

**Die Funktion des vakuolisierenden Cytotoxins (VacA) und
die Prozessierung des Cytotoxin-assoziierten Antigens (CagA)
von *Helicobacter pylori* in Immunzellen**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

Bettina Gebert

November 2003

Dissertation eingereicht am: 25. November 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 09. März 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Böck

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Boshart

Teile dieser Arbeit sind oder werden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Odenbreit S.*, Gebert B.*, Püls J., Fischer W., and R. Haas. 2001. Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the *cag* pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell. Microbiol.* **3**: 21-31.

Fischer W., Püls J., Buhrdorf R., Gebert B., Odenbreit S., and R. Haas. 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**: 1337-48.

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

Fischer W., Gebert B., and R. Haas. 2003. Novel activities of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: from epithelial cells towards the immune system. *Int. J. Med. Microbiol.* (im Druck)

Gebert B., Fischer W., Weiss E., and R. Haas. Different domains of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin are responsible for vacuolating activity and inhibition of IL-2 transcription (in Vorbereitung)

Weitere Publikationen im Promotionszeitraum, die nicht in der Arbeit enthalten sind:

Rüssmann H., Adler K., Haas R., Gebert B., Koletzko S., and J. Heesemann. 2001. Rapid and accurate determination of genotypic clarithromycin resistance in cultured *Helicobacter pylori* by fluorescent in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 4142-4.

Krauss-Etschmann S., Sammler E., Koletzko S., Konstantopoulos N., Aust D., Gebert B., Luckow B., Reinhardt D., and D.J. Schendel. 2003. Chemokine receptor 5 expression in gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected and noninfected children. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**: 22-9.

* beide Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| I | EINLEITUNG | 1 |
| 1 | Epidemiologie und Pathogenese der <i>H. pylori</i>-Infektion..... | 1 |
| 2 | Virulenzfaktoren von <i>H. pylori</i>..... | 2 |
| 3 | Die <i>cag</i>-Pathogenitätsinsel und das vakuolisierende Zytotoxin VacA..... | 3 |
| 3.1 | Die Rolle von CagA in eukaryontischen Zellen | 4 |
| 3.2 | Das vakuolisierende Zytotoxin: Sekretionsmechanismus und Funktion in der Wirtszelle | 5 |
| 4 | Humorale und zelluläre Immunantwort bei einer <i>H. pylori</i>-Infektion | 8 |
| 5 | Ziel der Arbeit | 10 |
| II | MATERIAL UND METHODEN..... | 11 |
| 1 | Material | 11 |
| 1.1 | Zelllinien..... | 11 |
| 1.2 | Bakterienstämme | 11 |
| 1.3 | Viren | 13 |
| 1.4 | Plasmide | 13 |
| 1.5 | Oligonukleotide | 14 |
| 1.6 | Antikörper..... | 15 |
| 1.7 | Zellkulturmedien und -puffer | 16 |
| 1.8 | Antibiotika, Zusätze und allgemeine Lösungen..... | 16 |
| 1.9 | Chemikalien und Reagenzien..... | 17 |
| 1.10 | Proteine und Enzyme | 17 |
| 1.11 | Molekulargewichtsmarker..... | 17 |
| 1.12 | Hilfsmittel | 18 |
| 1.13 | Apparaturen und Geräte..... | 18 |
| 2 | Methoden | 19 |
| 2.1 | Arbeiten mit Bakterien | 19 |

| | | |
|---------|-------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.1 | Kultur von Bakterien..... | 19 |
| 2.1.2 | Transformation von Bakterien | 19 |
| 2.1.2.1 | Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen..... | 19 |
| 2.1.2.2 | Transformation | 20 |
| 2.1.2.3 | Transformation von <i>E. coli</i> Top10-Zellen | 20 |
| 2.1.2.4 | Transformation von <i>H. pylori</i> | 20 |
| 2.2 | Arbeiten mit DNA | 20 |
| 2.2.1 | DNA-Gelelektrophorese | 20 |
| 2.2.2 | DNA-Fragmentisolierung..... | 21 |
| 2.2.3 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 21 |
| 2.2.4 | Klonierung von PCR-Produkten mittels TOPO-TA-Cloning® | 22 |
| 2.2.5 | Restriktion..... | 22 |
| 2.2.6 | Zentrifugationsentsalzung | 22 |
| 2.2.7 | Ligation | 23 |
| 2.2.8 | Präparation von Plasmiden | 23 |
| 2.2.8.1 | Isolierung von Plasmid-DNA nach Holmes und Quigley | 23 |
| 2.2.8.2 | Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA mit Quiagen-Säulen..... | 23 |
| 2.2.9 | Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Helicobacter pylori</i> | 23 |
| 2.3 | Arbeiten mit Protein..... | 24 |
| 2.3.1 | Proteinbestimmung nach Bradford | 24 |
| 2.3.2 | Herstellung bakterieller Zellysate | 24 |
| 2.3.3 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 24 |
| 2.3.4 | Western Blot | 25 |
| 2.3.4.1 | Transfer der Proteine auf die Membran | 25 |
| 2.3.4.2 | Detektion von Proteinen mittels polyklonaler Antikörper | 25 |
| 2.3.4.3 | Detektion von Proteinen mittels monoklonaler Antikörper | 26 |
| 2.3.5 | Immunpräzipitation..... | 26 |
| 2.3.6 | Aufkonzentrierung von Bakterien-Kulturüberständen | 26 |
| 2.3.7 | Reinigung und Aktivierung von VacA | 26 |
| 2.3.8 | <i>In vitro</i> -Phosphorylierung | 27 |

| | | |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.9 | <i>In vitro</i> -Proteolyse mit Calpain | 27 |
| 2.4 | Arbeiten mit Zellen und Zellkulturen | 27 |
| 2.4.1 | Kultivierung von Zelllinien | 27 |
| 2.4.1.1 | Kultur von Jurkat T-Zellen | 27 |
| 2.4.1.2 | Kultur von J774A.1-Makrophagen | 27 |
| 2.4.1.3 | Kultur von HeLa- und AGS-Zellen | 28 |
| 2.4.1.4 | Kultur von NHG-1 Zellen | 28 |
| 2.4.2 | Aufreinigung von Peripheren Blutlymphozyten (PBLC) | 28 |
| 2.4.3 | Isolierung von CD4 ⁺ T-Zellen | 28 |
| 2.4.4 | Isolierung von dendritischen Zellen | 29 |
| 2.4.5 | Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer | 29 |
| 2.4.6 | Test von gefällten Bakterien-Kulturüberständen auf Vakuolisierung von Jurkat T-Zellen | 29 |
| 2.4.7 | Bestimmung der Proliferation von Jurkat T-Zellen bzw. PBLC | 30 |
| 2.4.8 | Messung der IL-2-Produktion von T-Zellen mittels Sandwich-ELISA..... | 30 |
| 2.4.9 | Analyse von apoptotischen Zellen mit dem CaspACE TM FITC-VAD-FMK <i>In situ</i> Marker..... | 30 |
| 2.4.10 | Färbung von Oberflächenproteinen für die Durchflusszytometrie | 31 |
| 2.4.10.1 | CD25..... | 31 |
| 2.4.10.2 | CD69..... | 31 |
| 2.4.11 | Transfektion von Jurkat T-Zellen..... | 31 |
| 2.4.12 | Messung der Luciferase-Aktivität | 31 |
| 2.4.13 | Bestimmung der Transfektionseffizienz..... | 32 |
| 2.4.14 | Expression eines transfizierten Gens mit Hilfe rekombinanter <i>Vaccinia</i> -Viren | 32 |
| 2.4.15 | Vermehrung des <i>Vaccinia</i> -Virus..... | 33 |
| 2.4.16 | NFAT-Kerntranslokation..... | 33 |
| 2.4.17 | Infektion für <i>Microarray</i> -Analyse..... | 33 |
| 2.4.18 | Infektion für Phosphotyrosin-Assay | 34 |
| 2.5 | Statistische Auswertung | 34 |

| | | |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| III | ERGEBNISSE | 35 |
| 1 | Untersuchung der Wirkung sekretierter und translozierter Virulenzfaktoren auf die Aktivierbarkeit von T-Zellen | 35 |
| 1.1 | Nachweis der Aufnahme von CagA und VacA in T-Zellen..... | 35 |
| 1.1.1 | Translokation von CagA in Jurkat T-Zellen..... | 35 |
| 1.1.2 | Vakuolisierung von Jurkat T-Zellen durch VacA..... | 36 |
| 1.2 | Etablierung eines T-Zell-Proliferationsassays..... | 36 |
| 1.3 | Einfluss verschiedener <i>H. pylori</i> -Stämme auf die T-Zell-Proliferation | 38 |
| 1.3.1 | Einfluss von <i>H. pylori</i> auf die Proliferation von Jurkat T-Zellen..... | 38 |
| 1.3.2 | Einfluss von <i>H. pylori</i> auf die Proliferation von peripheren Blutlymphozyten..... | 38 |
| 1.3.3 | Proliferation der T-Zellen nach Behandlung mit gefällten Bakterienkulturüberständen..... | 39 |
| 1.4 | Einfluss von <i>H. pylori</i> auf die IL-2-Produktion der T-Zellen | 41 |
| 1.4.1 | Test der IL-2-Produktion von T-Zellen nach Infektion mit <i>H. pylori</i> | 41 |
| 1.4.2 | Verifizierung von VacA als hemmender Faktor für die IL-2-Sekretion..... | 43 |
| 1.4.3 | Effekt von VacA auf die IL-2-Produktion nach physiologischer Stimulierung der Jurkat T-Zellen | 44 |
| 1.4.4 | Bestimmung der minimalen Infektionsdosis für die Hemmung der IL-2-Produktion..... | 44 |
| 1.5 | Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Proliferationshemmung und Apoptose-Induktion | 45 |
| 1.6 | Einfluss von <i>H. pylori</i> auf den Zellzyklus der T-Zellen..... | 46 |
| 1.7 | Einfluss von <i>H. pylori</i> auf die Expression von Aktivierungsmarkern | 47 |
| 1.7.1 | Analyse der CD25-Expression von T-Zellen nach Infektion mit <i>H. pylori</i> | 47 |
| 1.7.2 | Untersuchung der CD69-Expression aktivierter T-Zellen nach Infektion mit <i>H. pylori</i> | 48 |
| 1.8 | Untersuchungen zum Mechanismus der Hemmung der IL-2-Produktion durch VacA.. | 49 |
| 1.8.1 | Nachweis der IL-2-Hemmung durch VacA auf transkriptioneller Ebene | 49 |
| 1.8.2 | Untersuchung der an der Transkription des IL-2-Gens beteiligten Transkriptionsfaktoren | 50 |
| 1.8.3 | Vergleich der Wirkung des <i>C. jejuni</i> Cdt-Toxins mit der Wirkung von VacA..... | 52 |

| | | |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.8.4 | Untersuchung der zur Aktivierung von NFAT führenden Signaltransduktion | 53 |
| 1.8.4.1 | Untersuchung der Kerntranslokation von NFAT nach Infektion mit <i>H. pylori</i> P12 bzw. P12 Δ <i>vacA</i> | 54 |
| 1.8.4.2 | Einfluss von konstitutiv aktivem Calcineurin auf die IL-2-Hemmung durch VacA .. | 56 |
| 1.8.4.3 | Einfluss der Calcium-Verfügbarkeit im Zytoplasma auf die IL-2-Hemmung durch VacA..... | 57 |
| 1.8.4.4 | Einfluss der Protein Kinase C θ auf die Hemmung der IL-2-Produktion durch VacA | 59 |
| 1.8.4.5 | Untersuchung einer direkten Interaktion von VacA und Calcineurin..... | 60 |
| 1.9 | Vergleich der Veränderung der Genexpression nach Behandlung von Jurkat T-Zellen mit VacA und FK506 | 60 |
| 1.10 | Untersuchung der Aktivität von m2-VacA bei intrazellulärer Expression | 62 |
| 1.10.1 | Klonierung der <i>vacA</i> - bzw. <i>ureB</i> -Gene von <i>H. pylori</i> 26695 und Tx30a in den Vektor pcDNA3.1 und Expression in Jurkat T-Zellen | 62 |
| 1.10.2 | Untersuchung der Hemmung der IL-2-Transkription durch intrazellulär produziertes VacA bzw. UreB | 64 |
| 1.11 | Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Vakuolisierung und Calcineurin-Hemmung | 65 |
| 1.11.1 | Untersuchung der Vakuolisierung bzw. IL-2-Hemmung mit Hilfe verschiedener Inhibitoren | 65 |
| 1.11.2 | Klonierung von <i>vacA</i> ₃₄₋₄₅₈ bzw. <i>vacA</i> _{P9A} in den Vektor pcDNA3.1 und Test der Expression in Jurkat T-Zellen | 66 |
| 1.11.3 | Einfluss von VacA ₃₄₋₄₅₈ bzw. VacA _{P9A} auf die Transkription des IL-2-Gens..... | 67 |
| 2 | Untersuchungen zur Translokation und Prozessierung von CagA | 69 |
| 2.1 | Nachweis der CagA-Prozessierung in verschiedenen Zelltypen..... | 69 |
| 2.2 | Mutagenese aller <i>cag</i> -PAI-Gene | 70 |
| 2.3 | Analyse der einzelnen <i>cag</i> -PAI-Gene im Hinblick auf die Prozessierung von CagA in J774A.1-Makrophagen | 71 |
| 2.4 | Analyse der CagA-Prozessierung mit Hilfe verschiedener Inhibitoren | 72 |
| 2.5 | Einfluss von BAPTA auf die Prozessierung von CagA..... | 73 |
| 2.6 | Test der Wirkung von Calpain-Inhibitoren auf die Prozessierung von CagA..... | 74 |
| 2.7 | <i>In vitro</i> -Proteolyse mit Calpain..... | 74 |

| | | |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.8 | Vergleich der CagA-Spaltung in der <i>in vitro</i> -Proteolyse mit der Spaltung in J774A.1-Makrophagen | 76 |
| IV | DISKUSSION..... | 78 |
| 1 | Hemmung der T-Zell-Aktivierung durch <i>H. pylori</i> | 78 |
| 1.1 | Effekte von VacA auf Epithelzellen und verschiedene Zellen des Immunsystems | 78 |
| 1.2 | Mechanismus der Calcineurin-Hemmung durch VacA..... | 80 |
| 1.3 | Auswirkungen der Calcineurin-Hemmung durch VacA | 82 |
| 1.4 | Bedeutung der Calcineurin-Hemmung durch VacA für die <i>H. pylori</i> -Infektion | 84 |
| 1.5 | Immunsuppression – ausgelöst durch eine Calcineurin-Hemmung? | 86 |
| 2 | Untersuchungen zur Prozessierung von CagA in Phagozyten und anderen Zellen..... | 87 |
| V | ZUSAMMENFASSUNG | 90 |
| VI | LITERATURVERZEICHNIS | 92 |
| VII | ANHANG | 117 |
| 1 | Apoptose | 117 |
| 2 | Microarray..... | 118 |
| 3 | Abkürzungen | 121 |

I Einleitung

1 Epidemiologie und Pathogenese der *H. pylori*-Infektion

Vor rund 20 Jahren konnte *Helicobacter pylori*, damals noch als *Campylobacter pylori* bezeichnet, erstmals aus Magen-Biopsien von Patienten mit aktiver chronischer Gastritis isoliert und kultiviert werden (223). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass *H. pylori*, ein Gram-negatives, spiralgewundenes und polar begeißeltes Bakterium, den Menschen schon sehr früh in der Entwicklungsgeschichte kolonisiert hat und sich mit diesem von Afrika aus weltweit verbreitet hat (28). Epidemiologische Studien zeigen, dass die Prävalenz der *H. pylori*-Infektion in verschiedenen Ländern und unter verschiedenen Populationsgruppen stark variiert. So sind in den Entwicklungsländern 80-90% der Bevölkerung mit *H. pylori* infiziert, in den Industrieländern dagegen liegt die Infektionsrate bei 20-50% (48). Damit stellt die *H. pylori*-Infektion eine der häufigsten bakteriellen Infektionen weltweit dar. Allerdings ist in den Industrieländern seit Mitte des 19. Jahrhunderts durch verbesserte Hygienebedingungen ein deutlicher Rückgang der *H. pylori*-Infektion zu verzeichnen (182), was darauf schließen lässt, dass sozioökonomische Bedingungen vor allem in der Kindheit die Prävalenz der *H. pylori*-Infektion stark beeinflussen (126). Die Übertragung der *H. pylori*-Infektion erfolgt hauptsächlich in der frühen Kindheit von der Mutter aufs Kind (48), wobei der genaue Übertragungsweg noch nicht geklärt werden konnte. Die Tatsache, dass es innerhalb von Familien eine Häufung von *H. pylori*-Infektionen gibt, weist auf eine oral-orale oder oral-fäkale Übertragung hin (47; 52). In den Entwicklungsländern könnte außerdem eine Übertragung durch unbehandeltes Wasser eine Rolle spielen (71).

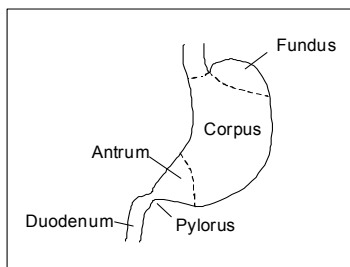


Abb. I.1: Schematische Darstellung des menschlichen Magens
H. pylori kolonisiert in der Regel Antrum- und Corpus-Region des menschlichen Magens.

H. pylori besiedelt die Antrum- und Corpus-Region des Magens (Abb. I.1). Die Infektion besteht ohne entsprechende Behandlung gewöhnlich jahrzehnte- oder sogar lebenslang und löst bei den Infizierten eine chronische Entzündungsreaktion der Magenschleimhaut aus (chronische Gastritis). Als Folge dieser chronischen Entzündung entstehen bei 15-20% der Infizierten im Laufe der Jahre Folgekrankheiten wie Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüre, eine chronische atrophische Gastritis, ein Magenkarzinom oder ein Magenlymphom. Forschungsarbeiten der letzten Jahre haben gezeigt, dass sowohl bakterielle Pathogenitätsfaktoren als auch genetische Wirtsdeterminanten, wie z.B. Polymorphismen im Interleukin-1 β Gen (51), das Risiko der Entwicklung einer Folgekrankheit beeinflussen (70). Auch der Ort der Infektion spielt eine Rolle. So haben Patienten mit einer Antrum-dominierten Gastritis ein höheres Risiko für das Entstehen eines

Zwölffingerdarmgeschwürs, während Patienten mit einer Corpus-dominierten Gastritis ein höheres Risiko für ein Magengeschwür oder ein Magenadenokarzinom haben (45). Da das Risiko, infolge einer *H. pylori*-Infektion an Magenkrebs zu erkranken um den Faktor sechs erhöht ist, erklärte die Weltgesundheitsorganisation *H. pylori* 1994 zum Klasse I-Karzinogen (116). Das Magenadenokarzinom ist derzeit die zweithäufigste Ursache für Krebs-bedingte Todesfälle weltweit (26). Die *H. pylori*-Infektion führt zudem zur Bildung von Mucosa-assoziiertem Lymphatischen Gewebe (MALT) in der Magenmukosa, woraus ein malignes MALT-Lymphom hervorgehen kann. 72-98% der Patienten mit MALT-Lymphom sind mit *H. pylori* infiziert (163; 230).

2 Virulenzfaktoren von *H. pylori*

Um den Gastrointestinaltrakt kolonisieren zu können, muß *H. pylori* im sauren Lumen des Magenmilieus überleben können. Ein dafür essentieller Faktor ist die Urease, ein cytosolisches, Ni²⁺-enthaltendes Enzym (83), das je nach Kulturbedingungen bis zu 10% des gesamten bakteriellen Proteins ausmachen kann (13). Die Urease hält im sauren Milieu des Magens einen neutralen pH-Wert im Inneren des Bakteriums aufrecht (174), der u.a. für den Aufbau des Membranpotentials zur Energiegewinnung nötig ist. Dies wird erreicht durch die Spaltung von Harnstoff in Hydrogencarbonat und Ammonium, das einströmende Protonen im Zytosol und Periplasma puffert. Die Urease besteht aus den Untereinheiten UreA und UreB, sowie akzessorischen Proteinen, die für die Aufnahme und den Einbau von Ni²⁺ in das aktive Zentrum des Apo-Enzyms benötigt werden (103). Reguliert wird die Umsetzung von Harnstoff über das Membranprotein Urel, das einen pH-regulierten Harnstoffkanal bildet (225). Bei einem pH-Wert <6,5 ist der Kanal offen, so dass Harnstoff aufgenommen und umgesetzt werden kann. Bei neutralem pH-Wert ist der Kanal geschlossen, wodurch kein Harnstoff mehr aufgenommen und dadurch eine Alkalisierung des Cytosols vermieden wird. Im Maus-Infektionsmodell konnte gezeigt werden, dass die Urease essentiell für die Kolonisierung ist (49). Diskutiert wird auch eine Rolle der Urease bei der Induktion von Epithelzellschäden, da Ammonium toxisch für Zellen ist (130; 206; 214). Ob jedoch die von der Urease produzierte Menge an Ammonium ausreicht, um Zell-Schäden zu induzieren, ist noch unklar. Ferner wird die Urease in Zusammenhang gebracht mit Apoptose-Induktion (55; 84) und der Aktivierung von Neutrophilen und Monozyten (75).

Da *H. pylori* kein acidophiles Bakterium ist, kann es im sauren Magenlumen nur kurzzeitig überleben und muss sich, um kolonisieren zu können, in die Carbonat-gepufferte Magenmukosa bewegen. Die Motilität von *H. pylori* wird bedingt durch die helikale Form des Bakteriums und zwei bis sieben unipolar angeordnete Flagellen. Diese bestehen aus den Flagellinproteinen FlaA (111) und FlaB, wobei FlaB vor allem an der Flagellenbasis lokalisiert ist (211). Zum Schutz des säurelabilen Flagellinpolymers sind die Flagellenfilamente von

einer membranartigen Hülle überzogen (67). Die Bewegung in Richtung Mukosa wird durch chemotaktische Faktoren wie Harnstoff- und Bicarbonatkonzentration gesteuert (239). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass nicht-motile *H. pylori*-Mutanten nicht kolonisieren können (50).

In Biopsien ist *H. pylori* sowohl im Mukus als auch adhären an Epithelzellen zu finden. Die Adhärenz ist wichtig, um einen Abtransport durch Peristaltik und Mukus-Erneuerung zu verhindern. Vermittelt wird die Adhärenz an Epithelzellen über verschiedene Adhäsine wie das BabA-Protein, das an fucosyliertes Lewis^b-Blutgruppenantigen auf der Oberfläche der Epithelzellen bindet (17; 86). Epidemiologische Studien zeigen, dass BabA-positive *H. pylori*-Stämme häufiger in Patienten mit Ulkus und Magenkarzinom zu finden sind als BabA-negative Stämme (68; 168). Die Beobachtung, dass BabA-Mutanten nicht mehr an normales Magengewebe binden können, aber an entzündetes Magengewebe adhären, führte zur Identifikation von SabA als weiteres Adhäsins (124). SabA bindet an sialylierte Glykoproteine, die in der gesunden Magenmukosa selten vorkommen, im entzündeten Gewebe aber verstärkt exprimiert werden (152). Dort dienen sie als Rezeptoren für Selektine, die die Migration der Leukozyten steuern und so die Immunantwort regulieren. Weitere beschriebene Adhäsine von *H. pylori* sind die Proteine AlpA und AlpB, die Adhärenz an Magenepithelzellen vermitteln, wobei aber der eukaryontische Rezeptor noch unbekannt ist (149).

Ein Protein, das ebenfalls als Adhäsins fungieren kann, ist das *Helicobacter pylori neutrophil activating protein* (HP-NAP). HP-NAP wird vermutlich durch altruistische Zellyse freigesetzt und bindet daraufhin an die bakterielle Oberfläche. Dort kann es die Bindung an Mucin (142) oder an Sphingomyelin auf polymorphkernigen Neutrophilen (218) induzieren. HP-NAP ist außerdem chemotaktisch für Neutrophile und Monozyten (188), aktiviert diese (54) und induziert die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen (188), was zu einer Gewebeschädigung führen kann.

3 Die *cag*-Pathogenitätsinsel und das vakuolisierende Zytotoxin VacA

Epidemiologische Studien zeigen, dass sich Stämme, die aus Patienten mit einem Magen- oder Zwölffingerdarmgeschwür oder einem Magenkarzinom isoliert wurden, und Stämme, die aus Patienten mit einer milden Gastritis isoliert wurden, im Vorhandensein einer *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) und der Expression eines aktiven Zytotoxins (VacA) unterscheiden. Diese Beobachtung führte zur Einteilung der *H. pylori*-Isolate in Typ I (*cag*-PAI und VacA positive) und Typ II (*cag*-PAI und VacA negative) -Stämme (231). Die 40 kb umfassende *cag*-PAI ist auf dem Chromosom lokalisiert und codiert für ein Typ-IV-Sekretionssystem, das starke Homologien zum *virB*-Operon von *Agrobacterium tumefaciens* aufweist. Mit Hilfe dieses Sekretionssystems transloziert *H. pylori* das 130 kD große

Cytotoxin-assoziierte-Antigen A (CagA), das ebenfalls auf der *cag*-PAI codiert ist, in eukaryontische Zielzellen (5; 7; 148; 208).

Epidemiologische Studien zeigen eine Korrelation zwischen dem Antikörper-Titer gegen CagA und der Schwere der ausgelösten Erkrankung, weshalb CagA häufig als Krankheitsmarker verwendet wird (162; 224). In den westlichen Industrieländern exprimieren 50-70% der klinischen Isolate *cagA*, in einigen Ländern wie Japan oder Korea liegt die Häufigkeit CagA-positiver Stämme sogar bei fast 100% (122; 161).

3.1 Die Rolle von CagA in eukaryontischen Zellen

Bei der Infektion von Epithelzellkulturen kann eine CagA-abhängige Wanderung der Zellen in der Kulturschale und eine Verlängerung der Zellausläufer, der sog. *Hummingbird*-Phänotyp, beobachtet werden (194). Verschiedene Studien zeigen, dass CagA nach der Translokation in die Zielzelle durch zelluläre Tyrosin-Kinasen der Src-Familie (c-Src, Lyn) phosphoryliert wird (196; 207). In Phagozyten wird das phosphorylierte CagA-Protein in ein stabiles 100 kD- und ein tyrosinphosphoryliertes 40 kD-Fragment gespalten (147). Dass CagA auch unter natürlichen Infektionsbedingungen *in vivo* phosphoryliert wird, zeigten Yamazaki *et al.* an menschlichen Magenbiopsie-Material (234). Assoziiert mit der Phosphorylierung von CagA ist die Dephosphorylierung von zwei zellulären Proteinen mit 120 kD (p120) und 80 kD (p80) (148). Das Protein p120 konnte bisher noch nicht näher charakterisiert werden, bei dem Protein p80 handelt es sich um das Aktin-bindende Protein Cortactin (197). Selbach *et al.* fanden, dass die Phosphorylierung von CagA durch die Src-Kinase eine Rückkopplungshemmung auslöst. Als Folge der CagA-Phosphorylierung wird die Src-Kinase an Tyrosin-527 phosphoryliert und an Tyrosin-418 dephosphoryliert, was zu einer Inaktivierung der Src-Kinase führt. Dadurch kann Cortactin, ein Substrat der Src-Kinase, nicht mehr phosphoryliert werden und geht durch die Aktivität von Tyrosin-Phosphatasen in den nicht-phosphorylierten Zustand über. Durch *in vitro*-Tests konnte gezeigt werden, dass CagA die Src-Kinase direkt hemmt und dazu keine anderen zellulären Proteine benötigt werden. Die Hemmung der Src-Kinase scheint auch essentiell zu sein für die Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts und die Induktion des *Hummingbird*-Phänotyps (197). Andere Studien zeigten mittels Immunpräzipitation *in vitro* und aus infiziertem Magenbiopsiematerial eine Interaktion von phosphoryliertem CagA mit der SH2-Domäne von SHP-2, einer zentralen Phosphatase eukaryontischer Zellen. Die CagA-Interaktion führt zur Aktivierung der Phosphatase-Aktivität von SHP-2 (77; 234). Auch diese Interaktion soll essentiell für die Induktion des *Hummingbird*-Phänotyps sein. Ferner wurde eine Interaktion zwischen CagA und dem Adaptorprotein Grb2 beschrieben, die zur Aktivierung des Ras/MEK/ERK-Signalwegs und so letztendlich zum *Hummingbird*-Phänotyp führen soll (132). Diese Interaktion scheint allerdings unabhängig von einer Phosphorylierung des

CagA-Proteins zu sein. Churin *et al.* fanden, dass CagA den gleichen Signalweg wie der Wachstumsfaktor *hepatocyte growth factor* (HGF) stimuliert, indem es wie ein Adaptorprotein mit dem HGF-Rezeptor c-Met und der Phospholipase C γ interagiert. Diese Interaktion scheint für die Migration der Zellen nach Infektion mit einem CagA-positiven Stamm verantwortlich zu sein (24). Mit Hilfe von MDCK-Zellen, die ein polarisiertes Epithel bilden, zeigten Amieva *et al.*, dass CagA das Gerüstprotein ZO-1 und das Transmembran-Protein JAM zum Ort der Adhärenz von *H. pylori* rekrutiert (3). Als Folge dieser Rekrutierung werden die Verbindungen zwischen den Epithelzellen, die sog. „*tight junctions*“ geöffnet. Auch diese Aktivität von CagA scheint unabhängig von dessen Tyrosinphosphorylierung und einer Interaktion mit SHP-2 zu sein. Laut dieser Studie führt die Langzeitinfektion von polarisiertem Epithel mit *H. pylori* zu einer Zerstörung der Funktion des Epithels als Barriere und verursacht eine Veränderung der Epithelzellmorphologie. Damit existieren z.T. widersprüchliche Beobachtungen in Bezug auf den oder die Interaktionspartner von CagA in der eukaryotischen Zelle, wobei einige Studien darauf hindeuten, dass CagA als bakterielles Oncoprotein agiert, indem es funktionell Adapterproteine imitiert und damit Signalwege in der Zelle beeinflusst, die an der Regulation der Zell-Proliferation beteiligt sind. Weitere Studien werden jedoch nötig sein, um die Bedeutung dieser verschiedenen Interaktionspartner zu bewerten.

Durch Infektionsexperimente mit Mongolischen Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*, Gerbil) konnten Ogura *et al.* die Beteiligung der *cag*-PAI an der Induktion eines Magengeschwürs nachweisen. Mäuse, die mit einer *H. pylori*-Mutante infiziert wurden, die CagA nicht translozieren kann, entwickelten keinen Magenulkus, während in der mit dem Wildtypstamm infizierten Kontrollgruppe nach Infektion für 62 Wochen bei 96% der Tiere ein Magengeschwür auftrat (150). Als weitere Effekte der *cag*-PAI wurden eine Induktion der IL-8-Produktion in Epithelzellen (39), die Aktivierung von NF- κ B-Komplexen, die Bildung von Aktinpodesten (195) und die Aktivierung der Protooncogene *c-fos* und *c-jun* (131) beschrieben.

3.2 Das vakuolisierende Zytotoxin: Sekretionsmechanismus und Funktion in der Wirtszelle

Ein zweiter Virulenzfaktor, der Typ I- und Typ II-Stämme unterscheidet, ist das sekretierte Zytotoxin VacA. Entdeckt wurde eine zytotoxische Aktivität in Kulturüberständen von *H. pylori* schon 1988 von Leunk *et al.* (110). 1992 wurde das VacA-Protein schließlich aus Kulturüberständen biochemisch aufgereinigt und gezeigt, dass es die Bildung saurer Vakuolen in Epithelzellen auslöst (30). Die biologische Bedeutung dieses Toxins zeigt sich durch Studien, die nachweisen, dass gereinigtes VacA in Mäusen Ulkus-ähnliche Erosionen verursacht (127) und dass VacA das Risiko für die Entwicklung eines Magenulkus in Gerbils

deutlich erhöht (150). Kloniert wurde das *vacA*-Gen 1994 unabhängig in vier Arbeitsgruppen (35; 166; 189; 217). Das *vacA*-Gen codiert für ein Vorläuferprotein von 140 kD, das über den Sec-abhängigen Transportweg über die Zytoplasmamembran transportiert wird, wobei die N-terminalen 33 Aminosäuren abgespalten werden (Abb. I.2a). Zum Transport über die äußere Membran wird ein Autotransporter-Mechanismus genutzt (60), wie er auch für die IgA-Protease von *Neisseria spec.* beschrieben ist (167). Hierbei wird die Autotransporterdomäne abgespalten, so dass das reife VacA-Toxin noch ein Molekulargewicht von 95 kD hat. Das 95 kD-Toxin einiger Stämme kann schließlich in einer Wiederholungssequenz aus acht Aminosäuren (AS), die eine hydrophobe, Protease-sensitive Schleife bilden, gespalten werden. Die daraus resultierenden 37 kD (p37)- und 58 kD (p58)- Fragmente bleiben nicht-kovalent miteinander verbunden (217). Die protease-sensitive Region ist allerdings nicht in der VacA-Sequenz aller *H. pylori*-Stämme vorhanden (189) und die Bedeutung der Spaltung ist noch unklar.

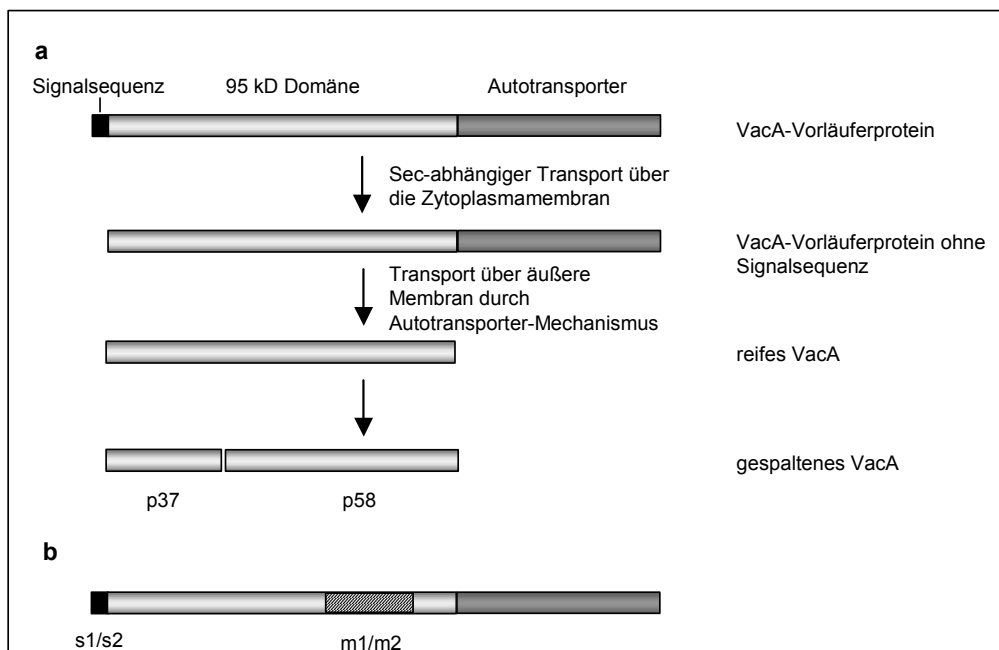


Abb. I.2: Schematische Darstellung der Prozessierung von VacA vom Vorläuferprotein zum reifen Toxin. Erläuterungen siehe Text.

Obwohl alle *H. pylori*-Stämme ein *vacA*-Gen besitzen, wie genetische Untersuchungen zeigen, ist eine vakuolisierende Aktivität nur bei etwa 50% aller Isolate vorhanden (35; 166; 189), nämlich in den Typ I-Stämmen. Genauere Analysen der *vacA*-Gene von Typ I- und Typ II-Stämmen zeigten, dass die Sequenzen sehr konserviert sind, sich aber in zwei Regionen unterscheiden: in der Signalsequenz und einer Mittelregion des Gens (Abb. I.2b). Dies führte zur Klassifizierung der *vacA*-Gene in je zwei Haupttypen: s1 bzw. s2 für die Unterschiede in der Signalsequenz und m1 bzw. m2 für die Unterschiede in der Mittelregion (6). Die Aminosäure-Identität liegt in der ca. 300 AS umfassenden Mittelregion bei nur 55%, bedingt

durch eine Deletion von 30 AS und einer Insertion von 23 AS im m2-Allel im Vergleich zum m1-Allel (61). Es sind verschiedene Kombinationen der s- und m- Allele bekannt, wobei ein s2m1-Typ noch nicht beobachtet wurde. Ursprünglich wurde das m1-Allel mit einem aktiven und das m2-Allel mit einem inaktiven Zytotoxin assoziiert, Studien mit verschiedenen Zellkultursystemen zeigten aber, dass das m2-Allel auf bestimmten Zellen, wie z.B. primären Magenzellen oder RK-13-Zellen (Kaninchen-Nierenepithelzelllinie) ebenfalls eine vakuolisierende Aktivität hat (154). Da die Hauptunterschiede im reifen VacA im wesentlichen im p58-Teil liegen und dieser Teil vermutlich die Rezeptorbindende Domäne darstellt (175), ist es wahrscheinlich, dass die unterschiedliche Zellspezifität von m1- und m2-VacA auf unterschiedlichen Rezeptorspezifitäten beruht. Die dominante Wirkung des m1-VacA könnte aber auch dadurch begründet sein, dass die m1-Form des vacA-Allels stärker exprimiert wird als die m2-Form (62).

Wie die Bindung und Aufnahme von VacA in die Zielzelle erfolgt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Als mögliche Rezeptoren wurden der *epidermal growth factor*- (EGF)-Rezeptor (198), die Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatase (RPTP)- β (153; 232) und RPTP- α beschrieben (233). Fujikawa *et al.* zeigten kürzlich an RPTP- β -*knockout*-Mäusen, dass die Bindung von VacA an RPTP- β eine fehlgeleitete Signaltransduktion auslöst, die zur Induktion eines Magenulkus führen kann (65). Neben der Aufnahme über Rezeptoren wurde auch eine Bindung von VacA an Detergenz-resistente Mikrodomänen (*lipid rafts*) der Zellmembran gefunden, die abhängig von Glycosylphosphatidylinositol (GPI)- verankerten Proteinen ist (102; 177). Schraw *et al.* dagegen fanden, dass diese Bindung unabhängig von GPI-verankerten Proteinen ist (190). VacA bildet in Lösung hexamere oder heptamere Strukturen (119). Ob VacA als Monomer oder als Oligomer an die Membran bindet, ist aber noch unklar. Für die Aufnahme von gereinigtem VacA ist allerdings eine kurzzeitige Inkubation der VacA-Oligomere bei pH 2 erforderlich (44), bei der die Oligomere in Monomere dissoziieren (32; 134), was vermutlich zur Exposition hydrophober Bereiche auf der Proteinoberfläche führt. Bakterien-assoziiertes VacA oder in den Überstand sekretiertes VacA benötigt keine Säureaktivierung (110), was darauf schließen lässt, dass VacA *in vivo* als Monomer vorliegt. Es wurde gezeigt, dass VacA in künstlichen Lipidmembranen (41; 159; 220) und in der Zytoplasmamembran von HeLa-Zellen (216) oligomerisiert und Kanäle bildet, die als selektive Anionentransporter fungieren (159; 216). Die VacA-Kanäle werden in einem Clathrin-unabhängigen Prozeß (177) endozytiert. VacA ist nach der Aufnahme in Epithelzellen in einem intermediären Kompartiment lokalisiert, das sich von späten Endosomen ableitet (29; 159). Diese Kompartimente enthalten sowohl lysosomale Marker, wie das Protein Igp110 (135), als auch Marker von späten Endosomen, wie das kleine GTP-bindende Protein Rab7 (157), das am Transport von späten Endosomen zu Lysosomen beteiligt ist. Diese Hybridkompartimente sind Vakuolen mit einem sauren Lumen, an deren

Bildung zelluläre Moleküle wie die vakuoläre (V)-ATPase (34; 156), Rac1 (81), Dynamin (213), Syntaxin 7 (212) und die Proteinkinase PIKfyve (85) beteiligt sind. Nach der derzeitigen Modellvorstellung aktiviert VacA durch seine Aktivität als Chloridkanal die V-ATPase, die daraufhin Protonen in die Vakuolen pumpt. Das durch die Aktivität der Urease vorhandene Ammonium diffundiert, da es acidotrop ist, in die Vakuolen, was aus osmotischen Gründen einen Wassereinstrom in die Vakuolen und damit deren Anschwellung auslöst (138). Welchen Zweck die Vakuolisierung von Epithelzellen hat, ist nach wie vor unklar. Diskutiert wird eine Zerstörung der Epithelzellen durch die Vakuolisierung und eine Freisetzung von Nährstoffen aus den nekrotischen Zellen (61), was *H. pylori* eine bessere Nährstoffversorgung sichern soll. In eine ähnliche Richtung gehen Spekulationen, dass die Kanalaktivität von VacA in der Zytoplasmamembran am Harnstoff- und Bicarbonat-Transport zur apikalen Oberfläche der Magenzellen beteiligt ist, oder dass VacA die Diffusion von Nickel- und Eisenionen erleichtert, indem es den parazellulären Weg des Magenepithels öffnet (159). Neben den kanalbildenden Eigenschaften von VacA wurden auch einige andere Aktivitäten beschrieben. So soll VacA den *Ii* (*invariant chain*)-abhängigen Antigenpräsentations-Weg in B-Zellen hemmen (136), die Proliferation von MKN28-Epithelzellen inhibieren (176) und die transepitheliale Ionendurchlässigkeit von polarisierten Epithelien erhöhen (158). Für Epithelzellen wurde außerdem gezeigt, dass VacA Apoptose auslöst (33; 66; 101). Galmiche *et al.* fanden, dass VacA, wenn es intrazellulär exprimiert wird, mit den Mitochondrien co-lokalisiert und dort die Freisetzung von Cytochrom c induziert, was den Caspase 3-abhängigen Apoptose-Signalweg aktiviert. Des Weiteren wurde beobachtet, dass VacA *H. pylori* ein verlängertes Überleben in Makrophagen ermöglicht (240). In Magenepithelzellen soll VacA zudem die Mucinsynthese signifikant erniedrigen (14).

