagcgcgaccggattttacaaaccgctcatcaagattaacagcgct
2161 caagatctcattaaaaatacagagcatgttttattgaaagcgaaaatcattggttatggt
2221 aatgtttctacaggtaccaattaa
```

Homo sapiens Toll-ähnlicher Rezeptor 2 (TLR2) (Genbank-Nummer: NM003264)

```
   1 cggaggcagcgagaaagcgcagccaggcggctgctcggcgttctctcaggtgactgctcg
  61 gagttctcccagtgtttggtgttgcaagcaggatccaaaggagacctatagtgactccca
 121 ggagctcttagtgaccaagtgaaggtacctgtggggctcattgtgcccattgctctttca
 181 ctgctttcaactggtagttgtgggttgaagcactggacaatgccacatactttgtggatg
 241 gtgtgggtcttgggggtcatcatcagcctctccaaggaagaatcctccaatcaggcttct
 301 ctgtcttgtgaccgcaatggtatctgcaagggcagctcaggatctttaaactccattccc
 361 tcagggctcacagaagctgtaaaaagccttgacctgtccaacaacaggatcacctacatt
 421 agcaacagtgacctacagaggtgtgtgaacctccaggctctggtgctgacatccaatgga
 481 attaacacaatagaggaagattctttttcttccctgggcagtcttgaacatttagactta
 541 tcctataattacttatctaatttatcgtcttcctggttcaagcccctttcttctttaaca
 601 ttcttaaacttactgggaaatccttacaaaaccctaggggaaacatctctttttctcat
 661 ctcacaaaattgcaaatcctgagagtgggaaatatggacaccttcactaagattcaaaga
 721 aaagattttgctggacttaccttccttgaggaacttgagattgatgcttcagatctacag
 781 agctatgagccaaaaagtttgaagtcaattcagaatgtaagtcatctgatccttcatatg
 841 aagcagcatattttactgctggagatttttgtagatgttacaagttccgtggaatgtttg
 901 gaactgcgagatactgatttggacactttccatttttcagaactatccactggtgaaaca
 961 aattcattgattaaaaagtttacatttagaaatgtgaaaatcaccgatgaaagtttgttt
1021 caggttatgaaacttttgaatcagatttctggattgttagaattagagtttgatgactgt
1081 acccttaatggagttggtaattttagagcatctgataatgacagagttatagatccaggt
1141 aaagtggaaacgttaacaatccggaggctgcatattccaaggttttacttattttatgat
1201 ctgagcactttatattcacttacagaaagagttaaaagaatcacagtagaaaacagtaaa
1261 gtttttctggttccttgtttactttcacaacatttaaaatcattagaatacttggatctc
1321 agtgaaaatttgatggttgaagaatacttgaaaaattcagcctgtgaggatgcctggccc
1381 tctctacaaactttaattttaaggcaaaatcatttggcatcattggaaaaaaccggagag
1441 actttgctcactctgaaaaacttgactaacattgatatcagtaagaatagttttcattct
1501 atgcctgaaacttgtcagtggccagaaaagatgaaatatttgaacttatccagcacacga
1561 atacacagtgtaacaggctgcattcccaagacactggaaattttagatgttagcaacaac
1621 aatctcaatttattttctttgaatttgccgcaactcaaagaactttatatttccagaaat
1681 aagttgatgactctaccagatgcctccctcttacccatgttactagtattgaaaatcagt
1741 aggaatgcaataactacgttttctaaggagcaacttgactcatttcacacactgaagact
1801 ttggaagctggtggcaataacttcatttgctcctgtgaattcctctccttcactcaggag
1861 cagcaagcactggccaaagtcttgattgattggccagcaaattacctgtgtgactctcca
1921 tcccatgtgcgtggccagcaggttcaggatgtccgcctctcggtgtcggaatgtcacagg
1981 acagcactggtgtctggcatgtgctgtgctctgttcctgctgatcctgctcacgggggtc
2041 ctgtgccaccgtttccatggcctgtggtatatgaaaatgatgtgggcctggctccaggcc
2101 aaaaggaagcccaggaaagctcccagcaggaacatctgctatgatgcatttgtttcttac
2161 agtgagcgggatgcctactgggtggagaaccttatggtccaggagctggagaacttcaat
2221 ccccccttcaagttgtgtcttcataagcgggacttcattcctggcaagtggatcattgac
2281 aatatcattgactccattgaaaagagccacaaaactgtctttgtgctttctgaaaacttt
2341 gtgaagagtgagtggtgcaagtatgaactggacttctcccatttccgtctttttgatgag
2401 aacaatgatgctgccattctcattcttctggagcccattgagaaaaaagccattccccag
2461 cgcttctgcaagctgcggaagataatgaacaccaagacctacctggagtggcccatggac
2521 gaggctcagcgggaaggattttgggtaaatctgagagctgcgataaagtcctaggttccc
2581 atatttaagaccagtctttgtctagttgggatctttatgtcactagttatagttaagttc
2641 attcagacataattatataaaaactacgtggatgtaccgtcatttgaggacttgcttact
2701 aaaactacaaaacttcaaattttgtctggggtgctgttttataaacatatgccagattta
2761 aaaattggtttttggtttttctttttctatgagataaccatgatcataagtctattact
2821 gatatctgaatatagtcccttggtatccaagggaattggttgcaggatcctcgtggatat
2881 caaaattcatagatgatcaagtcccttataagagtggcatagtatttgcatataacctgt
2941 gtacattctcctgtatactttaaatcatctctagattacttatgatacccaatacaatgt
3001 aaatactatgtaaatagttgtactgtctttttatttatattattattgttatttttatt
3061 ttcaaaatttttaaaacatacttttgatccacagttggttgacttcatggatgcagaacc
3121 catggatatagagggccaactgtaatctgtagcaactggcttagttcattaggaaacagc
3181 acaaatgaacttaagattctcaatgactgtgtcattctttcttcctgctaagagactcct
3241 ctgtggccacaaaaggcattctctgtcctacctagctgtcacttctctgtgcagctgatc
3301 tcaagagcaacaaggcaaagtatttggggcactccccaaaacttgttgctattcctagaa
3361 aaaagtgctgtgtatttcctattaaactttacaggatgagaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

Homo sapiens Toll-ähnlicher Rezeptor 4 (Genbank-Nummer: BC025294)

```
   1 gaaactgctcggtcagacgtggatagcgagccacgcattcacagggccactgctgctcac
  61 agaagcagtgaggatgatgccaggatgatgtctgcctcgcgcctggctgggactctgatc
 121 ccagccatggccttcctctcctgcgtgagaccagaaagctgggagccctgcgtggaggtg
 181 tgaaatccagacaattgaagatggggcatatcagagcctaagccacctctctaccttaat
 241 attgacaggaaaccccatccagagtttagccctgggagccttttctggactatcaagttt
 301 acagaagctggtggctgtggagacaaatctagcatctctagagaacttccccattggaca
 361 tctcaaaactttgaaagaacttaatgtggctcacaatcttatccaatctttcaaattacc
 421 tgagtatttttctaatctgaccaatctagagcacttggacctttccagcaacaagattca
 481 aagtatttattgcacagacttgcgggttctacatcaaatgcccctactcaatctctcttt
 541 agacctgtccctgaaccctatgaactttatccaaccaggtgcatttaaagaaattaggct
 601 tcataagctgactttaagaaataattttgatagtttaaatgtaatgaaaacttgtattca
 661 aggtctggctggtttagaagtccatcgtttggttctgggagaatttagaaatgaaggaaa
 721 cttggaaaagtttgacaaatctgctctagagggcctgtgcaatttgaccattgaagaatt
 781 ccgattagcatacttagactactacctcgatgatattattgacttatttaattgtttgac
 841 aaatgtttcttcattttccctggtgagtgtgactattgaaagggtaaaagacttttctta
 901 taatttcggatggcaacatttagaattagttaactgtaaatttggacagtttcccacatt
 961 gaaactcaaatctctcaaaaggcttactttcacttccaacaaaggtgggaatgctttttc
1021 agaagttgatctaccaagccttgagtttctagatctcagtagaaatggcttgagtttcaa
1081 aggttgctgttctcaaagtgattttgggacaaccagcctaaagtatttagatctgagctt
1141 caatggtgttattaccatgagttcaaacttcttgggcttagaacaactagaacatctgga
1201 tttccagcattccaatttgaaacaaatgagtgagttttcagtattcctatcactcagaaa
1261 cctcatttaccttgacatttctcatactcacaccagagttgctttcaatggcatcttcaa
1321 tggcttgtccagtctcgaagtcttgaaaatggctggcaattctttccaggaaaacttcct
1381 tccagatatcttcacagagctgagaaacttgaccttcctggacctctctcagtgtcaact
1441 ggagcagttgtctccaacagcatttaactcactctccagtcttcaggtactaaatatgag
1501 ccacaacaacttcttttcattggatacgtttccttataagtgtctgaactccctccaggt
1561 tcttgattacagtctcaatcacataatgacttccaaaaaacaggaactacagcattttcc
1621 aagtagtctagctttcttaaatcttactcagaatgactttgcttgtacttgtgaacacca
1681 gagtttcctgcaatggatcaaggaccagaggcagctcttggtggaagttgaacgaatgga
1741 atgtgcaacaccttcagataagcagggcatgcctgtgctgagtttgaatatcacctgtca
1801 gatgaataagaccatcattggtgtgtcggtcctcagtgtgcttgtagtatctgttgtagc
1861 agttctggtctataagttctattttcacctgatgcttcttgctggctgcataaagtatgg
1921 tagaggtgaaaacatctatgatgcctttgttatctactcaagccaggatgaggactgggt
1981 aaggaatgagctagtaaagaatttagaagaaggggtgcctccatttcagctctgccttca
2041 ctacagagactttattcccggtgtggccattgctgccaacatcatccatgaaggtttcca
2101 taaaagccgaaaggtgattgttgtggtgtcccagcacttcatccagagccgctggtgtat
2161 ctttgaatatgagattgctcagacctggcagtttctgagcagtcgtgctggtatcatctt
2221 cattgtcctgcagaaggtggagaagaccctgctcaggcagcaggtggagctgtaccgcct
2281 tctcagcaggaacacttacctggagtgggaggacagtgtcctggggcggcacatcttctg
2341 gagacgactcagaaaagccctgctggatggtaaatcatggaatccagaaggaacagtggg
2401 tacaggatgcaattggcaggaagcaacatctatctgaagaggaaaaataaaaacctcctg
2461 aggcatttcttgcccagctgggtccaacacttgttcagttaataagtattaaatgctgcc
2521 acatgtcaggccttatgctaagggtgagtaattccatggtgcactagatatgcagggctg
2581 ctaatctcaaggagcttccagtgcagagggaataaatgctagactaaaatacagagtctt
2641 ccaggtgggcatttcaaccaactcagtcaaggaacccatgacaaagaaagtcatttcaac
2701 tcttacctcatcaagttgaataaagacagagaaaacagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
2761 aa
```