4 Humorale und zelluläre Immunantwort bei einer *H. pylori*-Infektion

Wie im Tiermodell gezeigt werden konnte, kommt es schon kurz nach der Infektion mit *H. pylori* zu einer starken Infiltration der Magenmukosa durch Neutrophile und Lymphozyten (180). Angelockt werden die Neutrophilen durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 β und IL-8, die als Antwort auf eine *H. pylori*-Infektion von Zellen der Magenmukosa produziert werden (38; 39). Stämme, die eine *cag*-PAI besitzen, induzieren dabei eine stärkere IL-8-Sekretion in den Epithelzellen als *cag*-PAI-negative Stämme, lösen eine stärkere Infiltration von Granulozyten und damit auch eine stärkere Entzündungsreaktion aus (79; 151). Wie verschiedene Studien zeigen, aktiviert *H. pylori* *cag*-abhängig den NF- κ B-Signalweg in Epithelzellen, was zur Induktion der IL-8-Produktion führt (63; 88; 123). *H. pylori* wird von Neutrophilen und Makrophagen effizient phagozytiert, kann aber in diesen Zellen mindestens 24 Stunden überleben (2; 147).

Charakteristisch für eine *H. pylori*-Infektion ist neben der Infiltration durch Neutrophile auch eine deutliche Infiltration von CD3⁺ CD4⁺-Lymphozyten in die *Lamina propria* und das Magenepithel (10). Die infiltrierenden T-Zellen zeigen einen T_H1-Phänotyp, der durch die Sekretion von proinflammatorischen Zyto- und Chemokinen wie IFN- γ , IL-2 und TNF- β gekennzeichnet ist (10; 115; 205). T-Zellen vom T_H2-Phänotyp, die IL-4 produzieren, sind in der infizierten Magenmukosa kaum zu detektieren (10; 43; 205). Wie D'Elis *et al.* fanden, sind die meisten T_H1-T-Zell-Klone aus der Magenmukosa spezifisch für CagA und nur sehr wenige spezifisch für andere *H. pylori*-Antigene wie Urease oder VacA (42). Immunisierungsexperimente haben jedoch gezeigt, dass für die Eliminierung von *H. pylori* eine T_H2-Immunantwort erforderlich ist (170; 186). Ob allerdings die Polarisierung der Immunantwort in Richtung T_H1 durch *H. pylori* gesteuert wird, ist fraglich, da auch in der nicht infizierten Magenmukosa, sowie bei anderen entzündlichen Erkrankungen des Magens eine T_H1-Antwort vorherrscht (10; 92). Dass CD4⁺ T-Zellen aber entscheidend für die Kontrolle der *H. pylori*-Infektion sind, zeigen Vakzinierungsstudien im Mausmodell (1), die eine direkte Korrelation zwischen dem Grad der Protektion und der Dichte der in die Magenmukosa rekrutierten T-Zellen zeigen (53). So können MHC Klasse I- und B-Zell-*knockout*-Mäuse erfolgreich gegen eine *H. pylori*-Infektion immunisiert werden, MHC Klasse II-*knockout* Mäuse dagegen nicht. Lucas *et al.* wiesen nach, dass in nicht immunisierten Mäusen durch den adoptiven Transfer von UreA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen aus immunisierten Mäusen ein Schutz vor einer *H. pylori*-Infektion erreicht werden kann (117). Wie Biopsien von *H. pylori*-infizierten Patienten zeigen, sind neben den T-Zellen auch Antikörper-produzierende Zellen, die Antigen-spezifische IgA- oder IgM-Antikörper sezernieren, in großer Zahl in der Magenmukosa vorhanden (129). Insgesamt wird durch die *H. pylori*-Infektion eine starke humorale und zelluläre Immunantwort induziert, die aber offensichtlich nicht geeignet ist, *H. pylori* zu eliminieren. Ebenso ruft eine natürliche *H. pylori*-Infektion keine Immunität hervor (171).

Dies lässt vermuten, dass *H. pylori* Strategien entwickelt hat, um einer Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen. Die Tatsache, dass *H. pylori* in Phagozyten für längere Zeit überleben kann, kann zwar zur erfolgreichen Kolonisierung beitragen, die chronische Persistenz des Erregers aber nicht erklären (2). Studien von Knipp *et al.* (99) und Fan *et al.* (56) zeigten, dass *H. pylori* die Immunantwort durch Inhibition der antigen-spezifischen T-Zell-Proliferation umgehen kann. Wang *et al.* postulierten Apoptose-Induktion bei T-Zellen durch Erhöhung der Fas-Ligand-Expression als einen weiteren Mechanismus zur Immunevasion (222). Inwieweit diese Beobachtungen *in vivo* eine Rolle spielen, ist noch unklar.

5 Ziel der Arbeit

Die Infektion mit *H. pylori* ist eine der häufigsten bakteriellen Infektionen weltweit. Dabei besiedelt *H. pylori* mit dem menschlichen Magen eine ganz spezielle ökologische Nische, die lange Zeit als „steril“ galt. Die Infektion ruft eine lebhaft Immunantwort hervor, die allerdings die Kolonisierung des Magens durch *H. pylori* nicht verhindern kann, sondern eher noch zur Verschlimmerung der Erkrankung beiträgt. Die Gründe für die erfolgreiche Persistenz von *H. pylori* sind noch weitgehend unbekannt. Damit stellt sich die Frage, warum die Immunantwort der CD4⁺ T-Zellen bei einer natürlichen Infektion nicht in der Lage ist, die Eliminierung von *H. pylori* zu bewirken. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob und wie *H. pylori* Zellen des angeborenen oder erworbenen Immunsystems moduliert, um seine Eliminierung zu verhindern. Dabei soll vor allem die Rolle von CagA und VacA, die beide eukaryontische Zellen als Zielzellen haben, untersucht und die beteiligten Signaltransduktionskaskaden näher analysiert werden.

Weiterhin soll die in Vorarbeiten gezeigte Prozessierung von CagA in phagozytischen Zellen analysiert werden. CagA wird nach Translokation in Phagozyten spezifisch in ein tyrosinphosphoryliertes 40 kD Fragment und ein 100 kD Fragment gespalten. In dieser Arbeit soll untersucht werden, in welchen Zelltypen diese Prozessierung auftritt und welche Wirtsproteine daran beteiligt sind.

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Zelllinien

| | |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Jurkat E6.1 | Humane T-Zelllinie (ATCC TIB-152) |
| HeLa | humane Zervixkarzinom-Zelllinie (ACC 57) |
| J774A.1 | Murine Makrophagen-Zelllinie (ACC 170) |
| NHG-1 | humane Mageneithelzelllinie (M. Rutten, Oregon Health Sciences University, Portland, USA) |
| AGS | humane Magenadenokarzinomzelllinie (ATCC CRL-1739) |

1.2 Bakterienstämme

Escherichia coli-Stämme

| | |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DH5 α | F ⁻ , ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>hsdR</i> 17 (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺), <i>supE</i> 44, <i>thi</i> -1, λ ⁻ <i>gyrA</i> 96, <i>relA</i> 1 (Gibco, BRL) |
| HB101 | F ⁻ , <i>recA</i> 13, <i>ara</i> -14, <i>proA</i> 2, <i>leuB</i> , <i>lacY</i> 1, <i>galK</i> 2, <i>rpsL</i> 20 (<i>str</i> ^R), <i>xyl</i> -5, <i>mtl</i> -1, <i>supE</i> 44, <i>thi</i> -1, <i>hsdS</i> 20(<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻) (20) |

Helicobacter pylori-Stämme

| | |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ATCC43526 | typisierter Referenzstamm (121) |
| P1 | klinisches Isolat der Abteilung Medizinische Mikrobiologie der Universität Amsterdam (74) |
| P12 | klinisches Isolat der Abteilung Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Hamburg (189) |
| P17 | P12 <i>cagA</i> ⁻ , Cam ^R , hergestellt mit pWS30 (189) |
| P163 | P12 Δ <i>vacA</i> , Erm ^R , hergestellt mit pWS66 |
| P12 Δ <i>vacAcagA</i> ⁻ | Erm ^R , Cam ^R , hergestellt mit pWS66 und pWS30 |
| P49 | Wildtypstamm |
| SS1 | Mausadaptierter Wildtypstamm (109) |
| Tx30a | Wildtypstamm (6) |
| 26695 | Genom-sequenzierter Stamm (219) |
| BGP55 | 26695 Δ <i>hp537</i> , Cam ^R , hergestellt mit pBG11 |

| | |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BGP56 | 26695 Δ hp538, Cam ^R , hergestellt mit pBG 10 |
| BGP57 | 26695 Δ hp544, Cam ^R , hergestellt mit pBG 17 |
| BGP58 | 26695 Δ hp546, Cam ^R , hergestellt mit pBG 16 |
| JPP45 | P12 Δ cagA, komplementiert mit pJP54T (<i>cagA</i> ₂₆₆₉₅ mit C-terminaler Flagsequenz, J. Püls) |
| JPP103 | 26695 Δ hp527, Cam ^R , hergestellt mit pJP89 (J. Püls) |
| JPP104 | 26695 Δ hp528, Cam ^R , hergestellt mit pJP90 (J. Püls) |
| JPP106 | 26695 Δ hp524, Cam ^R , hergestellt mit pJP93 (J. Püls) |
| JPP107 | 26695 Δ hp523, Cam ^R , hergestellt mit pJP94 (J. Püls) |
| JPP108 | 26695 Δ hp532, Cam ^R , hergestellt mit pJP95 (J. Püls) |
| RBP2 | 26695 Δ hp520, Cam ^R , hergestellt mit pRB20 (R. Buhrdorf) |
| RBP3 | 26695 Δ hp521, Cam ^R , hergestellt mit pRB21 (R. Buhrdorf) |
| RBP4 | 26695 Δ hp529, Cam ^R , hergestellt mit pRB22 (R. Buhrdorf) |
| RBP8 | 26695 Δ hp525, Cam ^R , hergestellt mit pRB24 (R. Buhrdorf) |
| RBP9 | 26695 Δ hp526, Cam ^R , hergestellt mit pRB25 (R. Buhrdorf) |
| RBP10 | 26695 Δ hp530, Cam ^R , hergestellt mit pRB26 (R. Buhrdorf) |
| SOP257 | 26695hp534 ⁻ , TnMax5-Mutante, Cam ^R , hergestellt mit pJP16:: <i>Tn23</i> (S. Odenbreit) |
| SOP258 | 26695hp535 ⁻ , TnMax5-Mutante, Cam ^R , hergestellt mit pJP16:: <i>Tn4</i> (S. Odenbreit) |
| SOP259 | 26695hp536 ⁻ , TnMax5-Mutante, Cam ^R , hergestellt mit pSO169:: <i>Tn1</i> (S. Odenbreit) |
| SOP264 | 26695hp539 ⁻ , TnMax5-Mutante, Cam ^R , hergestellt mit pJP29:: <i>Tn7</i> (S. Odenbreit) |
| SOP265 | 26695 Δ hp540, Cam ^R , hergestellt mit pSO171 (S. Odenbreit) |
| SOP266 | 26695 Δ hp541, Cam ^R , hergestellt mit pSO172 (S. Odenbreit) |
| SOP267 | 26695 Δ hp542, Cam ^R , hergestellt mit pSO173 (S. Odenbreit) |
| SOP268 | 26695 Δ hp543, Cam ^R , hergestellt mit pSO174 (S. Odenbreit) |
| SOP269 | 26695 Δ hp545, Cam ^R , hergestellt mit pSO176 (S. Odenbreit) |
| WSP188 | 26695 Δ hp531, Cam ^R , hergestellt mit pWS139 (W. Fischer) |
| WSP191 | 26695 Δ hp522, Cam ^R , hergestellt mit pWS145 (W. Fischer) |

Campylobacter jejuni-Stämme

63 klinisches Isolat

64 klinisches Isolat

1.3 VirenvTF-7 *Vaccinia* rekombinantes *Vaccinia*-Virus, enthält Gen für T7-RNA-Polymerase (J. Haas, München) (64)**1.4 Plasmide**

pAD4 Transfektionsplasmid mit GFP-NFAT Fusion (R. Kehlenbach, Universität Heidelberg) (93)

pWS30 pBluescript mit *cagA::cat_{GC}* von Hp 185-44 (W. Fischer, München)pWS135 pc2a mit Deletion der *Bam*HI-Schnittstelle am 5'-Ende des Opaque-Promotors (W. Fischer, München)pIL-2 *luc* Transfektionsplasmid mit IL-2-Promotorsequenz vor dem Luciferase-Gen (L. Thomson, The Burnham Institute, San Diego) (87)pNFAT *luc* pCLN15ΔCX mit drei NFAT-Bindungsstellen im Promotor vor dem Luciferase-Gen (G. Crabtree, Stanford University) (201)pNF-κB *luc* pGL2 mit fünf NF-κB-Bindungsstellen im Promotor vor dem Luciferase-Gen (J. Fujisawa, Kansai Medical University, Osaka, Japan)pAP1 *luc* Transfektionsplasmid mit vier AP-1-Bindungsstellen im Promotor vor dem Luciferase-Gen (M. Iwashima, Medical College of Georgia) (89)pRE/AP *luc* pΔODLO mit 4 RE/AP-Bindungsstellen im Promotor vor dem Luciferase-Gen (A. Weiss, University of California, San Francisco) (200)

HA-pSG5-CnAβ2 pSG5 mit Calcineurin Aβ2 mit N-terminaler HA-Sequenz (P. Rothman, Columbia University, New York)

pSRαΔCaMAI pSRα mit Calcineurin A und deletierter Calmodulin-Bindungsstelle und deletierter autoinhibitorischer Domäne (R. Kincaid, Veritas, Inc., Rockville, Maryland)

pPKCθ A/E pEFneo mit PKCθ, konstitutiv aktiv durch Aminosäureaustausch an Position 25 (A→E), (G. Baier, Universität Innsbruck, Österreich) (8)

| | |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pcDNA3.1(+) | P _{CMV} , P _{T7} , ori _{f1} , ori _{SV40} , BGHpA, SV40pA, pUC _{ori} , Amp ^R , Neo ^R (Invitrogen) |
| pBG24 | pcDNA3.1(+) mit <i>vacA</i> von <i>H. pylori</i> Tx30a |
| pBG26 | pcDNA3.1(+) mit <i>vacA</i> von <i>H. pylori</i> 26695 |
| pBG30 | pcDNA3.1(+) mit <i>ureB</i> von <i>H. pylori</i> 26695 |
| pWS208 | pcDNA3.1(+) mit <i>vacA</i> _{P9A} von <i>H. pylori</i> 26695 |
| pWS209 | pcDNA3.1(+) mit <i>vacA</i> ₃₄₋₄₅₈ von <i>H. pylori</i> 26695 |

1.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech, Ebersberg bezogen.

| Name | Sequenz (5'→3') |
|-------|--------------------------------------------------------------|
| BG8 | CTGCTTGAATGCGCCAAAC |
| BG9 | ATGGAAATACAACAAACACAC |
| BG10 | GGTCAAATGCGGTCATGG |
| BG11 | CCATTGGTACCTGTAGAAAC |
| BG12 | CATAACTAGCGCCTTGCAC |
| BG13 | GGAGCCCCAGGAAACATTG |
| BG15 | CGGGATCCGAAATGGCCTTTTTT CACAACCGTGATCATT |
| BG16 | CGGGATCCGTCGACTTAATTAGGAGTGGCGCTAGG |
| BG17 | CGGGATCCGTCGACTTAATTAGGAGTGGCGCTAGG |
| BG19 | ACTCTTTGGGGCGTTCATTTGGAG |
| BG20 | TCGTACCTCTCCTTGGCGATATAAAGG |
| BG21 | CGGGATCCGAAATGAAAAAGATTAGCAGAAAAGAATATG |
| BG22 | GTCGACTTAGAAAATGCTAAAGAGTTGCGCCAAGCT |
| WS200 | ACCGCTCGAG CTTTAAGAAG GAGATATACA TATGGCCTTT TTCACAACCG TG |
| WS209 | CGGGATCCGT CGACTTAATT CACTCTTAAA GGCCC |
| WS240 | CGGGATCCGA AATGGCCTTT TTCACAACCG TGATCATTGC AGCCATTGTTGG |

1.6 Antikörper

Primäre Antikörper

| | |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| α -Actin (H-196) | monoklonaler Antikörper gegen Aktin (Maus), Santa Cruz Biotechnology |
| α -CagA (AK257) | polyklonales Antiserum gegen die C-terminale Hälfte des CagA-Proteins von <i>H. pylori</i> 185-44 (Kaninchen) |
| α -CaM I (FL-149) | polyklonales Antiserum gegen Calmodulin (Kaninchen), Santa Cruz Biotechnology |
| α -CD3 (UCHT1) | monoklonaler Antikörper gegen CD3 (Maus), Pharmingen |
| α -CD25 (M-A251) | monoklonaler Antikörper gegen CD25 (Maus), FITC gekoppelt, Pharmingen |
| α -CD28 (CD28.2) | monoklonaler Antikörper gegen CD28 (Maus), Pharmingen |
| α -CD69 (FN50) | monoklonaler Antikörper gegen CD69 (Maus), FITC gekoppelt, Pharmingen |
| α -CnA (H-209) | polyklonales Antiserum gegen die A-Untereinheit von Calcineurin (Kaninchen), Santa Cruz Biotechnology |
| α -CnB | polyklonales Antiserum gegen die B-Untereinheit von Calcineurin (Kaninchen), Affinity Bioreagents |
| α -Cyclin D3 (C-16) | polyklonales Antiserum gegen Cyclin D3 (Kaninchen), Santa Cruz Biotechnology |
| α -Cyclin E (HE12) | monoklonaler Antikörper gegen Cyclin E (Maus), Santa Cruz Biotechnology |
| α -FKBP12 (8) | monoklonaler Antikörper gegen FK506-Bindeprotein 12 (Maus), Pharmingen |
| α - Flag M2 | monoklonaler Antikörper gegen das Flag-Epitop DYKDDDDK (Maus), Sigma |
| α -HA (HA-7) | monoklonaler Antikörper gegen das HA-Epitop YPYDVPDYA (Maus), Sigma |
| α -NFATc1 (7A6.1) | monoklonaler Antikörper gegen NFAT (Maus), Pharmingen |
| α -P-Tyr (PY99) | monoklonaler Antikörper gegen tyrosinphosphorylierte Proteine (Maus), Santa Cruz Biotechnology |
| α -P-Rb (Ser807/811) | polyklonales Antiserum gegen phosphoryliertes Retinoblastom-Protein (Kaninchen), Cell Signaling Technology |

| | |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| α -Rb (C-15) | polyklonales Antiserum gegen das Retinoblastom-Protein (Kaninchen), Santa Cruz Biotechnology |
| α -UreB (AK201) | polyklonales Antiserum gegen die B-Untereinheit der Urease von <i>H. pylori</i> (Kaninchen) |
| α -VacA (AK197) | polyklonales Antiserum gegen das reife VacA-Protein von <i>H. pylori</i> (Kaninchen) |

Sekundäre Antikörper

Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Ziege) (Dianova)

Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Kaninchen) (Dianova)

1.7 Zellkulturmedien und -puffer

| | |
|------|-------------------------------------------------------------------|
| PBS | PBS Dulbeccos's ohne Calcium, Magnesium und Natriumbicarbonat |
| HBSS | Hanks' Balanced Salt Solution ohne Calcium und Magnesium |
| RPMI | RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium mit Natriumpyruvat und Pyridoxin |

Alle Zellkulturlösungen und Medien wurden von Gibco, BRL bezogen.

Zusätze für Zellkulturen

4x Penicillin/Streptomycin, Gentamicin, Fungizone, MEM-Aminosäurelösung, Basal-Medium Eagle Vitamin-Lösung (Gibco, BRL), TCM-Supplemente (Celox Corp.), Epidermaler Wachstumsfaktor (Promega).

1.8 Antibiotika, Zusätze und allgemeine Lösungen

In diesem Teil sind Materialien beschrieben, die allgemein Verwendung fanden. Puffer und Lösungen für spezielle Anwendungen sind bei der jeweiligen Methode beschrieben.

| | |
|-----------------------|--------------------------------------------------------|
| Ampicillin (Amp) | 100 mg/l |
| Chloramphenicol (Cam) | 30 mg/l (LB-Medium/-Platten) 6 mg/l (Serum-Platten) |
| Kanamycin (Kan) | 50 mg/l (LB-Medium/-Platten) 8 mg/l (Serum-Platten) |

| | |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tetracyclin (Tet) | 15 mg/l |
| Gentamicin (Gen) | 100 mg/l |
| 5-Brom-3-chlor-3-indolyl- β-D-Galaktopyranosid | 40 mg/l |
| PBS | 0,2 g/l KCl, 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ , 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ |
| TBS | 150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,5 |

1.9 Chemikalien und Reagenzien

Brucella Medium (Becton Dickinson); Fluoprep (BioMerieux); Coomassie Brilliant Blue R250 (Biomol); GC-Agar (remel); 4-Nitrophenylphosphat-di-natriumsalz (PNPP) (Fluka); Acrylamid/Methylenbisacrylamid 29:1 (30%), Lennox-L-LB-Agar, Lennox-L-LB-Medium, N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) (Gibco BRL); Desoxyribonukleinsäure- (dNTP-) Mix (MBI Fermentas); Chloramphenicol, Methylenblau, Nystatin, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Merck); Sephadex G-50 (Pharmacia); FK506, Calpastatin, Calpeptin, PD150606 (Calbiochem); TrichostatinA, Phytohämagglutinin (PHA), Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Lithiumacetat, Ionomycin, Cytochalasin D, Bafilomycin A1, PP1, Genistein, Cycloheximid, Gentamicin, Staurosporin, 5-Brom-3-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz (BCIP), Guanidin-HCl, Ampicillin, DAP, Ethidiumbromid, Kanamycin, Leupeptin, Natrium-Orthovanadat, Paraformaldehyd (PFA), Pepstatin, Tetracyclin, Trimethoprim, TritonX-100, Tween-20, Vancomycin, X-Gal (Sigma); BAPTA (Fluka); Luciferin (Roche).

Alle weiteren Chemikalien wurden im Reinheitsgrad „zur Analyse p.a.“ von Merck, Roth oder Sigma bezogen.

1.10 Proteine und Enzyme

AP-gekoppeltes ProteinA, Calpain, FKBP12 (Sigma); Calcineurin, Calmodulin, Calcineurin Assay Kit (Calbiochem); CyclophilinA (Dianova); Rinderserumalbumin (BSA) (Biomol); fötales Kälberserum (FCS), Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco BRL); Pferdeserum (PAA); AP-gekoppelte Nickel-Nitrilotriessigsäure (NTA) (Quiagen); Expand Taq Polymerase, ProteinG-Agarose, Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase (Roche).

1.11 Molekulargewichtsmarker

DNA-Gelelektrophorese: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas)

Polyacrylamid-Gelelektrophorese: Prestained Low Range (Bio-Rad)

Prestained High Range (Bio-Rad)

1.12 Hilfsmittel

Röntgenfilm (Fuji, A. Hartenstein); Dialyseschläuche (Medicell); PVDF-Membran (Bio-Rad); Nitrocellulose-Membran (Schleicher+Schüll); Zellkulturflaschen/-platten, ELISA Maxisorp Platten (Nunc); Zellschaber (Falcon); 0,2µm-Sterilfilter (Josef Peske GmbH); Elektroporationsküvetten für eukaryontische Zellen (Bio-Rad); Elektroporationsküvetten für Bakterien (Eurogentec); Halbmikroküvetten (Brand); Filterpapiere (Whatman); Einfrierröhrchen (Nalgene); Anaerobentöpfe (Fritz Gößner GmbH).

1.13 Apparaturen und Geräte

Agarose-Gelkammern, Gene Pulser™, Spannungsquellen, PAGE-Mini-Gelkammern (Bio-Rad); Blot-Apparaturen (Biotech Fisher); Brutschränke (Binder); Anaerobenbrutschrank Microincubator MI22C (Scholzen); UV-Transilluminator, Video-Geldokumentationssystem (Herolab); ELISA-Reader (Tecan); Sterilbank (BDK); Wasserbäder, Schüttelinkubator (GFL); Photometer (Hach); Magnetrührer (Heidolph); DNA Speed Vac (Savant); Thermocycler (Perkin Elmer); Heizblock (Techne); Rolltisch (Assistent); Zentrifuge RC5C Plus (Rotoren SS34, SLA3000) (Sorvall); Tischzentrifugen Megafuge1.0R, Biofuge15R, Biofuge15 (Heraeus); Fluoreszenzmikroskop DM RD mit Digitalkamera (Leitz); konfokales Laserscanning-Mikroskop (Leica); Luminometer MicroLumat Plus LB 96V (Berthold); Durchflußzytometer EPICS® XL-MCL (Coulter).

2 Methoden

2.1 Arbeiten mit Bakterien

2.1.1 Kultur von Bakterien

Escherichia coli wurde auf Luria-Bertani- (LB)-Platten kultiviert, die mit den jeweiligen Antibiotika zur Selektion hergestellt worden waren. Flüssigkulturen wurden entsprechend in LB-Flüssigmedium angesetzt. Platten und Flüssigkulturen wurden je nach Bedarf bei 28°C oder 37°C inkubiert.

Helicobacter pylori und *Campylobacter jejuni* wurden auf Serumplatten kultiviert, die gegebenenfalls mit Antibiotika versetzt worden waren. Flüssigkulturen wurden in Brucella-Medium, supplemetiert mit 10% FCS, angesetzt. Alle *H. pylori*-Kulturen wurden bei 37°C in einer Atmosphäre aus 85% N₂, 10% CO₂ und 5% O₂ inkubiert. *C. jejuni*-Kulturen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

| | |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LB-Flüssigmedium | 20 g/l Lennox-L-Medium |
| LB-Platte | 32 g/l Lennox-L-Agar |
| Serumplatten | 36 g/l GC-Agar-Base, nach dem Autoklavieren Zugabe von 10 ml/l Vitamin-Mix, 80 ml/l Pferdeserum, 10 mg/l Vancomycin, 5 mg/l Trimethoprim, 1 mg/l Nystatin |
| Vitamin-Mix | 100 g/l α -D-Glucose, 10 g/l L-Glutamin, 26 g/l L-Cystein, 0,1 g/l Cocarboxylase, 20 mg/l Fe(III)-Nitrat, 3 mg/l Thiamin, 13 mg/l p-Aminobenzoesäure, 0,25 g/l Nicotinamidadenindinucleotid (NAD), 10 mg/l Vitamin B12, 1,1 g/l L-Cystin, 1 g/l Adenin, 30 mg/l Guanin, 0,15 g/l L-Arginin, 0,5 g/l Uracil |
| Brucella-Medium | 28 g/l Brucella Broth |

2.1.2 Transformation von Bakterien

2.1.2.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Ein Liter LB-Medium wurde mit 10 ml einer *E. coli* Übernacht-Kultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₅₅₀ von 0,6-1 inkubiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien abzentrifugiert (4°C, 2300 x g, 15 min), das Zellsediment in einem Liter eiskaltem H₂O resuspendiert und danach erneut zentrifugiert. Nach Resuspension der Zellen in 500 ml eiskaltem H₂O und erneuter Zentrifugation erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 20 ml 10%iger eiskalter Glycerinlösung. Anschließend wurden die Zellen in einem

Gesamtvolumen von 3-4 ml 10%iger eiskalter Glycerinlösung aufgenommen und in Aliquots zu je 40 µl auf Trockeneis schockgefroren und danach bei -70°C gelagert.

2.1.2.2 Transformation

Ein Aliquot elektrokompenter Zellen wurde von -70°C langsam auf Eis aufgetaut, mit 0,8-1 µl DNA gemischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation wurde mittels einer *Gene Pulser* Apparatur bei 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 220 Ohm durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend sofort in 1 ml LB-Medium suspendiert und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz 1 h bei 37°C geschüttelt, bevor Aliquots des Transformationsansatzes auf LB-Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

2.1.2.3 Transformation von *E. coli* Top10-Zellen

Falls eine erhöhte Transformationseffizienz erwünscht war, wurden käufliche, superkompetente *E. coli* Top10-Zellen (Invitrogen) verwendet. Die Transformation erfolgte nach Gebrauchsanleitung.

2.1.2.4 Transformation von *H. pylori*

Da *H. pylori* über eine natürliche Transformationskompetenz verfügt, war keine Vorbehandlung der Bakterien notwendig. Zur Transformation wurden die Bakterien in Brucella/10% FCS-Medium resuspendiert und auf eine OD₅₅₀ von 0,2-0,3 eingestellt. Jeweils 1 ml dieser Suspension wurde mit 1-3 µg DNA versetzt und 4-8 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf entsprechende Serum-Selektivplatten ausplattiert und unter Standardbedingungen 5 Tage inkubiert.

2.2 Arbeiten mit DNA

2.2.1 DNA-Gelelektrophorese

Für die analytische Auftrennung von DNA wurden Agaroseflachbettgele mit einer Agarosekonzentration von 0,8-1,5% (in 1xTBE-Puffer) eingesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit mindestens ¼ Volumen GEBS-Puffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in Horizontalgelkammern mit 1xTBE-Puffer bei 100 V. In einem Ethidiumbromidbad (1 mg/l) wurden die Gele angefärbt und DNA-Fragmente durch UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurde ein Videosystem benutzt.

Für präparative Zwecke erfolgte die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit 1xTAE-Puffer als Gel- und Laufpuffer. Die Elektrophorese wurde bei 60 V für 3 h bzw. bei 11 V über Nacht durchgeführt. Die DNA-Banden wurden anschließend aus dem 30 min mit 0,1%

Methylenblau-Lösung angefärbten und mit Wasser entfärbten Gel auf einem Durchlichttisch ausgeschnitten. Für die DNA-Isolierung aus der Agarose wurde das Ultra Clean TM15 Kit (Dianova) verwendet.

10x TBE-Puffer 108 g/l Tris-Base, 55 g/l Borsäure, 8,3 g/l EDTA

50x TAE-Puffer 242 g/l Tris-Base, 57,1 ml/l Eisessig, 50 mM EDTA

GEBS-Puffer 20% Glycerin, 50 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,5% Sarkosyl

2.2.2 DNA-Fragmentisolierung

Für die DNA-Fragmentisolierung nach präparativer Gelelektrophorese wurde das Ultra Clean TM15 Kit von Dianova verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanweisung.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann man einen ausgewählten Abschnitt eines DNA-Moleküls effizient amplifizieren (184). Man synthetisiert zwei 18-25 bp lange Oligonukleotide, die nach Hitzedenaturierung der DNA in gegenläufiger Orientierung an jeden Einzelstrang hybridisieren. Das hitzestabile Enzym DNA-Polymerase I (= Taq-Polymerase) aus *Thermus aquaticus* katalysiert nach Zusetzen der vier Desoxyribonukleotide die Verlängerung des Einzelstrangs vom 3'-Ende der Oligonukleotide aus. Beim folgenden Denaturierungsschritt trennen sich die entstandenen Doppelstränge und können erneut mit den Oligonukleotiden hybridisieren. Auf diese Weise kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der DNA.

Zur Klonierung und zum Nachweis von Genen aus *H. pylori* oder *C. jejuni* wurde eine PCR mit *Expand*- oder *Powerscript*-Taq-Polymerase und dem dazugehörigen Puffersystem durchgeführt. Als Matrize wurde chromosomale DNA (1:25 verdünnt) oder Plasmid-DNA (1:100) eingesetzt. Je nach Anwendung wurden die PCR-Ansätze in einem Gesamtvolumen von 50 oder 100 µl durchgeführt.

Pro 100 µl Ansatz wurden 2 µl verdünnte DNA, je 100 pmol Oligonukleotide, je 20 nmol dATP/dGTP/dTTP/dCTP und 2 U Taq-Polymerase verwendet.

Die Matrizen-DNA wurde zunächst für 3 min bei 94°C in einem Thermocycler denaturiert; die Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments erfolgte dann in 30 wiederkehrenden Zyklen: 30 s Denaturieren bei 94 °C, 30 s Hybridisierung bei 48-52°C, 30 s-4 min (je nach Länge der amplifizierten DNA) Kettenverlängerung bei 72°C. Die entstandenen PCR-Produkte wurden auf einem TBE-Agarosegel analysiert.

2.2.4 Klonierung von PCR-Produkten mittels TOPO-TA-Cloning®

Schwer zu klonierende PCR-Produkte wurden mit Hilfe des TOPO-TA-Cloning®-Kits mit dem pCR2.1-TOPO-Vektor von Invitrogen ligiert. Dabei wird ausgenutzt, dass die Taq-Polymerase eine Sequenz-unspezifische terminale Transferase-Aktivität besitzt, durch die bei jeder Kettenverlängerung ein einzelnes Desoxyadenosin (A) an das 3'-Ende des PCR-Produktes angehängt wird. Der linearisierte pCR2.1-TOPO-Vektor besitzt einen überhängenden 3'-Desoxythymidin (T)-Rest und kovalent gebundene Topoisomerase I aus dem *Vaccinia*-Virus, wodurch eine effektive Ligation des PCR-Produkts mit dem Vektor vermittelt wird. Ausserdem enthält das Kit superkompetente Top10 *E. coli*-Zellen, die sehr effizient transformierbar sind.

Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanweisung.

2.2.5 Restriktion

Analytische DNA-Restriktionen wurden üblicherweise in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit Restriktionsenzymen von Roche und dem dazugehörigen Puffersystem durchgeführt. Etwa 1 µg DNA wurden bei zugesetzten Enzymmengen von 1-5 U hydrolysiert.

Bei präparativen Restriktionen wurden in Volumina von 50-60 µl DNA-Mengen von 3-10 µg und entsprechend größere Enzymmengen eingesetzt. Die Puffer- und Inkubationsbedingungen für die verschiedenen Restriktionsenzyme wurden nach den Hersteller-Angaben gewählt. Bei Zweifach-Restriktionen mit Enzymen, die unterschiedliche Puffer benötigen, wurde zwischen den beiden Restriktionen ein Zentrifugationsentsalzung durchgeführt. Zum Inaktivieren der Enzyme vor Ligationen wurde ¼ Volumen GEBS-Puffer zugegeben und der Ansatz 10 min bei 70°C inkubiert.

2.2.6 Zentrifugationsentsalzung

Die ausschlusschromatographische Methode der Zentrifugationsentsalzung wurde zur schnellen Entfernung von Salzen, Nukleotiden, denaturierten Proteinen und kleinen DNA-Fragmenten eingesetzt. Als Säule dienten 1,5 ml Eppendorfgefäße, deren Boden mit einer glühenden Kanüle perforiert wurde. Nach Einfüllen von ca. 20 µl silikonisierter Glasperlen wurde 1 ml des Säulenmaterials Sephadex G-50 (in wässriger Lösung) zupipettiert. Die Säule wurde durch Zentrifugation (2100 x g, 2 min) gepackt und mit 100 µl H₂O gewaschen. Danach wurde die Probe auf die Säule aufgetragen und durch Zentrifugation (2100 x g, 2 min) in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß eluiert.

2.2.7 Ligation

Für Ligationen wurden in 12 µl Gesamtvolumen 1,2 µl Ligationspuffer (10x) und 1 U T4-DNA-Ligase sowie das zu klonierende DNA-Fragment in einem vierfachen Überschuss zu der geschnittenen Vektor-DNA eingesetzt. Es wurde entweder 4 h bei 16°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Für die nachfolgende Transformation in *E. coli* wurde 1-5 µl des Ligationsansatzes verwendet.

2.2.8 Präparation von Plasmiden

2.2.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA nach Holmes und Quigley (80)

Zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde eine Einzelkolonie auf einer antibiotikahaltigen LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Impföse der Bakterien wurde in 300 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 15 µl Lysozym-Lösung wurde der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert. Durch einminütiges Kochen bei 100°C wurden die Zellen lysiert und anschließend Zelltrümmer und chromosomale DNA durch Zentrifugation (12000 x g, 15 min) sedimentiert. Das Sediment wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Der wässrige Überstand mit der Plasmid-DNA wurde mit 200 µl Isopropanol versetzt und das Gemisch 10 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 12000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50 µl sterilem, destilliertem Wasser aufgenommen.

| | |
|-------------|----------------------------------------------------------------------|
| STET-Puffer | 8% Saccharose, 5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8,0 |
|-------------|----------------------------------------------------------------------|

| | |
|----------------|-------------------------|
| Lysozym-Lösung | 10 mg/ml in STET-Puffer |
|----------------|-------------------------|

2.2.8.2 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA mit Qiagen-Säulen

Plasmid-DNA, die zur Transfektion von Jurkat T-Zellen eingesetzt wurde, wurde säulenchromatographisch aufgereinigt. Hierzu wurde das Qiagen Plasmid Midi-Kit benutzt. Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanleitung.

2.2.9 Isolierung chromosomaler DNA aus *Helicobacter pylori*

Zur Isolierung von chromosomaler DNA aus *H. pylori* wurde der QIAamp Tissue Kit von Quiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanleitung.

2.3 Arbeiten mit Protein

2.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford (21)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe wurden 100 µl der Probe (gegebenenfalls verdünnt in PBS) mit 1 ml Bradfordreagenz versetzt und nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur die Extinktion der Probe gegen einen entsprechenden Blindwert bei 595 nm gemessen. Für jede Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit bekannten BSA-Konzentrationen aufgenommen.

Bradford-Reagenz 0,01% Coomassie Brilliant Blue G250, 5% Ethanol, 10% Phosphorsäure (85%ig)

2.3.2 Herstellung bakterieller Zellysate

Zur Herstellung von Lysaten wurden die Bakterien in PBS suspendiert und auf eine OD₅₅₀ von 10 eingestellt. Die Suspension wurde abzentrifugiert (3200 x g) und die pelletierten Bakterien im entsprechenden Volumen SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Zellysate wurden vor dem Auftragen auf ein Proteingel 10 min bei 96°C aufgeköcht und anschließend 2 min bei 12000 x g zentrifugiert.

SDS-Probenpuffer 2% SDS, 0,1% Bromphenolblau, 10% Glycerin, 50 mM Tris-HCl pH 6,8

2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde das vertikale Gelelektrophoresesystem von Biorad benutzt. Trenn- und Sammelgele wurden nach Sambrook *et al.* (187) angesetzt. In der Regel wurden 5-10 µl der in SDS-Probenpuffer aufgenommenen Proteinproben aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben erfolgte bei einer Spannung von 100-120 V. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend entweder auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen (siehe Western Blot) oder mit Coomassie für 10-15 Minuten gefärbt. Anschließend wurde das Gel so lange in der Entfärbelösung inkubiert, bis die Proteine deutlich sichtbar waren.

Elektrophorese-Puffer 250 mM Glycin, 0,1% SDS, 25 mM Tris-HCl pH 8,3

Trenngelpuffer 1,5 M Tris-HCl pH 8,8

Sammelgelpuffer 1,0 M Tris-HCl pH 6,8

Coomassie-Lösung 0,275% Coomassie Brilliant Blue R250, 50% Methanol, 10% Essigsäure

Entfärbelösung 10% Methanol, 10% Ethanol, 7,5% Essigsäure

2.3.4 Western Blot

2.3.4.1 Transfer der Proteine auf die Membran

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Trockenblotverfahren mit Hilfe einer Elektrobloßapparatur auf eine PVDF- oder Nitrocellulosemembran übertragen. Der Kontakt zwischen Kathode und PAA-Gel bzw. Anode und Nitrocellulose-Filter erfolgte durch je zwei dicke und dünne Filterpapiere, wobei die beiden unteren dicken Filterpapiere in Anodenpuffer I, die folgenden dünnen Filterpapiere und die Membran in Anodenpuffer II und die oberen dünnen und dicken Filterpapiere in Kathodenpuffer getränkt wurden. Der Proteintransfer erfolgte bei 0,8 mA/cm² für eine Stunde.

| | |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Anodenpuffer I | 0,3 M Tris, pH 10,4; 10% Methanol |
| Anodenpuffer II | 25 mM Tris, pH 10,4; 10% Methanol |
| Kathodenpuffer | 25 mM Tris; 40 mM 6-Amino-n-Caprönsäure oder Glycin; 10% Methanol; eingestellt auf pH 9,4 |

2.3.4.2 Detektion von Proteinen mittels polyklöner Antikörper

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF- oder Nitrocellulosemembran wurden die nicht besetzten Bindungsstellen auf der Membran für mindestens eine Stunde in TBS/3% BSA abgesättigt. Anschließend wurde das jeweilige Antiserum je nach Titer um Faktor 1000-5000 in TBS/3% BSA verdünnt und mit der Membran für mindestens zwei Stunden inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 Minuten mit TTBS wurde die Membran mit einem Konjugat aus ProteinA und alkalischer Phosphatase (ProtA-AP) oder Peroxidase-gekoppeltem anti-Kaninchen-Antikörper in TTBS für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TTBS wurde die Membran bei Verwendung von ProtA-AP durch Schwenken in 10 ml Detektionslösung entwickelt und die Farbreaktion anschließend mit H₂O_{bidest} abgestoppt. Wurde als sekundärer Antikörper ein Peroxidase-Konjugat verwendet, erfolgte die Entwicklung mit ECL™ Western Blot Detektionsreagenzien (Amersham). Diese Art der Entwicklung ermöglicht eine sensitivere Detektion von Proteinen über Chemilumineszenz, Die Sichtbarmachung der Antikörper-markierten Proteine erfolgte mit Hilfe von Röntgenfilmen.

| | |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| TBS | 150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,5 |
| TTBS | TBS, 0,5% Tween20 |
| Detektionslösung | 0,1 M Tris/HCl pH 9,6, 0,1g/l NBT, 7 mM MgCl ₂ , 50 mg/l BCIP |

2.3.4.3 Detektion von Proteinen mittels monoklonaler Antikörper

Kommerziell erworbene monoklonale Antikörper wurden nach Anleitung des Herstellers in den empfohlenen Puffern eingesetzt. Zur Detektion der Proteine wurde ein Peroxidasegekoppelter anti-Maus-Antikörper verwendet. Die Visualisierung der Proteine erfolgte über ECL™ Western Blot-Detektionsreagenzien (Amersham) nach Anleitung des Herstellers.

2.3.5 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wurde eingesetzt, um eine Interaktion zwischen VacA und Calcineurin zu zeigen. Um eine Überexpression von Calcineurin in der Zelle zu erreichen, wurden Jurkat T-Zellen mit dem Plasmid HA-pSG5-CnA β 2, das für Calcineurin A mit einem N-terminalen HA-Tag codiert, transfiziert. 18 h nach der Transfektion wurden die Zellen für eine Stunde mit 250 μ g/ml P12-Überstand inkubiert und anschließend für 15 min bis 2 h mit 50 ng/ml PMA und 1 μ M Ionomycin aktiviert. Die Zellen wurden geerntet, einmal mit PBS gewaschen und in 800 μ l IP-Puffer lysiert. Die Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation bei 12000 x g (15 min, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde mit 5 μ l α -HA-Antikörper versetzt und eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die ProteinG-Agarose wurde mit IP-Puffer äquilibriert und 2 h bei 4°C mit dem Lysat inkubiert. Anschließend wurde die ProteinG-Agarose viermal mit IP-Puffer (ohne Triton) gewaschen und die gebundenen Proteine durch Aufkochen in 50 μ l SDS-Probenpuffer eluiert.

IP-Puffer 25 mM Hepes pH 7,5, 25 mM NaCl, 2 mM DTT, 10% Glycerol, 0,1% Triton-X-100, 1 mM PMSF, 1 μ M Leupeptin, 1 μ M Pepstatin

2.3.6 Aufkonzentrierung von Bakterien-Kulturüberständen

H. pylori-Flüssigkulturen wurden mit OD₅₅₀=0,1 angeimpft und zwei Tage bei leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (2500 x g, 20 min, 4°C) und die Überstände durch einen Sterilfilter (0,2 μ m Porengröße) filtriert. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden durch Versetzen mit dem gleichen Volumen gesättigter (NH₄)₂SO₄-Lösung ausgefällt. Die Proteine wurden durch Zentrifugation im SS34-Rotor (20 min, 20000 x g, 4°C) sedimentiert und das erhaltene Präzipitat in 1 ml PBS aufgenommen. Zur Entfernung des Ammoniumsulfats wurde das Präzipitat übernacht gegen PBS dialysiert.

2.3.7 Reinigung und Aktivierung von VacA

Gereinigtes VacA vom Stamm *H. pylori* 60190 wurde von N. Gauthier und P. Boquet (Nizza, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Die Aufreinigung erfolgte wie von Cover *et al.* (32) beschrieben. Das gereinigte VacA wurde durch Ansäuerung mit 0,25 M HCl auf pH 3,0 für 15 min bei 37°C aktiviert und vor Zugabe zu den Zellen mit 0,25 M NaOH wieder neutralisiert.

2.3.8 *In vitro*-Phosphorylierung

CagA kann mit Hilfe einer Src-Kinase *in vitro* phosphoryliert werden. Dazu wurden $1,2 \cdot 10^8$ Bakterien in 40 μ l NP40-Puffer lysiert. Anschließend wurden 5 μ l 10x Phosphorylierungspuffer und 5 U Src-Kinase (Upstate Biotechnology) zugegeben. Der Ansatz wurde 10 min bei 30°C inkubiert.

NP40-Puffer 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM Natriumvanadat,
1% NP-40

Phosphorylierungspuffer 25 mM Tris/HCl pH 7,2, 40 μ M ATP, 6,25 mM
MnCl₂, 31,25 mM MgCl₂, 62,5 μ M Natriumvanadat

2.3.9 *In vitro*-Proteolyse mit Calpain

$1,2 \cdot 10^8$ Bakterien wurden in 40 μ l NP40-Puffer lysiert. Zur Proteolyse wurden 5 μ l 10x Proteolyse-Puffer und 0,1-0,0025 U m-Calpain (Sigma) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 30°C.

Proteolyse-Puffer 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM Mercaptoethanol, 20 mM CaCl₂

2.4 Arbeiten mit Zellen und Zellkulturen

2.4.1 Kultivierung von Zelllinien

2.4.1.1 Kultur von Jurkat T-Zellen

Jurkat T-Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden alle zwei Tage 1:4 verdünnt. Da Jurkat-Zellen nicht adhären wachsen, wurden die Zellen zur Entfernung des alten Mediums und bei Waschschriffen fünf Minuten bei 200 x g abzentrifugiert.

2.4.1.2 Kultur von J774A.1-Makrophagen

Die adhärenente Maus-Makrophagen-Zelllinie J774A.1 wurde in DMEM-Medium mit 10% FCS bei 37°C, 10% CO₂ kultiviert. Die Passage erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen. Von einer konfluent gewachsenen Kultur wurde das Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen, um Mediumreste und abgelöste Zellen zu entfernen. Da sich J774A.1-Zellen nicht durch Trypsinisieren ablösen lassen, wurden die Zellen in DMEM mit einem sterilen Zellschaber abgeschabt. Die Verdopplungszeit beträgt ca. zwei Tage, so dass die Zellen alle zwei Tage 1:2 verdünnt weiterkultiviert wurden.

2.4.1.3 Kultur von HeLa- und AGS-Zellen

HeLa- und AGS-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS kultiviert. Bevor die Zellen einen konfluenten Rasen gebildet hatten, wurden sie verdünnt und in eine neue Zellkulturflasche umgesetzt. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend einige Minuten mit 2 ml Trypsinlösung bei 37°C und 5%CO₂ behandelt. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Sobald alle Zellen vom Flaschenboden abgelöst waren, wurde das Trypsin durch Zugabe von 4 ml DMEM-Medium mit 10% FCS inaktiviert. Ein Teil der Zellen wurde dann in eine frische Flasche mit DMEM, 10% FCS umgesetzt. Die frische Kultur wurde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.4.1.4 Kultur von NHG-1 Zellen

Die NHG-1 Zelllinie wurde in DMEM/HEPES-Medium mit Penicillin/Streptomycin, 12,5 µg/ml Gentamicin, 1µg/ml Fungizone, 1x TCM-Supplemente, 1x MEM Aminosäurelösung, 1x Basal-Medium Eagle Vitamin-Lösung, 10% FCS und 6 ng/ml Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) kultiviert. Zur Verdünnung einer konfluenten Kultur wurden die Zellen einmal mit Ca²⁺/Mg²⁺ freier HBSS-Lösung gewaschen und mit Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Ein Teil der Zellen wurde in frischem Medium in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät. Die Kultur erfolgte bei 37°C und 5%CO₂.

2.4.2 Aufreinigung von Peripheren Blutlymphozyten (PBLC)

PBLC wurden über Dichtegradienten-Zentrifugation aus humanem Blut isoliert. Hierzu wurden 15 ml einer Ficoll-Lösung (Dichte 1,077) mit frisch entnommenem, heparinisierten und mit 3 Volumen PBS verdünntem Blut überschichtet. Nach der Zentrifugation (400 x g, 40 min, ohne Bremse, Heraeus Megafuge 1.0R) wurde die an der Phasengrenze entstandene Bande aus Lymphozyten, Monozyten und Blutplättchen abgenommen und die Zellen einmal mit 50 ml PBS gewaschen. Zur Abtrennung der Blutplättchen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und bei 200 x g zentrifugiert, wobei die Blutplättchen im Überstand bleiben. Zur Depletion von Makrophagen und Monozyten über Adhärenz an Plastikoberflächen wurden die Zellen anschließend in RPMI, 20% FCS in einer Zelldichte von 2*10⁶ Zellen/ml aufgenommen und für 1-2 h in einer Zellkulturflasche im Brutschrank inkubiert. Die nicht adhärenen Zellen, die im wesentlichen aus T-Zellen und B-Zellen bestehen, wurden abzentrifugiert, gezählt und in der für den Versuch benötigten Zelldichte in RPMI, 10% FCS aufgenommen.

2.4.3 Isolierung von CD4⁺ T-Zellen

Zur Isolierung von humanen CD4⁺ T-Zellen wurden die PBLC nach der Depletion der Blutplättchen gezählt und mit einer Zelldichte von 10⁷ Zellen/80 µl in MACS-Puffer

aufgenommen. Pro 10^7 Zellen wurden 20 μ l MACS-CD4-MicroBeads (Miltenyi Biotec) zugegeben und die Zellen 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem 20fachen Volumen an MACS-Puffer gewaschen und zum Auftragen auf die mit MACS-Puffer äquilibrierte Säule (Typ LS) in 500 μ l/ 10^8 Zellen aufgenommen. Nachdem die Zellsuspension durch die Säule getropft war, wurde die Säule mit mindestens 8 ml MACS-Puffer gewaschen. Zur Elution wurde die Säule aus der Magnethalterung genommen und die Zellen mit 3 ml MACS-Puffer eluiert. Die erhaltenen Zellen wurden gezählt und nach Zentrifugation in dem entsprechenden Volumen RPMI/10% FCS aufgenommen.

MACS-Puffer PBS, 0,5% BSA, 2 mM EDTA

2.4.4 Isolierung von dendritischen Zellen

Die dendritischen Zellen wurden aus mit GM-CSF ausdifferenzierten Knochenmarkszellen einer C57/BL6-Maus mit Hilfe von MACS-CD11c MicroBeads (Miltenyi Biotec) isoliert. Die Differenzierung und Aufreinigung der dendritischen Zellen erfolgte durch J. Alferink (Institut für Med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU München).

2.4.5 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot einer Zellsuspension in der Neubauer-Zählkammer ausgewertet. Gezählt wurden die Zellen in vier Quadranten der Neubauer-Zählkammer und daraus der Mittelwert gebildet. Die Zellzahl pro ml errechnete sich nach folgender Formel:

Zellzahl / ml = Mittelwert x Verdünnungsfaktor x 10^4

2.4.6 Test von gefällten Bakterien-Kulturüberständen auf Vakuolisierung von Jurkat T-Zellen

Die vakuolisierende Aktivität des Zytotoxins wurde nach Cover *et al.* (31) bestimmt. Dazu wurden Jurkat T-Zellen mit 250 μ g/ml der gefällten Bakterien-Kulturüberstände für ca. 12 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Anfärbung der Vakuolen wurden die Zellen mit einer Neutralrotlösung behandelt. Dazu wurde eine Färbestammlösung 1:10 in RPMI/10% FCS verdünnt, die Zellen darin resuspendiert und für 4 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 ml 0,9% NaCl gewaschen und die Vakuolisierung der Zellen lichtmikroskopisch untersucht.

Färbestammlösung 0,5% Neutralrot, 0,9% NaCl

2.4.7 Bestimmung der Proliferation von Jurkat T-Zellen bzw. PBLC

Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von $2.5 \cdot 10^5$ Zellen/ml in 96-Napf-Platten ausgesät und für eine Stunde mit *H. pylori* (MOI 30) infiziert oder mit 250 µg/ml gefällten Bakterienkulturüberstand behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 50 ng/ml PMA und 5 µg/ml PHA (Jurkat) oder PHA allein (PBLC) aktiviert und, um ein Überwachsen der Bakterien zu verhindern, 100 µg/ml Gentamicin zugefügt. Die Proliferation der Zellen wurde nach vier Tagen mit Hilfe des CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assays (Promega) bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanweisung.

2.4.8 Messung der IL-2-Produktion von T-Zellen mittels Sandwich-ELISA

Jurkat T-Zellen wurden mit *H. pylori*-Stämmen (MOI 60) infiziert oder mit verschiedenen Konzentrationen an gefälltem Bakterien-Kulturüberstand inkubiert. Nach einer Stunde wurden 100 µg/ml Gentamicin, 50 ng/ml PMA und 1 µM Ionomycin zugegeben. Bei einigen Experimenten wurde zur Aktivierung eine Kombination aus an die Zellkulturplatte gebundenem α-CD3-Antikörper (Klon UCTH1) und löslichem α-CD28-Antikörper (Klon CD28.2) verwendet. 18-22 Stunden nach Aktivierung wurden die Zellen abzentrifugiert und die Überstände zur Messung der IL-2-Konzentration im ELISA eingesetzt oder zunächst bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der IL-2-Konzentration in den Zellkulturüberständen erfolgte mit dem OptEIA™ Human IL-2 Set von Pharmingen nach Anleitung des Herstellers.

2.4.9 Analyse von apoptotischen Zellen mit dem CaspACE™ FITC-VAD-FMK *In situ* Marker

Zur Bestimmung der apoptotischen Zellen nach Inkubation mit *H. pylori* wurden die Zellen mit *H. pylori* (MOI 60) infiziert und nach einer Stunde mit 50 ng/ml PMA und 1 µM Ionomycin aktiviert. Kontrollzellen blieben nicht infiziert bzw. wurden mit 1 µM Staurosporin behandelt. Die Zellen wurden nach 6 h bzw. nach 22 h mit 10 µM CaspACE™ FITC-VAD-FMK *In situ* Marker von Promega für 20 min gefärbt. Dieser Marker bindet irreversibel an aktivierte Caspasen, so dass apoptotische Zellen gefärbt werden. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für die Analyse im Durchflusszytometer (FACS) in 1 ml PBS resuspendiert. Pro Ansatz wurden 10000 Zellen im FACS analysiert (EPICS® XL-MCL cell sorter, Coulter).

2.4.10 Färbung von Oberflächenproteinen für die Durchflusszytometrie

2.4.10.1 CD25

$6 \cdot 10^6$ PBLC wurden mit 250 $\mu\text{g/ml}$ gefälltem Bakterienkultur-Überstand inkubiert; zur Negativkontrolle blieben die Zellen unbehandelt, als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 100 nM FK506 behandelt. Nach einer Stunde wurde 100 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin zugegeben und die Zellen mit 5 $\mu\text{g/ml}$ PHA stimuliert. 24 Stunden später wurden die Zellen abzentrifugiert, gewaschen und mit 20 μl FITC-gekoppeltem α -CD25-Antikörper für 30 Minuten bei 4°C gefärbt. Die CD25-Expression wurde mit einem EPICS® XL-MCL cell sorter (Coulter) analysiert, wobei standardmäßig 10.000 Zellen gezählt wurden.

2.4.10.2 CD69

Jurkat T-Zellen wurden mit Hp P12 bzw. P12 Δ vacA (MOI 60) oder mit deren gefällten Kulturüberständen (250 $\mu\text{g/ml}$) behandelt und nach einer Stunde aktiviert. Nach Inkubation für 24 h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 20 μl FITC-gekoppeltem α -CD69-Antikörper für 30 min bei 4°C gefärbt. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PBS gewaschen und im Durchflusszytometer analysiert. Auch hier wurden standardmäßig 10.000 Zellen gezählt.

2.4.11 Transfektion von Jurkat T-Zellen

Plasmide wurden in Jurkat T-Zellen über Elektroporation eingebracht.

Exponentiell wachsende Jurkat T-Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Zelldichte von ca. $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml in 400 μl RPMI-Medium mit 10% FCS resuspendiert. Je nach Plasmid und Anwendung wurden 15-30 $\mu\text{g/ml}$ Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben und der Transfektionsansatz in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenspalt von 0,4 cm überführt. Nach kurzer Vorinkubation der Zellen mit der DNA (2-3 min) wurden die Zellen einem Puls bei 250 V und 960 μF (Gene Pulser, Biorad) ausgesetzt. Die transfizierten Zellen wurden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie in RPMI/10% FCS überführt wurden. Zur Expression des transfizierten Gens wurden die Zellen 16-24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.4.12 Messung der Luciferase-Aktivität

Jurkat T-Zellen wurden durch Elektroporation mit 15 μg des entsprechenden Reporter-Plasmids transfiziert (250 V, 960 μF). 16-18 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen aliquotiert und mit lebenden Bakterien (MOI 60) oder gefällten Überständen für eine

Stunde behandelt. Die Zellen wurden mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (1 μ M) für 6 Stunden aktiviert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 100 μ l Lyse-Puffer aufgenommen. Zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurden 50 μ l des Lysats mit 50 μ l Luciferase-Puffer gemischt und die emittierten Photonen im Luminometer gemessen (MicroLumat Plus LB 96V, Berthold).

| | |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lyse-Puffer | 14 g/l K_2HPO_4 , 2,67 g/l KH_2PO_4 , 0,74 g/l EDTA, 5 g/l BSA, 1 g/l Triton X-100, eingestellt auf pH 7,8 |
| Luciferase-Puffer | 20 mM Tricin, 1,07 mM $(MgCO_3)_4Mg(OH)_2 \times 5 H_2O$, 0,1mM EDTA, 33,3 mM DTT, 270 μ M Li_3 -CoenzymA, 470 μ M Luciferin, 530 μ M Mg-ATP, eingestellt auf pH 7,8 |

2.4.13 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Um die Messdaten verschiedener Transfektionen vergleichen zu können, muss die Transfektionseffizienz der einzelnen Ansätze standardisiert werden. Hierzu wurde jeweils ein Plasmid, das für β -Galaktosidase (β -Gal) codiert, mit den anderen Plasmiden co-transfiziert. Da die β -Gal-Expression in den Zellen konstitutiv erfolgt, kann über die Bestimmung der β -Gal-Aktivität die Transfektionseffizienz bestimmt werden. Dazu wurde ein Aliquot des Zellysats, das zur Luciferase-Messung hergestellt wurde, im β -Galaktosidase-Enzym-Assay-System von Promega eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanleitung.

2.4.14 Expression eines transfizierten Gens mit Hilfe rekombinanter *Vaccinia*-Viren

In den pcDNA3.1-Vektor klonierte Gene, die nach Transfektion nicht effizient über den CMV-Promotor exprimiert werden konnten, wurden mit Hilfe des *Vaccinia*-Expressionssystems exprimiert. In diesem System werden die Gene nicht über den CMV-Promotor transkribiert, sondern über den ebenfalls auf dem Expressionsvektor pcDNA3.1 enthaltenen T7-Promotor. Die dazu benötigte T7-RNA-Polymerase wird mit Hilfe rekombinanter *Vaccinia*-Viren in die Zellen eingebracht.

Die Zellen wurden mit dem entsprechenden Expressions-Plasmid und dem pIL-2 *luc*-Reporterplasmid transfiziert und anschließend in einem Volumen von 1 ml mit dem rekombinanten *Vaccinia*-Stamm vTF-7 infiziert (MOI 1-10). Dieser Virus-Stamm enthält in seinem Genom das Gen für die T7-RNA-Polymerase, das bei einer Infektion in die Zellen gelangt und dort exprimiert wird. Nach einer Stunde wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischem RPMI/FCS-Medium aufgenommen. 18-24 h nach Transfektion wurden die Zellen für die Luciferase-Messung lysiert. Zur Kontrolle der Transfektion wurde ein Aliquot der Zellen lysiert und im Western Blot auf die Expression des jeweiligen Gens getestet.

2.4.15 Vermehrung des *Vaccinia*-Virus

Zur Vermehrung des *Vaccinia*-Virus wurden HeLa Zellen verwendet. Ein Aliquot einer *Vaccinia*-Präparation wurde eine Minute im Ultraschallwasserbad beschallt, um Aggregate zu solubilisieren. Anschließend wurde ein ca. 80% konfluenten Zellmonolayer mit der Viren-Suspension infiziert. Nach zwei Tagen, wenn sich die Zellen durch die Infektion von der Oberfläche abgelöst hatten, wurden die Zellen geerntet, einmal mit PBS gewaschen und durch dreimaliges Beschallen für je eine Minute im Ultraschallwasserbad aufgeschlossen. Die Suspension wurde bei -70°C gelagert oder zur weiteren Amplifikation der Viren verwendet. Dazu wurde dann eine entsprechend größere Zellmenge infiziert.

2.4.16 NFAT-Kerntranslokation

Zur Untersuchung der Kerntranslokation von NFAT wurde eine HeLa-Zelllinie verwendet, die stabil mit dem Plasmid pAD4 transfiziert ist. Diese Zelllinie exprimiert konstitutiv ein GFP-NFAT-Fusionsprotein, das sich in der Zelle wie endogenes NFAT verhält. Für den Versuch wurden die Zellen auf Deckgläschen angezüchtet und, um eine hohe Expression von GFP-NFAT zu induzieren, übernacht mit 250 nM TrichostatinA behandelt. Die Zellen wurden anschließend mit gefällten *H. pylori*-Kulturüberständen behandelt, wobei die Kontrollen nicht infiziert wurden. Eine Stunde nach Infektion wurden die Zellen für 6 h mit 1 μM Ionomycin und 50 ng/ml PMA stimuliert. Um einen Export von NFAT aus dem Kern zu verhindern, wurden 30 mM Lithiumacetat zugegeben. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS/30 mM Lithiumacetat gewaschen und eine Stunde mit 3,7% PFA in PBS fixiert. Zur Auswertung wurden die Präparate mikroskopiert und die Zellen in fünf willkürlich gewählten Sichtfeldern ausgezählt (mindestens 200 Zellen pro Präparat). Dabei wurde die Zahl der Zellen mit Kernlokalisierung von NFAT im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen bestimmt.

Zum Nachweis der Kerntranslokation von NFAT in Jurkat T-Zellen wurden die Zellen transient mit dem Plasmid pAD4 transfiziert. Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte wie für HeLa-Zellen beschrieben.

2.4.17 Infektion für *Microarray*-Analyse

Für jedes Hybridisierungsexperiment wurden $4 \cdot 10^6$ Jurkat T-Zellen in serumfreiem RPMI-Medium in Zellkulturflaschen (25 cm^2) ausgesät. Die Zellen wurden mit aktiviertem VacA-Toxin (1 $\mu\text{g/ml}$) oder FK506 (25 nM) behandelt. Kontrollzellen blieben unbehandelt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C , 5% CO_2 wurden 10% FCS zugegeben und die Zellen mit 50 ng/ml PMA und 1 μM Ionomycin aktiviert. Die Zellen wurden fünf Stunden inkubiert, bevor die zelluläre RNA isoliert wurde. Die Isolation der RNA erfolgte mit Hilfe des Trizol RNA-

Isolierungsreagenz (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers. Labeling, Fragmentierung und Hybridisierung der RNA auf einen Affymetrix Human Genome U133_subA Array wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.4.18 Infektion für Phosphotyrosin-Assay

Zum Nachweis der Translokation von CagA wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen für vier Stunden mit *H. pylori* (MOI 60) infiziert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden in 1 ml PBS* resuspendiert bzw. adhärenente Zellen in 1 ml PBS* mit einem sterilen Zellschaber abgeschabt. Durch Zentrifugation (5 min , 400 x g) wurden die Zellen sedimentiert und anschließend in 30 μ l PBS* und 40 μ l 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nachdem die Lysate 10 min bei 96°C inkubiert und 2 min bei 12000 x g abzentrifugiert worden waren, wurden die Proben auf einem SDS-PAGE aufgetrennt.

PBS* PBS, 1mM EDTA, 1mM Na-Vanadat, 1 mM PMSF, 1 μ M Leupeptin, 1 μ M Pepstatin

2.5 Statistische Auswertung

Soweit nicht anders angegeben, sind alle angegebenen Werte Mittelwerte +/- Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

III Ergebnisse

1 Untersuchung der Wirkung sekretierter und translozierter Virulenzfaktoren auf die Aktivierbarkeit von T-Zellen

1.1 Nachweis der Aufnahme von CagA und VacA in T-Zellen

CagA und VacA sind Virulenzfaktoren von *H. pylori*, die in eukaryontische Zellen transloziert bzw. aufgenommen werden. Da noch keine Studien existieren, die zeigen, dass CagA und VacA auch mit T-Zellen interagieren, wurde zunächst in Vorarbeiten untersucht, ob T-Zellen Zielzellen von CagA und VacA sein können. Hierzu wurde die Jurkat T-Zelllinie verwendet.

1.1.1 Translokation von CagA in Jurkat T-Zellen

CagA wird über das von der *cag*-PAI codierte Typ-IV-Sekretionssystem in diverse Zielzellen eingeschleust. In der Eukaryontenzelle wird CagA von Src-Kinasen phosphoryliert, weshalb die Phosphorylierung hier als Marker für dessen Translokation verwendet wird. Um die Translokation von CagA in Jurkat T-Zellen zu zeigen, wurden 1×10^6 Zellen mit dem Wildtyp-Stamm P12 bzw. einer *cagA*-Deletionsmutante (P12 Δ *cagA*) für 4 h infiziert. Als Kontrolle wurde die Makrophagen-Zelllinie J774A.1 infiziert, bei der die Translokation und Phosphorylierung von CagA bereits nachgewiesen ist (147). Die Lysate wurden im SDS-Proteingel aufgetrennt und tyrosinphosphorylierte Proteine mit dem Antikörper PY99 im Western Blot detektiert.

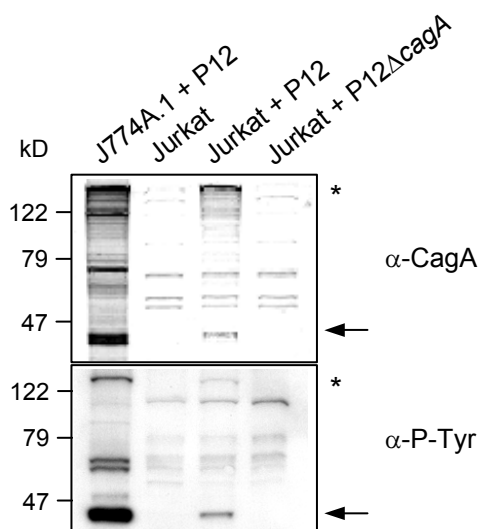


Abb. III.1: Translokation von CagA in Jurkat T-Zellen

Western Blot zur Detektion von CagA bzw. tyrosinphosphorylierten Proteinen in infizierten bzw. nicht-infizierten Jurkat oder J774A.1-Zellen. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen. Der Stern markiert das ungespaltene CagA-Protein, der Pfeil das phosphorylierte Spaltprodukt P40^{P-Tyr}.

Der Western Blot (Abb. III.1) zeigt, dass das CagA-Protein in Jurkat T-Zellen phosphoryliert und folglich in diese transloziert wird. Dabei kommt es ebenso wie in Makrophagen zu einer proteolytischen Spaltung des phosphorylierten CagA-Proteins in P100 und P40^{P-Tyr}. Die

Phosphorylierung von P40 ist allerdings deutlich schwächer als in J774A.1-Zellen, was auf eine geringere Translokation oder Phosphorylierung in T-Zellen schließen lässt. Da aber phosphoryliertes CagA nachweisbar ist, kann daraus geschlossen werden, dass es in T-Zellen eingeschleust wird.

1.1.2 Vakuolisierung von Jurkat T-Zellen durch VacA

Als Nachweis der Aufnahme von VacA in T-Zellen wurde die Bildung saurer Vakuolen durch VacA herangezogen. Dazu wurden die Zellen 14 h mit *H. pylori* P12 bzw. einer isogenen *vacA*-Mutante infiziert und anschließend eine Vakuolenfärbung mit Neutralrot durchgeführt.

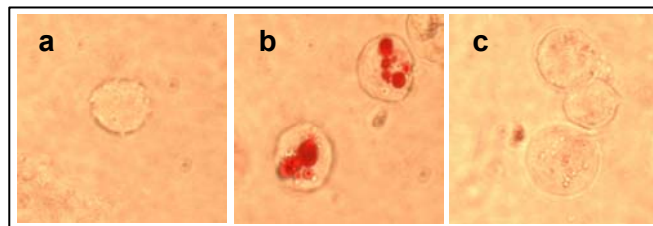


Abb. III.2: Vakuolisierung von Jurkat T-Zellen nach Infektion mit P12 bzw. P12 Δ vacA

Jurkat T-Zellen wurden 14 h mit *H. pylori* P12 bzw. P12 Δ vacA infiziert und die Vakuolen mit Neutralrot angefärbt. Die Mikroskopie erfolgte mit einem Leica DM Phasenkontrast-Mikroskop (Vergrößerung: 1000-fach). (a) nicht infiziert, (b) P12, (c) P12 Δ vacA.

Wie Abb. III.2 zeigt, ruft die Infektion mit *H. pylori* P12 die Bildung saurer Vakuolen hervor, während bei der Infektion mit der *vacA*-Mutante keine Vakuolisierung auftritt. Also können auch T-Zellen Zielzellen für das Effektorprotein VacA sein.

1.2 Etablierung eines T-Zell-Proliferationsassays

Aus früheren Studien war bereits bekannt, dass *H. pylori* die Funktion von T-Zellen beeinträchtigt (99; 222) und die Antigenpräsentation von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) moduliert. Da hier ein direkter Einfluss von *H. pylori* auf T-Zellen untersucht werden sollte, wurde ein *in vitro*-Assay etabliert, in dem die T-Zellen direkt mit Bakterien infiziert und anschließend nicht antigenspezifisch über APC's sondern antigenunspezifisch mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) und Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert wurden. Die Proliferation der T-Zellen als Antwort auf die Aktivierung wurde vier Tage nach der Infektion gemessen. Als Kontrollen wurden die *Campylobacter jejuni*-Stämme C63 und C64, beides klinische Isolate, und *Escherichia coli* HB101 verwendet. *C. jejuni* wurde als Kontrolle gewählt, da dieser Stamm nahe mit *H. pylori* verwandt ist, und da die proliferationshemmende Wirkung des Cdt-Toxins (*cytolethal distending toxin*) von *C. jejuni* gut untersucht ist (227). *E. coli* HB101 wurde als Negativkontrolle verwendet.

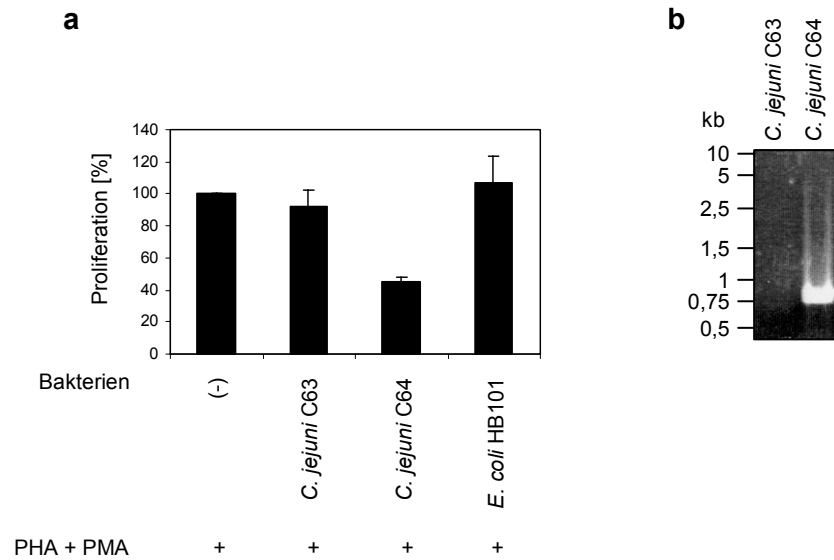


Abb. III.3: Effekt von *C. jejuni* und *E. coli* auf die Proliferation von Jurkat T-Zellen

(a) Jurkat T-Zellen wurden mit *C. jejuni* C63 und C64 oder *E. coli* HB101 infiziert. Nach einer Stunde wurde, um ein Überwachsen der Bakterien zu verhindern, Gentamicin zugegeben, und die Zellen mit PMA und PHA aktiviert. Die Bestimmung der Proliferation erfolgte nach viertägiger Inkubation mit dem CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay von Promega. Die Grafik zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Werte der nicht infizierten, aber aktivierten Jurkat T-Zellen wurden jeweils auf 100% gesetzt. **(b)** PCR-Amplifikation des *cdtA*-Gens von *C. jejuni* C63 und C64 über die Oligonukleotide BG19 und BG20. Bei *cdtA*-positiven Stämmen liefert die PCR ein Produkt von 750 bp.

Wie Abb. III.3a zeigt, bewirkt die Infektion mit dem *C. jejuni*-Stamm C64 eine Hemmung der T-Zell-Proliferation, während die Infektion mit C63 keinen Einfluss hat. Aufgrund dieser Unterschiede wurden die *cdt*-Gene von C63 und C64 näher charakterisiert. Das Toxin besteht aus drei Proteinen, die von den Genen *cdtA*, *cdtB* und *cdtC* codiert werden (107). Fehlt eine dieser Komponenten, ist das Toxin inaktiv. Um das Vorhandensein der *cdt*-Gene zu überprüfen, wurde eine PCR durchgeführt, in der das *cdtA*-Gen amplifiziert wurde (Abb. III.3b). Dabei konnte nur bei dem Stamm C64 ein Produkt von 750 bp amplifiziert werden, das der Größe des *cdtA*-Gens entspricht. Eine DNA-Hybridisierung von chromosomaler DNA der Stämme C63 und C64 mit einer *cdtA*-Sonde bestätigte das Fehlen eines Teils des *cdtA*-Gens im Chromosom von C63 (Daten nicht gezeigt). Somit scheint der Stamm C63 ein defektes *cdt*-Operon zu besitzen. Bei den folgenden Versuchen wurde deshalb der Stamm C64 als Positivkontrolle, die Stämme C63 und *E. coli* HB101 als Negativkontrolle für die Proliferationshemmung verwendet.

1.3 Einfluss verschiedener *H. pylori*-Stämme auf die T-Zell-Proliferation

1.3.1 Einfluss von *H. pylori* auf die Proliferation von Jurkat T-Zellen

Um die Wirkung von *H. pylori* auf die Proliferation der T-Zellen zu untersuchen, wurde die Jurkat T-Zelllinie mit verschiedenen *H. pylori*-Wildtypstämmen und Mutanten in *cagA*, *vacA* oder in beiden Genen infiziert. Die Ergebnisse nach vier Tagen Proliferation sind in Abb. III.4 dargestellt.

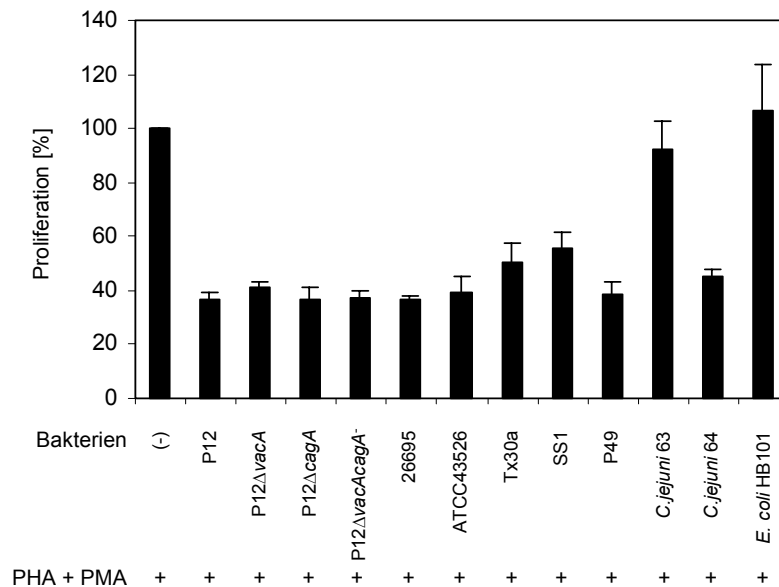


Abb. III.4: Effekt von verschiedenen *H. pylori*-Stämmen auf die Proliferation von Jurkat T-Zellen

Jurkat T-Zellen wurden mit verschiedenen *H. pylori*-Wildtypstämmen, sowie isogenen Mutanten in *cagA*, *vacA* oder beiden Genen infiziert. Als Positiv- und Negativkontrollen wurden die *C. jejuni*-Stämme C64, C63 und *E. coli* HB101 verwendet. Die T-Zellen wurden mit PMA und PHA aktiviert und die Proliferation nach vier Tagen bestimmt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Aktivierte Jurkat T-Zellen ohne Bakterien wurden auf 100% gesetzt.

Die Infektion der Jurkat T-Zellen mit *H. pylori* führte zu einer Reduktion der Proliferation um 40-60% im Vergleich zur aktivierten, aber nicht infizierten Kontrolle. Die Hemmung der T-Zell-Proliferation durch *H. pylori* scheint allerdings unabhängig von CagA und VacA zu sein, da der Effekt auch bei diesen Mutanten auftritt.