Homo sapiens Toll-ähnlicher Rezeptor 9 (TLR9) (Genbank-Nummer: NM138688)

```
   1 tggtgaactgcaactggctgttcctgaagtctgtgccccacttctccatggcagcacccc
  61 gtggcaatgtcaccagcctttccttgtcctccaaccgcatccaccacctccatgattctg
 121 actttgcccacctgcccagcctgcggcatctcaacctcaagtggaactgcccgccggttg
 181 gcctcagccccatgcacttcccctgccacatgaccatcgagcccagcaccttcttggctg
 241 tgcccaccctggaagagctaaacctgagctacaacaacatcatgactgtgcctgcgctgc
 301 ccaaatccctcatatccctgtccctcagccataccaacatcctgatgctagactctgcca
```

```
 361 gcctcgccggcctgcatgccctgcgcttcctattcatggacggcaactgttattacaaga
 421 acccctgcaggcaggcactggaggtggccccgggtgccctccttggcctgggcaacctca
 481 cccacctgtcactcaagtacaacaacctcactgtggtgccccgcaacctgccttccagcc
 541 tggagtatctgctgttgtcctacaaccgcatcgtcaaactggcgcctgaggacctggcca
 601 atctgaccgccctgcgtgtgctcgatgtgggcggaaattgccgccgctgcgaccacgctc
 661 ccaacccctgcatggagtgccctcgtcacttcccccagctacatcccgataccttcagcc
 721 acctgagccgtcttgaaggcctggtgttgaaggacagttctctctcctggctgaatgcca
 781 gttggttccgtgggctgggaaacctccgagtgctggacctgagtgagaacttcctctaca
 841 aatgcatcactaaaaccaaggccttccagggcctaacacagctgcgcaagcttaacctgt
 901 ccttcaattaccaaaagagggtgtcctttgcccacctgtctctggccccttccttcggga
 961 gcctggtcgccctgaaggagctggacatgcacggcatcttcttccgctcactcgatgaga
1021 ccacgctccggccactggcccgcctgcccatgctccagactctgcgtctgcagatgaact
1081 tcatcaaccaggcccagctcggcatcttcagggccttccctggcctgcgctacgtggacc
1141 tgtcggacaaccgcatcagcggagcttcggagctgacagccaccatgggggaggcagatg
1201 gaggggagaaggtctggctgcagcctggggaccttgctccggccccagtggacactccca
1261 gctctgaagacttcaggcccaactgcagcaccctcaacttcaccttggatctgtcacgga
1321 acaacctggtgaccgtgcagccggagatgtttgcccagctctcgcacctgcagtgcctgc
1381 gcctgagccacaactgcatctcgcaggcagtcaatggctcccagttcctgccgctgaccg
1441 gtctgcaggtgctagacctgtcccacaataagctggacctctaccacgagcactcattca
1501 cggagctaccacgactggaggccctggacctcagctacaacagccagccctttggcatgc
1561 agggcgtgggccacaacttcagcttcgtggctcacctgcgcaccctgcgccacctcagcc
1621 tggcccacaacaacatccacagccaagtgtcccagcagctctgcagtacgtcgctgcggg
1681 ccctggacttcagcggcaatgcactgggccatatgtgggccgagggagacctctatctgc
1741 acttcttccaaggcctgagcggtttgatctggctggacttgtcccagaaccgcctgcaca
1801 ccctcctgccccaaaccctgcgcaacctccccaagagcctacaggtgctgcgtctccgtg
1861 acaattacctggccttctttaagtggtggagcctccacttcctgcccaaactggaagtcc
1921 tcgacctggcaggaaaccagctgaaggccctgaccaatggcagcctgcctgctggcaccc
1981 ggctccggaggctggatgtcagctgcaacagcatcagcttcgtggcccccggcttctttt
2041 ccaaggccaaggagctgcgagagctcaaccttagcgccaacgccctcaagacagtggacc
2101 actcctggtttgggcccctggcgagtgccctgcaaatactagatgtaagcgccaaccctc
2161 tgcactgcgcctgtggggcggcctttatggacttcctgctggaggtgcaggctgccgtgc
2221 ccggtctgcccagccgggtgaagtgtggcagtccgggccagctccagggcctcagcatct
2281 ttgcacaggacctgcgcctctgcctggatgaggccctctcctgggactgtttcgccctct
2341 cgctgctggctgtggctctgggcctgggtgtgcccatgctgcatcacctctgtggctgggg
2401 acctctggtactgcttccacctgtgcctggcctggcttccctggcgggggcggcaaagtg
2461 ggcgagatgaggatgccctgccctacgatgccttcgtggtcttcgacaaaacgcagagcg
2521 cagtggcagactgggtgtacaacgagcttcgggggcagctggaggagtgccgtgggcgct
2581 gggcactccgcctgtgcctggaggaacgcgactggctgcctggcaaaaccctctttgaga
2641 acctgtgggcctcggtctatggcagccgcaagacgctgtttgtgctggcccacacggacc
2701 gggtcagtggtctcttgcgcgccagcttcctgctggcccagcagcgcctgctggaggacc
2761 gcaaggacgtcgtggtgctggtgatcctgagccctgacggccgccgctcccgctatgtgc
2821 ggctgcgccagcgcctctgccgccagagtgtcctcctctggccccaccagcccagtggtc
2881 agcgcagcttctgggcccagctgggcatggccctgaccagggacaaccaccacttctata
2941 accggaacttctgccagggacccacggccgaatagccgtgagccggaatcctgcacggtg
3001 ccacctccacactcacctcacctctgcctgcctggtctgaccctcccctgctcgcctccc
3061 tcaccccacacctgacacagagcaggcactcaataaatgctaccgaaggc
```

10.2 Sequenzen weiterer verwendeter Oligonukleotide

Kapitel 7.5.3

p22^{phox} forward: 5'-GGCGCTTCACCCAGTGGTACTTTGG-3'

p22^{phox} reverse: 5'-TAGGTAGATGCCGCTCGCAATGGC-3'

p47^{phox} forward: 5'-CTCCCAGCTCCCAAGTGGTTTGACG-3'

p47^{phox} reverse: 5'-TCTTCTCGTAGTCGGCAATGGGGC -3'

p67^{phox} forward: 5'-GGAGTGTGTCTGGAAGCAG-3'

p67^{phox} reverse: 5'-AGTGTGTAGGGCATGGGAAC-3'

cox2 forward: 5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3'

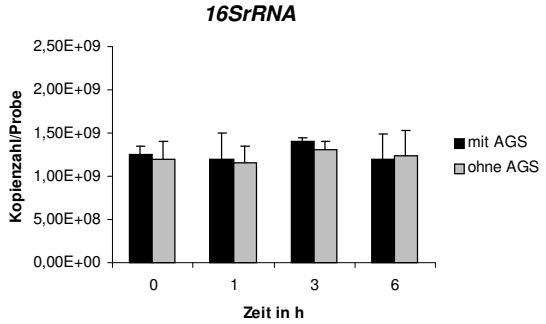
cox2 reverse: 5'-AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3'

5-LO forward: 5'-GAAGACCTGATGTTTGGCTACC-3'

5-LO reverse: 5'-AGGGTTCTCATCTCCCGG-3'

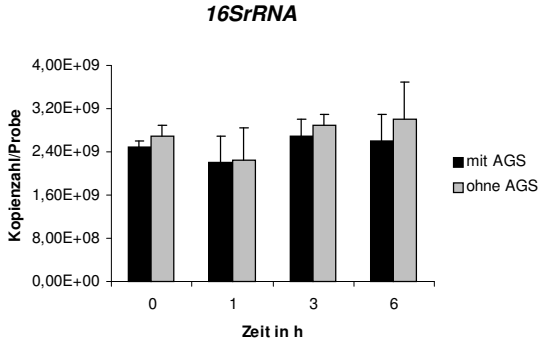
10.3 Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl der *H.pylori*-Gene während der Infektion mit AGS-Zellen durch Echtzeit-PCR

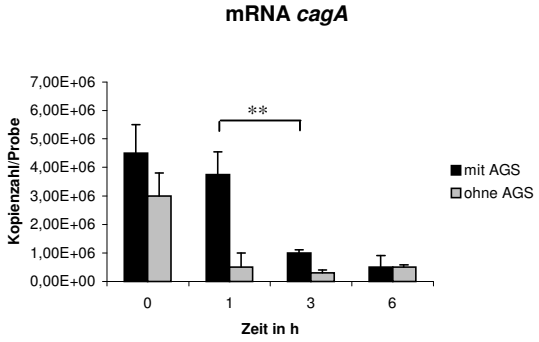
H. pylori-Stamm P1

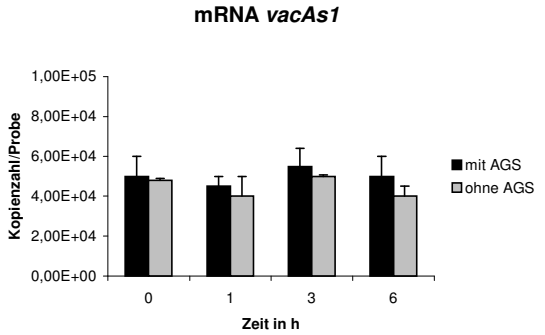


Die mRNA-Expression der Gene *napA*, *katA* und *cagA* des Stammes P1 sind im Ergebnisteil Kapitel 7.2.2 in der Abb. 7.4 D,E und G dargestellt.Die mRNA der Gene *ureA* und *vacAs1* bzw. *vacAs2* sind negativ.

H. pylori-Stamm P12

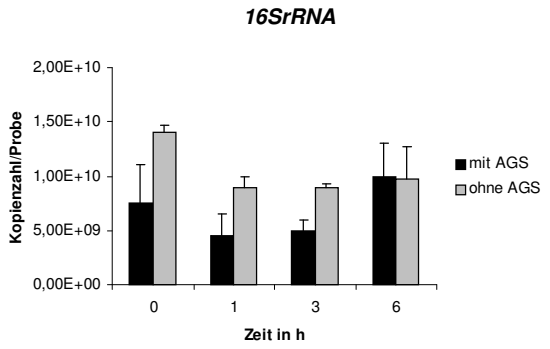


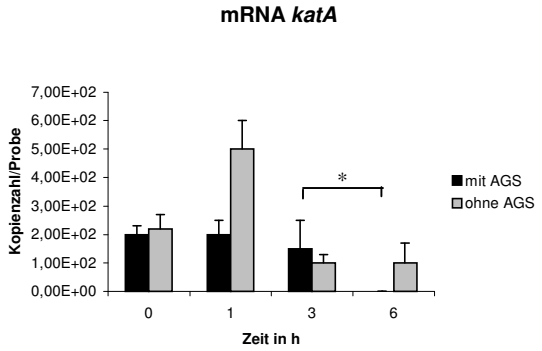


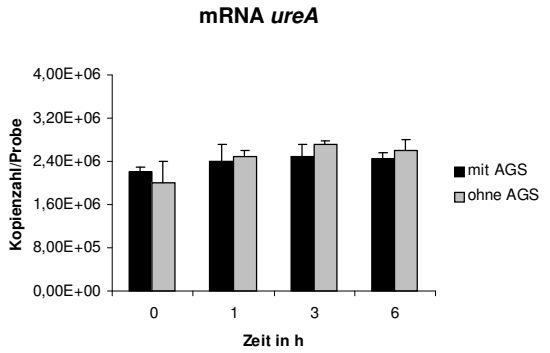


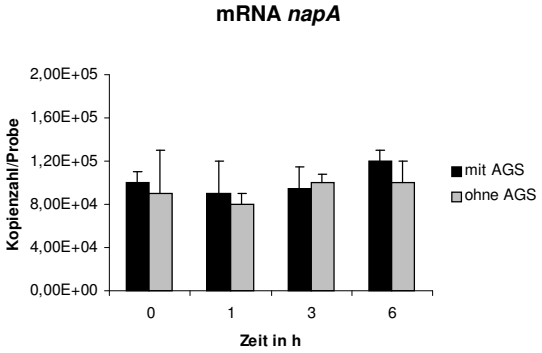
Die mRNA-Expression des Gens *ureA* des Stammes P12 ist im Ergebnisteil Kapitel 7.2.2 in der Abb. 7.4 H dargestellt. Die mRNA der Gene *napA* und *katA* sind negativ.