1.3.2 Einfluss von *H. pylori* auf die Proliferation von peripheren Blutlymphozyten

Da es sich bei den Jurkat T-Zellen um eine transformierte Zelllinie handelt und diese sich im Proliferationsverhalten von nicht-transformierten Zellen unterscheiden, wurden die Versuche mit frisch isolierten peripheren Blutlymphozyten (PBL) wiederholt (Abb. III.5).

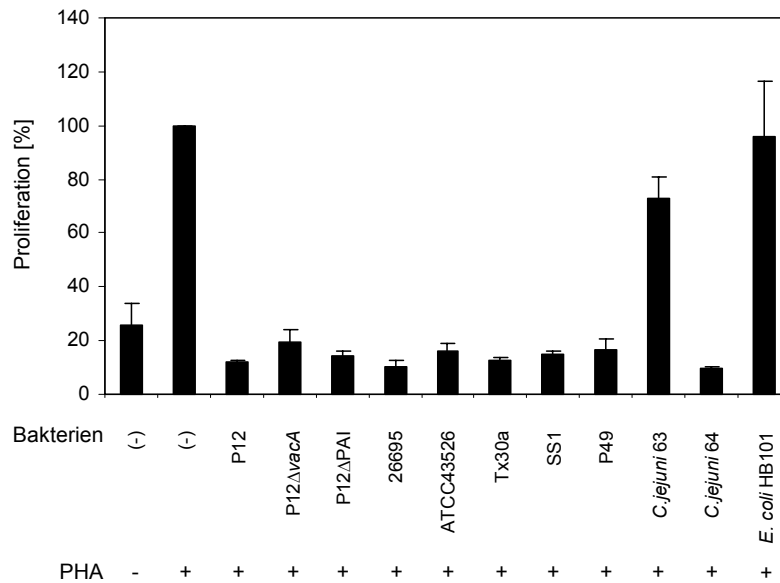


Abb. III.5: Effekt von verschiedenen *H. pylori*-Stämmen auf die Proliferation von frisch isolierten PBLC
 PBLC wurden aus dem Blut eines *H. pylori*-negativen Spenders isoliert und mit verschiedenen *H. pylori*-Stämmen infiziert. Als Positiv- und Negativkontrollen wurden die *C. jejuni*- Stämme C64, C63 und *E. coli* HB101 verwendet. Die PBLC wurden mit PHA aktiviert und die Proliferation nach vier Tagen bestimmt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Aktivierte PBLC ohne Bakterien wurden auf 100% gesetzt.

Auch hier zeigte sich, dass die Infektion mit *H. pylori* die Proliferation der PBLC stark hemmt. Die Proliferation war um ca. 80% im Vergleich zur Kontrolle reduziert und lag auf dem Niveau von nicht aktivierten Zellen. Gleiche Ergebnisse wurden für aufgereinigte CD4⁺ T-Zellen erhalten (Daten nicht gezeigt). Wie bei den Jurkat T-Zellen gab es auch hier keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen *H. pylori*-Stämmen und -Mutanten.

1.3.3 Proliferation der T-Zellen nach Behandlung mit gefällten Bakterienkulturüberständen

T-Zellen kommen in der Magenmukosa vereinzelt als intraepitheliale T-Zellen vor, die meisten Zellen finden sich aber in einer tieferen Schicht des Magens, der *Lamina propria* (100). Damit ist es fraglich, ob *H. pylori* bei der Infektion in direkten Kontakt mit T-Zellen kommt. Sekretierte Proteine von *H. pylori* wie zum Beispiel VacA können aber auch in der *Lamina propria* nachgewiesen werden (125). Deshalb wurde untersucht, ob von *H. pylori* in den Überstand sekretierte Proteine ebenfalls einen Einfluss auf die Proliferation der T-Zellen haben. Dazu wurden zunächst die *H. pylori*-Stämme P12, P12 Δ vacA, Tx30a und als Kontrollen *C. jejuni* C63, C64 und *E. coli* HB101 in Flüssigkulturen angezchtet. Nach Entfernung der Bakterien wurde der Kulturüberstand durch Ammoniumsulfatfällung konzentriert und nach Dialyse gegen PBS im Proliferationsassay eingesetzt.

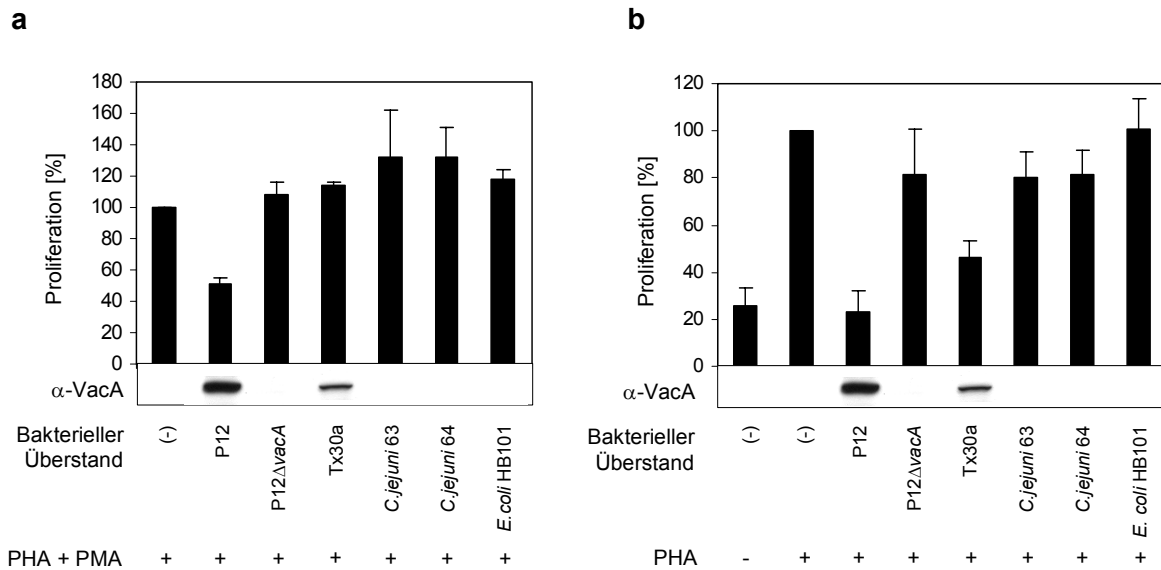


Abb. III.6: Effekt von aufkonzentrierten Bakterienkulturüberständen auf die Proliferation von Jurkat T-Zellen bzw. PBLCL

Die T-Zellen (a) Jurkat, (b) PBLCL wurden für eine Stunde mit 250 µg/ml der gefällten Bakterienkulturüberstände der angegebenen Stämme behandelt. Anschließend wurden die Zellen aktiviert und die Proliferation nach viertägiger Inkubation bestimmt. Der Immunoblot (AK 197) zeigt die *vacA*-Expression der verschiedenen Stämme. Die Grafik zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Aktivierte Zellen ohne Bakterien wurden auf 100% gesetzt.

Wie die Abb. III.6 zeigt, hemmt der Kulturüberstand von P12 die Proliferation der T-Zellen, nicht aber der Überstand von dessen isogener *vacA*-Mutante. Da sich die Kulturüberstände von P12 und P12Δ*vacA* nur hinsichtlich des *VacA*-Proteins unterscheiden, lässt dies den Schluss zu, dass *VacA* eine proliferationshemmende Wirkung auf T-Zellen hat. Obwohl auch der Stamm Tx30a ein *VacA*-Protein sekretiert, hat dieses keinen Einfluss auf die Proliferation von Jurkat T-Zellen, hemmt aber die Proliferation der PBLCL. Da das Cdt-Toxin unter den hier angewendeten Bedingungen nicht in den Überstand sekretiert wird, zeigt der Überstand von *C. jejuni* C64 keine hemmende Wirkung.

Die Tatsache, dass bei Infektion mit den Bakterien auch P12Δ*vacA* eine hemmende Wirkung auf die Proliferation der T-Zellen hat, nicht aber die Behandlung der Zellen mit dessen Überstand, legt den Schluss nahe, dass *H. pylori* die Proliferation von T-Zellen durch zwei verschiedene Faktoren hemmt: durch einen bakterienassoziierten Faktor, der nur bei direktem Kontakt zwischen *H. pylori* und der T-Zelle wirkt und durch das sekretierte *VacA*-Toxin.

1.4 Einfluss von *H. pylori* auf die IL-2-Produktion der T-Zellen

1.4.1 Test der IL-2-Produktion von T-Zellen nach Infektion mit *H. pylori*

Die Proliferation von T-Zellen ist begleitet von einer starken Induktion der Interleukin (IL)-2-Sekretion. Das Zytokin IL-2 ist ein Überlebens- und Wachstumsfaktor, der nötig ist für die Expansion der T-Zellen. Nachdem die bisherigen Daten darauf hinwiesen, dass VacA die Proliferation der T-Zellen hemmt, wurde analysiert, ob die Infektion mit ganzen Bakterien oder die Behandlung mit Kulturüberständen auch einen Einfluss auf die IL-2-Sekretion der T-Zellen hat. Hierzu wurden die Zellen mit *H. pylori* infiziert, nach einer Stunde aktiviert und sekretiertes IL-2 nach ca. 18 h mit Hilfe eines *Sandwich* IL-2-ELISA detektiert. Zur Infektion wurden verschiedene *H. pylori*-Wildtypstämme, sowie Mutanten in *vacA* und der *cag*-PAI verwendet. Die Ergebnisse sind in Abb. III.7 dargestellt.

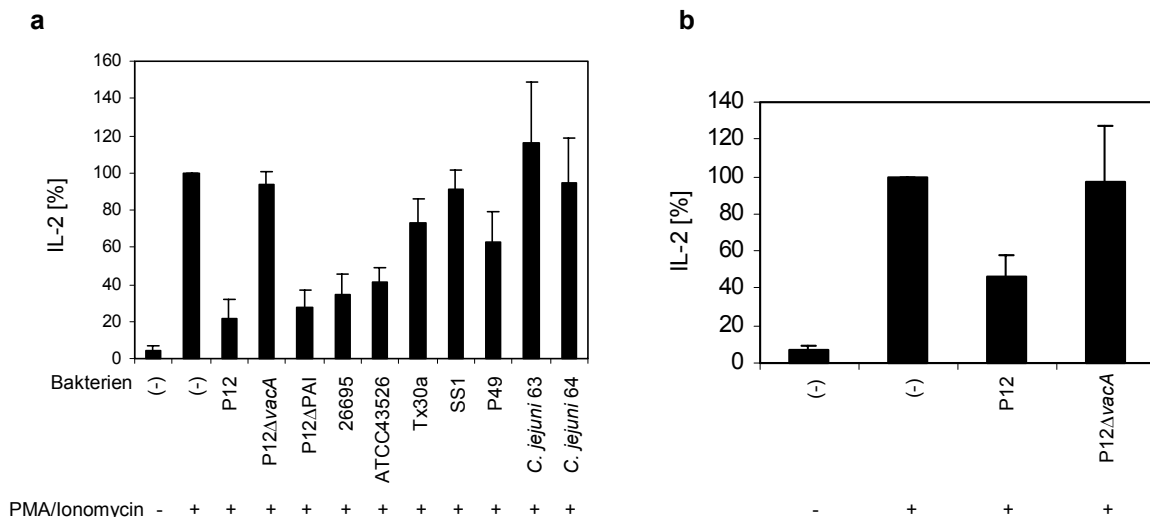


Abb. III.7: Effekt von *H. pylori* auf die IL-2 Sekretion der T-Zellen

Jurkat T-Zellen (**a**) bzw. PBLC (**b**) wurden mit verschiedenen *H. pylori*- und *C. jejuni*-Wildtypstämmen oder Mutanten in *vacA* und der *cag*-PAI infiziert. Die IL-2-Konzentration im Überstand wurde 18-22 h nach Aktivierung im IL-2-ELISA bestimmt. Die IL-2-Produktion von aktivierten, nicht infizierten Zellen wurde auf 100% gesetzt, was ca. 500 pg/ml IL-2 entspricht. Die Grafik zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Infektion der Jurkat T-Zellen mit *H. pylori* P12, P12ΔPAI, 26695 und ATCC43526 bewirkt eine Reduktion der IL-2-Sekretion um 60-80%, während P12Δ*vacA* keinen Effekt hat. Auch die Stämme Tx30a, SS1 und P49, sowie die *C. jejuni*-Stämme C63 und C64 haben keinen signifikanten Einfluss auf die IL-2-Sekretion der T-Zellen. Die Infektion der PBLC mit P12, nicht aber mit P12Δ*vacA*, resultiert ebenfalls in einer deutlichen Hemmung der IL-2-Sekretion. Gleiche Ergebnisse wurden erhalten, wenn die Zellen mit gefällten *H. pylori*-Bakterienkulturüberständen behandelt wurden (Daten nicht gezeigt). Die IL-2-Sekretion der

T-Zellen wird also durch VacA inhibiert, während die Oberflächen-assoziierte antiproliferative Aktivität von *H. pylori* hier keinen Einfluss hat.

Da nicht alle *H. pylori*-Wildtypstämme die IL-2-hemmende Wirkung zeigten und bekannt ist, dass bei *H. pylori* verschiedene *vacA*-Genotypen vorkommen (s1m1, s1m2, s2m2), die mit unterschiedlicher Aktivität assoziiert sind, wurden die *vacA*-Allele der verwendeten Stämme näher untersucht. Dazu wurden die *vacA*-Sequenzen der Stämme 26695 (219), ATCC43526 (AF001358), Tx30a (U29401) und SS1 (109), die publiziert sind, analysiert. Der Vergleich der Sequenzen zeigte, dass 26695 und ATCC43526 ein s1m1-*vacA*-Allel haben, während Tx30a und SS1 ein s2m2-*vacA*-Allel exprimieren. Da von den *vacA*-Genen der Stämme P12 und P49 keine Sequenz bekannt ist, wurde hier der *vacA*-Genotyp nach der Methode von Atherton bestimmt (6). Hierbei werden mittels PCR die s1/s2 Region bzw. m1 oder m2 Region des *vacA*-Gens amplifiziert. Für die Amplifikation der s1/s2-Region wurden die Oligonukleotide BG8 und BG9 verwendet, was bei einer s1-Region ein Transkript von 259 bp, bei einer s2-Region von 286 bp liefert. Die Oligonukleotide BG10 und BG11 amplifizieren die m1-Region und liefern ein Transkript von 290 bp, während die Oligonukleotide BG12 und BG13 die m2-Region mit 352 bp amplifizieren (Abb. III.8).

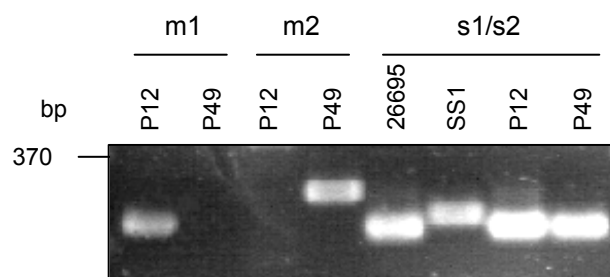


Abb. III.8: Genotypisierung der *vacA*-Allele von *H. pylori* P12 und P49 mittels PCR

Zur Amplifikation der m1-Region wurden die Oligonukleotide BG10 und BG11 eingesetzt, die ein PCR-Produkt von 290 bp liefern. Die m2-Region wurde mit den Oligonukleotiden BG12 und BG13 amplifiziert, die bei positiven Stämmen ein Produkt von 352 bp ergeben. Die Amplifikation der s1/s2-Region erfolgt mit den Oligonukleotiden BG8 und BG9. Dabei ergibt sich beim s1-Allel ein PCR-Produkt von 259 bp, beim s2-Allel von 286 bp. Da hier die Unterscheidung nur auf der unterschiedlichen Größe des Transkripts beruht, wurden als Kontrolle die s1-Region von 26695 und die s2-Region von SS1 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,4%-igen Agarosegel aufgetrennt.

Die Auswertung der PCR-Daten zeigt, dass P12 ein s1m1-*vacA*-Allel besitzt, während P49 ein s1m2-*vacA*-Allel hat. Der Vergleich dieser Daten mit dem Effekt der verschiedenen Stämme auf die Hemmung der IL-2-Produktion deutet darauf hin, dass die IL-2-Hemmung von der m1-Form des VacA-Toxins abhängt. Die Stämme, die ein m2-*vacA* exprimieren, haben keinen signifikanten Einfluss auf die IL-2-Produktion der Jurkat T-Zellen.

1.4.2 Verifizierung von VacA als hemmender Faktor für die IL-2-Sekretion

Um zu beweisen, dass die Hemmung der IL-2-Produktion tatsächlich von VacA abhängt, wurde der Effekt von gereinigtem VacA auf die IL-2-Produktion der T-Zellen getestet. Das VacA-Toxin wurde aus dem *H. pylori*-Stamm 60190, der ein s1m1-VacA produziert, aufgereinigt und von P. Boquet (INSERM, Fakultät für Medizin, Nizza, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Da aus *H. pylori* aufgereinigtes VacA-Toxin nicht Lipopolysaccharid (LPS)-frei ist, wurde der Einfluss von LPS mit Hilfe von Polymyxin untersucht. Um nachzuweisen, dass die Hemmung allein von einem Proteinfaktor abhängt, wurden zudem Versuche mit Proteinase K durchgeführt (Abb. III.9).

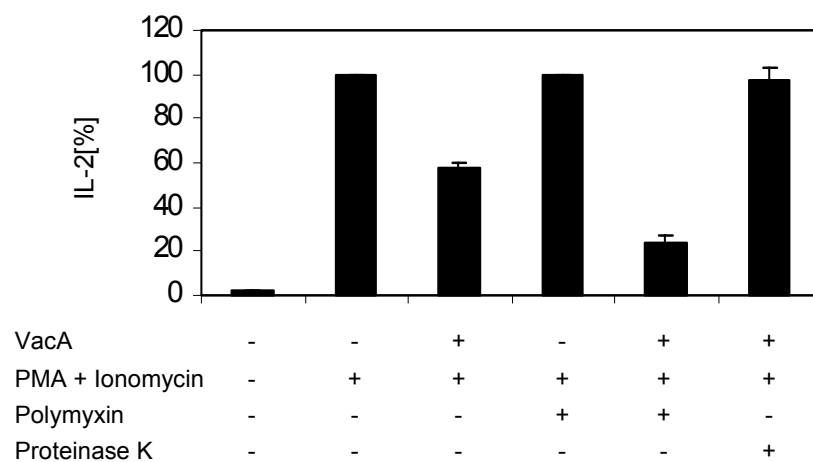


Abb. III.9: Hemmung der IL-2-Sekretion durch gereinigtes VacA-Toxin und Einfluss von LPS

Jurkat T-Zellen wurden mit 1 µg/ml gereinigtem VacA-Toxin oder mit Toxin, das 15 min mit Polymyxin (10 µg/ml) bzw. 4 h mit Proteinase K (1 mg/ml bei 55°C) vorbehandelt worden war, inkubiert. Vor Zugabe zu den Zellen wurde das Toxin durch Ansäuerung auf pH 3,0 aktiviert. Die Jurkat T-Zellen wurden nach einer Stunde mit PMA und Ionomycin aktiviert und die IL-2-Produktion nach 18 h im ELISA gemessen. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten. Aktivierte T-Zellen ohne Toxin wurden auf 100% gesetzt.

Die Behandlung der Jurkat T-Zellen mit gereinigtem VacA löst eine Hemmung der IL-2-Produktion aus. Noch deutlicher ist dieser Effekt, wenn Signalwege, die durch LPS stimuliert werden, durch Polymyxin blockiert werden. Polymyxin alleine hat aber keine hemmende Wirkung auf die IL-2-Sekretion. Werden die Proteine in der Toxin-Fraktion mit Hilfe von Proteinase K degradiert, ist die hemmende Wirkung aufgehoben. Die Daten zeigen also, dass das LPS von *H. pylori* keine hemmende Wirkung, sondern eher eine aktivierende Wirkung auf die T-Zellen hat und dass die Hemmung der IL-2-Produktion auf dem Proteinfaktor VacA beruht.

1.4.3 Effekt von VacA auf die IL-2-Produktion nach „physiologischer“ Stimulierung der Jurkat T-Zellen

Da die Aktivierung der T-Zellen mittels PMA und Ionomycin oder PMA und PHA einen künstlichen Stimulus darstellt, wurde überprüft, ob der Effekt von VacA auf die IL-2-Produktion auch bei „physiologischer“ Aktivierung der T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor (TCR) und das co-stimulatorische Molekül CD28 auftritt. Dazu wurden die Zellen mit Antikörpern gegen den TCR (α -CD3) und CD28 (α -CD28) stimuliert (Abb. III.10).

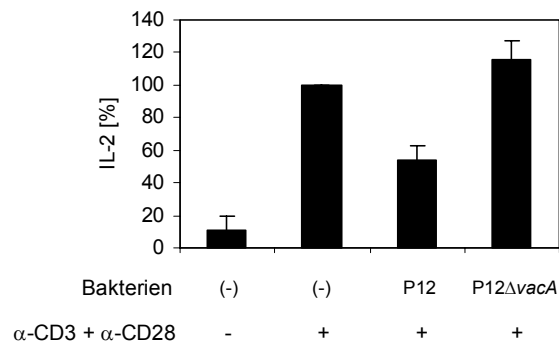


Abb. III.10: Effekt von VacA auf die IL-2-Produktion nach Aktivierung mit α -CD3- und α -CD28-Antikörpern.

Die Jurkat T-Zellen wurden mit *H. pylori* P12 oder P12 Δ vacA infiziert und anschließend mit α -CD3- und α -CD28-Antikörpern aktiviert. Die IL-2-Konzentration im Überstand wurde nach 22 h im ELISA bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Bei Aktivierung der Jurkat T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor (CD3) und das co-stimulatorische Molekül CD28 führt die Infektion mit P12 ebenfalls zu einer Reduktion der IL-2-Produktion, wie vorher schon bei der Stimulation mit PMA und Ionomycin beobachtet wurde. P12 Δ vacA hat dagegen keinen Effekt auf die IL-2-Produktion. Da für die Hemmung der IL-2-Produktion durch VacA die Art der Stimulation offensichtlich keine Rolle spielt, wurde für die weiteren Versuche die Verwendung von PMA und Ionomycin oder PMA und PHA zur Aktivierung der T-Zellen beibehalten.

1.4.4 Bestimmung der minimalen Infektionsdosis für die Hemmung der IL-2-Produktion

Die bisherigen Experimente wurden mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 30-60 durchgeführt, das heißt, eine T-Zelle wurde durchschnittlich von 30-60 *H. pylori*-Zellen infiziert. Um herauszufinden, wie viele Bakterien pro T-Zelle tatsächlich notwendig sind, um einen Effekt auf die IL-2-Sekretion von T-Zellen zu beobachten, wurde im folgenden Versuch die minimale Infektionsdosis ermittelt.

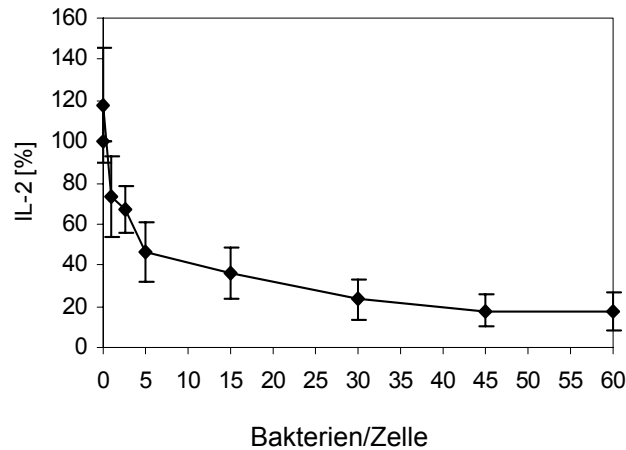


Abb. III.11: Dosis-Antwort-Kurve zur Bestimmung der minimalen MOI

Jurkat T-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von *H. pylori* P12 (MOI 0,1 bis MOI 60) infiziert, aktiviert und die IL-2-Sekretion im ELISA nach 18-22 h bestimmt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die IL-2-Sekretion von aktivierten Jurkat T-Zellen ohne Bakterien wurde auf 100% gesetzt.

Wie Abb. III.11 zeigt, führt ein Bakterium pro T-Zelle bereits zu einer Hemmung der IL-2-Produktion um 25%, fünf Bakterien pro T-Zelle reduzieren die IL-2-Sekretion um 50%. Höhere Infektionsdosen führen zu einer Inhibition um bis zu 80%. Die Hemmung der IL-2-Produktion durch *H. pylori* ist also ein sehr effizienter, spezifischer und sensitiver Effekt, der schon bei physiologisch relevanten Bakterienzahlen auftritt.

1.5 Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Proliferationshemmung und Apoptose-Induktion

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass das VacA-Protein von *H. pylori* in Epithelzellen Apoptose auslösen kann (33; 66; 101). Auch für T-Zellen wurde eine Apoptose-Induktion durch *H. pylori* publiziert, die allerdings nicht VacA-, sondern *cag*-PAI-abhängig ist (222). Da somit widersprüchliche Daten existieren, wurde untersucht, ob VacA Apoptose in T-Zellen auslöst und ob der Effekt der Proliferations- und IL-2-Hemmung auf Apoptose-Induktion beruht. Da alle bisherigen Studien über Apoptose-Induktion durch *H. pylori* mit sehr hohen Konzentrationen an Bakterien oder gereinigtem VacA-Toxin durchgeführt wurden, wurde hier ebenfalls die eher hohe MOI von 60 Bakterien/Zelle eingesetzt. Die T-Zellen wurden mit P12, P12 Δ vacA und den Stämmen Tx30a und SS1, die beide ein m2-VacA exprimieren, infiziert und nach einer Stunde aktiviert. Die Zahl der apoptotischen T-Zellen wurde nach sechs bzw. 22 Stunden bestimmt. Hierzu wurde der CaspACE FITC-VAD-FMK *In situ* Marker von Promega verwendet, ein membrangängiger, FITC-gekoppelter Caspase-Inhibitor. Dieser bindet irreversibel an aktivierte Caspasen in apoptotischen Zellen, die dann mit dem Durchflusszytometer (FACS) analysiert werden können (Abb. III.12).

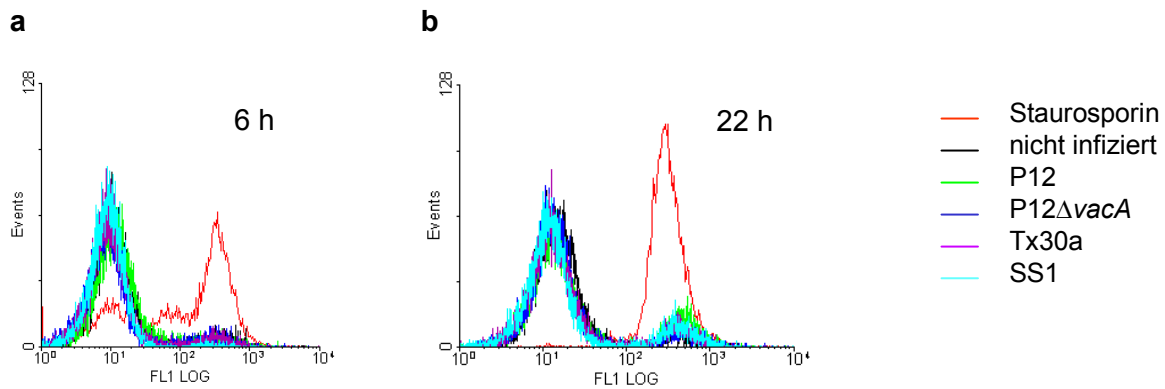


Abb. III.12: Analyse apoptotischer Zellen nach Infektion mit verschiedenen *H. pylori*-Stämmen

Jurkat T-Zellen wurden mit *H. pylori* P12, P12ΔvacA, Tx30a oder SS1 infiziert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 1 μM Staurosporin behandelt, das Apoptose auslöst. Nach einer Stunde wurden die Zellen aktiviert und (a) sechs bzw. (b) 22 h später die apoptotischen Zellen gefärbt und im FACS analysiert. Die Abbildungen zeigen die zusammengefassten Ergebnisse der FACS-Analyse. Die Graphen der einzelnen Stämme finden sich im Anhang auf S. 117.

Um die Frage zu beantworten, ob die Proliferations- und IL-2-Hemmung auf der Induktion von Apoptose beruht, wurden die Zellen für die Bestimmung der Apoptose genauso behandelt wie für die Messung von IL-2. Unter diesen Bedingungen zeigte sich nach sechs Stunden bei keinem der Ansätze eine signifikante Apoptose-Induktion, während die mit Staurosporin behandelten Zellen bereits stark apoptotisch waren. Auch nach 22 h war die Zahl der apoptotischen Zellen bei den Ansätzen, die mit *H. pylori* infiziert waren, nicht höher als bei den nicht infizierten Zellen.

H. pylori löst also in Jurkat T-Zellen unter den hier verwendeten Bedingungen keine signifikante Apoptose aus. Somit kann die Hemmung der T-Zell-Proliferation durch VacA nicht durch Induktion von Apoptose erklärt werden.

1.6 Einfluss von *H. pylori* auf den Zellzyklus der T-Zellen

Da die Proliferationshemmung nicht auf einer Apoptose-Induktion beruht, wurde als nächstes analysiert, ob *H. pylori* den Zellzyklus der T-Zellen hemmt. Ruhende T-Zellen befinden sich in der G₀- oder G₁-Phase des Zellzyklus. Werden sie aktiviert, treten sie in die S-Phase ein, in der der Chromosomensatz verdoppelt und die Zelle auf die folgende Teilung vorbereitet wird. Ein Faktor, der für den Übergang von der G₁- in die S-Phase essentiell ist, ist das Retinoblastom (Rb)-Protein. Dieses wird bei Aktivierung von Cyclin-abhängigen Kinasen phosphoryliert und induziert den Übergang von der G₁- in die S-Phase. Eine dieser Kinasen wird von dem Faktor Cyclin D3 aktiviert, dessen Expression nach Stimulation der T-Zellen hochreguliert wird (140). Da für Epithelzellen bereits ein Zellzyklusarrest in der G₁-Phase durch *H. pylori* beschrieben ist (203), wurde hier der Einfluss von VacA auf den Übergang

von der G1- in die S-Phase analysiert. Dazu wurde die Expression von Cyclin D3 und Cyclin E, sowie der Phosphorylierungszustand von Rb untersucht (Abb. III.13).

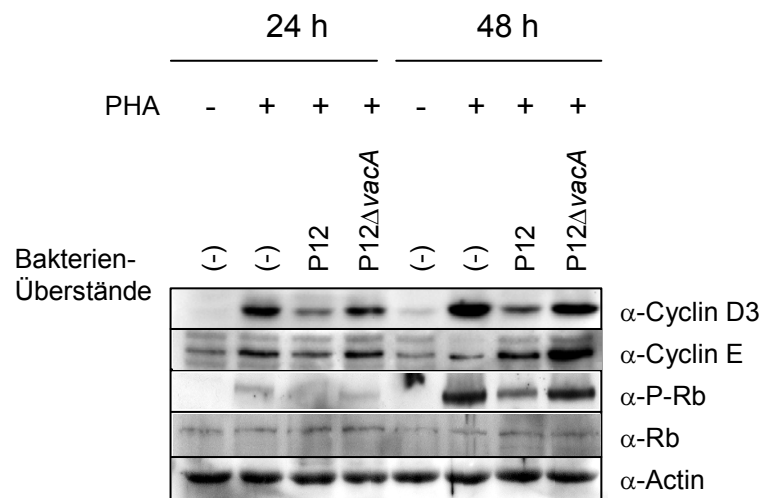


Abb. III.13: Effekt von VacA auf die Cyclin-Produktion und den Phosphorylierungszustand von Rb
 PBLC wurden mit 250 µg/ml P12 bzw. P12ΔvacA –Überstand behandelt und nach einer Stunde aktiviert. Nach 24 h bzw. 48 h wurden die Zellen lysiert und die Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Cyclin D3, Cyclin E, Rb und Phospho-Rb wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. Als Beladungskontrolle wurde Aktin mit einem spezifischen Antikörper angefärbt.

Die Menge von Cyclin D3 und Cyclin E ist bei Behandlung der Zellen mit P12-Überstand im Vergleich zur Behandlung mit P12ΔvacA-Überstand nach 24 und 48 h deutlich reduziert. Als Folge ist auch die Phosphorylierung des Rb-Proteins bei VacA- behandelten Zellen stark vermindert. Wie der Test mit einem α-Rb-Antikörper, der Rb unabhängig von dessen Phosphorylierung erkennt, zeigt, ist nicht die Expression des Rb-Gens, sondern die Phosphorylierung des Proteins reduziert. Damit verhindert VacA die Aktivierung von Rb und den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase, was letztendlich die Proliferationshemmung der T-Zellen erklären kann.

1.7 Einfluss von *H. pylori* auf die Expression von Aktivierungsmarkern

1.7.1 Analyse der CD25-Expression von T-Zellen nach Infektion mit *H. pylori*

IL-2 wird von aktivierten T-Zellen sekretiert und wirkt autokrin und auf andere T-Zellen als Wachstumsfaktor (113). Die Signaltransduktion, die zur Proliferation der T-Zellen führt, wird über die Bindung von IL-2 an den IL-2-Rezeptor (IL-2R) ausgelöst. Der IL-2-Rezeptor setzt sich zusammen aus den Untereinheiten IL-2Rα, IL-2Rβ und IL-2Rγ (113). Die Dimerisierung der konstitutiv exprimierten β- und γ-Kette des IL-2-Rezeptors reicht aus, um eine Signaltransduktion zu induzieren (141; 144). Die Expression der IL-2R-α-Kette erhöht allerdings die Affinität des IL-2R zu IL-2 um das 100-fache und ermöglicht damit ein

Ansprechen des Rezeptors auf physiologische IL-2-Konzentrationen (141). Wird die T-Zelle aktiviert, wird die Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors, die auch als CD25 bezeichnet wird, hochreguliert (94). Da die bisherigen Infektionsexperimente gezeigt hatten, dass *H. pylori* die Aktivierung der T-Zellen hemmt, wurde als nächstes untersucht, ob *H. pylori* auch die Expression von CD25 beeinflusst. Dazu wurden PBLC aus humanem Blut isoliert und mit Kulturüberständen von P12 und P12 Δ vacA behandelt. Als Positivkontrolle wurde FK506 eingesetzt, das in die T-Zell-Aktivierung eingreift und wie aus der Literatur bekannt ist, die CD25-Expression hemmt (183). 24 h nach der Aktivierung wurde die Oberflächenlokalisation von CD25 mittels FACS analysiert (Abb. III.14)

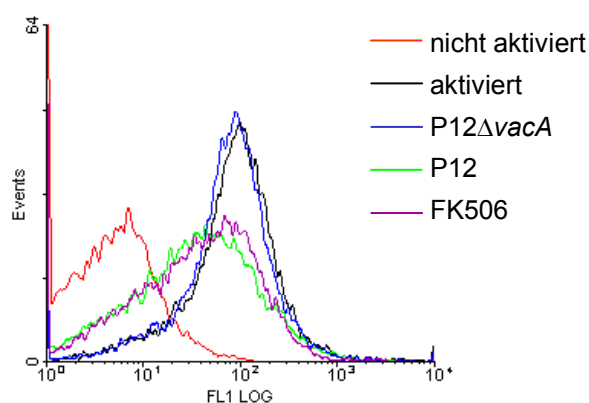


Abb. III.14: Effekt von VacA auf die Oberflächenlokalisation von CD25

PBLC wurden mit 250 μ g/ml der gefällten Kulturüberstände von P12 bzw. P12 Δ vacA und als Positivkontrolle mit 100 nM FK506 behandelt. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit PMA und PHA aktiviert und nach 24 h Oberflächen-lokalisierendes CD25 mit einem monoklonalen α -CD25-Antikörper angefärbt. Die Expression von CD25 wurde im FACS analysiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von drei durchgeführten Experimenten.

Die FACS-Analyse zeigt, dass die Aktivierung der PBLC zu einer Hochregulation der CD25-Expression führt. Bei den Zellen, die mit dem Überstand von P12 oder FK506 behandelt wurden, ist die Oberflächenlokalisation von CD25 signifikant erniedrigt. Die Behandlung der Zellen mit dem Überstand von P12 Δ vacA hat dagegen keinen Einfluss auf die Expression von CD25. Somit greift *H. pylori* nicht nur in die IL-2-Produktion ein, sondern auch in die von IL-2 ausgelöste Signaltransduktion.

1.7.2 Untersuchung der CD69-Expression aktivierter T-Zellen nach Infektion mit *H. pylori*

Die bisherigen Daten zeigten, dass *H. pylori* die Proliferation und die IL-2-Signaltransduktion in T-Zellen hemmt. Damit stellte sich die Frage, ob *H. pylori* auch die Oberflächenlokalisation von CD69, einem sehr frühen Marker für T-Zell-Aktivierung, hemmt. Dazu wurden Jurkat T-Zellen mit *H. pylori* P12 oder P12 Δ vacA infiziert und nach einer Stunde aktiviert. Als Kontrolle

wurden die Zellen entweder nicht infiziert oder mit FK506 behandelt, das eine Proliferationshemmung in T-Zellen auslöst. Nach 24 h wurde CD69 mit einem monoklonalen Antikörper angefärbt und die Expression im FACS analysiert (Abb. III.15).

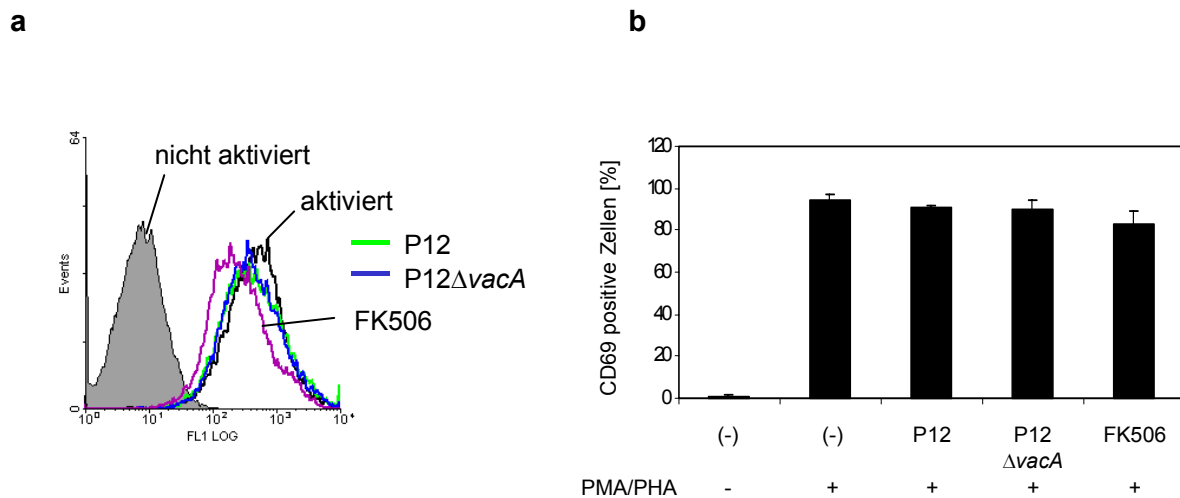


Abb. III.15: Oberflächenlokalisierung von CD69 nach Infektion mit *H. pylori* P12 oder P12 $\Delta vacA$

(a) FACS Analyse der Oberflächenlokalisierung von CD69 auf Jurkat T-Zellen nach Infektion mit P12 bzw. P12 $\Delta vacA$ für 24 h. Zum Vergleich wurden die Zellen mit FK506 behandelt. (b) Quantitative Auswertung der FACS-Daten aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie die Daten zeigen, hat weder die Behandlung der Zellen mit FK506 noch die Infektion mit *H. pylori* einen signifikanten Einfluss auf die Oberflächenlokalisierung von CD69. Gleiche Ergebnisse wurden erhalten, wenn die Zellen mit gefällten Kulturüberständen von *H. pylori* P12 bzw. P12 $\Delta vacA$ behandelt wurden (Daten nicht gezeigt). *H. pylori* kann also die Proliferation der T-Zellen hemmen, nicht aber die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69.

1.8 Untersuchungen zum Mechanismus der Hemmung der IL-2-Produktion durch VacA

1.8.1 Nachweis der IL-2-Hemmung durch VacA auf transkriptioneller Ebene

Die Tatsache, dass VacA die Proliferation von T-Zellen, die Produktion von IL-2 und die Oberflächenlokalisierung von CD25 erniedrigt, aber keinen Effekt auf die CD69-Expression hat, deutet darauf hin, dass das VacA-Protein in einen bestimmten Signaltransduktionsweg eingreift. Um herauszufinden, ob VacA die Transkription des IL-2-Gens oder die Sekretion des IL-2-Proteins hemmt, wurde ein Luciferase-Reporter-Konstrukt eingesetzt, bei dem das Luciferase (*luc*)-Gen als Reporter unter Kontrolle des IL-2-Promotors steht (pIL-2 *luc*, siehe Abb. III.17a). Werden die mit diesem Konstrukt transfizierten T-Zellen aktiviert, bindet der für die Transkription des IL-2-Gens benötigte Transkriptionskomplex an den IL-2-Promotor und

das *luc*-Gen wird exprimiert. Die Aktivität der Luciferase kann dann in einem Luminometer gemessen werden.

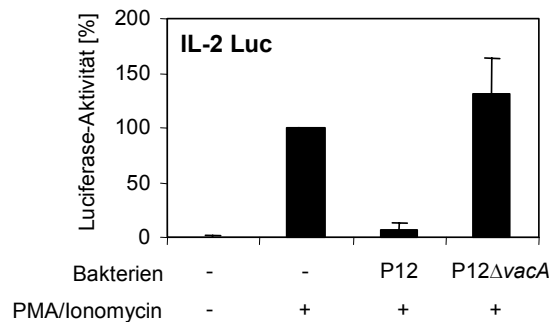


Abb. III.16: Hemmung der Aktivierung des IL-2-Promotors durch VacA

Jurkat T-Zellen wurden mit einem Reporterplasmid transfiziert, bei dem das *luc*-Gen unter Kontrolle des IL-2-Promotors steht. 14-16 h nach Transfektion wurden die Zellen mit *H. pylori* P12 bzw. P12 Δ vacA infiziert und aktiviert. Die Aktivität der Luciferase wurde nach 6 h im Luminometer bestimmt. Die Abbildung zeigt das Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. Die Luciferase-Aktivität aktivierter Zellen ohne Bakterien wurde auf 100% gesetzt.

Abb. III.16 zeigt, dass die Infektion mit *H. pylori* P12 die Transkription über den IL-2-Promotor stark inhibiert, während P12 Δ vacA keine hemmende, sondern eher eine aktivierende Wirkung hat. VacA hemmt also nicht die Sekretion von IL-2, sondern interferiert mit der Transkription des IL-2-Gens.

1.8.2 Untersuchung der an der Transkription des IL-2-Gens beteiligten Transkriptionsfaktoren

Die Transkription des IL-2-Gens hängt von verschiedenen Transkriptionsfaktoren ab, die nach Stimulation der T-Zellen durch Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden. Essentiell für die Expression des IL-2-Gens sind dabei die Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- κ B und NFAT (90). Wichtig ist auch das RE/AP-Element, das aus einem CD28 *responsive element* (CD28RE) und einer NF-IL-2B AP-1-Bindestelle besteht (200). Bei Aktivierung der T-Zelle werden die Transkriptionsfaktoren in den Zellkern transloziert, bilden den Transkriptionskomplex und initiieren die Transkription des IL-2-Gens. Fehlt einer der Transkriptionsfaktoren, kann das IL-2-Gen nicht abgelesen werden (36). Da die vorhergehenden Versuche gezeigt hatten, dass die Aktivierung des IL-2-Promotors durch VacA inhibiert wird, wurde als nächstes untersucht, ob VacA die Aktivierung eines oder mehrerer der beteiligten Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Dazu wurden Konstrukte verwendet, die nicht den gesamten IL-2-Promotor, sondern nur eine AP-1-Bindestelle (AP-1 *luc*), eine NF- κ B-Bindestelle (NF- κ B *luc*), eine NFAT-Bindestelle (NFAT *luc*) oder ein RE/AP-Element (RE/AP *luc*) vor dem Luciferase-Gen besitzen (Abb. III.17).

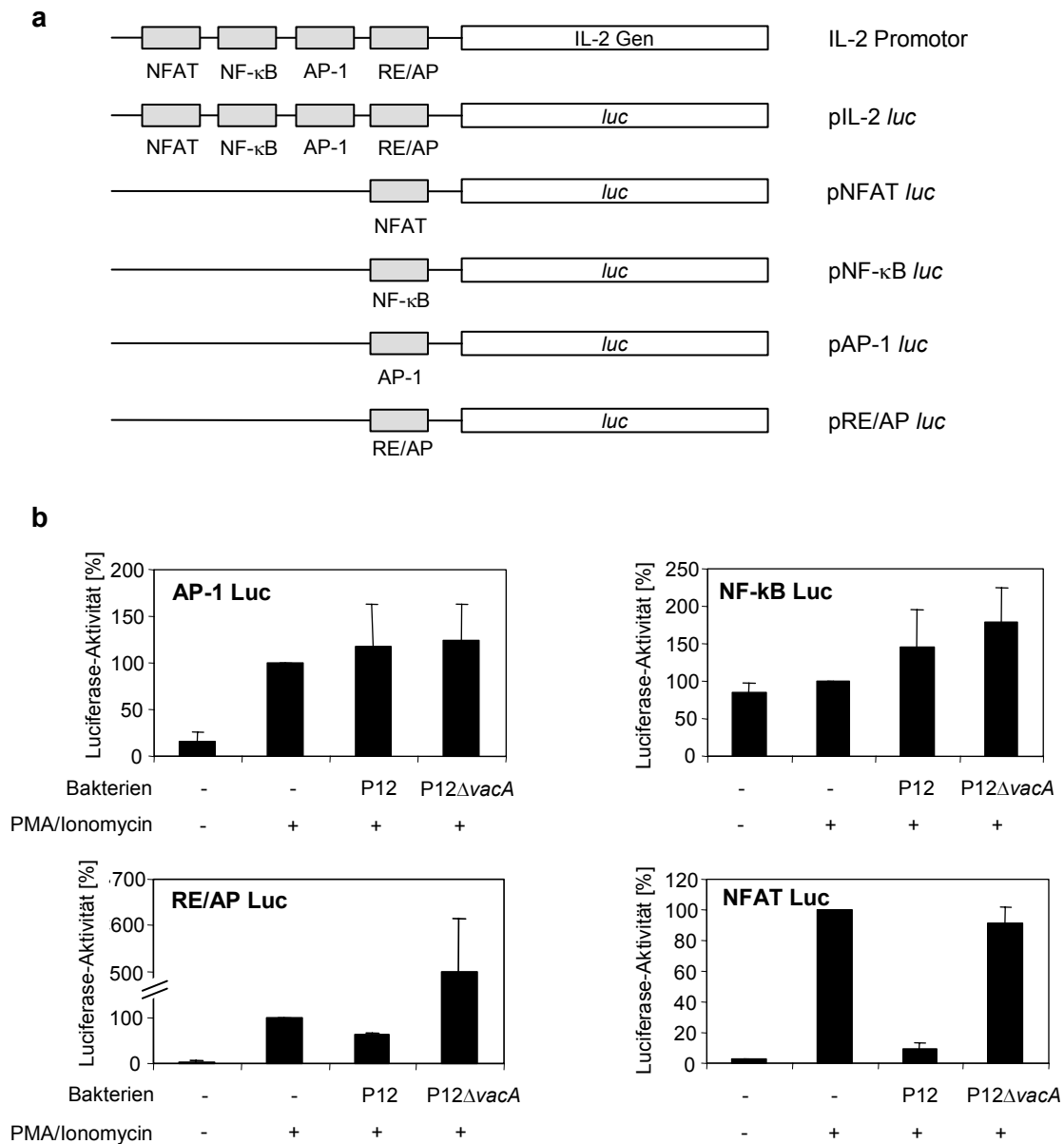


Abb. III.17: Analyse der Aktivierung der an der IL-2-Transkription beteiligten Transkriptionsfaktoren nach Infektion mit *H. pylori*

(a) Schematische Darstellung des Promotors vor dem IL-2-Gen. Bei den Reporter-Konstrukten wurde das IL-2-Gen durch das Luciferase-Gen ersetzt. Die AP-1-, NF-κB-, NFAT- und RE/AP-Reporterkonstrukte enthalten nicht den gesamten IL-2-Promotor, sondern nur die Bindungsstelle des jeweiligen Transkriptionsfaktors vor dem Luciferase-Gen. (b) Die AP-1-, NF-κB-, RE/AP- oder NFAT-Reporter-Konstrukte wurden in Jurkat T-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden mit *H. pylori* P12 oder P12Δ*vacA* infiziert und nach einer Stunde aktiviert. Nach 6 h Aktivierung wurde die Luciferase-Aktivität im Luminometer bestimmt. Gezeigt sind die Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Luciferase-Aktivität aktivierter, aber nicht infizierter Zellen wurde auf 100% gesetzt.

Der AP-1-Reporter und der NF-κB-Reporter zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Luciferase-Aktivität nach Infektion mit P12 oder P12Δ*vacA*. Der RE/AP-Reporter zeigt eine geringe Reduktion der Luciferase-Aktivität nach Infektion mit P12 und eine starke Aktivierung

nach Infektion mit P12 Δ vacA. Die Aktivität des NFAT-Reporters wird am deutlichsten verändert durch die Infektion mit P12 im Vergleich zu P12 Δ vacA. Hier ist die Luciferase-Aktivität durch Infektion mit P12 stark reduziert, während die Infektion mit P12 Δ vacA keinen Einfluss hat. Die Aktivierung des NFAT-Reporters ist ebenso effizient gehemmt wie die Aktivierung des IL-2-Reporters, der den gesamten IL-2-Promotor enthält.

Damit kann die Hemmung der IL-2-Produktion durch spezifische Hemmung des NFAT-abhängigen Signaltransduktionswegs erklärt werden.

1.8.3 Vergleich der Wirkung des *C. jejuni* Cdt-Toxins mit der Wirkung von VacA

Da das Cdt-Toxin von *C. jejuni* ebenso wie das VacA-Toxin von *H. pylori* eine Proliferationshemmung induziert, wäre es möglich, dass auch der Wirkungsmechanismus der beiden Toxine ähnlich ist. Deshalb wurde mit Hilfe der IL-2- und NFAT-Reporter-Konstrukte ein möglicher Einfluss von Cdt auf die Transkription von IL-2 bzw. Aktivierung von NFAT untersucht (Abb. III.18).

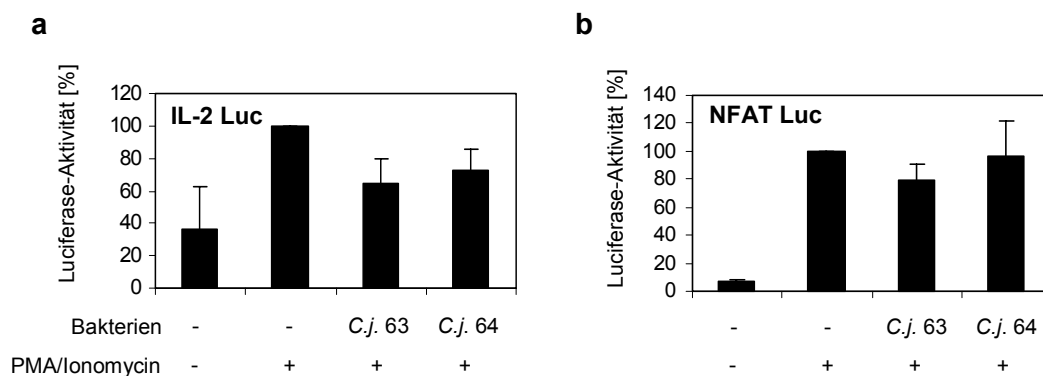


Abb. III.18: Effekt von *C. jejuni* auf die IL-2-Transkription und Aktivierung von NFAT

Jurkat T-Zellen wurden mit den Reporterplasmiden (a) pIL-2 *luc* und (b) pNFAT *luc* transformiert und mit *C. jejuni* C63 (*cdt*⁻) oder C64 (*cdt*⁺) infiziert. 6 h nach Aktivierung wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität im Luminometer bestimmt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen. Die Luciferase-Aktivität aktivierter Zellen ohne Bakterien wurde auf 100% gesetzt.

Wie Abb. III.18 zeigt, führt die Infektion mit *C. jejuni* C63 und C64 zu einer leichten Erniedrigung der Transkription des IL-2-Gens, dies allerdings unabhängig von einem aktiven Cdt-Toxin. Auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT wird nicht signifikant durch einen der *Campylobacter*-Stämme verändert. Dies lässt darauf schließen, dass das Cdt-Toxin von *C. jejuni* und das VacA-Toxin von *H. pylori* in unterschiedliche Signalwege eingreifen, um eine Hemmung des Zellzyklus zu induzieren. VacA erreicht dies offensichtlich durch Hemmung der NFAT-Aktivierung. Für das Cdt-Toxin wurde eine DNase-Aktivität beschrieben, die zu DNA-Strang-Brüchen im Kern der Zielzelle führt, was einen Zellzyklus-Arrest auslöst (106).

1.8.4 Untersuchung der zur Aktivierung von NFAT führenden Signaltransduktion

Mit Hilfe des NFAT-Reporterkonstrukts konnte gezeigt werden, dass VacA die Aktivierung von NFAT hemmt. Der Transkriptionsfaktor NFAT ist wichtig für die Expression von Zytokinen und die Entwicklung der T-Zellen, sowie für Immunregulation und Induktion von Apoptose und Anergie (173).

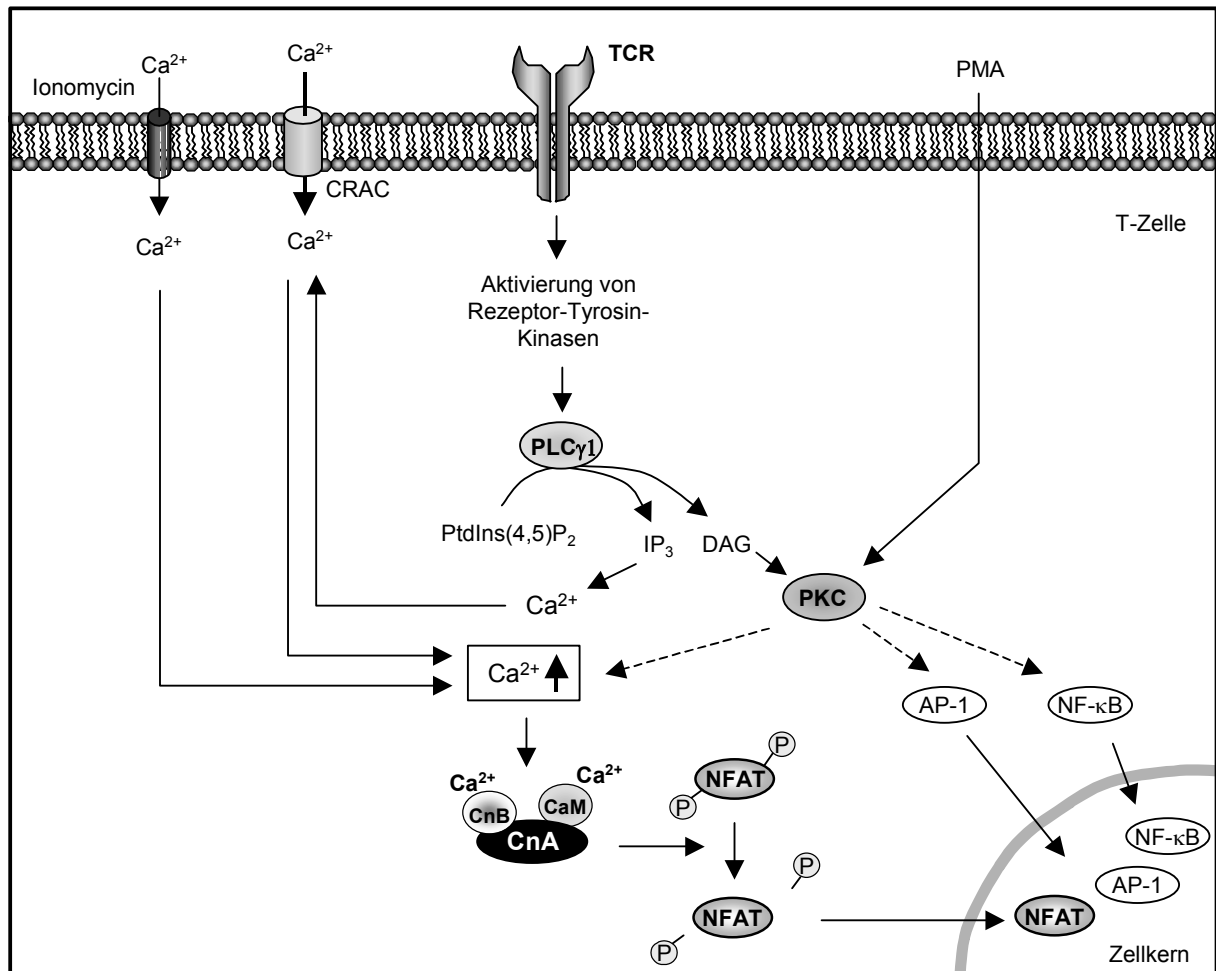


Abb. III.19: Schematische Darstellung der Signaltransduktion, die nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors zur Aktivierung von NFAT führt. Erläuterungen siehe Text.

Der erste Schritt der Aktivierung von NFAT ist die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors (TCR), von dem aus die Stimulation zunächst über eine Reihe von Rezeptortyrosinkinasen weitergeleitet wird (Abb. III.19). Dies führt zur Aktivierung der Phospholipase $\text{C}\gamma 1$ ($\text{PLC}\gamma 1$), die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP_3 setzt Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern frei, welches zu einem Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} über die CRAC (*Calcium release activated calcium channel*)-Kanäle in der Zytoplasmamembran und so zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), was die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B induziert. Daneben scheint die PKC

auch einen Einfluss auf die Aktivierung von NFAT zu haben (165). Durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration werden Calmodulin (CaM) und Calcineurin B (CnB) aktiviert und binden an die katalytische Untereinheit Calcineurin A (CnA). Diese Komplexbildung aktiviert die Phosphatase-Aktivität von CnA, das daraufhin Serin/Threonin-Motive des NFAT-Proteins dephosphoryliert und so dessen Kernlokalisationssequenz zugänglich macht. Als Folge wird NFAT in den Kern transloziert und die Transkription NFAT-abhängiger Gene initiiert (172). Im Versuch kann die Aktivierung der T-Zellen auch über PMA und Ionomycin erfolgen. PMA ist ein Strukturanalogon von DAG, das die PKC aktiviert. Ionomycin ist ein Calcium-Ionophor und induziert einen Ca^{2+} -Einstrom über die Zytoplasmamembran.

Die Tatsache, dass die Hemmung der IL-2-Transkription durch VacA nicht nur nach physiologischer Stimulierung des T-Zell-Rezeptors, sondern auch bei einer Aktivierung mit PMA und Ionomycin auftritt, lässt darauf schließen, dass VacA unterhalb der $\text{PLC}\gamma 1$ in die Signalweiterleitung eingreift. Deshalb wurde im folgenden der Einfluss von VacA auf die Aktivität der Komponenten, die in der Signalkaskade der $\text{PLC}\gamma 1$ nachgeschaltet sind, untersucht.

1.8.4.1 Untersuchung der Kerntranslokation von NFAT nach Infektion mit *H. pylori* P12 bzw. P12 Δ vacA

Eine Möglichkeit, wie VacA die Aktivierung von NFAT hemmen könnte, wäre die Kerntranslokation von NFAT zu verhindern. Um dies zu überprüfen, wurde eine HeLa-Zelllinie verwendet, die konstitutiv ein Fusionsprotein aus NFAT und dem *green fluorescent protein* (GFP) exprimiert (GFP-NFAT) (93). Dieses verhält sich wie endogenes NFAT und wird nach Aktivierung in den Kern transportiert, was mittels Fluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen werden kann. Um die Frage zu klären, ob VacA einen Einfluss auf die Translokation von NFAT in den Kern hat, wurden die GFP-NFAT-produzierenden Zellen mit P12 bzw. P12 Δ vacA infiziert und nach einer Stunde mit PMA und Ionomycin aktiviert. Sechs Stunden nach der Aktivierung wurden die Zellen fixiert und die Kerntranslokation von GFP-NFAT mittels Fluoreszenz-Mikroskopie ausgewertet (Abb. III.20).

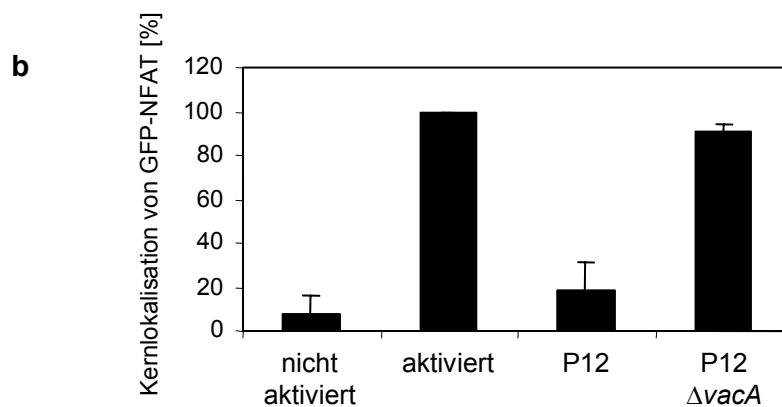
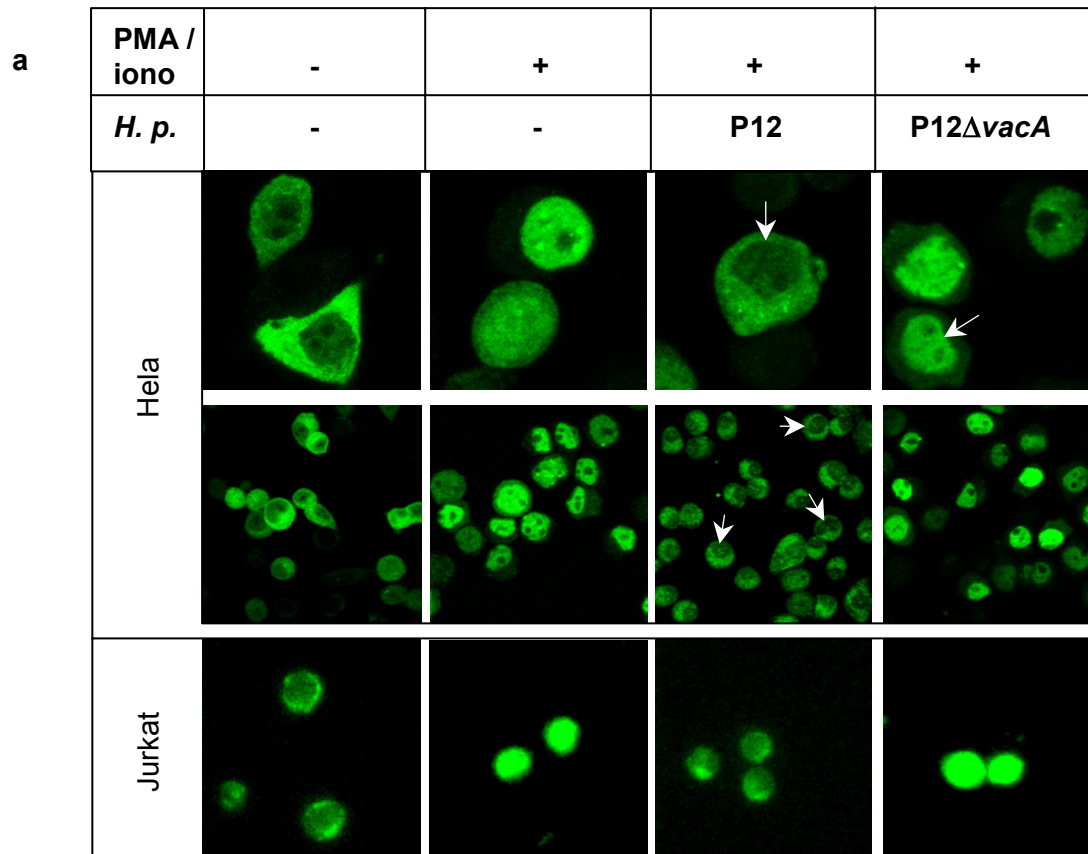


Abb. III.20: Effekt von VacA auf die Translokation von NFAT in den Kern nach Aktivierung

(a) HeLa-Zellen, die konstitutiv GFP-NFAT exprimieren, wurden mit P12 bzw. P12 Δ *vacA* infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit PMA und Ionomycin aktiviert (+), die Kontrolle blieb nicht aktiviert (-). Nach Fixierung der Zellen wurden die Präparate mittels Fluoreszenz-Mikroskopie ausgewertet. Jurkat T-Zellen wurden transient mit dem Plasmid pAD4 transfiziert, das für das GFP-NFAT-Fusionsprotein codiert. Infektion und Aktivierung erfolgten wie für HeLa-Zellen beschrieben. (b) Quantitative Auswertung der mit HeLa-Zellen erhaltenen Daten. Es wurden fünf zufällig ausgewählte Gesichtsfelder (mindestens 200 Zellen) pro Ansatz ausgewertet und dabei die Zahl der Zellen, bei denen NFAT in den Kern transloziert wurde im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen bestimmt. Die Abbildung zeigt das Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

In nicht aktivierten HeLa- oder Jurkat-Zellen befindet sich GFP-NFAT überwiegend im Zytoplasma. Nach Aktivierung der Zellen mit PMA und Ionomycin wird das GFP-NFAT-Fusionsprotein in den Kern transloziert, was zu einer gleichmäßigen GFP-Färbung der Kerne führt. Im Vergleich zur aktivierten, nicht infizierten Kontrolle führt die Infektion mit P12 zu einer starken Reduktion der Translokation von NFAT in den Kern, während P12 Δ vacA die Kerntranslokation von NFAT nicht beeinträchtigt. Dabei gibt es keine Unterschiede zwischen HeLa und Jurkat-Zellen. Die quantitative Auswertung der Daten zeigt, dass VacA die Kerntranslokation von NFAT auf ca. 20% reduziert, was in etwa dem Niveau von nicht aktivierten Zellen entspricht. Damit scheint VacA die Transkription von IL-2 durch Hemmung der Kerntranslokation von NFAT zu inhibieren.

1.8.4.2 Einfluss von konstitutiv aktivem Calcineurin auf die IL-2-Hemmung durch VacA

Die bisherigen Daten zeigten, dass VacA die Translokation von NFAT in den Zellkern verhindert. Dies könnte dadurch passieren, dass VacA direkt an NFAT bindet und damit die Translokation verhindert oder dass VacA in die Signaltransduktionskaskade, die zur Aktivierung von NFAT führt, eingreift. Somit könnte beispielsweise auch die Calcium-abhängige Phosphatase Calcineurin ein Angriffspunkt von VacA sein. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden die Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das für eine konstitutiv aktive Form von Calcineurin codiert (pSR α - Δ CaM-AI) (Abb. III.21a). Bei diesem Konstrukt wurde die Calmodulin bindende Domäne und die Autoinhibitorische Domäne (AI) deletiert, so dass das Calcineurin unabhängig von einer Calciumerhöhung aktiv ist (155). Durch Co-Transfektion dieses Plasmids mit dem pIL-2 *luc*-Reporterplasmid kann untersucht werden, ob VacA die IL-2-Transkription in Anwesenheit von konstitutiv aktivem Calcineurin hemmen kann (Abb. III.21).

Wie bereits gezeigt, führt VacA in der T-Zelle zu einer Hemmung der Transkription des IL-2-Gens. Ist allerdings in der Zelle konstitutiv aktives Calcineurin vorhanden, ist der Effekt von VacA auf die Expression des IL-2-Gens aufgehoben. Dies deutet darauf hin, dass VacA nicht direkt an NFAT angreift, sondern die Aktivierung von NFAT entweder durch Interferenz mit Calcineurin oder der Signalkaskade, die zur Aktivierung von Calcineurin führt, hemmt.

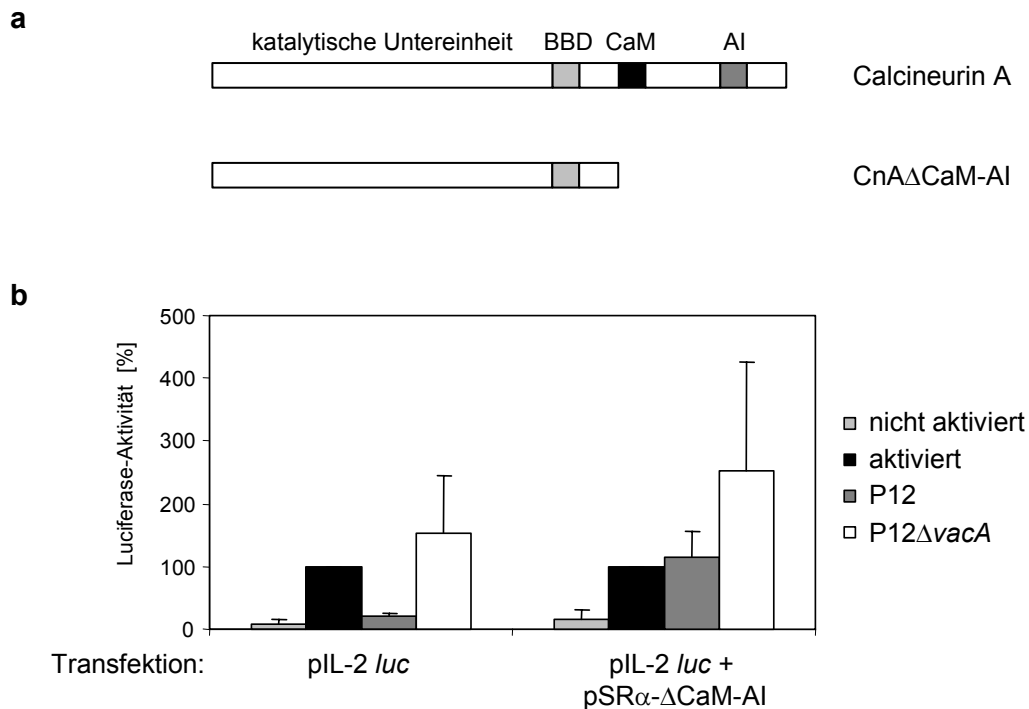


Abb. III.21: Effekt von konstitutiv aktivem Calcineurin auf die IL-2-Hemmung durch VacA

(a) Schematische Darstellung der verschiedenen Domänen des Calcineurin-Proteins. Calcineurin A besteht aus der katalytisch aktiven Untereinheit, einer CnB-bindenden (BBD) und einer CaM-bindenden (CaM) Untereinheit. Bei einer niedrigen Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle sind CnB und CaM nicht gebunden und die Autoinhibitorische Domäne (AI) inhibiert die katalytische Untereinheit. Beim konstitutiv aktiven Calcineurin sind die CaM-bindende und die autoinhibitorische Domäne deletiert, so dass die katalytische Untereinheit unabhängig von einer Calciumerhöhung aktiv ist. (b) Jurkat T-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid pIL-2 luc oder mit pIL-2 luc und dem Plasmid pSR α - Δ CaM-AI, das für die konstitutiv aktive Form des Calcineurins codiert, transfiziert. 16 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit *H. pylori* P12 oder P12 Δ vacA infiziert und eine Stunde später mit PMA und Ionomycin aktiviert. Die Luciferase-Aktivität wurde nach 6 h bestimmt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten. Die Luciferase-Aktivität der aktivierten Zellen ohne Bakterien wurde jeweils auf 100% gesetzt.

1.8.4.3 Einfluss der Calcium-Verfügbarkeit im Zytoplasma auf die IL-2-Hemmung durch VacA

Die Phosphatase Calcineurin wird durch die Bindung von Calcium über die Untereinheiten Calmodulin und Calcineurin B aktiviert. Ist nicht genügend Calcium im Zytoplasma verfügbar, wird die Phosphatase-Aktivität von CnA nicht stimuliert (98). Ausgelöst wird der Calcium-Einstrom in die T-Zelle durch die Aktivierung der PLC- γ , die DAG und IP₃ produziert. IP₃ aktiviert die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), das wiederum Calciumkanäle in der Zytoplasmamembran aktiviert (57; 143). Dadurch kommt es zu einem starken Calcium-Einstrom in die Zelle (*capacitative calcium influx*). Dort ist aber nur kurzzeitig eine hohe Calciumkonzentration vorhanden, da das eingeströmte Calcium in intrazelluläre Kompartimente wie z.B. die Mitochondrien aufgenommen und von dort nur

langsam wieder ins Zytoplasma abgegeben wird (82). Dadurch werden hohe Calciumkonzentrationen im Zytoplasma, die toxisch sein können, gepuffert, und stattdessen über einen längeren Zeitraum moderat erhöhte Calciumkonzentrationen im Zytoplasma aufrechterhalten. Durch die Verwendung des Calcium-Ionophors Ionomycin zur Aktivierung der T-Zellen wird ein Calcium-Einstrom in die Zellen induziert, so dass es unwahrscheinlich ist, dass VacA seine hemmende Wirkung durch Veränderung der Calcium-Konzentration ausübt. Allerdings ist es möglich, dass VacA die Freisetzung von Calcium aus den intrazellulären Vorratsspeichern moduliert und damit die Verfügbarkeit von Calcium so verändert, dass keine Aktivierung der T-Zellen möglich ist. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde nach Infektion der Zellen mit P12 bzw. P12 Δ vacA und nach Aktivierung mit PMA und Ionomycin Thapsigargin zugegeben. Thapsigargin inhibiert die Calcium-ATPase im ER, was zur Freisetzung von Calcium aus dem intrazellulären Kompartiment führt. Da Ionomycin zusätzlich für einen Calcium-Einstrom von außen sorgt, sollte so genügend Calcium im Zytoplasma verfügbar sein. In Abbildung III.22 sind die Ergebnisse des Versuchs dargestellt.

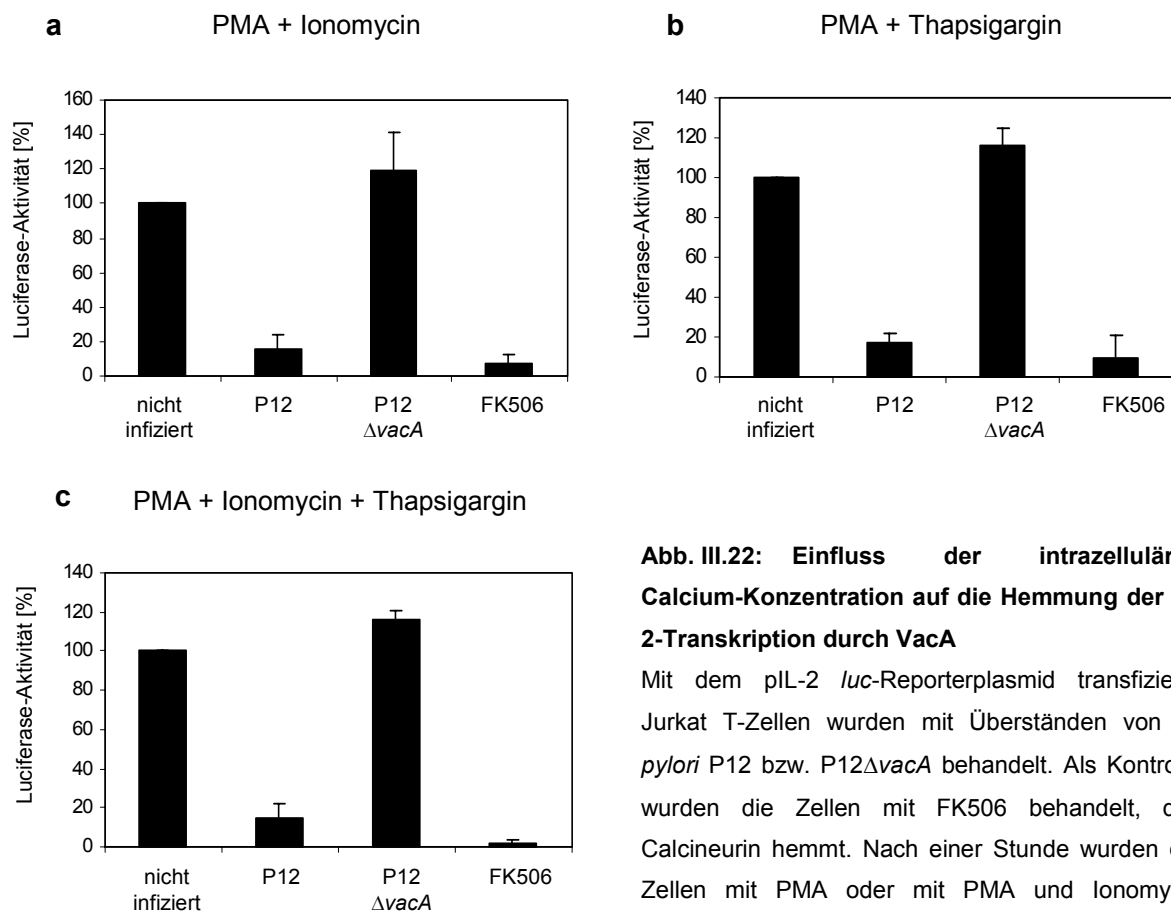


Abb. III.22: Einfluss der intrazellulären Calcium-Konzentration auf die Hemmung der IL-2-Transkription durch VacA

Mit dem pIL-2 *luc*-Reporterplasmid transfizierte Jurkat T-Zellen wurden mit Überständen von *H. pylori* P12 bzw. P12 Δ vacA behandelt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit FK506 behandelt, das Calcineurin hemmt. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit PMA oder mit PMA und Ionomycin aktiviert und 250 nM Thapsigargin zugegeben. Die

Luciferase-Aktivität wurde nach weiteren 5 h bestimmt. Die Luciferase-Aktivität in den nicht infizierten Ansätzen, die mit **(a)** PMA/Ionomycin bzw. **(b)** PMA und Thapsigargin oder **(c)** PMA/Ionomycin und Thapsigargin aktiviert wurden, wurde jeweils auf 100% gesetzt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

Die erfolgreiche Aktivierung der T-Zellen mit PMA und Thapsigargin zeigt, dass Thapsigargin in der Zelle aktiv ist und Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern freisetzt. Die IL-2-Transkription ist aber nach Behandlung der Zellen mit Überständen von P12 und Aktivierung mit PMA und Ionomycin sowohl mit als auch ohne Thapsigargin stark reduziert. FK506 hemmt Calcineurin durch eine direkte, Calcium-unabhängige Bindung (191). Demzufolge kann eine Erhöhung der Calcium-Verfügbarkeit die Hemmung von Calcineurin durch FK506 nicht aufheben. Die Tatsache, dass die erhöhte Verfügbarkeit von Calcium auch keinen Effekt auf die IL-2-Hemmung durch VacA hat, lässt darauf schließen, dass VacA Calcineurin nicht durch Modulation der intrazellulären Calcium-Konzentration hemmt, sondern vermutlich ähnlich wie FK506 direkt am Calcineurin angreift.

1.8.4.4 Einfluss der Protein Kinase C θ auf die Hemmung der IL-2-Produktion durch VacA

Die am häufigsten in T-Zellen exprimierte Form der Protein Kinase C (PKC) ist die PKC θ , die eine entscheidende Rolle bei der T-Zellaktivierung spielt, indem sie die Aktivierung von AP-1 (8) und NF- κ B (27) vermittelt. Wie Pfeifhofer *et al.* kürzlich zeigten, ist die PKC θ aber auch wichtig für die Aktivierung von NFAT (165). Sie wiesen nach, dass die fehlende Proliferation der T-Zellen von PKC θ -*knockout*-Mäusen im wesentlichen auf einer Hemmung der NFAT-Aktivierung durch Reduktion der IP $_3$ -Bildung und damit einer Hemmung der Calcium-Mobilisierung beruht. Damit könnte auch die PKC θ eine Rolle bei der VacA-induzierten IL-2-Hemmung spielen. Um dies zu untersuchen, wurden Jurkat T-Zellen mit einem Plasmid, das für eine konstitutiv aktive Form der PKC θ codiert (8) und mit dem pIL-2 *luc*-Reporterplasmid transfiziert und anschließend mit *H. pylori* P12 und P12 Δ *vacA* infiziert (Abb. III.23).