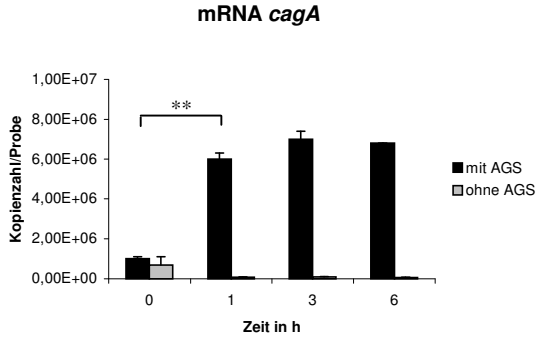
***H. pylori*-Stamm P303**





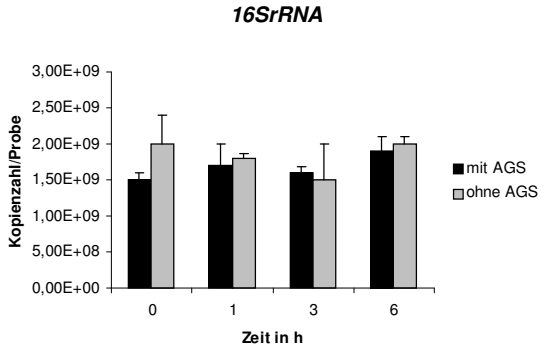


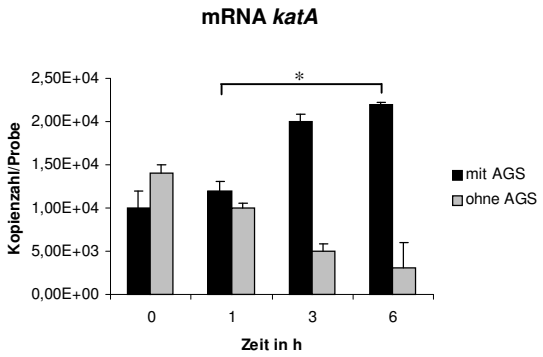


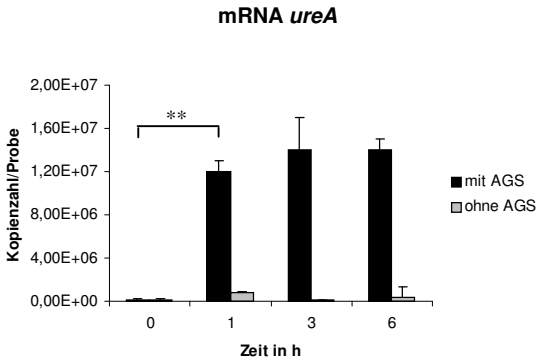


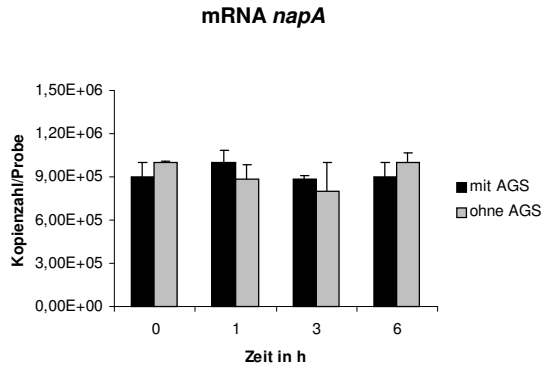
Die mRNA-Expression des Gens *vacAs2* des Stammes P303 ist im Ergebnisteil Kapitel 7.2.2 in der Abb. 7.4 B dargestellt.

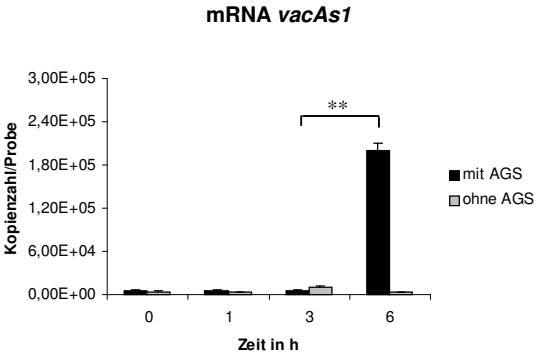
***H. pylori*-Stamm P284**





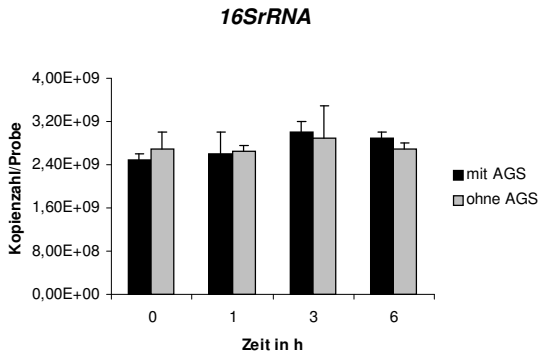


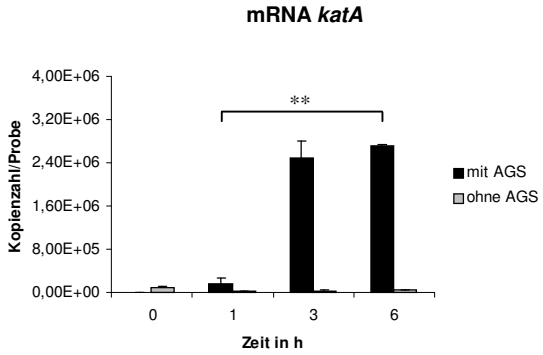


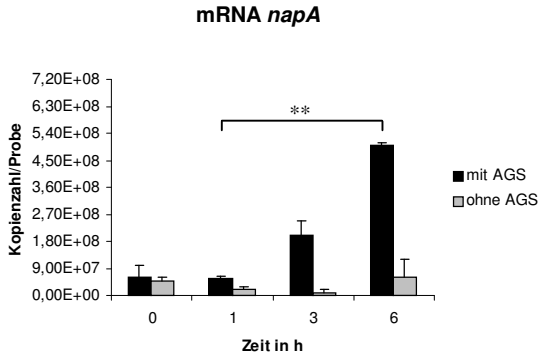


Die mRNA-Expression des Gens *cagA* des Stammes P284 ist negativ.

H. pylori-Stamm P1280

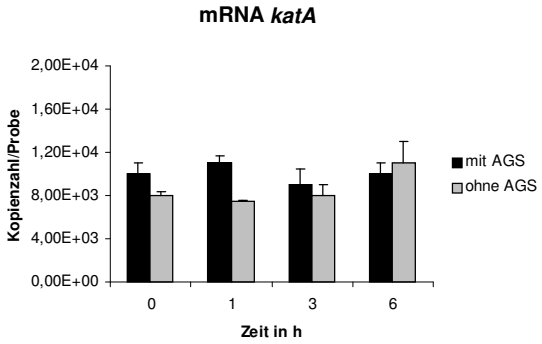


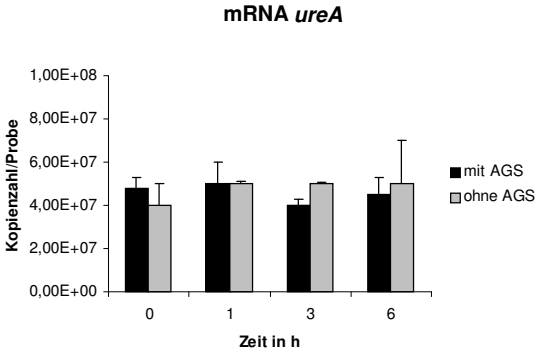


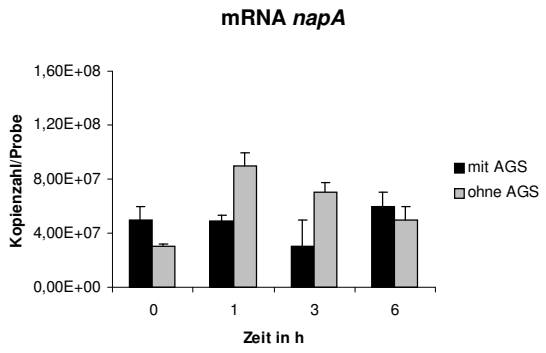


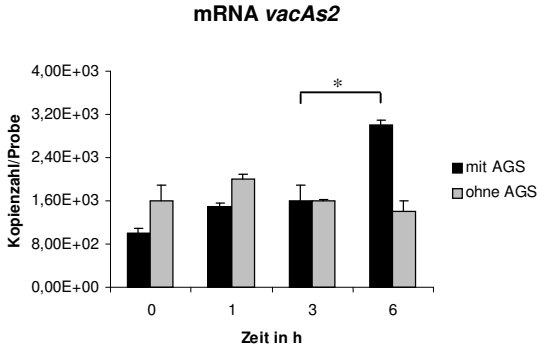
Die mRNA-Expression der Gene *ureA*, *cagA*, *vacAs1* bzw. *vacAs2* des Stammes P1280 sind negativ.

H. pylori-Stamm P1288



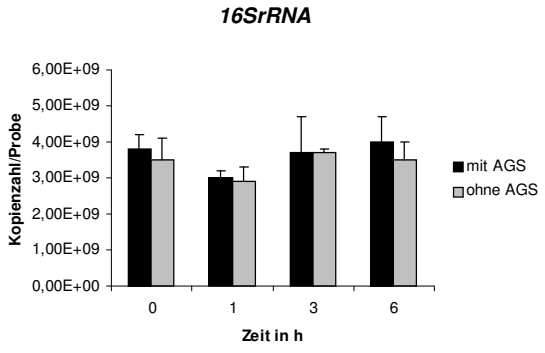


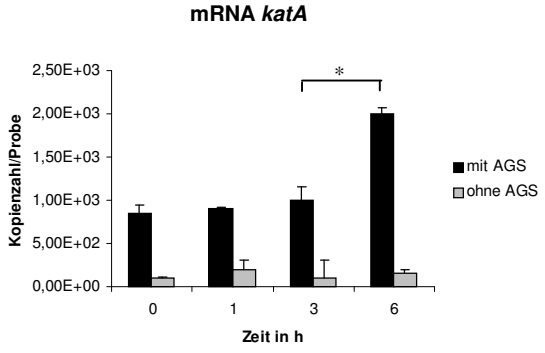


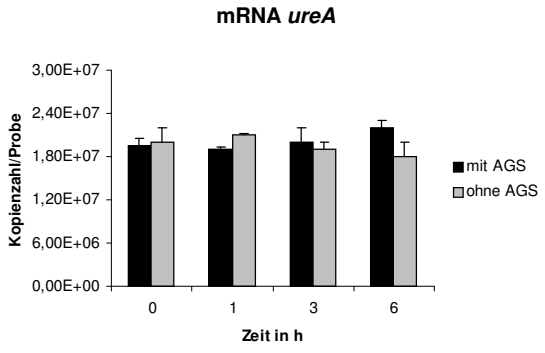


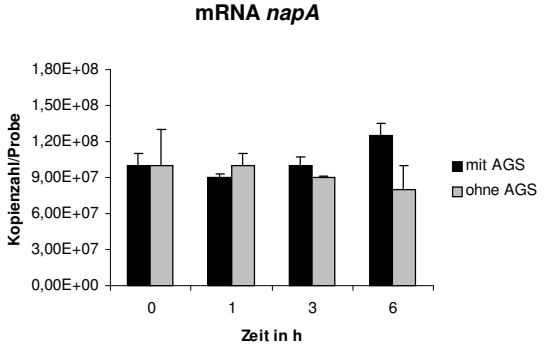
Die Expression des 1*6SrRNA*-Gens des Stammes P1288 ist im Ergebnisteil Kapitel 7.2.2 in der Abb. 7.4 A dargestellt. Die mRNA des Gens *cagA* ist negativ.

***H. pylori*-Stamm P1303**



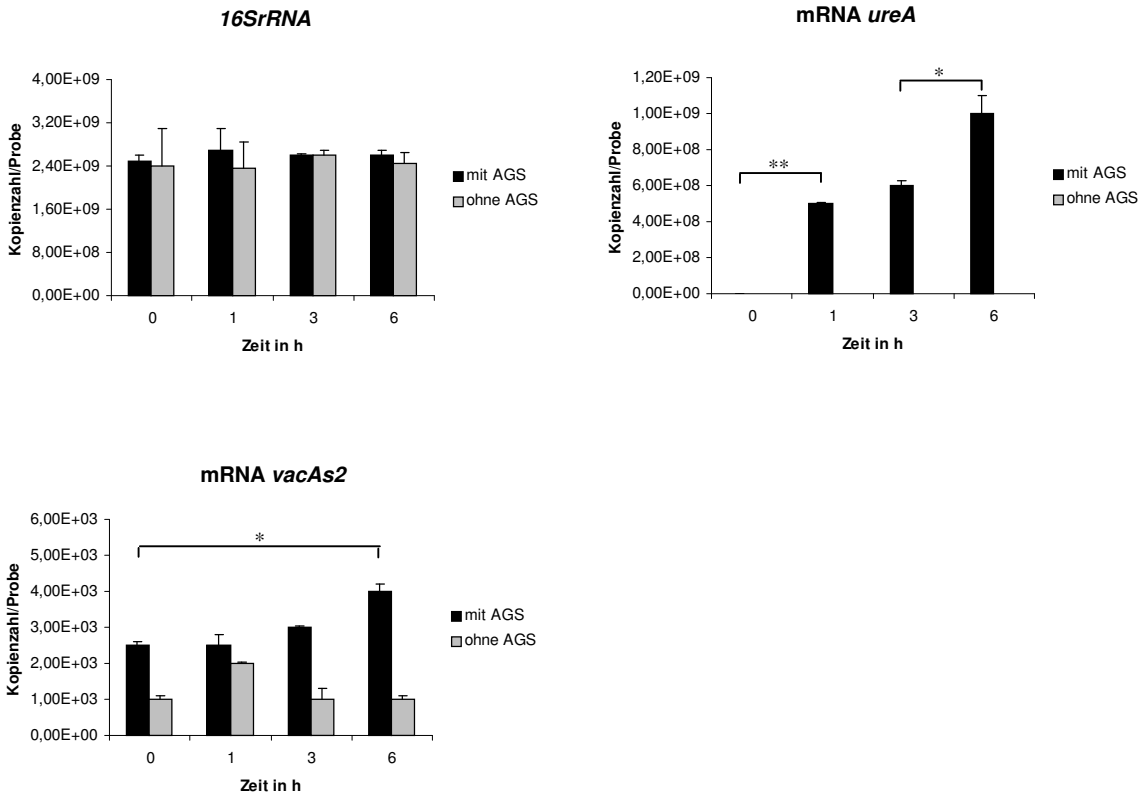






Die mRNA-Expression der Gene *cagA* und *vacAs1* bzw. *vacAs2* des Stammes P1303 sind negativ.

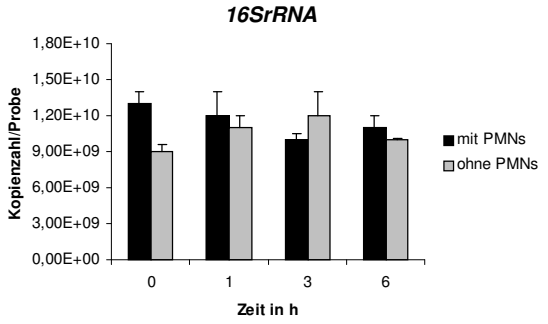
***H. pylori*-Stamm P1321**

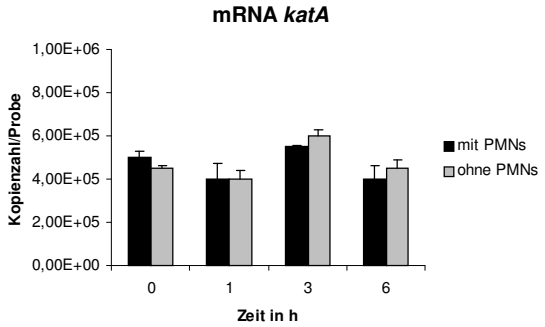


Die mRNA-Expression der Gene *napA und katA* des Stammes P1321 sind im Ergebnisteil Kapitel 7.2.2 in der Abb. 7.4 C und F dargestellt. Die mRNA des Gens *cagA ist* negativ.

10.4 Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl der *H.pylori*-Gene während der Infektion mit PMNs durch Echtzeit-PCR

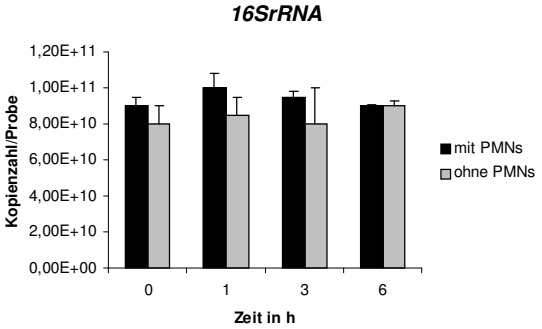
H. pylori-Stamm P1

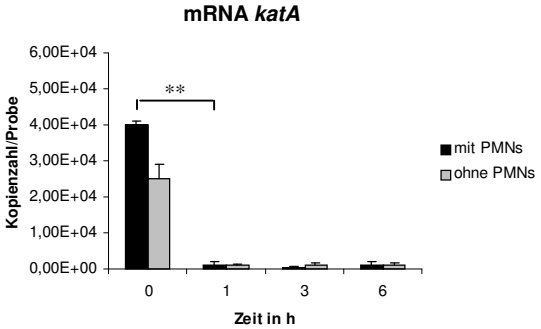


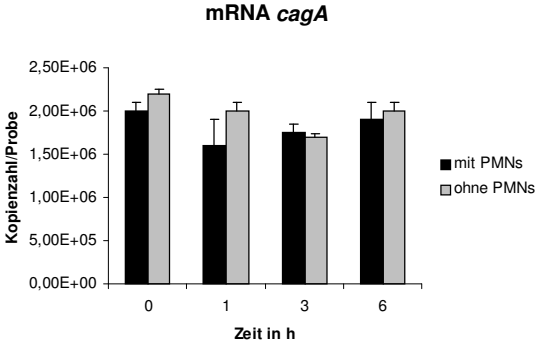


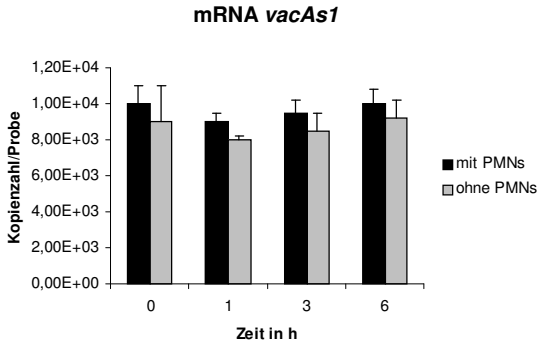
Die mRNA-Expression der Gene *napA und cagA* des Stammes P1 sind im Ergebnisteil Kapitel 7.2.3 in der Abb. 7.5 B und H dargestellt. Die mRNA der Gene *ureA* und *vacAs1* bzw. *vacAs2* sind negativ.

H. pylori-Stamm P12



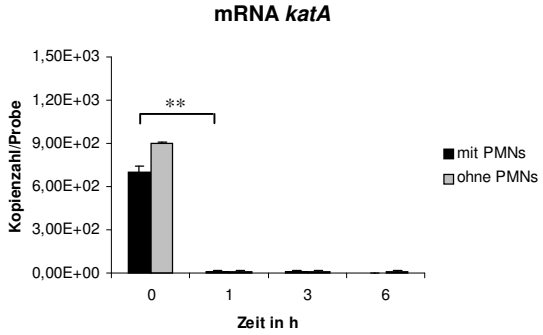


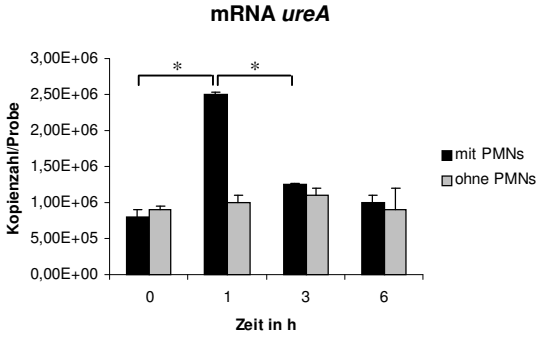


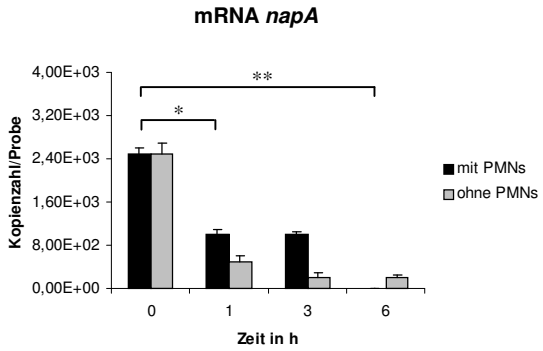


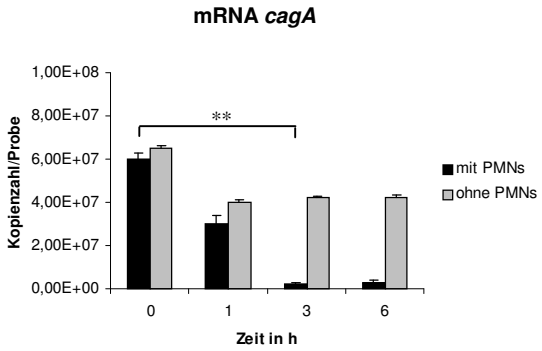
Die mRNA-Expression des Gens *ureA* des Stammes P12 ist im Ergebnisteil Kapitel 7.2.3 in der Abb. 7.5 E dargestellt. Die mRNA des Gens *napA* ist negativ.