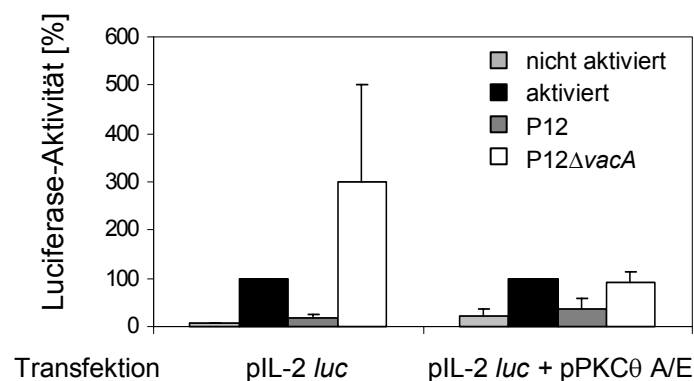


Abb. III.23: Effekt von konstitutiv aktiver PKC θ auf die Hemmung der IL-2-Transkription durch VacA

Das Plasmid PKC θ A/E, das für eine konstitutiv aktive Form der PKC θ codiert, wurde zusammen mit dem pIL-2 *luc*-Reporterplasmid in Jurkat T-Zellen transfiziert. Als Kontrolle wurden Zellen nur mit dem pIL-2 *luc*-Reporterplasmid transfiziert. Die Zellen wurden mit *H. pylori* P12 oder P12 Δ *vacA* infiziert, mit PMA und Ionomycin aktiviert und nach 6 h die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. Die Luciferase-Aktivität aktivierter, nicht infizierter Zellen wurde jeweils auf 100% gesetzt.

Die Aktivität der konstitutiv aktiven PKC θ wurde mit Hilfe des AP-1-Reporterkonstrukts überprüft. Dabei zeigten nicht aktivierte Zellen eine ebenso hohe Luciferase-Aktivität wie aktivierte Zellen, was belegt, dass diese Form der PKC θ konstitutiv aktiv ist (Daten nicht gezeigt). Allerdings hat die Expression der konstitutiv aktiven Form der PKC θ keinen signifikanten Einfluss auf die Hemmung der IL-2-Transkription durch VacA (Abb. III.23), was bedeutet, dass die PKC θ nicht der Angriffspunkt von VacA sein kann. Falls VacA hier angreifen würde, müsste durch die konstitutive Aktivität der PKC θ die Hemmung der IL-2-Transkription aufgehoben werden. Dies ist auch in Übereinstimmung mit den mit Thapsigargin erhaltenen Daten, die zeigen, dass eine erhöhte Calcium-Mobilisierung die Hemmung der NFAT-Aktivierung durch VacA nicht aufheben kann. Daraus lässt sich schließen, dass VacA vermutlich in die Signalkaskade unterhalb der PKC und der Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration eingreift. Die Tatsache, dass P12 Δ vacA bei Transfektion des pIL-2-luc-Reporterplasmids die Aktivierung des IL-2-Promotors stark stimuliert im Vergleich zur Kontrolle, kann momentan noch nicht erklärt werden.

1.8.4.5 Untersuchung einer direkten Interaktion von VacA und Calcineurin

Die bisherigen Daten deuten also darauf hin, dass VacA die T-Zell-Aktivierung durch direkte oder indirekte Hemmung von Calcineurin inhibiert. Deshalb wurde versucht, mittels Co-Immunpräzipitation eine direkte Interaktion zwischen VacA und dem Calcineurin-Komplex zu zeigen. Da der zur Verfügung stehende VacA-Antikörper nur denaturiertes, nicht aber natives VacA erkennt, konnte der Antikörper nicht zur Immunpräzipitation eingesetzt werden. Stattdessen wurden Jurkat T-Zellen mit dem Plasmid HA-pSG5-CnA β 2 transfiziert, das für HA-Calcineurin codiert, und mit Überständen von *H. pylori* P12 behandelt. Anschließend wurde versucht, HA-Calcineurin-VacA-Komplexe mit einem HA-spezifischen Antikörper aus diesen Zellen zu präzipitieren. Leider konnte hier keine Co-Präzipitation von Calcineurin und VacA gezeigt werden. Dies könnte bedeuten, dass VacA nicht direkt mit Calcineurin interagiert, dass die Zahl der VacA-Calcineurin-Komplexe zu gering ist, um sie nach Immunpräzipitation im Western Blot zu detektieren oder dass die Interaktion von VacA und Calcineurin unter den Präzipitations-Bedingungen aufgehoben wird. Zu diesem Zeitpunkt kann also noch nicht definitiv gesagt werden, wie VacA die Aktivität von Calcineurin hemmt.

1.9 Vergleich der Veränderung der Genexpression nach Behandlung von Jurkat T-Zellen mit VacA und FK506

Die Analyse der zur Aktivierung von NFAT führenden Signaltransduktion weist darauf hin, dass VacA auf der Ebene der Phosphatase Calcineurin eingreift. Eine bereits bekannte Substanz, die Calcineurin direkt hemmt, ist FK506. Um zu überprüfen, ob die Behandlung von T-Zellen mit VacA ähnliche Auswirkungen auf die Genexpression hat wie die

Behandlung mit FK506, wurden in Zusammenarbeit mit Reinhard Hoffmann (Max-von-Pettenkofer Institut, München) *Microarray*-Analysen durchgeführt. Dazu wurden Jurkat T-Zellen mit 1 µg/ml gereinigtem VacA-Toxin oder mit 25 nM FK506 behandelt. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit PMA und Ionomycin aktiviert. Die zelluläre RNA wurde fünf Stunden nach Aktivierung isoliert, markiert, fragmentiert und auf einen *Microarray*-Chip (*Affymetrix Human Genome U133_subA Array*), der 22.283 humane Gene enthält, hybridisiert. Die Experimente wurden unabhängig voneinander dreimal unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Auswertung der Array-Daten erfolgte durch R. Hoffmann. Nach Normalisierung und Korrektur der *Array*-Daten ergaben sich 136 Gene, die nach Behandlung mit VacA oder FK506 differentiell reguliert wurden, das heißt, mindestens um den Faktor 2 im Vergleich zur Kontrolle hoch- oder herunterreguliert wurden (Abb. III.24).

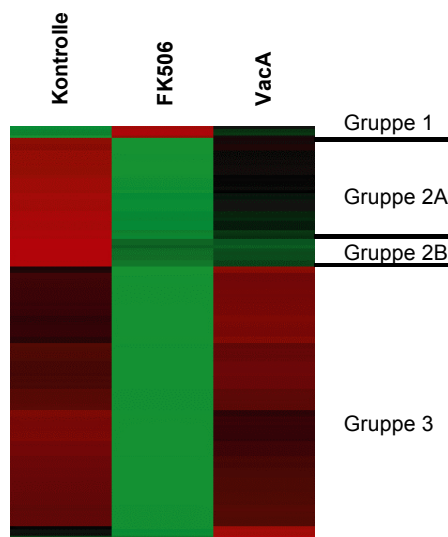


Abb. III.24: Expressionsanalyse von 136 differentiell regulierten Genen nach Behandlung der Jurkat T-Zellen mit VacA oder FK506

Microarray-Analyse von Jurkat T-Zellen, die mit 1 µg/ml gereinigtem, aktiviertem VacA Toxin oder 25 nM FK506 behandelt worden waren. Kontrollzellen blieben unbehandelt. Die Auswertung von drei unabhängig durchgeführten Hybridisierungsexperimenten ergab 136 Gene als differentiell reguliert (*false discovery rate* ≤ 0.82%), die in der Abbildung dargestellt sind. Jedes dieser 136 Gene wird durch einen Balken repräsentiert, wobei rot eine höhere Expression und grün eine niedrigere Expression im Vergleich zur Kontrolle anzeigt. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die 136 differentiell regulierten Gene lassen sich in vier Gruppen unterteilen (siehe Abb. III.24). Gene in Gruppe 1 wurden sowohl von VacA als auch von FK506 im Vergleich zur Kontrolle hochreguliert, während Gene in der Gruppe zwei von beiden Substanzen herunterreguliert wurden. Die Gruppe 2 kann weiterhin unterteilt werden in Gene, die von FK506 stärker reprimiert wurden als von VacA (Gruppe 2A) und in Gene, die von FK506 und VacA gleich stark herunterreguliert wurden (Gruppe 2B). Gene in der Gruppe 3 schließlich sind Gene, die von FK506, nicht aber von VacA reprimiert wurden. In der Gruppe 2B finden sich Gene, die für IL-2 und NFAT codieren, aber auch für C- und CC-Chemokine, wie *Single Motif-1* (SCM-1β), SCM-1α, *Macrophage Inflammatory Protein* (MIP)-1α und MIP-1β. Interessanterweise sind alle Gene, deren Expression von VacA erniedrigt wird, eine Untergruppe der von FK506 reprimierten Gene, was auf einen gemeinsamen Mechanismus, nämlich die Calcineurin-Hemmung hindeutet. Unterschiede zwischen FK506 und VacA gibt es in der Gruppe 3. Da laut Literatur FK506 in B-Zellen auch andere Transkriptionsfaktoren

als NFAT beeinflusst (69), wurde die Substanz auch auf Hemmung der AP-1- und NF- κ B-Aktivierung in T-Zellen getestet (Abb. III.25).

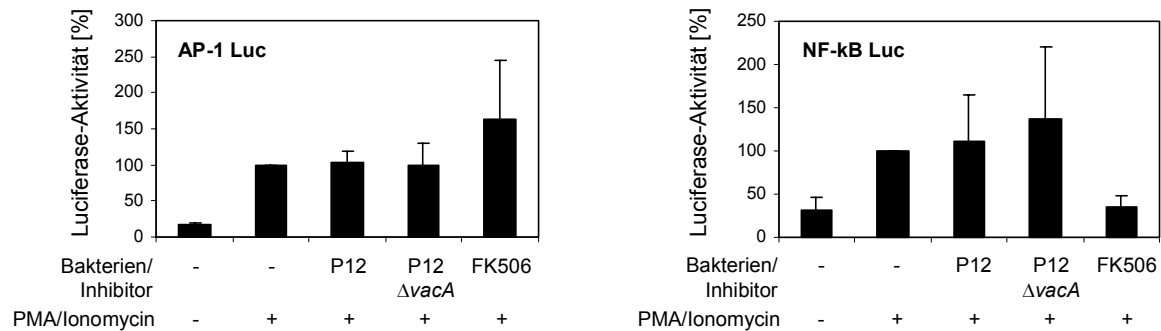


Abb. III.25: Wirkung von FK506 auf die Aktivierung von AP-1 und NF- κ B in Jurkat T-Zellen

Die mit dem jeweiligen Reporterkonstrukt transfizierten Jurkat T-Zellen wurden mit P12 bzw. P12 $\Delta vacA$ oder mit 25 nM FK506 behandelt, aktiviert und nach 6 h die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie die Daten zeigen, hat FK506 keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivierung von AP-1, hemmt aber deutlich die Aktivierung von NF- κ B. Diese Hemmung könnte die in der Gruppe 3 beobachteten Unterschiede in der Genexpression erklären, da VacA keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivierung von NF- κ B hat.

Eine vollständige Liste der differentiell regulierten Gene findet sich im Anhang auf Seite 118.

1.10 Untersuchung der Aktivität von m2-VacA bei intrazellulärer Expression

Die Proliferation der PBLC wurde nicht nur durch das m1-VacA Protein von *H. pylori* P12, sondern auch durch das m2-VacA von Tx30a gehemmt (siehe Kapitel III.1.3.3), nicht aber die Proliferation und IL-2-Produktion von Jurkat T-Zellen. Da sich die m1- und m2-Form des reifen VacA-Proteins im wesentlichen im p58 Teil unterscheiden, der die Rezeptor-bindende Domäne beinhaltet, deutet dies darauf hin, dass die verschiedenen Formen des VacA-Proteins über unterschiedliche Rezeptoren in Jurkat T-Zellen und PBLC aufgenommen werden. Über die Rezeptoren ist allerdings noch wenig bekannt. Deshalb wurde untersucht, ob die m2-Form des *vacA*-Allels bei intrazellulärer Expression auch in Jurkat T-Zellen die Transkription des IL-2 Gens inhibiert.

1.10.1 Klonierung der *vacA*- bzw. *ureB*-Gene von *H. pylori* 26695 und Tx30a in den Vektor pcDNA3.1 und Expression in Jurkat T-Zellen

Das m1-*vacA* Gen des *H. pylori*-Stamms 26695 sowie das m2-*vacA* Gen von *H. pylori* Tx30a wurden in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Diese Stämme wurden gewählt, weil die Sequenz ihrer *vacA*-Gene bekannt ist. Als Kontrolle wurde das *ureB*-Gen von *H. pylori* 26695 in den pcDNA3.1 Vektor kloniert, da UreB die IL-2-

Transkription nicht beeinflussen sollte. Die *vacA*-Gene wurden ohne Signalsequenz und Autotransporterdomäne über die Oligonukleotide BG15 und BG16 (26695) bzw. BG15 und BG17 (Tx30a) amplifiziert, das *ureB* Gen über die Oligonukleotide BG21 und BG22. Die *Bam*HI/*Sal*I-restringierten PCR-Fragmente wurden in den *Bam*HI/*Xho*I-geschnittenen Vektor pcDNA3.1 ligiert und die korrekte Insertion der Gene in den Vektor durch Restriktionsanalysen überprüft.

Im Normalfall werden Gene, die in den Vektor pcDNA3.1 kloniert wurden, nach Transfektion in der Eukaryontenzelle über den CMV-Promotor transkribiert. Aus Gründen, die nicht bekannt sind, kann das *vacA*-Gen jedoch nicht effizient über den CMV-Promotor exprimiert werden. Mit Hilfe rekombinanter *Vaccinia*-Viren, die das Gen für die T7-RNA-Polymerase im Genom integriert haben, kann das *vacA*-Gen aber über den ebenfalls auf dem pcDNA3.1-Vektor enthaltenen T7-Promotor erfolgreich exprimiert werden (64).

Um die Expression der klonierten Gene zu testen, wurden die Plasmide pcDNA, pcDNA-*vacA*₂₆₆₉₅, pcDNA-*vacA*_{Tx30a} und pcDNA-*ureB* in Jurkat T-Zellen transfiziert und anschließend mit dem rekombinanten *Vaccinia*-Stamm vTF-7 (J. Haas, Max-von-Pettenkofer Institut, München) mit einer MOI von 1-10 infiziert. Nach 18 h wurden die Zellen lysiert und die Produktion von VacA bzw. UreB im Western Blot analysiert (Abb. III.26).

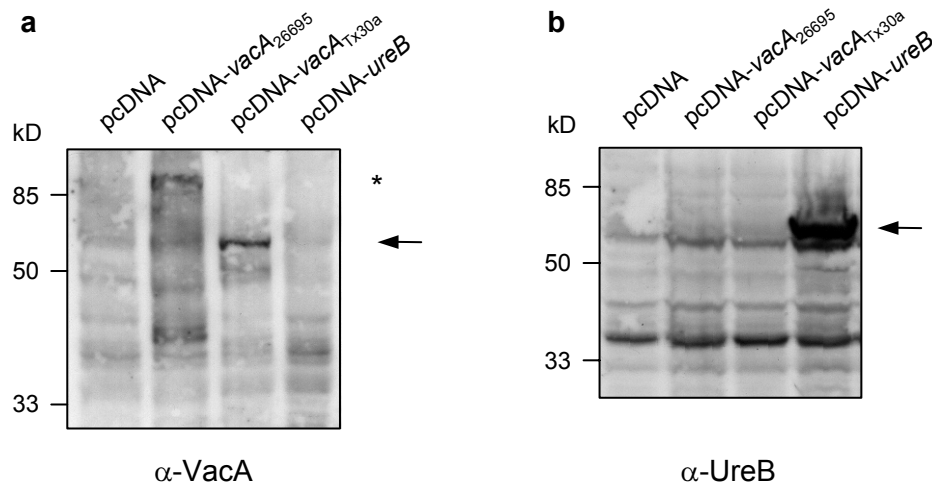


Abb. III.26: Expression von *vacA* und *ureB* über das *Vaccinia*-Expressionssystem

Die Plasmide pcDNA, pcDNA-*vacA*₂₆₆₉₅, pcDNA-*vacA*_{Tx30a} und pcDNA-*ureB* wurden in Jurkat T-Zellen transfiziert. Zur Expression der Gene wurden die transfizierten Zellen mit rekombinanten vTF-7 *Vaccinia*-Viren infiziert und für ca. 18 h inkubiert. Die Produktion von VacA und UreB wurde im Western Blot mit den Antikörpern AK197 (VacA) bzw. AK201 (UreB) nachgewiesen. (a) VacA-Blot. Der Stern markiert das ungespaltene VacA-Protein, der Pfeil markiert das Spaltprodukt p58. (b) UreB-Blot. Der Pfeil markiert UreB. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen.

Der Expressionstest zeigt, dass sowohl VacA als auch UreB nach Transfektion der Jurkat T-Zellen produziert werden. Das VacA-Protein von Tx30a wird dabei möglicherweise in p37

und p58 gespalten, wobei im Western Blot nur das p58-Fragment detektierbar ist. Die Expression von *ureB* in den T-Zellen scheint stärker zu sein als die Expression von *vacA*.

1.10.2 Untersuchung der Hemmung der IL-2-Transkription durch intrazellulär produziertes VacA bzw. UreB

Um die Frage zu klären, ob die m2-Form des VacA-Proteins die IL-2-Produktion in Jurkat T-Zellen hemmen kann, wurden die Plasmide pcDNA, pcDNA-*vacA*₂₆₆₉₅, pcDNA-*vacA*_{Tx30a} und als Kontrolle pcDNA-*ureB* zusammen mit dem pIL-2 *luc*-Reporterplasmid in Jurkat T-Zellen transfiziert. Die Expression der *vacA*- bzw. *ureB*-Gene wurde durch Infektion mit den rekombinanten *Vaccinia*-Viren induziert. Da die Infektion mit den *Vaccinia*-Viren schon eine Aktivierung der T-Zellen auslöst (209), wurden die Zellen hier nicht mehr zusätzlich mit PMA und Ionomycin aktiviert. Nach 18 h wurde die Luciferase-Aktivität der einzelnen Ansätze bestimmt (Abb. III.27).

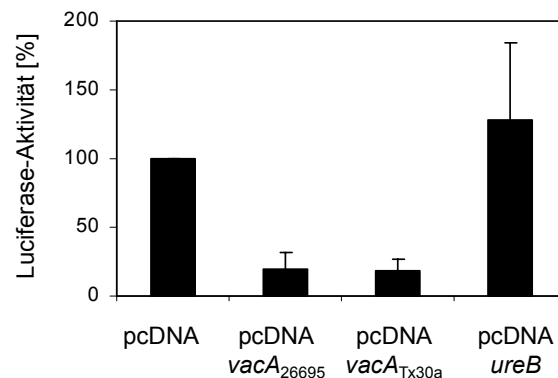


Abb. III.27: Effekt von intrazellulär produziertem VacA bzw. UreB auf die Transkription des IL-2-Gens in Jurkat T-Zellen

Jurkat T-Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA, pcDNA-*vacA*₂₆₆₉₅, pcDNA-*vacA*_{Tx30a} und pcDNA-*ureB* transfiziert und anschließend mit rekombinanten *Vaccinia*-Viren infiziert. Nach 18 h wurde die Luciferase-Aktivität gemessen. Zur Standardisierung der Transfektionseffizienz wurde die β -Gal-Aktivität der einzelnen Ansätze bestimmt. Die Luciferase-Aktivität der mit dem pcDNA-Vektor transfizierten Zellen wurde auf 100% und die übrigen Werte in Relation dazu gesetzt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Im Vergleich zur Kontrolle führt die intrazelluläre Expression von *vacA* zu einer starken Hemmung der IL-2-Transkription. Dabei ist die Hemmung durch die m1-Form (26695) und die m2-Form (Tx30a) des VacA-Proteins gleich effizient. UreB dagegen hat keinen Einfluss auf die Produktion von IL-2, was zeigt, dass *H. pylori*-Proteine die Transkription des IL-2-Gens nicht unspezifisch hemmen. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass sowohl die m1- als auch die m2-Form des VacA-Proteins in der Lage ist, die Transkription des IL-2-Gens zu hemmen. Somit scheinen die Sequenz-Unterschiede des m1- und m2-VacA keine Rolle bei der Hemmung der IL-2-Transkription zu spielen. Allerdings scheint die m2-Form,

möglicherweise wegen des fehlenden entsprechenden Rezeptors, nicht in Jurkat T-Zellen aufgenommen zu werden.

1.11 Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Vakuolisierung und Calcineurin-Hemmung

Diverse Studien zeigten, dass VacA verschiedene Effekte auf Zellen hervorruft. Die am besten charakterisierte Aktivität ist die Induktion von sauren Vakuolen in eukaryontischen Zellen. Dabei wurde die minimale Domäne, die noch eine Vakuolisierung hervorrufen kann, als Aminosäure 34-458 (VacA₃₄₋₄₅₈) bestimmt (237). Ein noch weiter verkürztes VacA-Protein hat keine vakuolisierende Aktivität mehr. Ausserdem wurde gezeigt, dass die Vakuolisierung der Zellen von einer Kanalbildung des VacA-Proteins abhängt. Ein VacA-Protein, bei dem die Aminosäure Prolin an Position 9 durch ein Alanin ersetzt wurde (VacA_{P9A}) und das dadurch keinen Kanal mehr bildet, kann keine Vakuolisierung in eukaryontischen Zellen auslösen (236).

1.11.1 Untersuchung der Vakuolisierung bzw. IL-2-Hemmung mit Hilfe verschiedener Inhibitoren

In Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) führt die Hemmung von Calcineurin über die Modulation der Aktivität der V-ATPase zur Bildung von Vakuolen (40; 76). Um zu überprüfen, ob eine Calcineurin-Hemmung auch in Jurkat T-Zellen die Bildung von Vakuolen auslöst, wurden die Zellen mit 25 nM FK506 behandelt und nach 16-18 h eine Vakuolenfärbung durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Calcineurin-Hemmung durch FK506 im Gegensatz zu VacA nicht zur Induktion saurer Vakuolen führt (Daten nicht gezeigt).

Im Gegenzug wurde untersucht, ob die Kanalbildung durch VacA bzw. die Ansäuerung der VacA-induzierten Vakuolen nötig ist, um Calcineurin zu hemmen. Dazu wurden die Zellen nach Transfektion mit dem pIL-2 *luc*-Reporterplasmid mit verschiedenen Inhibitoren behandelt und anschließend für eine Stunde mit *H. pylori* P12 infiziert oder als Kontrolle mit FK506 behandelt. Fünf Stunden nach der Aktivierung wurde die Luciferase-Aktivität der einzelnen Ansätze gemessen. Zur Hemmung der Kanalaktivität von VacA wurden Bumetanid und Furosemid eingesetzt (139), zur Hemmung der Ansäuerung der Vakuolen Bafilomycin A1, das die vakuoläre V-ATPase hemmt (19). Der Effekt der Inhibitoren auf die Vakuolisierung der T-Zellen durch *H. pylori* P12 wurde durch eine Vakuolenfärbung überprüft (Abb.III.28).

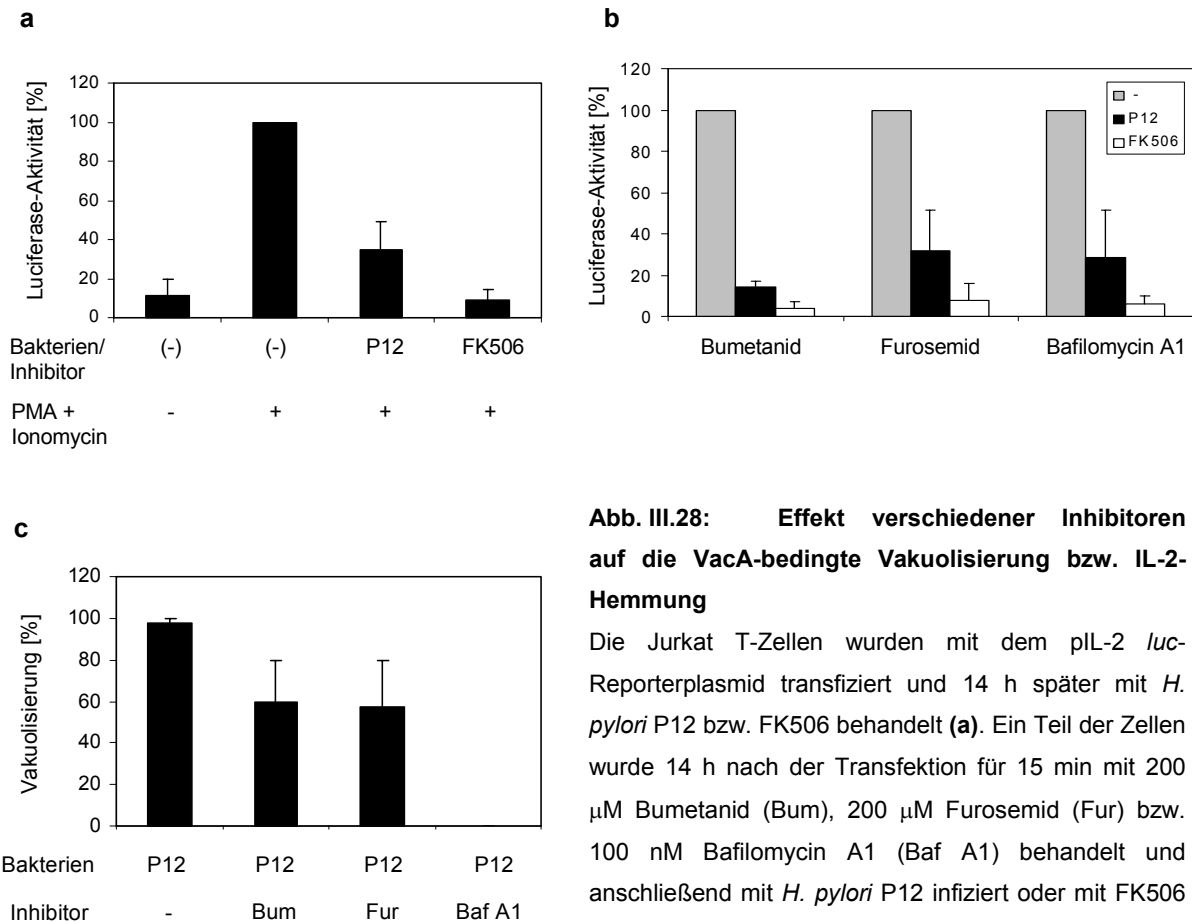


Abb. III.28: Effekt verschiedener Inhibitoren auf die VacA-bedingte Vakuolisierung bzw. IL-2-Hemmung

Die Jurkat T-Zellen wurden mit dem pIL-2 *luc*-Reporterplasmid transfiziert und 14 h später mit *H. pylori* P12 bzw. FK506 behandelt (a). Ein Teil der Zellen wurde 14 h nach der Transfektion für 15 min mit 200 μ M Bumetanid (Bum), 200 μ M Furosemid (Fur) bzw. 100 nM Bafilomycin A1 (Baf A1) behandelt und anschließend mit *H. pylori* P12 infiziert oder mit FK506 behandelt (b). Die Zellen wurden nach einer Stunde für

5 h aktiviert und dann die Luciferase-Aktivität gemessen. Zur Überprüfung der Wirksamkeit der Inhibitoren wurde eine Vakuolenfärbung von allen Ansätzen durchgeführt (c). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von mind. drei unabhängigen Experimenten. Dabei wurden die Luciferase-Aktivitäten der aktivierten und mit dem jeweiligen Inhibitor behandelten, aber nicht infizierten Zellen auf 100% gesetzt.

Die Vakuolenfärbung zeigte, dass die Inhibitoren Bumetanid und Furosemid die Induktion der Vakuolen nicht effizient hemmen, so dass hier keine Aussage getroffen werden kann, ob die Kanalaktivität von VacA wichtig für die Hemmung von Calcineurin ist. Bafilomycin A1 hemmt dagegen die Vakuolisierung durch VacA vollständig, hat aber keinen Einfluss auf die VacA-bedingte Hemmung von Calcineurin. Daraus kann geschlossen werden, dass eine Ansäuerung der Vakuolen nicht essentiell für die Calcineurin-Hemmung durch VacA ist.

1.11.2 Klonierung von *vacA*₃₄₋₄₅₈ bzw. *vacA*_{P9A} in den Vektor pcDNA3.1 und Test der Expression in Jurkat T-Zellen

Da die Bedeutung der Kanalbildung durch VacA für die Calcineurin-Hemmung mit Hilfe der Inhibitoren Bumetanid und Furosemid nicht geklärt werden konnte, wurde versucht, diese Frage mit Hilfe der in den pcDNA klonierten *vacA*-Mutante P9A zu beantworten. Der Aminosäure-Austausch an Position 9 führt dazu, dass kein Kanal mehr gebildet und somit keine Vakuolisierung ausgelöst werden kann. Um zusätzlich herauszufinden, ob die

Calcineurin-Hemmung durch die gleiche VacA-Domäne, die auch für die Vakuolisierung verantwortlich ist, ausgelöst wird oder ob dafür andere Domänen von VacA erforderlich sind, wurde auch die Gensequenz des zur Vakuolisierung benötigten minimal aktiven VacA in den Vektor pcDNA3.1 kloniert und seine Auswirkung auf die Transkription von IL-2 untersucht.

Die Klonierung wurde von Wolfgang Fischer durchgeführt und erfolgte wie bei der Klonierung des Wildtyp-*vacA*-Gens ohne Signalsequenz und Autotransporter-Domäne ausgehend vom *vacA*-Gen des Stamms 26695 mit Hilfe der Oligonukleotide WS200 und WS209 (*VacA*₃₄₋₄₅₈) bzw. WS240 und BG16 (*VacA*_{P9A}). Der Expressionstest mit dem *Vaccinia*-System zeigte, dass nach Transfektion der Plasmide in Jurkat T-Zellen beide Proteine produziert wurden. Das *VacA*_{P9A} hat ein Molekulargewicht von 95 kD, das minimal aktive VacA (*VacA*₃₄₋₄₅₈) von 46 kD (Abb. III.29). Die Expression von *vacA*_{P9A} ist allerdings deutlich geringer als die Expression des Wildtyp *vacA*-Gens.

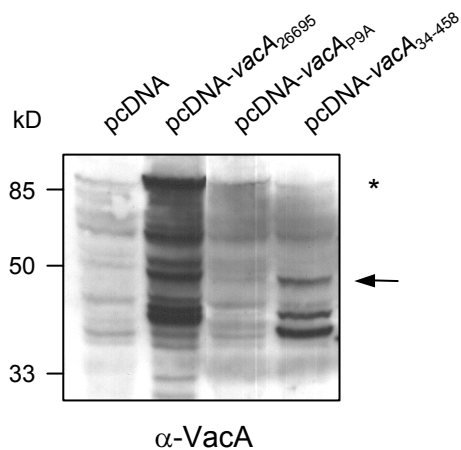


Abb. III.29: Expression von *vacA*, *vacA*₃₄₋₄₅₈ und *vacA*_{P9A} in Jurkat T-Zellen

Die Plasmide pcDNA, pcDNA-*vacA*₂₆₆₉₅, pcDNA-*vacA*_{P9A} und pcDNA-*vacA*₃₄₋₄₅₈ wurden in Jurkat T-Zellen transfiziert. Zur Expression der Gene wurden die transfizierten Zellen mit rekombinanten *Vaccinia*-Viren infiziert und für ca. 18 h inkubiert. Die Produktion der verschiedenen VacA-Proteine wurde im Western Blot mit dem Antikörpern AK197 nachgewiesen. Der Stern markiert das ungespaltene VacA-Protein, der Pfeil das minimal aktive VacA.

1.11.3 Einfluss von *VacA*₃₄₋₄₅₈ bzw. *VacA*_{P9A} auf die Transkription des IL-2-Gens

Um zu untersuchen, ob die Vakuolisierung und die Calcineurin-Hemmung durch VacA zusammenhängen, wurden Jurkat T-Zellen mit den Plasmiden pcDNA, pcDNA-*vacA*₂₆₆₉₅, pcDNA-*vacA*₃₄₋₄₅₈ und pcDNA-*vacA*_{P9A} zusammen mit dem pIL-2 *luc*-Reporterplasmid und zur Standardisierung der Transfektionseffizienz dem β -Gal-Plasmid transfiziert. Die Expression der *vacA*-Gene wurde durch Infektion der Zellen mit dem *Vaccinia*-Virus induziert und die Luciferase-Aktivität nach 18 h gemessen (Abb. III.30).

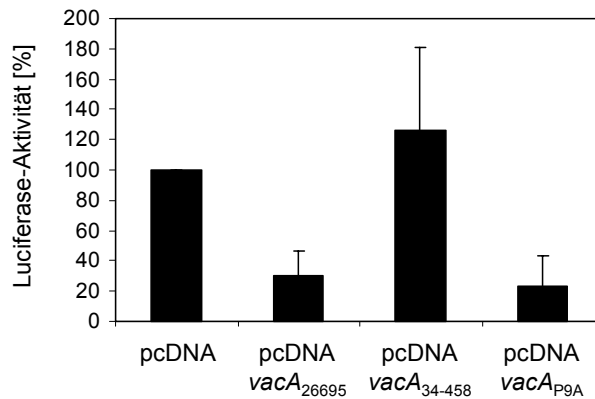


Abb. III.30: Einfluss von *VacA*₃₄₋₄₅₈ und *VacA*_{P9A} auf die Luciferase-Aktivität von pIL-2 *luc*

Jurkat T-Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA, pcDNA-*vacA*₂₆₆₉₅, pcDNA-*vacA*₃₄₋₄₅₈ und pcDNA-*vacA*_{P9A} sowie dem Reportergen pIL-2 *luc* transfiziert und anschließend mit rekombinanten *Vaccinia*-Viren infiziert. Nach 18 h wurde die Luciferase-Aktivität gemessen. Zur Standardisierung der Transfektionseffizienz wurde die β -Gal-Aktivität der einzelnen Ansätze bestimmt. Die Luciferase-Aktivität der mit dem pcDNA-Vektor transfizierten Zellen wurde auf 100% und die übrigen Werte in Relation dazu gesetzt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Interessanterweise induziert das *VacA*-Protein, das aus den Aminosäuren 34-458 besteht, im Gegensatz zum Wildtyp-*VacA* keine Hemmung der Transkription des Luciferase-Gens über den IL-2-Promotor. Die P9A-Mutante dagegen hemmt offensichtlich diese Transkription. Die Tatsache, dass *VacA*₃₄₋₄₅₈ zur Vakuolisierung führt, aber die IL-2-Transkription nicht beeinflusst, während die P9A-Mutante keine Vakuolisierung induziert, aber die IL-2-Transkription stark hemmt, zeigt, dass Vakuolisierung und Calcineurin-Hemmung nicht zusammenhängen und offenbar auf zwei unterschiedlichen Aktivitäten von *VacA* beruhen. Dafür spricht auch, dass durch eine Behandlung von Jurkat T-Zellen mit FK506 keine Vakuolisierung in diesen Zellen induziert werden kann. Damit konnte in dieser Arbeit eine neue Aktivität des *VacA*-Proteins identifiziert werden.

2 Untersuchungen zur Translokation und Prozessierung von CagA

2.1 Nachweis der CagA-Prozessierung in verschiedenen Zelltypen

Wie von Odenbreit *et al.* beschrieben, wird CagA nach Translokation in Makrophagen phosphoryliert und proteolytisch in ein 100 kD- und ein 40 kD-Fragment gespalten, wobei das 40 kD-Fragment den phosphorylierten, C-terminalen Teil des CagA-Proteins darstellt (147). In der Magen-Epithelzelllinie AGS tritt diese Spaltung in der Regel nicht auf. Um die Bedeutung der Prozessierung näher zu untersuchen, wurden zunächst verschiedene Zelltypen, die bei einer Infektion mit *H. pylori* in Kontakt kommen könnten, auf Translokation von CagA sowie dessen Prozessierung untersucht. Verwendet wurden die humanen Magenepithelzelllinien AGS und NHG-1, sowie als Vertreter von Zellen des Immunsystems die Zelllinien J774A.1 (Makrophagen) und Jurkat (T-Zellen). Außerdem wurde die Prozessierung von CagA in frisch isolierten murinen dendritischen Zellen (DC) untersucht (Abb. III.31).

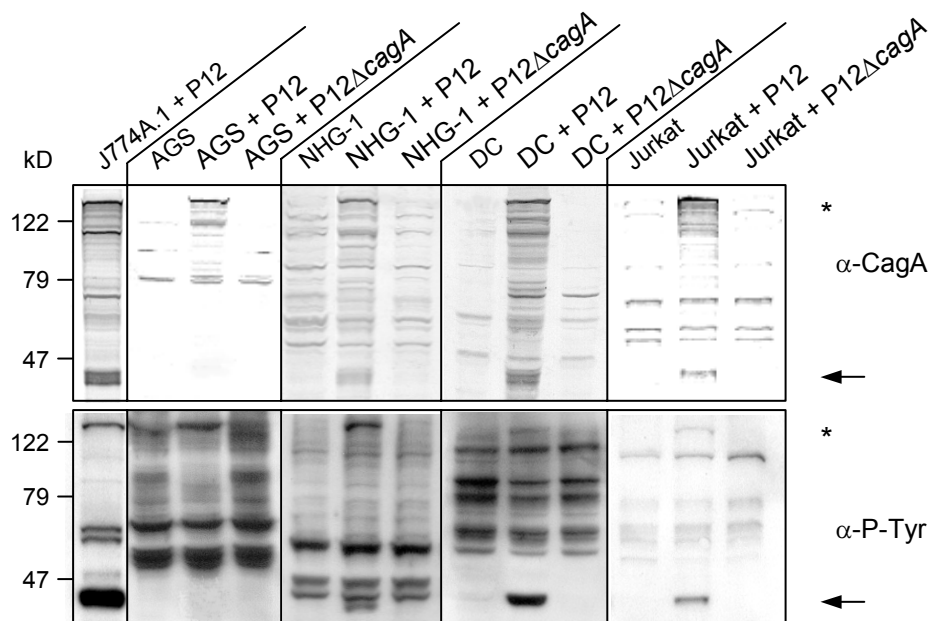


Abb. III.31: Phosphorylierung und Prozessierung von CagA in verschiedenen Zelltypen

Immunoblot von mit P12 bzw. P12 Δ cagA infizierten J774A.1, AGS, NHG-1, DC und Jurkat T-Zellen zur Detektion von phosphoryliertem und damit transloziertem CagA. Der Stern markiert das ungespaltene CagA, der Pfeil das phosphorylierte Spaltprodukt P40^{P-Tyr}.

Abb. III.31 zeigt, dass in den getesteten Immunzellen, also in Makrophagen, T-Zellen und dendritischen Zellen eine Phosphorylierung und Prozessierung von CagA erfolgt. Auch in der Epithelzelllinie NHG-1 wird CagA zu P100 und P40^{P-Tyr} gespalten, nicht aber in den AGS-Zellen. NHG-1-Zellen sind ebenso wie AGS-Zellen transformierte Magenepithelzellen, sind aber im Gegensatz zu AGS in ihren Eigenschaften primären Magenepithelzellen noch sehr

ähnlich. Da die Prozessierung von CagA auch in NHG-1-Zellen auftritt, könnte dies bedeuten, dass die Prozessierung von CagA der normale Vorgang nach der Translokation ist und die fehlende Spaltung in AGS-Zellen eher eine Ausnahme darstellt.