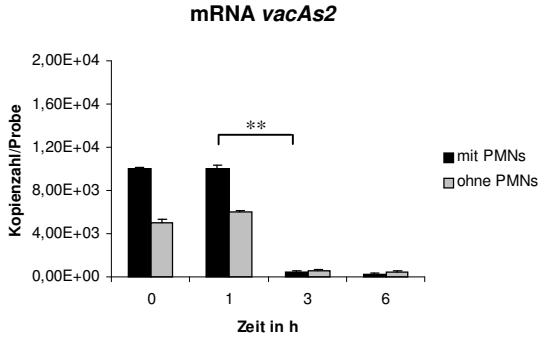
***H. pylori*-Stamm P303**





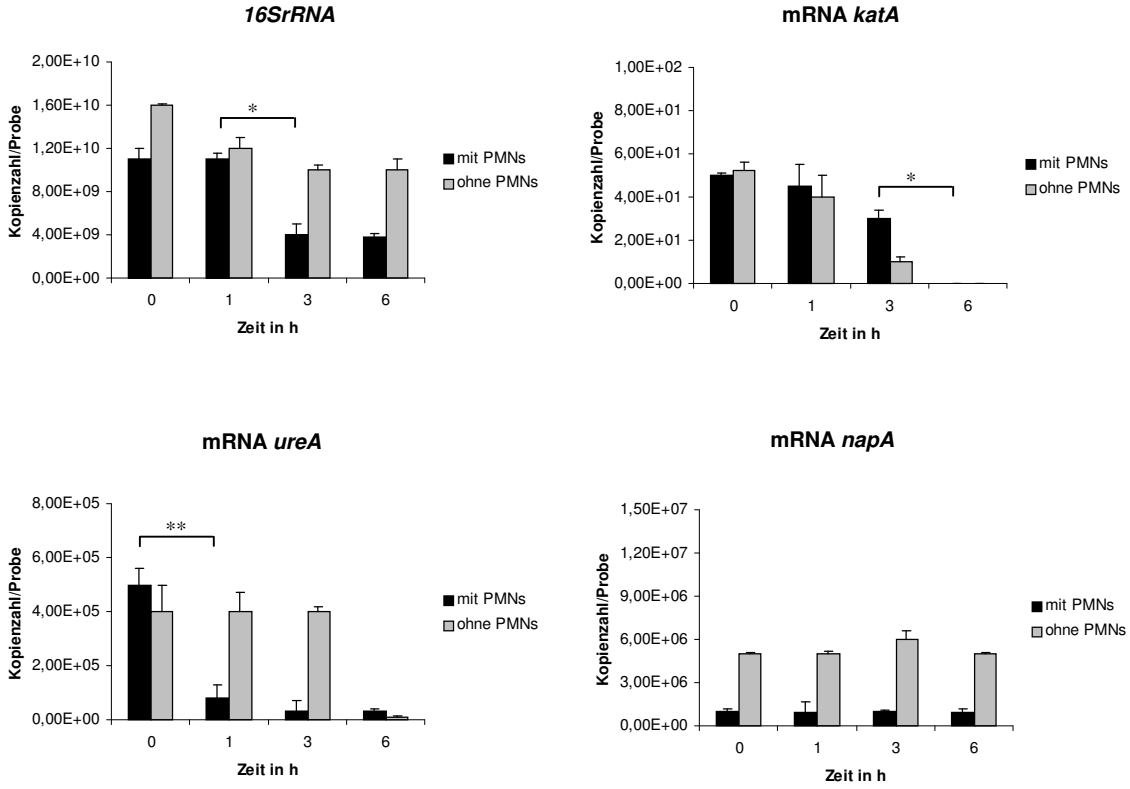






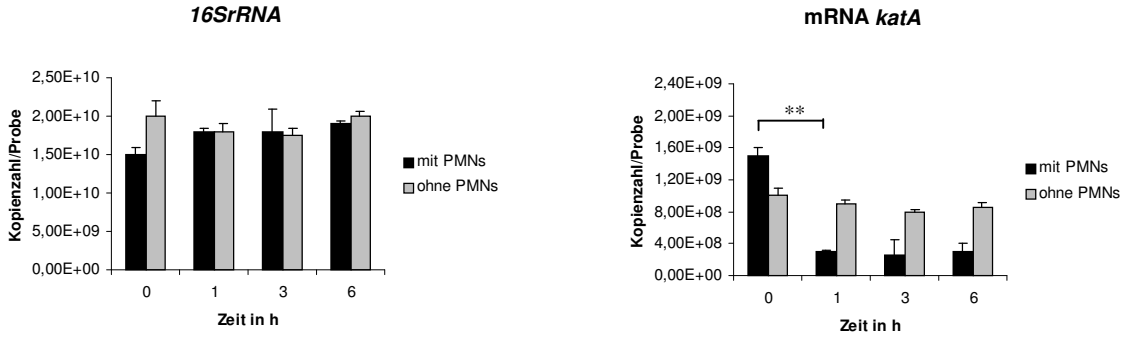
Die Expression des *16SrRNA*-Gens des Stammes P303 ist im Ergebnisteil Kapitel 7.2.3 in der Abb. 7.5 A dargestellt.

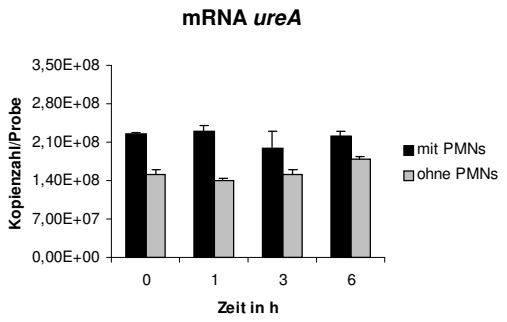
H. pylori-Stamm P284

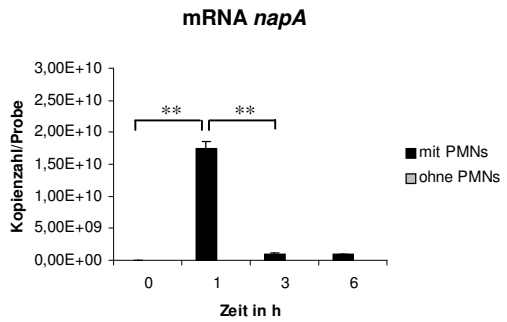


Die mRNA-Expression des Gens *vacAs1* des Stammes P284 ist im Ergebnisteil Kapitel 7.2.3 in der Abb. 7.5 C dargestellt. Die mRNA des Gens *cagA* ist negativ.

H. pylori-Stamm P1280

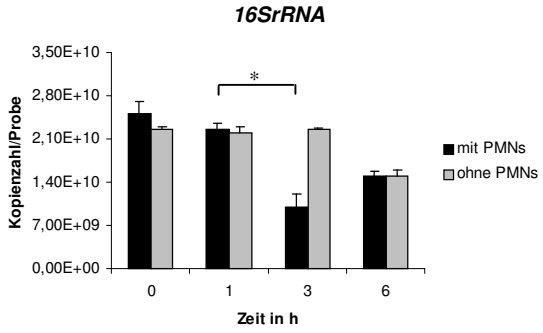


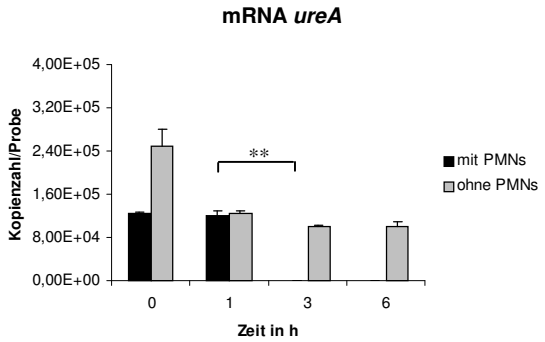


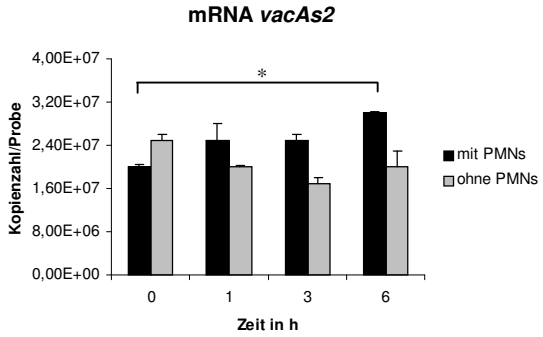


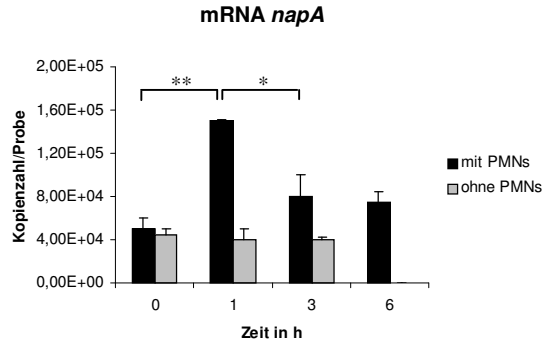
Die mRNA-Expression der Gene *cagA* und *vacAs1* bzw. *vacAs2* des Stammes P1280 sind negativ.