2.2 Mutagenese aller *cag*-PAI-Gene

Die *cag*-PAI umfasst 29 Gene, die u.a. für Komponenten des Typ-IV-Translokationssystems codieren. In einem gemeinsamen Projekt mit J. Püls, W. Fischer, R. Buhrdorf und S. Odenbreit wurden Mutanten in allen *cag*-PAI-Genen erzeugt, die dann auf verschiedene Effekte untersucht werden sollten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die einzelnen Mutanten auf Prozessierung von CagA in J774A.1 Makrophagen getestet, um herauszufinden, ob eine *cag*-PAI-codierte Protease, die CagA spaltet, in die Zielzellen co-transloziert wird.

Da die *cag*-PAI-Gene meist zu mehreren in gleicher Orientierung hintereinander liegen und die Operon-Struktur noch unklar ist, wurde, um polare Effekte auszuschließen, jedes Gen durch eine terminatorlose Chloramphenicol (*cat*) -Resistenzkassette mit vorgeschaltetem Opaque-Promotor ersetzt (*cat_{GC}**). Dies verhindert ein Abfallen der Ribosomen an Terminator-Strukturen des mRNA-Transkripts, so dass die Translation nachfolgend codierter Proteine nicht gestört ist. Dazu wurde von J. Püls die *cag*-PAI unterteilt in neun Regionen in den pBA-Vektor kloniert. Ausgehend von diesen Konstrukten wurden einzelne Gene durch inverse PCR deletiert und durch die *cat_{GC}**-Kassette ersetzt (Abb. III.32).

Ausgeklammert wurden bei der Mutagenese *hp533*, da dieser *orf* nur 87 bp umfasst und wahrscheinlich kein Gen darstellt, sowie *hp548*, da dieses Gen nicht in allen sequenzierten Stämmen vorhanden ist und somit vermutlich kein essentieller Teil der *cag*-PAI ist. Da die Gene *hp534* - *hp536* jeweils mehr als 400 bp auseinander liegen und deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit nicht als Operon organisiert sind, wurde in diesem Fall sowie bei Gen *hp539*, das sich am Ende eines putativen Operons befindet, von S. Odenbreit eine Mutagenese mit dem Transposon *TnMax5* durchgeführt. Zur Mutagenese und Transformation der *cag*-PAI-Gene wurde der Stamm *H. pylori* 26695 verwendet, dessen Genom sequenziert vorliegt (219).

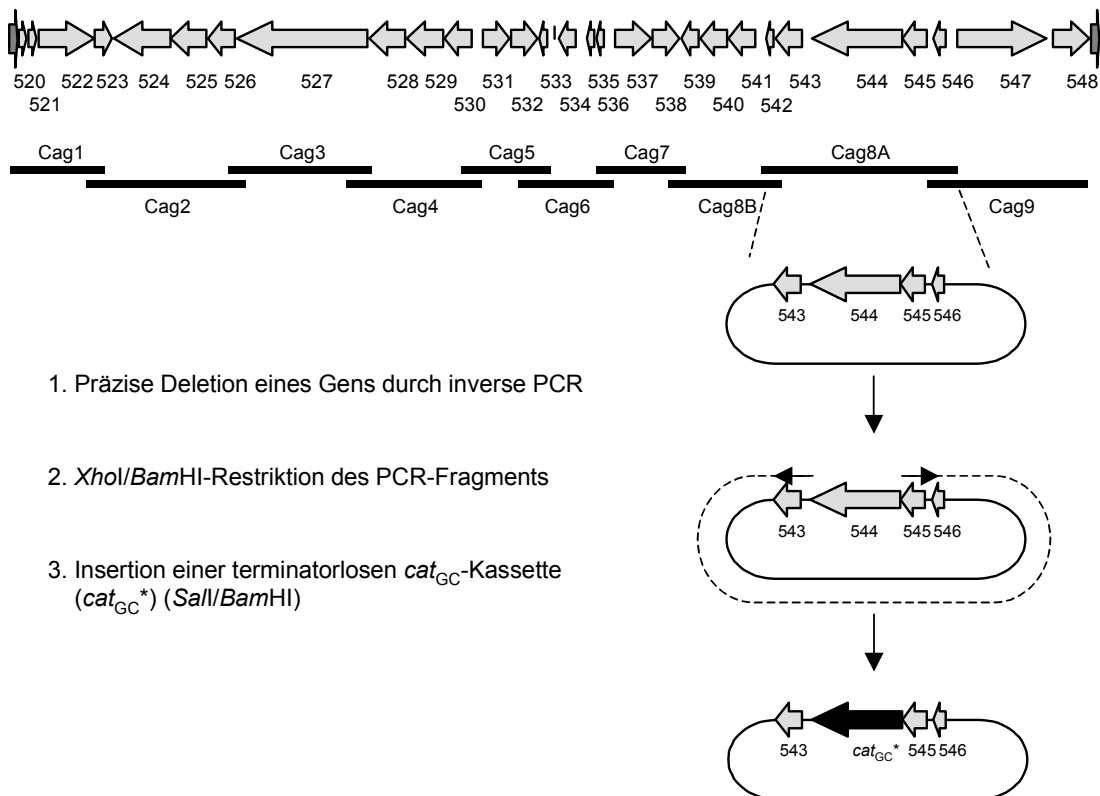


Abb. III.32: Schema zur Konstruktion von Plasmiden zur unpolaren Mutation von *cag*-PAI-Genen

Beispielhaft für *hp544* ist gezeigt, wie Plasmide zur unpolaren Mutation von *cag*-PAI-Genen erzeugt wurden. pBA-Plasmide mit den *cag*-PAI-Regionen Cag1-9 wurden als Matrize für eine inverse PCR herangezogen. Dabei wurden Oligonukleotide verwendet, die direkt vor dem Start- bzw. nach dem Stop-Codon binden und mit einer *XhoI*- bzw. *BamHI*-Erkennungsstelle versehen wurden. Das restringierte PCR-Fragment wurde mit einer terminatorlosen *cat_{GC}**-Kassette ligiert, die *Sall/BamHI*-hydrolysiert aus pWS135 isoliert wurde. Die Plasmide wurden durch Restriktionsanalysen verifiziert. Zur Erzeugung der *H. pylori*-Mutanten wurden die Plasmide in *H. pylori* 26695 transformiert.

2.3 Analyse der einzelnen *cag*-PAI-Gene im Hinblick auf die Prozessierung von CagA in J774A.1-Makrophagen

Um die Frage zu klären, ob bestimmte *cag*-PAI-Gene essentiell für die Prozessierung von CagA in der Zielzelle sind, wurden J774A.1-Makrophagen mit allen *cag*-PAI-Mutanten infiziert und die Lysate im Western Blot auf das Vorhandensein von P40^{P-Tyr} untersucht. In Tab. III.1 sind die Ergebnisse dargestellt.

Die fehlende Phosphorylierung von CagA bei 18 der Mutanten zeigt, dass die betreffenden Gene essentiell für die Translokation von CagA in die Zielzelle sind. Vermutlich handelt es sich hier um Proteine, die den Typ-IV-Sekretionsapparat bilden. Neun Gene scheinen für die Translokation von CagA nicht essentiell zu sein, da CagA bei diesen Mutanten phosphoryliert wird. Das phosphorylierte CagA-Protein dieser Mutanten wird in den J774A.1-Zellen auchprozessiert, was bedeutet, dass auf der *cag*-PAI keine Protease codiert ist, die an der Prozessierung von CagA beteiligt ist. Theoretisch könnte eine derartige Protease

auch außerhalb der *cag*-PAI codiert sein und trotzdem über den *cag*-Apparat transloziert werden. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass das CagA-Protein durch eine eukaryontische Protease gespalten wird oder sich in der Zielzelle selbst prozessiert.

| <i>H. pylori</i> 26695 | Phosphorylierung | Prozessierung | <i>H. pylori</i> 26695 | Phosphorylierung | Prozessierung |
|---------------------------|------------------|---------------|---------------------------|------------------|---------------|
| Wildtyp | + | + | 534 | + | + |
| ΔPAI | - | - | 535 | + | + |
| 520 | + | + | 536 | + | + |
| 521 | + | + | 537 | - | - |
| 522 | - | - | 538 | + | + |
| 523 | - | - | 539 | - | - |
| 524 | - | - | 540 | - | - |
| 525 | - | - | 541 | - | - |
| 526 | + | + | 542 | - | - |
| 527 | - | - | 543 | + | + |
| 528 | - | - | 544 | - | - |
| 529 | - | - | 545 | + | + |
| 530 | - | - | 546 | - | - |
| 531 | - | - | 547 | - | - |
| 532 | - | - | | | |

Tab. III.1: Zusammenstellung der Translokations- und Prozessierungsergebnisse bei den verschiedenen *cag*-PAI-Mutanten

Die Versuche wurden mit dem *H. pylori* 26695 Wildtyp (WT), der entsprechenden *cag*-PAI-Deletionsmutante (ΔPAI) als Negativkontrolle sowie Mutanten in den einzelnen *cag*-PAI-Genen (520-547) durchgeführt. Die J774A.1-Makrophagen wurden für 4 h infiziert und die Phosphorylierung von CagA, sowie die Prozessierung zu P40^{P-Tyr} im Western Blot untersucht.

2.4 Analyse der CagA-Prozessierung mit Hilfe verschiedener Inhibitoren

Um den Translokationsprozeß und die Spaltung von CagA näher zu untersuchen, wurden verschiedene Inhibitoren verwendet. Zum Einsatz kamen Chloramphenicol und Cycloheximid zur Inhibition der prokaryontischen und eukaryontischen Proteinsynthese, Cytochalasin D zur Hemmung der Phagozytose, Bafilomycin A1 zur Inhibition der Ansäuerung des Phagolysosoms, PP1 zur Hemmung von Src-Kinasen sowie Genistein zur generellen Hemmung von Tyrosin-Kinasen. Die Ergebnisse sind in Tab. III.2 zusammengefasst.

Die Reduktion der CagA-Phosphorylierung und -Prozessierung durch Cytochalasin D deutet darauf hin, dass *H. pylori* CagA sowohl über die Zytoplasmamembran als auch über die Phagosomenmembran transloziert. Eine Ansäuerung des Phagosoms ist allerdings nicht nötig für die Prozessierung von CagA, wie die Daten mit Bafilomycin A1 zeigen. Werden Tyrosinkinase oder als Untergruppe die Src-Kinasen gehemmt, wird CagA nicht

phosphoryliert und auch nicht prozessiert. Die Daten mit Cycloheximid und Chloramphenicol zeigen ausserdem, dass eine eukaryontische Proteinsynthese für die Prozessierung nicht erforderlich ist, eine prokaryontische Proteinsynthese aber schon.

| Inhibitor | Cytochalasin D | Bafilomycin A1 | PP1 | Genistein | Cycloheximid | Chlor- amphenicol |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-----|-----------|--------------|----------------------|
| CagA Phosphorylierung | (+) | + | - | - | + | - |
| CagA Prozessierung | (+) | + | - | - | + | - |

Tab. III.2: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Phosphorylierung und Prozessierung von CagA

Die J774A.1-Makrophagen wurden 15-30 Minuten mit 1 µg/ml Cytochalasin D, 100 nM Bafilomycin A1, 100 µM PP1, 250 µM Genistein, 100 µg/ml Cycloheximid oder 10 µg/ml Chloramphenicol inkubiert, ehe sie mit *H. pylori* P12 infiziert wurden. Nach 4 h wurden die Zellen lysiert und die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Detektion von CagA und dessen Tyrosinphosphorylierung wurde ein Western Blot mit AK257 und PY99 durchgeführt. (+) bedeutet eine Reduktion im Vergleich zur Kontrollinfektion ohne Inhibitor.

2.5 Einfluss von BAPTA auf die Prozessierung von CagA

Da viele zelluläre Proteasen Calcium-abhängig sind, wurde als nächstes die Spaltung von CagA in Anwesenheit des intrazellulären Calciumchelators BAPTA untersucht. Dazu wurden die J774A.1-Zellen 15 Minuten mit 60 µM BAPTA inkubiert, ehe sie infiziert wurden. Abb. III. 33 zeigt, dass CagA in Anwesenheit von BAPTA nicht gespalten wird. Allerdings ist auch keine Phosphorylierung von CagA nachweisbar, so dass unklar ist, ob BAPTA die Spaltung direkt hemmt oder die Phosphorylierung, die Voraussetzung für die Spaltung zu sein scheint.

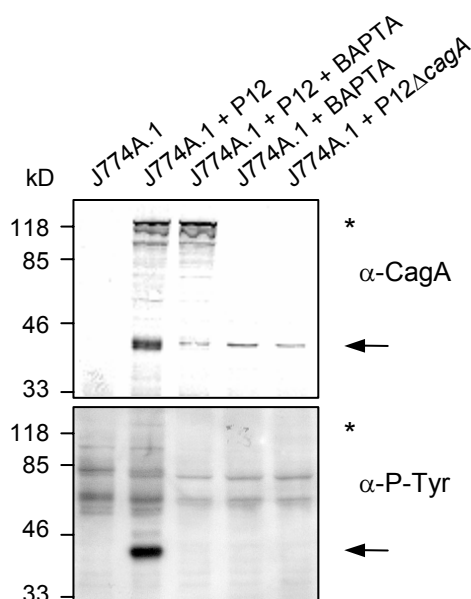


Abb. III.33: Effekt von BAPTA auf die Phosphorylierung und Prozessierung von CagA

Die J774A.1-Zellen wurden 15 min mit 60 µM BAPTA inkubiert und dann mit *H. pylori* P12 oder als Kontrolle P12ΔcagA infiziert. Nach 4 h wurden die Zellen lysiert und die Lysate in der SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Detektion von CagA bzw. der Phosphorylierung von CagA wurde ein Western Blot mit AK257 bzw. PY99 durchgeführt. Der Stern markiert das ungespaltene CagA-Protein, der Pfeil markiert P40^{P-Tyr}.

2.6 Test der Wirkung von Calpain-Inhibitoren auf die Prozessierung von CagA

Nachdem die Versuche mit BAPTA darauf hindeuten, dass Calcium bei der Prozessierung von CagA eine Rolle spielt, wurde der Einfluss von Calpeptin, einem spezifischen Inhibitor der Calcium-abhängigen Protease Calpain, auf die Prozessierung von CagA getestet. Da der Inhibitor nur etwa 30-60 Minuten stabil ist, wurde die Infektionszeit der J774A.1-Makrophagen entsprechend verkürzt (Abb. III.34).

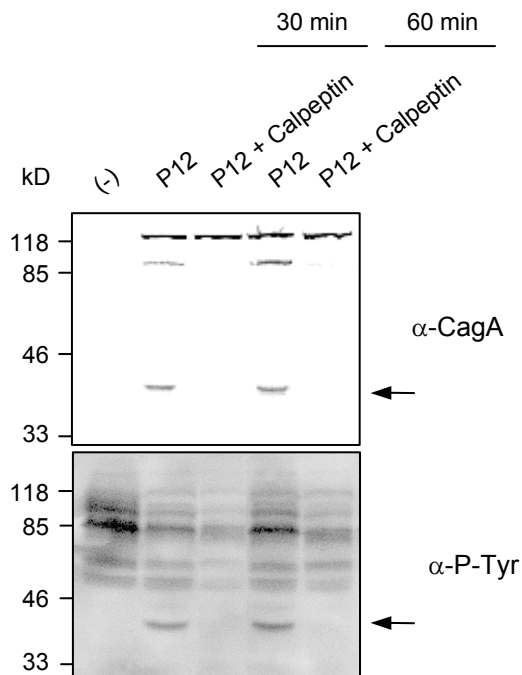


Abb. III.34: Effekt von Calpeptin auf die Prozessierung von CagA

J774A.1-Makrophagen wurden mit 100 μ M Calpeptin für 10 min vorinkubiert und dann für 30 bzw. 60 min mit *H. pylori* P12 infiziert. Die Lysate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und der Western Blot mit PY99 bzw. AK257 entwickelt. Der Pfeil markiert P40^{P-Tyr}.

Wie der CagA-Blot zeigt, verhindert die Vorinkubation mit Calpeptin die Spaltung von CagA. Dies ist sowohl nach Inkubation für 30 wie auch nach 60 Minuten der Fall, was bedeuten könnte, dass CagA tatsächlich durch die Protease Calpain gespalten wird. Allerdings ist im P-Tyr-Blot bei den Ansätzen mit Calpeptin keine Phosphorylierung von CagA zu detektieren, was ungewöhnlich ist, da es in der Literatur keine Hinweise darauf gibt, dass Calpeptin die Src-Kinase inhibiert.

2.7 *In vitro*-Proteolyse mit Calpain

Um die Frage zu klären, ob die Phosphorylierung von CagA nötig ist für dessen Spaltung durch Calpain wurde ein *in vitro*-Proteolyse-Assay mit gereinigtem Calpain etabliert. Dazu wurde CagA in einem Bakterienlysat gegebenenfalls *in vitro* mit einer rekombinanten Src-Kinase phosphoryliert und anschließend mit m-Calpain gespalten. Das Calpain zeigte die höchste Aktivität bei Zugabe von 20 mM CaCl₂ zum Proteolyse-Puffer, weshalb bei den folgenden Versuchen diese Calciumkonzentration eingesetzt wurde. Zur besseren Detektion der C-terminalen Spaltprodukte wurde ein *H. pylori* P12-Stamm verwendet, dessen *cagA*-Gen deletiert und durch ein *cagA*-Gen mit einer C-terminalen FLAG-Sequenz ersetzt worden

war (JPP45). Abb. III.35 zeigt die erhaltenen CagA-Fragmente nach Proteolyse von *in vitro*-phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem CagA mit Calpain.

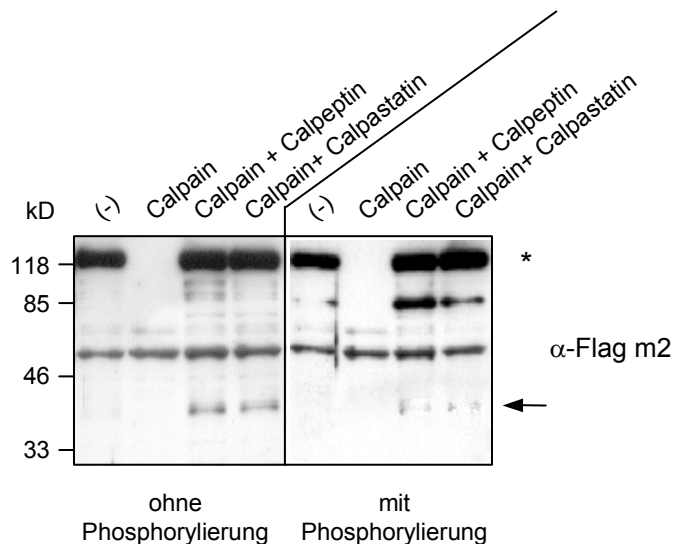


Abb. III.35: *In vitro*-Proteolyse von CagA mit Calpain und Einfluss verschiedener Calpain-Inhibitoren
Ein Teil des Bakterienlysats von JPP45 wurde einer *in vitro*-Phosphorylierung mit rekombinanter Src-Kinase unterzogen. Anschliessend wurden die Lysate 30 min bei 30°C mit 0,1 U m-Calpain inkubiert. Zur Hemmung von Calpain wurden 100 µM Calpeptin und 20 µM Calpastatin eingesetzt. Ein Teil des Lysats wurde ohne Calpain inkubiert (-). Die Lysate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und C-terminale CagA-Fragmente mit dem AK α -FLAG m2 detektiert. Der Stern markiert das ungespaltene CagA-Protein, der Pfeil markiert P40^{P-Tyr}.

Ohne Zugabe von Calpain erfolgt unter den gewählten Bedingungen kein Abbau von CagA, mit Calpain dagegen wird CagA vollständig degradiert. Die Calpain-Inhibitoren Calpeptin und Calpastatin verhindern den Abbau von CagA sehr effektiv, aber nicht vollständig. Interessanterweise entsteht bei Zugabe dieser Inhibitoren ein C-terminales CagA-Fragment, das von der Größe her dem in Phagozyten auftretenden CagA-Spaltprodukt entspricht. Möglicherweise entsteht dieses Proteinfragment durch eine Restaktivität von Calpain. Dass das Fragment sowohl nach *in vitro*-Phosphorylierung als auch bei den nicht-phosphorylierten Ansätzen nachweisbar ist, heißt, dass diese Spaltung unabhängig von der Tyrosinphosphorylierung von CagA ist. Die Tatsache, dass mit 0,1 U m-Calpain CagA komplett degradiert wird, deutet darauf hin, dass in diesem Versuch die Calpain-Konzentration zu hoch gewählt wurde und CagA dadurch unspezifisch abgebaut wird.

2.8 Vergleich der CagA-Spaltung in der *in vitro*-Proteolyse mit der Spaltung in J774A.1-Makrophagen

Da Calpain offensichtlich eine sehr hohe proteolytische Aktivität hat, wurden zunächst niedrigere Calpain-Konzentrationen in der *in vitro*-Proteolyse getestet. Dabei wurden Konzentrationen von 0,1 U bis 0,00625 U eingesetzt. Die *in vitro* Proteolyse zeigte, dass auch 0,05 U und 0,025 U Calpain noch eine sehr hohe proteolytische Aktivität haben. Erst bei der geringen Menge von 0,0125 – 0,00625 U Calpain erfolgte kein totaler Abbau von CagA mehr. Bei diesen Konzentrationen war das C-terminale 40 kD-Fragment am stärksten zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde im folgenden Versuch 0,0125 U Calpain zur Proteolyse eingesetzt. Abb. III.36 zeigt die Ergebnisse aus *in vitro*-Prozessierung und *in vitro*-Phosphorylierung mit dem Stamm P12 im direktem Vergleich zur Prozessierung von CagA in Phagozyten.

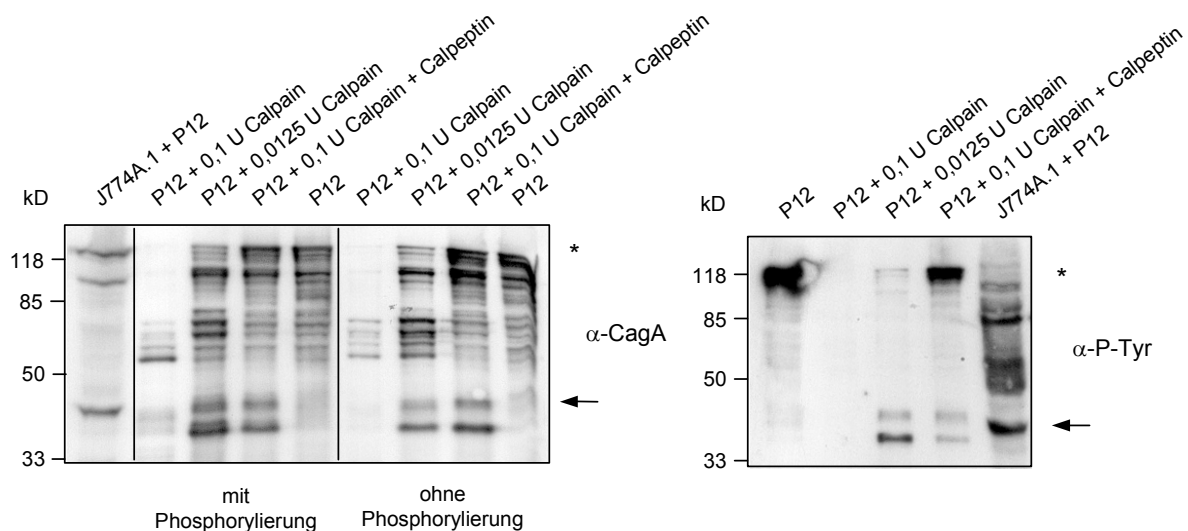


Abb. III.36: Vergleich der Prozessierung von CagA durch Calpain in phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem Zustand mit der Prozessierung in Makrophagen.

Der CagA und P-Tyr Western Blot zeigt die Prozessierung von P12 CagA im Proteolyse-Assay im Vergleich zur Prozessierung in J774A.1-Makrophagen. Der Stern markiert das ungespaltene CagA-Protein, der Pfeil markiert $P40^{P-Tyr}$.

Der direkte Vergleich der CagA-Prozessierung durch Calpain *in vitro* und in Makrophagen zeigt, dass die entstehenden Fragmente annähernd gleich groß sind. Möglicherweise sind die Fragmente, die in der *in vitro*-Proteolyse entstehen etwas größer als das C-terminale Fragment, das in Makrophagen entsteht. Dies könnte aber auch auf einem unterschiedlichen Laufverhalten der Proteine durch verschiedene Modifikationen beruhen. Auffallend ist jedoch, dass das C-terminale CagA-Fragment bei der *in vitro*-Proteolyse noch weiter prozessiert wird. Dabei entsteht ein ca. 35 kD großes, phosphoryliertes Fragment, das bei der Spaltung in Phagozyten nicht auftritt.

Alles in allem deuten die Daten darauf hin, dass CagA in verschiedenen Zelltypen durch die Aktivität von Calpain gespalten werden könnte. Zum letztendlichen Beweis, dass Calpain die CagA-spaltende Protease ist, müssten allerdings das in der *in vitro*-Proteolyse entstehende Fragment und P40^{P-Tyr} aus den Makrophagen aufgereinigt, die Spaltstelle ansequenziert und eventuelle Modifikationen untersucht werden. Würde dies zeigen, dass die Spaltung *in vitro* und in den Zellen das gleiche Fragment erzeugt, könnte das die Rolle von Calpain bei der Spaltung belegen. Da aber die Menge des in die Zellen translozierten CagA sehr niedrig ist, ist auch eine Aufreinigung des Spaltprodukts über Immunpräzipitation sehr schwierig. Der Versuch, die CagA-Spaltregion über Immunpräzipitation und MALDI-Analyse zu identifizieren, lieferte kein verwertbares Ergebnis, da die Menge des prozessierten CagA-Proteins nach der Immunpräzipitation nicht ausreichend war. Somit kann zum momentanen Zeitpunkt noch nicht eindeutig belegt werden, dass Calpain an der Prozessierung von CagA beteiligt ist.

IV Diskussion

1 Hemmung der T-Zell-Aktivierung durch *H. pylori*

1.1 Effekte von VacA auf Epithelzellen und verschiedene Zellen des Immunsystems

H. pylori gehört zu den wenigen bakteriellen Pathogenen, die im Menschen eine chronische Infektion hervorrufen. Die lebenslange Kolonisation des Magens kann schwere Erkrankungen wie ein Magen- oder Zwölffingerdarm-Geschwür, ein MALT-Lymphom oder ein Magen-Adenokarzinom auslösen. Die Schwere der Erkrankung korreliert dabei mit Typ-I *H. pylori*-Stämmen, die eine *cag*-PAI besitzen und ein aktives Zytotoxin (VacA) produzieren. Die Funktion des CagA-Proteins in der Eukaryontenzelle ist noch unklar. Auch die biologische Bedeutung des VacA-Proteins für die *H. pylori*-Infektion konnte trotz der Beschreibung diverser Effekte in verschiedenen Zelltypen noch nicht eindeutig geklärt werden (Abb. IV.1).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das VacA-Protein von *H. pylori* *in vitro* die Proliferation und Zytokin-Produktion von T-Lymphozyten durch Interferenz mit dem Calcineurin-NFAT-Weg effizient hemmt (Abb. IV.1, D). Ob die Aufnahme des Toxins in die T-Zellen dabei über einen Rezeptor, wie beispielsweise RPTP- β und über *lipid rafts* erfolgt, ist noch nicht geklärt. Allerdings deutet die Tatsache, dass in die Jurkat T-Zellen nur das m1-VacA, in PBLCL aber offensichtlich auch das m2-VacA aufgenommen wird, darauf hin, dass die Aufnahme über Rezeptoren stattfindet, wobei der Rezeptor für das m2-VacA in Jurkat T-Zellen vermutlich nicht vorhanden ist. In Epithelzellen liegt das VacA-Protein nach der Internalisierung in Vakuolen vor, die Hybridkompartimente aus späten Endosomen und Lysosomen darstellen. Von diesen Kompartimenten leiten sich auch die sauren Vakuolen ab, die VacA durch Bildung eines anionenselektiven Kanals in diversen Zelltypen auslöst (Abb. IV.1, B), wobei die Funktion der Vakuolen aber noch unklar ist. Die Kanalbildung durch VacA scheint jedoch Voraussetzung für die Induktion von Apoptose durch VacA zu sein (33; 228). Dass VacA in T-Zellen im Gegensatz zu Epithelzellen keine Apoptose auslöst, obwohl auch diese Zellen vakuolisiert werden, beruht vermutlich darauf, dass die Aktivierung der Proteinkinase C die Apoptose-Induktion durch *H. pylori* blockiert (146). Somit kann *H. pylori* nach Aktivierung der PKC durch Stimulation der T-Zellen vermutlich keine Apoptose induzieren. Weitere Belege, dass VacA Zellen des Immunsystems modulieren kann, stammen von Molinari *et al.*, die zeigen, dass VacA die Prozessierung und Präsentation von Antigenen in B-Zellen hemmt (136). Dabei wird selektiv der li-abhängige Weg, der an der Präsentation von Antigenen über neu synthetisierte MHC Klasse II-Moleküle beteiligt ist, inhibiert (Abb. IV.1, C). Dieser Effekt scheint ebenso wie die Vakuolisierung in Epithelzellen auf einer Interferenz von VacA mit dem Vesikeltransport der Zelle zu beruhen.

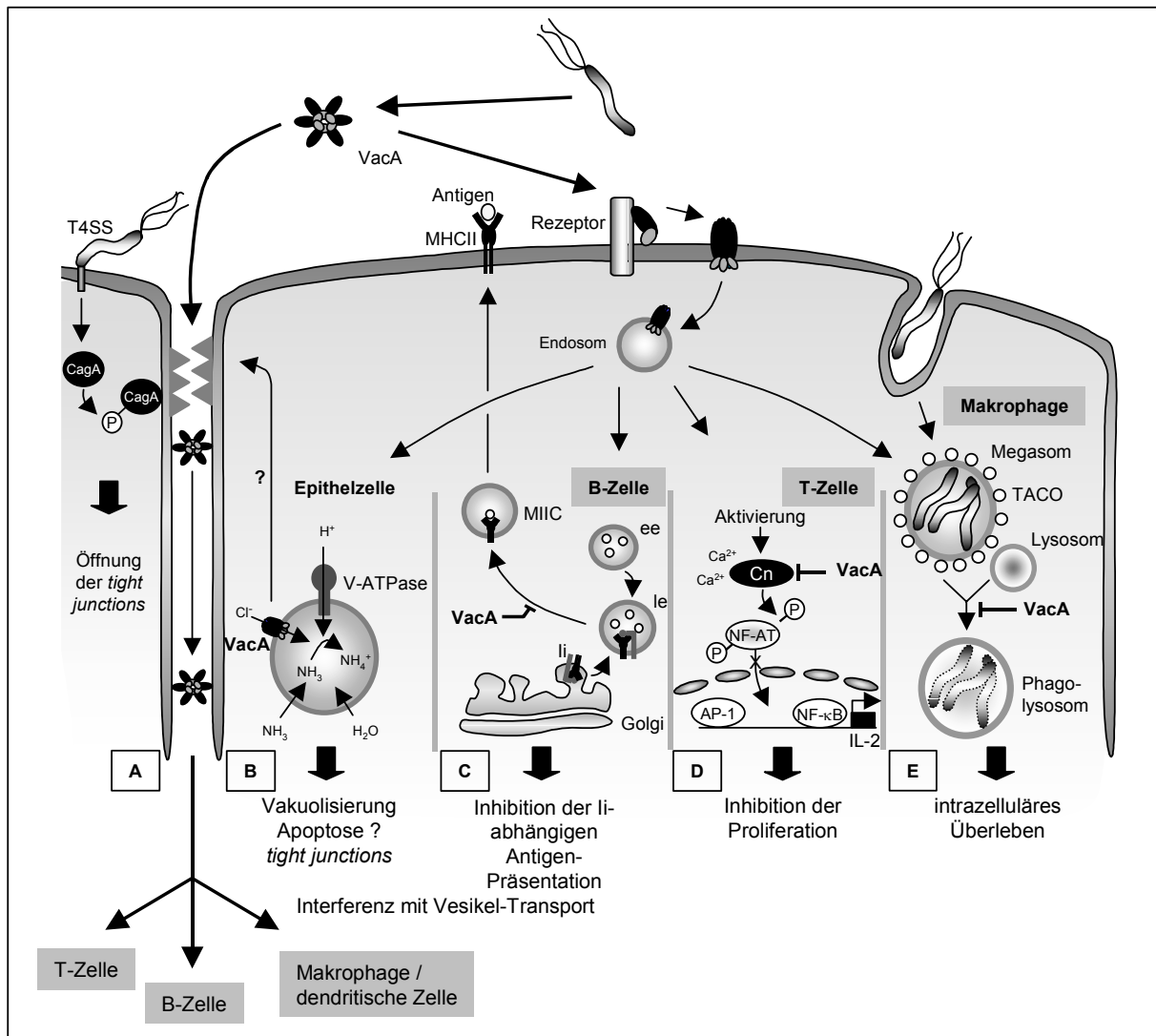


Abb. IV.1: Schematische Darstellung der Funktionen von VacA in verschiedenen Zelltypen

Erläuterungen siehe Text. Abkürzungen: T4SS, Typ-IV-Sekretionssystem; MIIC, MHC Klasse II Kompartiment; ee, frühes Endosom; le, spätes Endosom; TACO, *tryptophan aspartate containing coat protein*.

Auch in Makrophagen wurde eine Funktion des VacA-Proteins beschrieben. VacA-produzierende Stämme sind nach Phagozytose in sog. Megasomen lokalisiert, die nicht mit Lysosomen verschmelzen (Abb. IV.1, E). Die Hemmung der Phagosomenreife beruht auf der Rekrutierung von TACO (Tryptophan-Aspartat-enthaltendes Coat-Protein), das die Fusion mit Lysosomen verhindert. Dadurch können VacA-positive Stämme länger in Makrophagen überleben als VacA-negative Stämme (240). Dies ist ein Mechanismus, der auch für *Mycobacterium bovis* beschrieben ist (58). Angesichts der vielfältigen Funktionen von VacA stellt sich die Frage, ob die verschiedenen Aktivitäten auf einem gemeinsamen Mechanismus beruhen. So gibt es beispielsweise in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* Hinweise darauf, dass die Bildung von Vakuolen mit einer Calcineurin-Hemmung zusammenhängt (40; 76). Wie jedoch die Versuche mit dem Vakuolisierungs-defekten VacA P9A, das die Aktivierung von Calcineurin hemmt, zeigen, scheint in T-Zellen die

Vakuolisierung nicht mit der Calcineurin-Hemmung gekoppelt zu sein. Auch die Tatsache, dass das minimal aktive VacA Zellen vakuolisiert, aber Calcineurin nicht hemmt, deutet darauf hin, dass die Induktion von Vakuolen und die Hemmung von Calcineurin auf zwei unterschiedlichen Aktivitäten von VacA beruhen. Inwiefern die Rekrutierung von TACO und die Hemmung von Calcineurin zusammenhängen, müssen entsprechende Versuche klären.

VacA ist ein sekretiertes Protein, das die Epithelbarriere durchdringen kann. Dies könnte durch die Öffnung der Zellverbindungen (*tight junctions*) erleichtert werden, woran möglicherweise VacA selbst (158) oder das CagA-Protein beteiligt ist (Abb. IV.1, A). CagA führt in polarisiertem Epithel zu einer Zerstörung der Barrierefunktion durch Interaktion mit dem Gerüstprotein ZO-1 und dem Transmembranprotein JAM (3). Damit ist ein kooperativer Effekt von CagA und VacA denkbar, indem CagA die *tight junctions* öffnet und VacA den Durchtritt in die Magensubmukosa ermöglicht, wo es in Kontakt mit T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen kommt. Dies würde erstmals ein Zusammenspiel der beiden Virulenzfaktoren beschreiben, was aufgrund der Tatsache, dass die beiden Gene häufig zusammen exprimiert werden, schon länger vermutet wird.

1.2 Mechanismus der Calcineurin-Hemmung durch VacA

Die Inhibition der IL-2-Produktion durch VacA erfolgt, wie mit Hilfe von Reporter-Gen-Analysen gezeigt werden konnte, auf transkriptioneller Ebene, indem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT durch Interferenz mit der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin verhindert wird (Abb. IV.2). Nach Aktivierung von T-Zell-Rezeptor und CD28 durch Antigen-MHC-Komplexe bzw. co-stimulatorische Moleküle wird eine Reihe von Signaltransduktionsprozessen in Gang gesetzt, die zur Aktivierung der Phospholipase $\text{C}\gamma 1$ ($\text{PLC}\gamma 1$) führen (112). Das von der $\text{PLC}\gamma 1$ produzierte Diacylglycerol (DAG) aktiviert über die Protein-Kinase C (PKC) und die MAP/MEKK-Kinase-Wege die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B. Das Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) stimuliert die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, was einen Einstrom von Calcium über CRAC-Kanäle in der Zytoplasmamembran auslöst. Die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration führt zur Zusammenlagerung des Calcineurin-Calmodulin-Komplexes und damit zur Aktivierung der Phosphatase-Aktivität von Calcineurin (25). Die Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin induziert über Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFAT dessen Translokation in den Zellkern, wo er die Transkription einer Reihe von Genen, deren Produkte wichtig für eine koordinierte Immunantwort sind, reguliert. Diese Gene codieren für Zytokine wie IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, GM-CSF, IFN- γ und MIP-1 α , für Oberflächenrezeptoren wie CD40L, FasL und CD25 und für Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, NFAT, c-Rel, Oct-2 und Nur77 (173).