***H. pylori*-Stamm P1288**



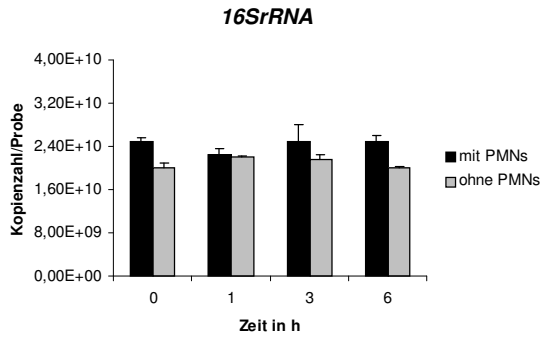


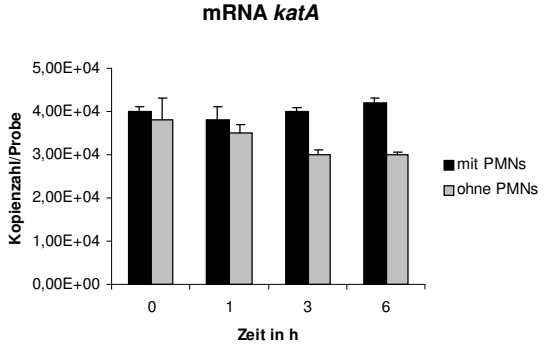


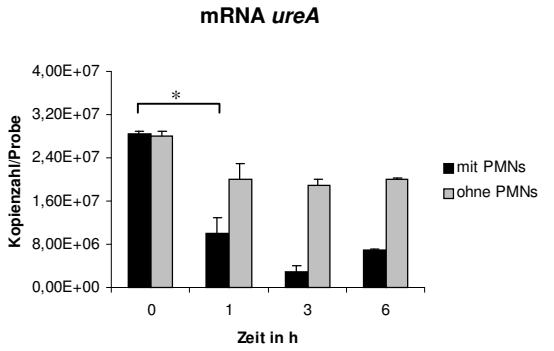


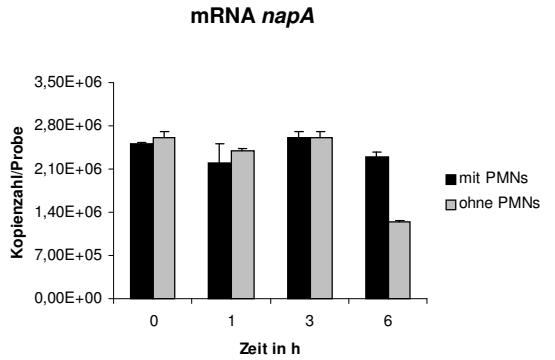
Die mRNA-Expression des Gens *katA* des Stammes P1288 ist im Ergebnisteil Kapitel 7.2.3 in der Abb. 7.5 G dargestellt. Die mRNA des Gens *cagA* ist negativ.

H. pylori-Stamm P1303



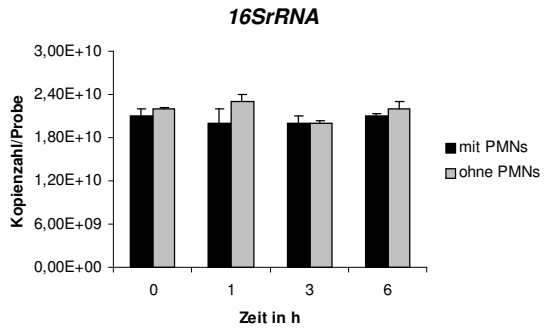


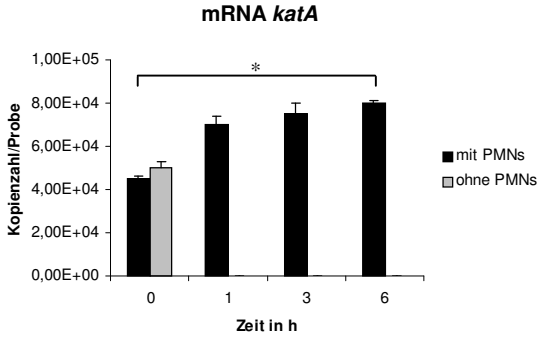


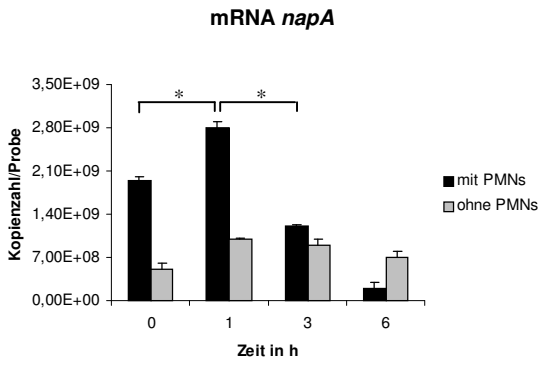


Die mRNA-Expression der Gene *cagA* und *vacAs1* bzw. *vacAs2* des Stammes P1303 sind negativ.

H. pylori-Stamm P1321



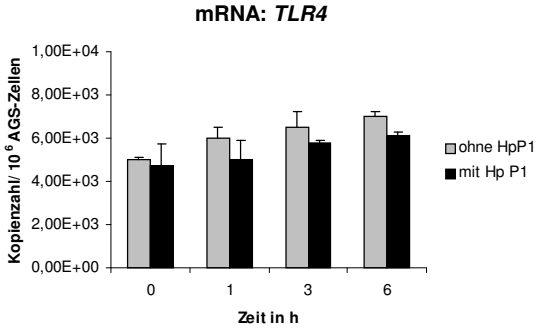




Die mRNA-Expression der Gene *vacAs2* und *ureA* des Stammes P1321 sind im Ergebnisteil Kapitel 7.2.3 in der Abb. 7.5 D und F dargestellt. Die mRNA des Gens *cagA* ist negativ.

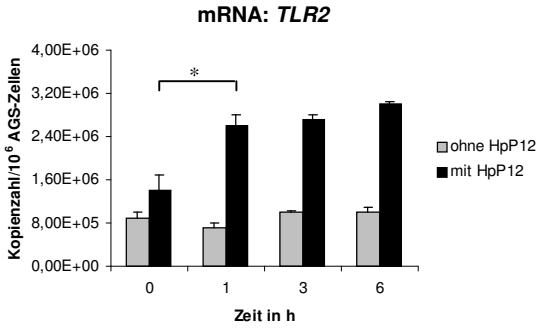
10.5 Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) an AGS-Zellen während Infektion mit *H. pylori* durch Echtzeit-PCR

AGS / *H.pylori*-Stamm P1



Die mRNA-Expression der Gene *TLR2* und *TLR9* durch AGS-Zellen während der Infektion mit dem Stamm P1 sind im Ergebnisteil Kapitel 7.3.4 in der Abb. 7.9 A und E dargestellt.

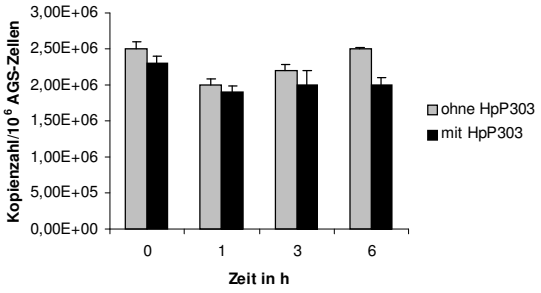
AGS / *H.pylori*-Stamm P12



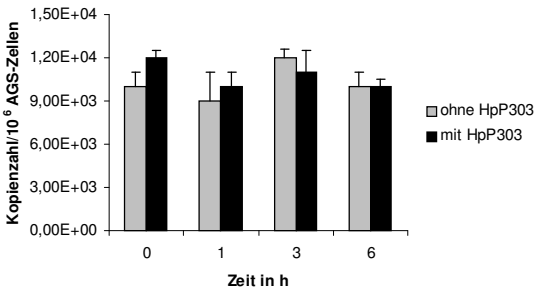
Die mRNA-Expression der Gene *TLR4* und *TLR9* durch AGS-Zellen während der Infektion mit dem Stamm P12 sind im Ergebnisteil Kapitel 7.3.4 in der Abb. 7.9 C und F dargestellt.

AGS / *H.pylori*-Stamm P303

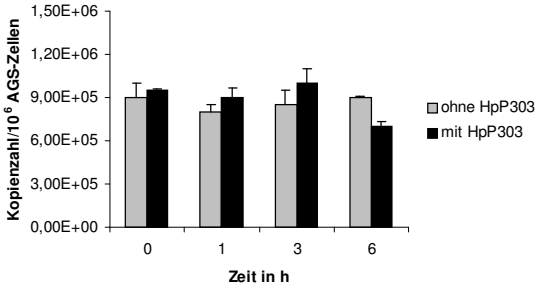
mRNA: *TLR2*



mRNA: *TLR4*

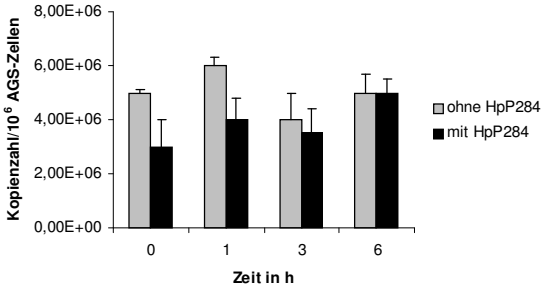


mRNA: *TLR9*

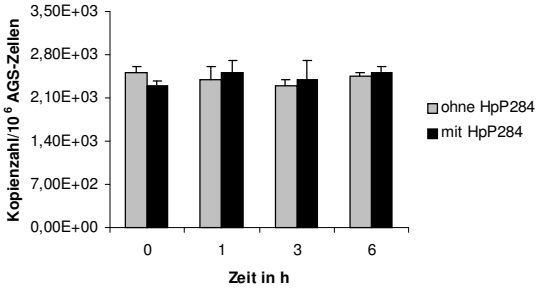


AGS / *H.pylori*-Stamm P284

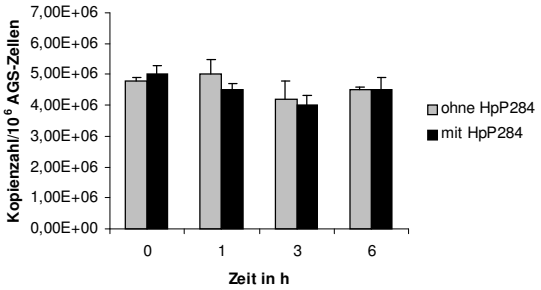
mRNA: *TLR2*



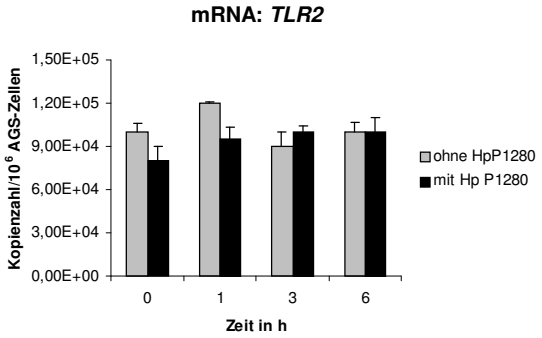
mRNA: *TLR4*

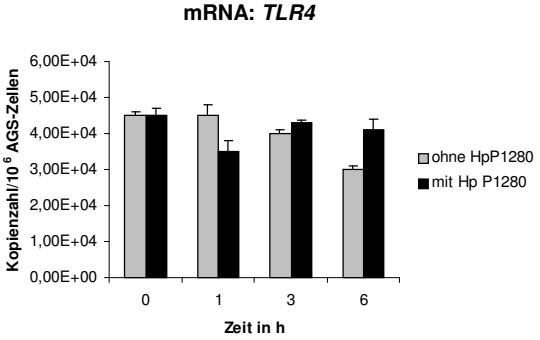


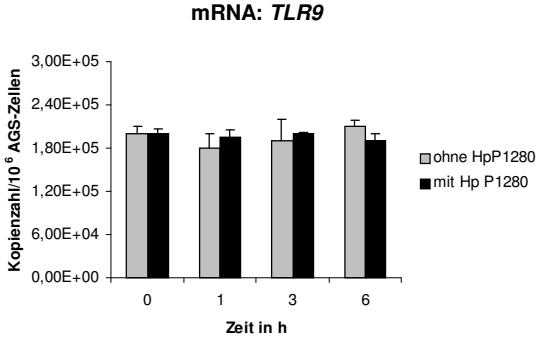
mRNA: *TLR9*



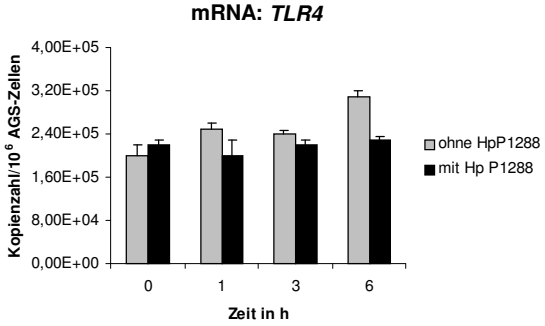
AGS / *H.pylori*-Stamm P1280

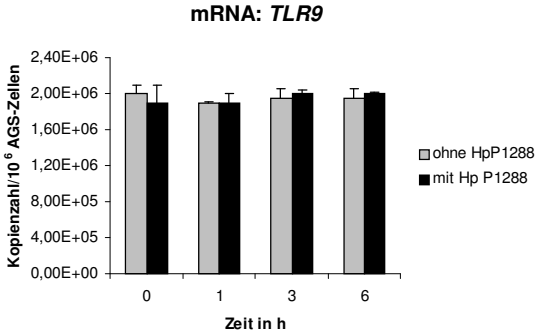






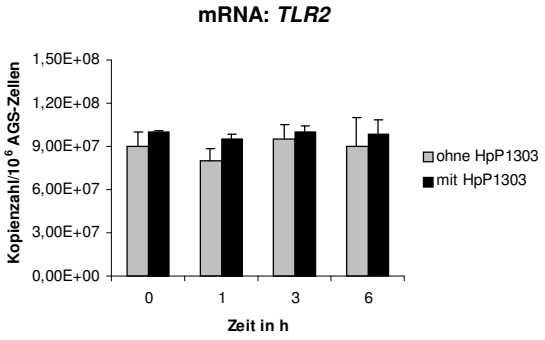
AGS / *H.pylori*-Stamm P1288

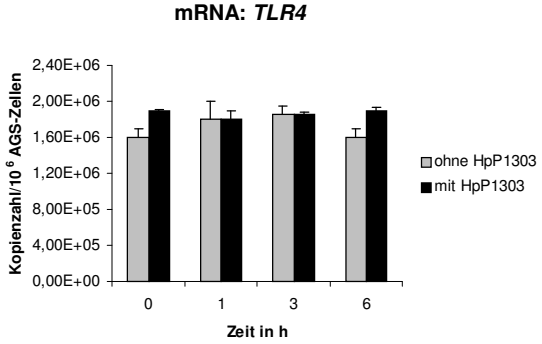


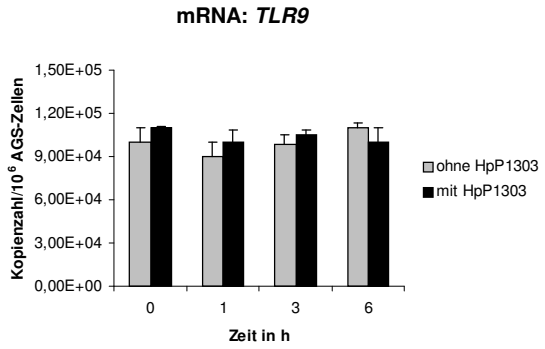


Die mRNA-Expression des Gens *TLR2* durch AGS-Zellen während der Infektion mit dem Stamm P1288 ist im Ergebnisteil Kapitel 7.3.4 in der Abb. 7.9 B dargestellt.

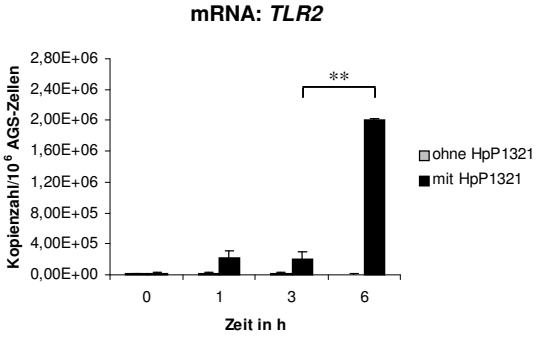
AGS / *H.pylori*-Stamm P1303

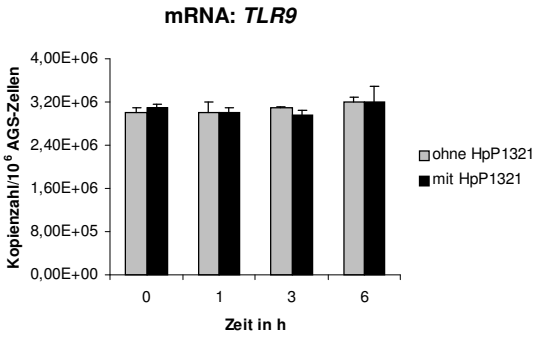






AGS / *H.pylori*-Stamm P1321

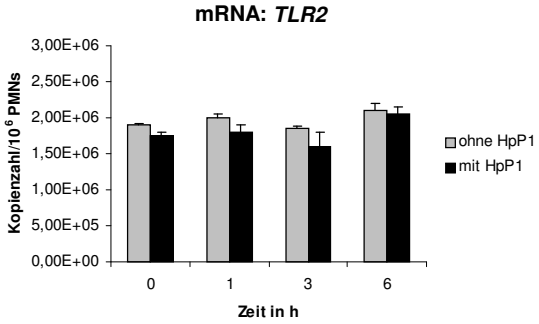


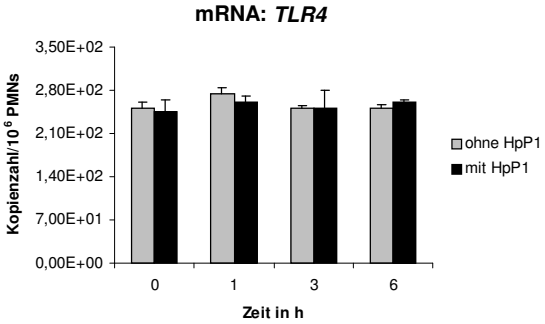


Die mRNA-Expression des Gens *TLR4* durch AGS-Zellen während der Infektion mit dem Stamm P1321 ist im Ergebnisteil Kapitel 7.3.4 in der Abb. 7.9 D dargestellt.

10.6 Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) an PMNs während Infektion mit *H. pylori* durch Echtzeit-PCR

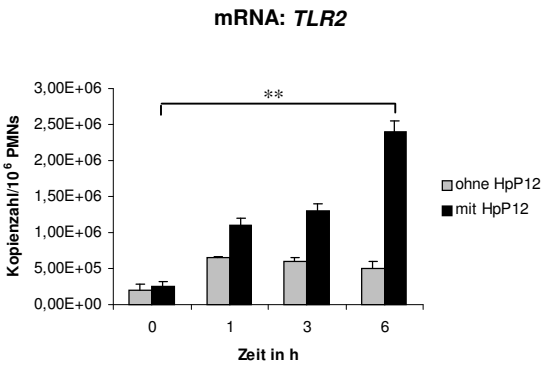
PMNs / *H.pylori*-Stamm P1

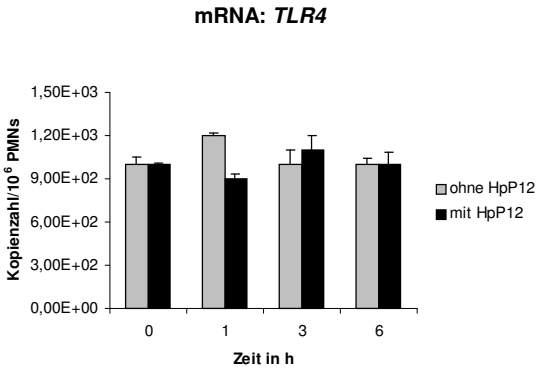




Die mRNA-Expression des Gens *TLR9* durch PMNs während der Infektion mit dem Stamm P1 ist im Ergebnisteil Kapitel 7.4.4 in der Abb. 7.16 E dargestellt.

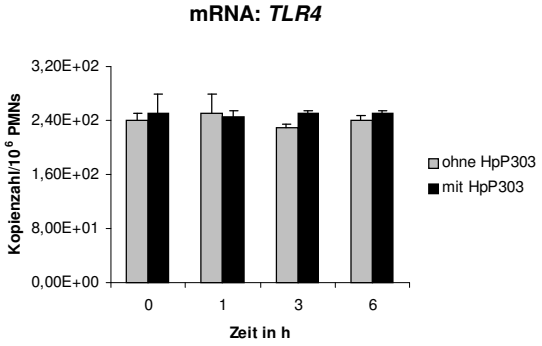
PMNs / *H.pylori*-Stamm P12

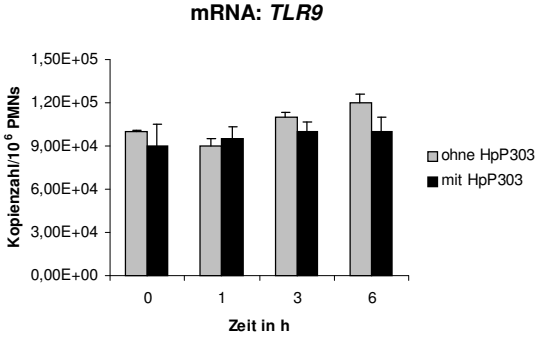




Die mRNA-Expression des Gens *TLR9* durch PMNs während der Infektion mit dem Stamm P12 ist im Ergebnisteil Kapitel 7.4.4 in der Abb. 7.16 F dargestellt.

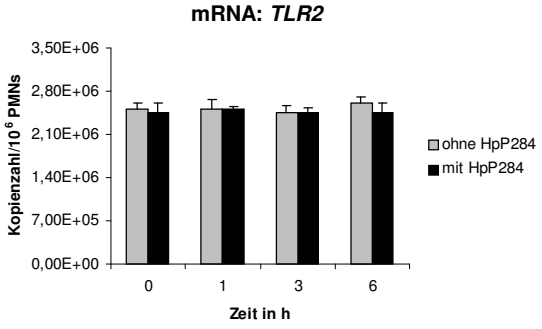
PMNs / *H.pylori*-Stamm P303

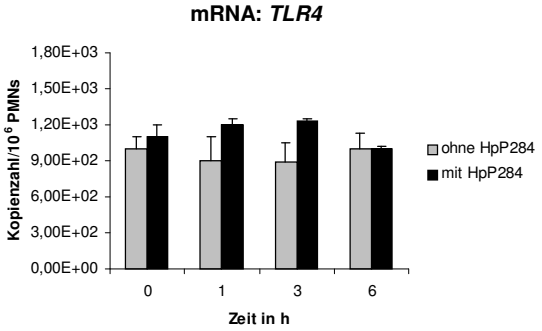


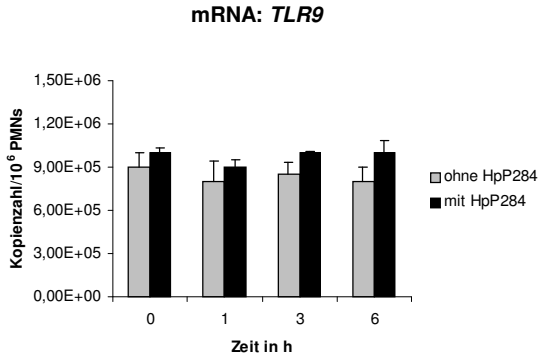


Die mRNA-Expression des Gens *TLR2* durch PMNs während der Infektion mit dem Stamm P303 ist im Ergebnisteil Kapitel 7.4.4 in der Abb. 7.16 A dargestellt.

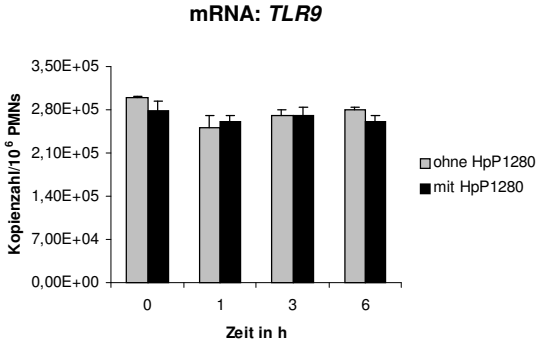
PMNs / *H.pylori*-Stamm P284





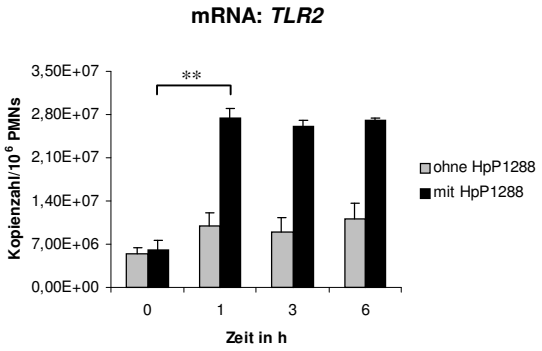


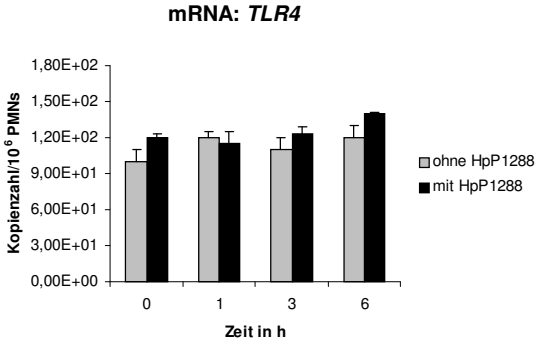
PMNs / *H.pylori*-Stamm P1280

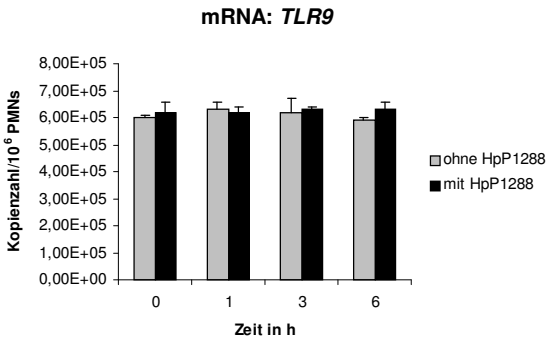


Die mRNA-Expression der Gene *TLR2* und *TLR4* durch PMNs während der Infektion mit dem Stamm P1280 sind im Ergebnisteil Kapitel 7.4.4 in der Abb. 7.16 B und C dargestellt.

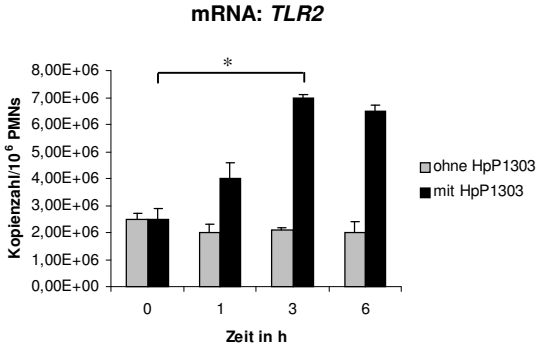
PMNs / *H.pylori*-Stamm P1288

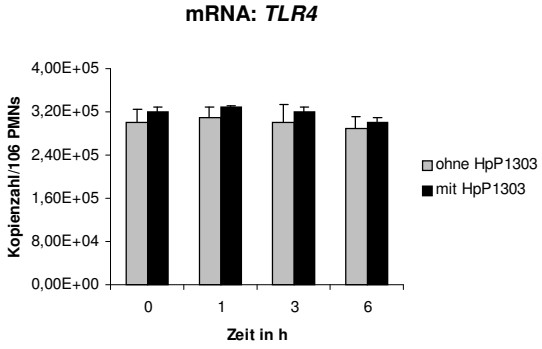






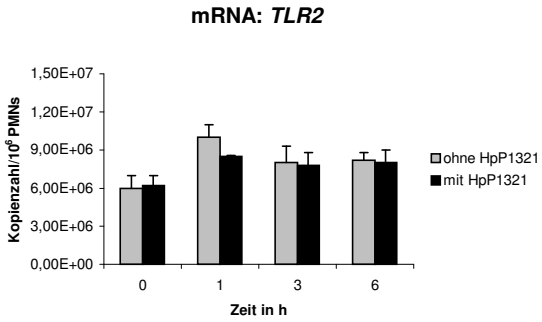
PMNs / *H.pylori*-Stamm P1303

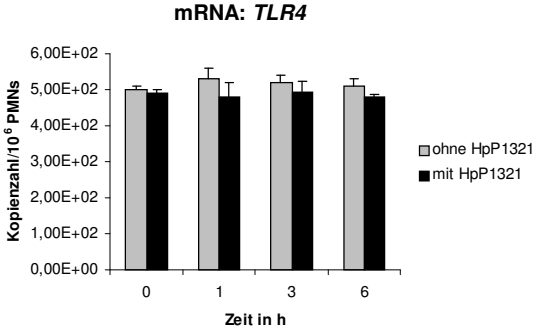


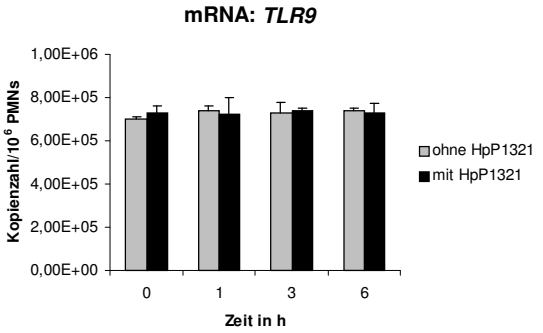


Die mRNA-Expression des Gens *TLR4* durch PMNs während der Infektion mit dem Stamm P1303 ist im Ergebnisteil Kapitel 7.4.4 in der Abb. 7.16 D dargestellt.

PMNs / *H.pylori*-Stamm P1321







11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Menschen bedanken, die beim Zustandekommen der vorliegenden Arbeit einen Beitrag geleistet haben:

Zuerst möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinischen Mikrobiologie für die herzliche Aufnahme und die angenehme Atmosphäre danken.

Besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang König für die Überlassung des Themas, der Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und das tägliche Interesse am Fortgang der Forschungsarbeiten danken.

Herrn Dr. rer. nat. Steffen Backert danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Ohne sein Interesse am Fortgang der Forschungsarbeiten, seine allzeit offene Tür, sowie die hilfreichen Hinweise bei der Laborarbeit, der Bereitschaft mit seinem Wissen zur Seite zu stehen und der kritischen Durchsicht bei der Abfassung dieser Schrift wäre die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. med. Peter Malfertheiner als Vertreter der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg möchte ich für die Begutachtung meiner Dissertation danken. Mein Dank gilt außerdem Prof. Rainer Haas, der als externer Gutachter zur Verfügung stand.

Ein großer Dank gilt den fleißigen Heinzelmännchen des Labors 334: Dana Zabler und Diana Schmidt für ihre ständige Hilfsbereitschaft im Laboralltag. Lysann Hamel möchte ich für die Einführung in die *Helicobacter*-Welt danken. Mein Dank geht auch an Anita Marquardt und Huong Vu Thi Than für die Hilfe in der Herstellung von Nährmedien und Agar-Platten und Herrn Kraska gebührt mein Dank für die stetige Hilfe bei technischen Problemen.

Wenn auch die Arbeit im Labor so manches Mal zu laut ausgesprochenen Flüchen geführt hat, so war es doch eine schöne Zeit im Labor 334, denn ihr wart ja da. Ihr, Sabine Brandt und Gosia Krause, meine Leidensgenossinnen und Mitdoktorandinnen, die ihr das gleiche Schicksal durchleidet oder durchlitten habt. Ich danke euch für das angenehme Arbeitsklima und den Spaß den wir bei der Arbeit

hatten, die offenen Ohren, die fachliche Unterstützung und notwendigen Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Großeltern, für ihre Zuneigung, ihre moralische Unterstützung und das sie es stets geschafft haben, mich aus den unzähligen Tälern der Zweifel herauszuholen.

12. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Steffi Gieseler
Geburtsdatum	18.10.1975
Geburtsort	Burg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Adresse	Mehringstrasse 25 39114 Magdeburg
E-mail	steffigieseler@web.de

Schulische Ausbildung

1982 - 1990	Polytechnische Oberschule „Ernst Thälmann“ Königsborn
1990 - 1991	Oberschule „Hans Schellheimer“ Magdeburg
1991 - 1994	Europagymnasium Gommern Abschluss Abitur

Hochschulausbildung

1994 - 2001	Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Abschluss Diplom

Praktika

August / September 1997	Praktikum Gewässermikrobiologie UFZ - Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH / Sektion Gewässerforschung Magdeburg

Promotion

seit August 2001	Institut für Medizinische Mikrobiologie / Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg Thema der Promotionsarbeit: „Molekulare Mechanismen der *Helicobacter pylori*-Infektion: die Rolle von gastrischen Epithelzellen und Granulozyten“

Magdeburg, den 25.10.2005

Steffi Gieseler

13. Publikationsliste

Gieseler, S., König, B., König, W. und Backert, S. (2005) Strain-specific expression profiles of virulence genes in *Helicobacter pylori* during infection of gastric epithelial cells and granulocytes. *Microbes Infect.* **7**, 437-447.

14. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema „Molekulare Mechanismen der *Helicobacter pylori*-Infektion: Rolle von gastrischen Epithelzellen und Granulozyten“ selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 25.10.2005