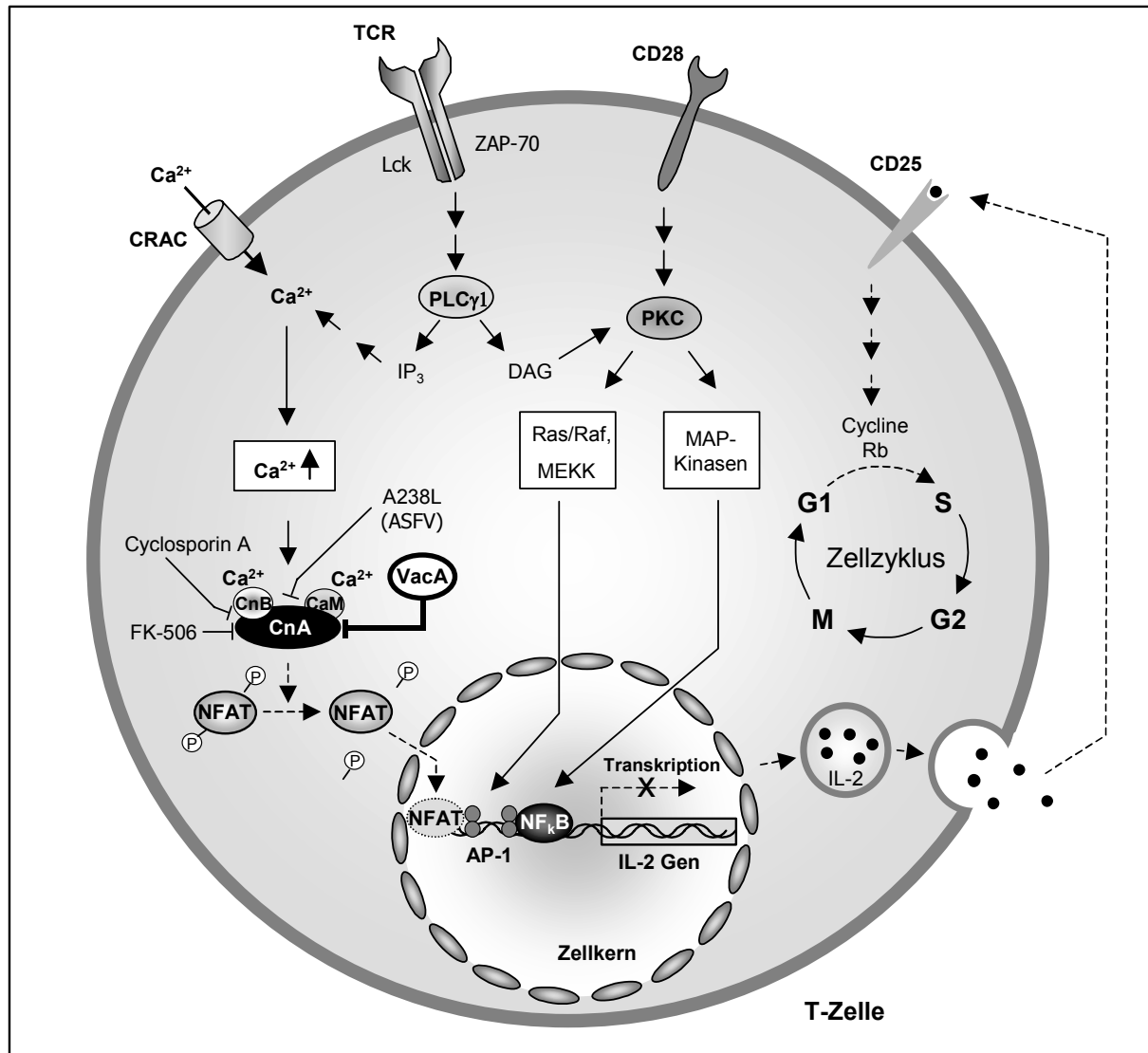


Abb. IV.2: Modell der VacA-vermittelten Hemmung der Signalübertragung nach Aktivierung der T-Zelle
Schematische Darstellung der Vorgänge in der T-Zelle nach deren Aktivierung. Die gestrichelten Linien zeigen Wege, die nach Aufnahme von VacA in die T-Zelle gehemmt sind. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Durch Versuche mit GFP-markiertem NFAT konnte nachgewiesen werden, dass NFAT nach Infektion der T-Zellen mit einem VacA-positiven *H. pylori*-Stamm nicht mehr in den Zellkern transloziert werden kann. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B wird von VacA dagegen nicht beeinträchtigt. Die nähere Untersuchung des Calcineurin-NFAT-Wegs zeigte, dass die Hemmung dieses Wegs durch VacA nicht durch Interferenz mit der PKC θ und offensichtlich auch nicht durch Modulation der intrazellulären Ca²⁺-Verfügbarkeit ausgelöst wird. Theoretisch könnte die Aktivität von VacA als anionen-selektiver Kanal (216) das Ionengleichgewicht in der Zelle so verschieben, dass nicht genügend Calcium zur Aktivierung von Calcineurin zur Verfügung steht. Die mit Thapsigargin und Ionomycin erhaltenen Daten deuten aber darauf hin, dass der Mechanismus der VacA-bedingten IL-2-Hemmung nicht auf einer Störung des Ca²⁺-Haushalts der Zelle beruht. Ca²⁺-Messungen in *H. pylori*-infizierten Mageneithelzellen zeigten zudem, dass VacA in diesen Zellen keine

Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt (128). Die Tatsache, dass mit einem konstitutiv aktiven Calcineurin-Konstrukt die Hemmung der IL-2-Produktion aufgehoben werden kann, deutet darauf hin, dass der Calcineurin-Komplex Angriffspunkt von VacA ist. Calcineurin wird auch durch Produkte von Viren wie dem A238L-Protein des Afrikanischen Schweinefieber-Virus (133) und durch die Immunsuppressiva FK506 und Cyclosporin A (CsA) gehemmt (Abb. IV.2).

Der genaue Mechanismus der Calcineurin-Hemmung durch VacA ist noch unklar. Denkbar wäre eine direkte Hemmung durch Bindung von VacA an Calcineurin, was aber durch Co-Immunpräzipitationsversuche nicht nachgewiesen werden konnte. Möglich wäre auch, dass VacA nicht direkt an Calcineurin bindet, sondern ähnlich wie FK506 oder CsA über ein Immunophilin (siehe unten). Ferner könnte VacA Calcineurin auch durch eine enzymatische Aktivität inaktivieren. Eine proteolytische Aktivität wurde beispielsweise für das Effektorprotein YopT von *Yersinia spec.* beschrieben, das nach Translokation in die Eukaryontenzelle durch eine Aktivität als Cystein-Protease posttranslational modifizierte Rho-GTPasen spaltet und damit inaktiviert (199). Die Aminosäure-Sequenz des VacA-Proteins zeigt allerdings keine Homologie zu bekannten Proteinen mit enzymatischer Aktivität. Das aus VacA-behandelten Zellen und aus Kontrollzellen präzipitierte Calcineurin unterscheidet sich auch nicht in seinem Molekulargewicht, so dass ein Mechanismus wie bei YopT eher unwahrscheinlich ist. Unter Umständen beruht die Calcineurin-Hemmung durch VacA auch nicht auf einer direkten Interaktion mit Calcineurin, sondern wird ausgelöst durch die Hochregulation von Calcineurin-Inhibitoren. Bisher sind als zelluläre Inhibitoren das Gerüstprotein AKAP79 (97), das CAIN- oder Cabin-Protein (104), das CnB-Homolog CHP (114) und das DSCR1-Protein (181) beschrieben. Banerjee *et al.* zeigten außerdem, dass eine Überexpression von *Suppressor of Cytokine Signaling* (SOCS) 3 die Aktivierung von NFAT durch eine Interaktion von SOCS3 mit der katalytischen Untereinheit von Calcineurin verhindert (11). Es gibt also verschiedene Möglichkeiten, wie VacA die Aktivierung von Calcineurin hemmen kann. Weitere Versuche werden nötig sein, um den genauen Mechanismus zu klären.

1.3 Auswirkungen der Calcineurin-Hemmung durch VacA

Die von VacA ausgelöste Hemmung der T-Zell-Proliferation beruht auf einer Blockierung des Zellzyklus in der G1-Phase, verursacht durch die herunterregulierte Expression der Cycline D3 und E und damit einer fehlenden Aktivierung des Rb-Proteins. Neben der Hemmung des Zellzyklus führt VacA auch zu einer starken Repression der IL-2-Produktion in den T-Zellen. Nourse *et al.* zeigten, dass IL-2 nötig ist, um Cyclin E/CDK2-Komplexe zu aktivieren. Wurde die IL-2-Produktion durch Rapamycin, einen Calcineurin-Inhibitor gehemmt, konnte der CDK-Inhibitor p27^{Kip1} nicht inaktiviert werden und die Zellen nicht von der G1- in die S-Phase

übertreten (145). Bekannt ist außerdem, dass IL-2 die Expression einer Reihe von Genen, deren Produkte wichtig für den Ablauf des Zellzyklus sind, moduliert. So induziert die Bindung von IL-2 an den IL-2-Rezeptor die Hochregulation der Cycline A, B, C, D2, D3 und E und reguliert die Expression von Zellzyklus-Kinasen wie *cdc2* und *cdk2* (202). Da das VacA-Toxin durch die Hemmung von Calcineurin sowohl die Produktion von IL-2 als auch die Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) reprimiert, wird die Expression der Cycline und damit der Übertritt der Zellen von der G1- in die S-Phase nicht induziert (siehe Abb. IV.2). Folglich können die T-Zellen trotz einer Stimulation durch Antigen nicht proliferieren. Die Expansion der T-Zellen nach der Aktivierung ist aber entscheidend für die Induktion und Steuerung der zellulären Immunantwort gegen ein Pathogen (204). So ist es z.B. Aufgabe der T-Zellen, andere Zellen des Immunsystems, wie B-Zellen und Makrophagen, über Expression von Oberflächenrezeptoren und Sekretion von Zytokinen zu aktivieren.

Das Makrolid FK506 und das cyclische Undecapeptid Cyclosporin A (CsA) werden in der Medizin eingesetzt, um nach Transplantationen eine Abstoßungsreaktion zu unterdrücken. Die immunsuppressive Wirkung von FK506 und CsA, die keine strukturelle Homologie besitzen, beruht dabei auf einer Hemmung der Aktivierung von Calcineurin (191). FK506 und CsA binden aber nicht direkt an Calcineurin, sondern bilden einen Komplex mit einem sogenannten Immophilin, im Fall von FK506 mit dem FK506-bindenden Protein 12 (FKBP12), und CsA mit Cyclophilin A (CypA). Diese Komplexe binden an Calcineurin und hemmen dessen Aktivität, indem sie den Zutritt des Substrats, wie z.B. NFAT, zum aktiven Zentrum des Enzyms verhindern (73; 96). FKBP12 und CypA sind zelluläre Enzyme mit Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität, die in der Zelle als Protein-Chaperone agieren (191). Um zu analysieren, wie weitgehend die Hemmung der T-Zellen durch VacA im Vergleich zu FK506 ist, wurden *Microarray*-Analysen durchgeführt, in denen der Effekt von VacA mit der Wirkung von FK506 auf die Genexpression der T-Zellen verglichen wurde. Neben den schon bekannten Genen für IL-2 und NFAT, wurden dabei im wesentlichen Gene, die für C- oder CC-Chemokine codieren, von VacA und FK506 herunterreguliert. Für die meisten dieser Gene sind NFAT-Bindungsstellen im Promotor nachgewiesen (120; 238). Die hohe Anzahl an Genen, deren Expression durch FK506, nicht aber durch VacA verändert wird, beruht zum einem vermutlich auf der Tatsache, dass FK506 im Gegensatz zu VacA auch die Aktivierung von NF- κ B hemmt, zum anderen können dies auch Effekte sein, die durch Bildung von FK506/FKBP12 Komplexen zustande kommen. FKBP12 kann, wenn es durch FK506 gebunden wird, seine Funktion als Chaperon nicht mehr erfüllen (191). Somit könnten Veränderungen in der Genexpression auch auf einer Hemmung der Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität von FKBP12 beruhen. Insgesamt zeigt sich jedoch, dass VacA auf die Expression bestimmter Zytokine eine ähnliche Wirkung hat wie FK506. VacA scheint sogar

eine spezifischere Immunmodulation auszulösen als FK506, das noch eine Reihe anderer Gene beeinflusst, was möglicherweise die schweren Nebenwirkungen, die bei einer FK506-Therapie auftreten, erklären könnte.

Wie die *Microarray*-Analyse gezeigt hat, wird die Expression von *Macrophage Inflammatory Protein* (MIP)-1 α , MIP-1 β , *Single C Motif* (SCM)-1 α (Lymphotactin) und SCM-1 β durch VacA inhibiert. Diese Chemokine spielen eine Rolle bei der Anlockung und Aktivierung von Polymorphkernigen Leukozyten (PMN), Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen und verschiedenen Subpopulationen von T-Zellen und bewirken zusammen mit Interferon (IFN)- γ eine Aktivierung der Makrophagen (46). Durch Repression dieser Zytokine unterbricht *H. pylori* vermutlich die Kommunikation zwischen den Zellen des Immunsystems und induziert so eine lokale Immunsuppression.

Die Hemmung der T-Zell-Proliferation durch VacA scheint ein sehr spezifischer und sensitiver Effekt zu sein, da schon die Infektionsdosis von einem Bakterium pro T-Zelle die IL-2-Produktion um 25% erniedrigt. Fünf Bakterien pro T-Zelle führen bereits zu einer 50%-igen Hemmung, was zeigt, dass physiologisch relevante Bakterienzahlen ausreichen, um die Aktivierung der T-Zellen zu verhindern. Auch FK506 und CsA führen in sehr niedrigen Konzentrationen zu einer fast vollständigen Hemmung von Calcineurin (9), wobei Versuche gezeigt haben, dass eine 50%-ige Hemmung von Calcineurin ausreicht, um eine Immunsuppression zu induzieren und die Abstoßungsreaktion von Fremdgewebe zu unterdrücken (12).

1.4 Bedeutung der Calcineurin-Hemmung durch VacA für die *H. pylori*-Infektion

Wie wichtig T-Zellen für eine effektive Immunreaktion gegen *H. pylori* sind, zeigen diverse Vakzinierungsstudien. So ist der Schutz vor einer *H. pylori*-Infektion nach Immunisierung von Mäusen unabhängig von einer IgA- und IgG-Antikörperantwort (16; 53). MHC Klasse I-defiziente Mäuse können ebenso wie B-Zell-defiziente Mäuse erfolgreich immunisiert werden, MHC Klasse II-defiziente Mäuse dagegen nicht (53; 160), was zeigt, dass CD4⁺ T-Zellen essentiell für die Eliminierung von *H. pylori* sind und damit geeignete Zielzellen für das VacA-Toxin. Ob die Calcineurin-Hemmung durch VacA allerdings *in vivo* eine Rolle spielt, muss noch untersucht werden. Epidemiologische Studien zeigen jedoch, dass eine *H. pylori*-Infektion zu einer erniedrigten T-Zell-Antwort führen kann. So wurde gefunden, dass T-Zellen aus dem Magentrakt und auch zirkulierende T-Zellen bei einer *H. pylori*-Infektion anergisch werden können (215), d.h. die T-Zellen können trotz einer Aktivierung durch Antigen kein IL-2 produzieren und nicht proliferieren (192). Aus dem Blut von *H. pylori*-infizierten Patienten aufgereinigte Gedächtnis-T-Zellen, sowie T-Zellen aus der Magenmukosa reagieren zudem weniger stark auf die Stimulation mit Antigen als T-Zellen aus nicht infizierten Personen (56; 91; 118; 169). Auch die Expression von Zytokinen in der Mukosa von *H. pylori*-infizierten

Personen ist signifikant niedriger als bei nicht infizierten Personen (210). Allerdings wurden in diesen Studien nur die infektionsbedingten Veränderungen auf der Wirtsseite analysiert, der beteiligte *H. pylori*-Stamm jedoch nicht näher charakterisiert, so dass eine Korrelation dieser Effekte mit VacA-positiven Stämmen derzeit spekulativ ist.

Die Hemmung der IL-2-Produktion über den NFAT-Calcineurin-Weg muss nicht auf T-Zellen beschränkt sein. Kürzlich wurde beispielsweise gefunden, dass auch dendritische Zellen (DC) nach Kontakt mit einem Pathogen IL-2 produzieren (72). Unreife DCs, die phagozytisch sehr aktiv sind, aber nur geringe T-Zell-stimulatorische Fähigkeiten haben, kommen in allen peripheren Geweben vor, vor allem in der Haut und in der Mukosa. Treffen sie dort auf ein Pathogen, beginnt ein Reifungsprozess, der begleitet ist von der Expression bestimmter Zytokine und Oberflächenrezeptoren, die wichtig sind für die Initiation und Kontrolle der angeborenen und erworbenen Immunantwort (105). Besonders inflammatorische Zytokine wie TNF- α , MIP-1 α , MIP-1 β und MIP-2 werden kurz nach dem Antigen-Kontakt stark induziert. Während des Reifungsprozesses wandern die DCs in die Lymphknoten, wo sie als reife DCs T-Zellen aktivieren. Granucci *et al.* zeigten, dass IL-2 defiziente DCs in ihrer Fähigkeit primäre T-Zellen zu aktivieren, stark beeinträchtigt sind (72). Die IL-2 Produktion der DCs scheint auch einer der Hauptgründe zu sein, warum DCs im Vergleich zu anderen Antigen-präsentierenden Zellen stärkere T-Zell-stimulatorische Fähigkeiten besitzen. Angesichts der Tatsache, dass VacA die Expression von IL-2, MIP-1 α und MIP-1 β in T-Zellen hemmt und diese Zytokine auch für die Funktion der DCs entscheidend sind, könnten auch DCs Zielzellen von VacA sein. Für das murine Cytomegalovirus (MCMV) wurde beispielsweise eine Hemmung der IL-2-Produktion in DCs gezeigt, was deren Fähigkeit, T-Zellen zu aktivieren, stark beeinträchtigt (4). Den Calcineurin-NFAT-Signalweg gibt es daneben auch in B-Zellen (23; 221), Mastzellen (226) und in verschiedenen Zelltypen außerhalb des Immunsystems wie Muskel-, Herz- und Neuronalzellen (22; 78; 137). Allerdings scheinen Nicht-Immunzellen weniger sensitiv für eine Calcineurin-Hemmung zu sein, da sie eine stärkere Calcineurin-Expression als Immunzellen aufweisen (37).

Versuche mit Mäusen und Gerbils haben gezeigt, dass VacA nicht essentiell für die Kolonisierung ist (229). Salama *et al.* fanden jedoch im Mausmodell, dass eine isogene *vacA*-Mutante bei Co-Infektion mit dem Wildtypstamm in ihrer Fähigkeit zu kolonisieren stark beeinträchtigt ist. Nach ein bis zwei Tagen konnte nur noch der Wildtyp aus der Maus reisoliert werden (185). Dies zeigt, dass VacA offensichtlich einen Vorteil bei der Kolonisierung bringt. Ob dies auf der Induktion einer lokalen Immunsuppression beruht, muss noch untersucht werden, zumal, da VacA ein sekretierter Faktor ist, eine Trans-Komplementation denkbar wäre. Bei Beurteilung dieser Daten muss auch berücksichtigt werden, dass sich in Mäusen die immunologische Wirtsreaktion auf eine *H. pylori*-Infektion stark von der Situation im Menschen unterscheidet.

1.5 Immunsuppression – ausgelöst durch eine Calcineurin-Hemmung?

Verschiedene Beispiele zeigen, dass eine Hemmung des Calcineurin-NFAT-Wegs die Funktion des Immunsystems stark beeinträchtigt. So kann beispielsweise die Immunschwäche bei Patienten mit schwerer Immundefizienz (*severe combined immunodeficiency*, SCID) auf einem Defekt des Calcium-Einstroms über die Zytoplasmamembran (59) beruhen. Dadurch ist der Calciumhaushalt der T- und B-Zellen nach Aktivierung gestört und Calcineurin kann nicht aktiviert werden. Die T-Zellen dieser Patienten können kein IL-2, IL-4 und CD40 exprimieren, was zu einer schweren Störung des Immunsystems führt (108). Auch diverse Viren greifen in den Calcineurin-NFAT-Weg ein, um sich ein besseres Überleben im Wirt zu sichern. So bindet das A238L-Protein des Afrikanischen Schweinefieber-Virus direkt an die katalytische Untereinheit von Calcineurin, hemmt dessen Aktivität und inhibiert damit die Translokation von NFAT in den Zellkern (133). Eine Hemmung der Kerntranslokation von NFAT ist auch für das *Herpes simplex* Virus beschrieben (193). Andere Viren wie das *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) (95) und das Hepatitis C Virus (15) modulieren ebenfalls die T-Zell-Signaltransduktion über Calcineurin. Allerdings aktivieren diese Viren den NFAT-Weg, um die Vermehrung der T-Zellen anzuregen. Es gibt also eine Reihe von Viren, die in den Calcineurin-NFAT-Weg eingreifen, um einen zellulären Zustand zu induzieren, der günstig ist für die Infektion und Replikation der Viren oder um das Immunsystem zu unterdrücken und eine Eliminierung zu verhindern. Erstmals konnte nun gezeigt werden, dass es mit *H. pylori* auch unter den Bakterien einen Vertreter gibt, der mit der Aktivierung von Calcineurin interferiert. Andere Bakterien wie beispielsweise *Neisseria gonorrhoeae* oder *Yersinia pseudotuberculosis* hemmen ebenfalls die Proliferation von T-Zellen, allerdings über einen anderen Mechanismus. *N. gonorrhoeae* exprimiert Phasenvariable *Opacity* Proteine (OPA) auf der Oberfläche, die den co-inhibitorischen Rezeptor CEACAM1 auf den T-Zellen aktivieren. Damit werden die T-Zellen schwerer aktivierbar (18). *Y. pseudotuberculosis* dagegen transloziert das Effektorprotein YopH in T-Zellen, das Tyrosin-Phosphatase-Aktivität hat und Signalmoleküle der T-Zell-Rezeptor-Signalkette dephosphoryliert, wodurch die Weiterleitung der Aktivierung unterbrochen wird (235). Die Tatsache, dass mit *H. pylori*, HIV- und *Herpes simplex*-Viren vor allem Pathogene, die eine chronische Infektion hervorrufen, in den Calcineurin-Weg eingreifen, zeigt, dass Calcineurin offensichtlich ein geeigneter Angriffspunkt ist, um das Immunsystem dauerhaft zu modulieren. Da VacA kein oberflächengebundenes Protein ist, sondern in die tieferen Schichten des Magens diffundieren kann, steht *H. pylori* sozusagen eine „Langstreckenwaffe“ gegen das Immunsystem zur Verfügung.

2 Untersuchungen zur Prozessierung von CagA in Phagozyten und anderen Zellen

Die Öffnung der Zellverbindungen zwischen den Zellen der Magenmukosa nach Translokation von CagA in die Epithelzellen könnte ein wichtiger Mechanismus sein, der VacA den Durchtritt in die Magensubmukosa ermöglicht. CagA wird aber über das von der *cag*-PAI codierte Typ-IV-Translokationssystem nicht nur in Epithelzellen, sondern auch in Phagozyten eingeschleust (5; 7; 147; 148; 208). Nach der Translokation wird das CagA-Protein durch Src-Kinasen phosphoryliert, was durch einen Rückkopplungsmechanismus deren Inaktivierung auslöst (197) (Abb. IV.3). In Phagozyten wird das phosphorylierte CagA-Protein dann in ein tyrosinphosphoryliertes 40 kD-Fragment und ein 100 kD-Fragment gespalten.

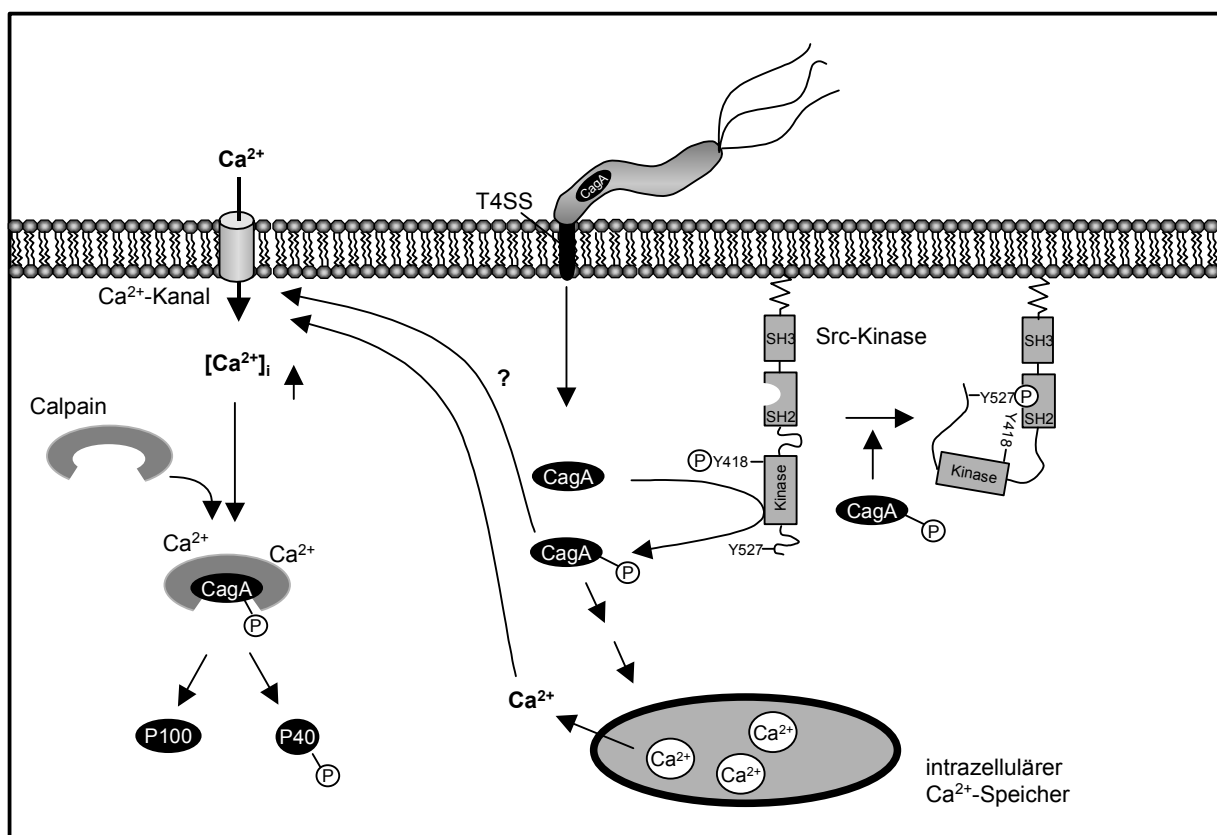


Abb. IV.3: Modell der möglichen Vorgänge nach der Translokation von CagA in eukaryontische Zellen
Erläuterungen siehe Text. Abkürzungen: T4SS, Typ-IV-Sekretionssystem; SH2, Src-Homologieregion 2; SH3, Src-Homologieregion 3.

In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass CagA nicht nur in Makrophagen, sondern auch in anderen Zelltypen wie dendritischen Zellen oder T-Zellen sowie in der Magenepithelzelllinie NHG-1 prozessiert wird. Dies könnte bedeuten, dass die spezifische Prozessierung von CagA in P40^{P-Tyr} und P100 ein normaler Vorgang nach der Translokation in eukaryontische Zellen ist und die Magenepithelzelllinie AGS, bei der keine Spaltung des CagA-Proteins auftritt, hier eine Ausnahme darstellt. Damit müsste die Prozessierung auch eine biologische Bedeutung haben. Um dieser näher zu kommen, wurde versucht, die CagA-

spaltende Protease zu identifizieren. Dazu wurden zunächst alle auf der *cag*-PAI codierten Gene einzeln mutagenisiert und die Mutanten auf Translokation, Tyrosinphosphorylierung und Prozessierung von CagA untersucht. Hierbei wurden 18 Gene der *cag*-PAI als essentielle Komponenten des Translokationsapparats identifiziert, da bei diesen Mutanten kein CagA transloziert wurde. In neun Mutanten wurde CagA transloziert, was durch dessen Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich wurde das CagA-Protein dieser Mutanten in P40^{P-Tyr} und P100 gespalten, was zeigt, dass keines der *cag*-PAI-Gene für eine CagA-spaltende Protease codiert. Da die Spaltung von CagA nur nach Translokation in die Zielzelle und nicht in der Bakterienzelle stattfindet, ist anzunehmen, dass CagA durch eine eukaryontische Protease gespalten wird oder sich, ausgelöst durch Veränderungen in der Zielzelle, selbst prozessiert.

Um die Frage zu klären, ob die Phosphorylierung von CagA durch die Src-Kinase Voraussetzung für dessen Prozessierung ist, wurden die Zellen vor der Infektion mit *H pylori* mit den Inhibitoren PP1 und Genistein behandelt (siehe Tab III.2). Die Tatsache, dass CagA, wenn die Phosphorylierung gehemmt wird, auch nicht prozessiert wird, deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung durch die Src-Kinase tatsächlich notwendig ist. Möglich wäre aber auch, dass die Protease durch eigene Phosphorylierung aktiviert wird und CagA deshalb nicht gespalten werden kann. Wie weitere Versuche zeigten, ist eine eukaryontische Proteinsynthese für die Prozessierung nicht erforderlich, was darauf hindeutet, dass die Protease bei der Translokation von CagA schon in der Zelle vorliegt. Wird jedoch die bakterielle Proteinsynthese gehemmt, ist keine Phosphorylierung und Prozessierung von CagA mehr nachweisbar. Dies lässt den Schluss zu, dass nur neu synthetisiertes, noch nicht gefaltetes CagA transloziert wird oder dass Komponenten des Translokationsapparats bei Kontakt mit einer Eukaryontenzelle erst gebildet werden müssen. Bei Verwendung des intrazellulären Calciumchelators BAPTA findet ebenfalls keine Prozessierung von CagA statt, allerdings auch keine Phosphorylierung. Dies könnte bedeuten, dass CagA von einer Calcium-abhängigen Protease gespalten wird und das ungespaltene, phosphorylierte CagA-Protein durch die Aktivität von Phosphatasen wieder in den nicht-phosphorylierten Zustand übergeht. Interessanterweise induziert CagA in nicht-transformierten Magenepithelzellen, eine transiente Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration (128) (Abb. IV.3). Dabei kommt es ca. 15 Minuten nach der Infektion zu einer Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, wonach die Ca²⁺-Konzentration rasch wieder auf das Grundniveau zurückgeht. 25-30 Minuten nach der Infektion erfolgt ein Calcium-Einstrom über Kanäle in der Zytoplasmamembran, der zu einer längeranhaltenden erhöhten Calcium-Konzentration in der Zelle führt. Da die Veränderungen im Calcium-Haushalt von CagA abhängen, wäre es denkbar, dass dadurch eine Calcium-abhängige Protease aktiviert wird, die CagA spaltet. Die Versuche mit den Calpain-Inhibitoren Calpeptin und Calpastatin, sowie die *in vitro*-

Proteolyse mit Calpain zeigen, dass die Calcium-abhängige Protease Calpain die CagA-spaltende Protease sein könnte. Allerdings konnte dies noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Interaktion von CagA mit der in allen Zelltypen vorkommenden Cystein-Protease Calpain könnte aber interessante Konsequenzen haben. Calpain ist eine Protease, die mit vielen Signal- und Strukturproteinen interagiert. So ist Calpain z.B. beteiligt an der Wanderung von Zellen durch Veränderung von Zell-Adhäsionspunkten und Zytoskelett-Komponenten (164). Interessanterweise induziert CagA nach Translokation in Epithelzellen eine Wanderung der Zellen, deren Grundlage noch weitgehend unbekannt ist (24). Daneben wurde gezeigt, dass Calpain im Komplex mit β 1-Integrin, Talin und anderen membranassoziierten Proteinen vorkommt (178; 179). Da der Cag-Translokationsapparat mit β 1-Integrinen auf der Zelloberfläche interagiert (G. Rieder, R. Haas, persönliche Mitteilung), könnte die Interaktion von CagA mit Calpain ein interessanter Mechanismus sein, um die Translokation von CagA in die Zielzelle durch einen neuartigen Rückkopplungs-Mechanismus zu regulieren.

V Zusammenfassung

Das humanpathogene Bakterium *H. pylori* persistiert im Gastroduodenaltrakt für Jahre oder sogar Jahrzehnte und löst durch die Kolonisation der Magenmukosa eine chronische Entzündungsreaktion aus. In den meisten Fällen bleibt diese symptomlos, es können jedoch auch schwerwiegende Erkrankungen wie ein Magen- oder Zwölffingerdarm-Geschwür oder Magenkrebs daraus hervorgehen. Obwohl die Infektion eine starke zelluläre und humorale Immunantwort hervorruft, kann *H. pylori* durch das Immunsystem nicht eliminiert werden. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von *H. pylori* auf die Proliferation und Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass *H. pylori* zwei Faktoren besitzt, um die Expansion der T-Zellen zu hemmen. Der eine, nicht näher charakterisierte Faktor scheint mit der Oberfläche der Bakterien assoziiert zu sein und inhibiert die Proliferation der T-Zellen bei direktem Kontakt der Bakterien mit den Zellen. Der zweite Faktor wurde als vakuolisierendes Zytotoxin VacA identifiziert, das, wie bisher bekannt war, in Epithelzellen die Bildung saurer Vakuolen auslöst. T-Zellen produzieren, wenn sie aktiviert werden, den Wachstumsfaktor IL-2, beginnen sich zu vermehren und setzen eine Immunreaktion gegen das Pathogen in Gang. Das VacA-Toxin hemmt jedoch die Bildung von IL-2 und bewirkt eine Hemmung des Zellzyklus bei T-Zellen, indem es die Expression der Cycline D3 und E reprimiert. Diese sind essentiell für die Aktivierung des Retinoblastom-Proteins, das den Übergang des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase vermittelt. Durch die Hemmung der IL-2-Produktion und die Erniedrigung der Oberflächenlokalisation von CD25, der α -Kette des IL-2-Rezeptors, unterbricht VacA die Signaltransduktion, die normalerweise über den IL-2-Rezeptor zur Expression der Cycline führt. Die Hemmung der IL-2-Produktion durch VacA erfolgt auf transkriptioneller Ebene, indem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) verhindert wird. Die anderen für die Transkription des IL-2-Gens essentiellen Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B werden durch VacA nicht beeinflusst. Die Stimulation der T-Zellen aktiviert zwei Haupt-Signalwege: einer führt über den MAP-Kinase / ERK-Kinase Weg zur Aktivierung von AP-1 und NF- κ B, der andere löst eine Erhöhung der Calcium-Konzentration im Zytoplasma aus, was die Ca²⁺-abhängige Phosphatase Calcineurin aktiviert. Calcineurin dephosphoryliert daraufhin den Transkriptionsfaktor NFAT und NFAT wird in den Zellkern transportiert, wo es zusammen mit AP-1 und NF- κ B die Transkription des IL-2-Gens initiiert. Es konnte gezeigt werden, dass VacA die Translokation von NFAT in den Kern durch Hemmung der Phosphatase-Aktivität von Calcineurin verhindert. Dies hat zur Folge, dass NFAT-abhängige Gene, wie das IL-2-Gen oder das für CD25 codierende Gen, nicht abgelesen werden können. Dass Calcineurin ein geeignetes Zielmolekül ist, um eine Immunantwort zu unterdrücken, zeigen auch die medizinisch bedeutsamen Substanzen FK506 (Tacrolimus) und Cyclosporin A. Beide

Substanzen verursachen durch Hemmung von Calcineurin eine starke Immunsuppression. In DNA-Microarray-Analysen wurde untersucht, ob VacA einen ähnlich drastischen Effekt auf die Funktion der T-Zellen hat wie FK506. Dabei zeigte der Vergleich der Genexpression von VacA- und FK506-behandelten T-Zellen, dass VacA eine Untergruppe der Gene, die auch von FK506 reprimiert werden, herunterreguliert, wie z.B. die Gene für die Zytokine *Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 α* , MIP-1 β , *Single C Motif-1 (SCM-1 β)* und SCM-1 α . VacA scheint also die Genaktivität von T-Zellen ähnlich wie FK506 zu modulieren, was auf einen ähnlichen Mechanismus, nämlich die Calcineurin-Hemmung schließen lässt. Da das VacA-Toxin ein sekretiertes Protein ist, das auch in den tieferen Schichten des Magengewebes nachgewiesen werden kann, erreicht *H. pylori* nicht nur die vereinzelt im Magenepithel vorkommenden T-Zellen, sondern auch die T-Zellen, die bei der Infektion in die *Lamina propria*, eine tiefere Schicht der Magenmukosa, einwandern. Durch die Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung und die Repression von Zytokin-Genen, die wichtig sind für die Modulation der Immunantwort, induziert *H. pylori* so vermutlich eine lokale Immunsuppression, die seine Eliminierung durch das Immunsystem verhindert und eine chronische Infektion des Magens ermöglicht.

In einem zweiten Projekt wurde die Spaltung von CagA in ein 100 kD- und ein Tyrosin-phosphoryliertes 40 kD- Fragment nach dessen Translokation in diverse Zelltypen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung nicht nur in Makrophagen, sondern auch in dendritischen Zellen und in T-Zellen auftritt. Die Spaltung scheint von der Tyrosin-Phosphorylierung des CagA-Proteins und von Calcium abhängig zu sein. Dabei wurde die Ca²⁺-abhängige Protease Calpain in einem *in vitro*-Ansatz als ein CagA-prozessierendes Enzym identifiziert. Auch in Makrophagen kann die Spaltung von CagA in P100 und P40^{P-Tyr} durch den Calpain-Inhibitor Calpeptin verhindert werden. Die Tatsache, dass transloziertes CagA in allen getesteten eukaryontischen Zelltypen außer der Magenepithelzelllinie AGS prozessiert wird, deutet darauf hin, dass diese Prozessierung eine biologische Bedeutung hat.

VI Literaturverzeichnis

1. **Aebischer, T., B. Lucas, J. Koesling, D. Bumann, and T. F. Meyer.** 2000. How CD4(+) T cells may eliminate extracellular gastric *Helicobacter pylori*? J. Biotechnol. **83**: 77-84.
2. **Allen, L. A., L. S. Schlesinger, and B. Kang.** 2000. Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. J. Exp. Med. **191**: 115-128.
3. **Amieva, M. R., R. Vogelmann, A. Covacci, L. S. Tompkins, W. J. Nelson, and S. Falkow.** 2003. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. Science **300**: 1430-1434.
4. **Andrews, D. M., C. E. Andoniou, F. Granucci, P. Ricciardi-Castagnoli, and M. A. Degli-Esposti.** 2001. Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. Nat. Immunol. **2**: 1077-1084.
5. **Asahi, M., T. Azuma, S. Ito, Y. Ito, H. Suto, Y. Nagai, M. Tsubokawa, Y. Tohyama, S. Maeda, M. Omata, T. Suzuki, and C. Sasakawa.** 2000. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. J. Exp. Med. **191**: 593-602.
6. **Atherton, J. C., P. Cao, R. M. J. Peek, M. K. Tummuru, M. J. Blaser, and T. L. Cover.** 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.
7. **Backert, S., E. Ziska, V. Brinkmann, U. Zimny-Arndt, A. Fauconnier, P. R. Jungblut, M. Naumann, and T. F. Meyer.** 2000. Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. Cell. Microbiol. **2**: 155-164.
8. **Baier-Bitterlich, G., F. Uberall, B. Bauer, F. Fresser, H. Wachter, H. Grunicke, G. Utermann, A. Altman, and G. Baier.** 1996. Protein kinase C-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes. Mol. Cell. Biol. **16**: 1842-1850.
9. **Baksh, S. and S. J. Burakoff.** 2000. The role of calcineurin in lymphocyte activation. Semin. Immunol. **12**: 405-415.

10. **Bamford, K. B., X. Fan, S. E. Crowe, J. F. Leary, W. K. Gourley, G. K. Luthra, E. G. Brooks, D. Y. Graham, V. E. Reyes, and P. B. Ernst.** 1998. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* **114**: 482-492.
11. **Banerjee, A., A. S. Banks, M. C. Nawijn, X. P. Chen, and P. B. Rothman.** 2002. Cutting edge: Suppressor of cytokine signaling 3 inhibits activation of NFATp. *J. Immunol.* **168**: 4277-4281.
12. **Batiuk, T. D., F. Pazderka, and P. F. Halloran.** 1995. Calcineurin activity is only partially inhibited in leukocytes of cyclosporine-treated patients. *Transplantation* **59**: 1400-1404.
13. **Bauerfeind, P., R. Garner, B. E. Dunn, and H. L. Mobley.** 1997. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut* **40**: 25-30.
14. **Beil, W., M. L. Enss, S. Muller, B. Obst, K. F. Sewing, and S. Wagner.** 2000. Role of *vacA* and *cagA* in *Helicobacter pylori* inhibition of mucin synthesis in gastric mucous cells. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2215-2218.
15. **Bergqvist, A. and C. M. Rice.** 2001. Transcriptional activation of the interleukin-2 promoter by hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* **75**: 772-781.
16. **Blanchard, T. G., S. J. Czinn, R. W. Redline, N. Sigmund, G. Harriman, and J. G. Nedrud.** 1999. Antibody-independent protective mucosal immunity to gastric *Helicobacter pylori* infection in mice. *Cell. Immunol.* **191**: 74-80.
17. **Boren, T., P. Falk, K. A. Roth, G. Larson, and S. Normark.** 1993. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* **262**: 1892-1895.
18. **Boulton, I. C. and S. D. Gray-Owen.** 2002. Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nat. Immunol.* **3**: 229-236.
19. **Bowman, E. J., A. Siebers, and K. Altendorf.** 1988. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 7972-7976.
20. **Boyer, H. W. and D. Roulland-Dussoix.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**: 459-472.
21. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

22. **Chin, E. R., E. N. Olson, J. A. Richardson, Q. Yang, C. Humphries, J. M. Shelton, H. Wu, W. Zhu, R. Bassel-Duby, and R. S. Williams.** 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* **12**: 2499-2509.
23. **Choi, M. S., R. D. Brines, M. J. Holman, and G. G. Klaus.** 1994. Induction of NF-AT in normal B lymphocytes by anti-immunoglobulin or CD40 ligand in conjunction with IL-4. *Immunity* **1**: 179-187.
24. **Churin, Y., L. Al-Ghoul, O. Kepp, T. F. Meyer, W. Birchmeier, and M. Naumann.** 2003. *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *J. Cell. Biol.* **161**: 249-255.
25. **Clipstone, N. A. and G. R. Crabtree.** 1992. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* **357**: 695-697.
26. **Correa, P.** 1996. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: state of the art. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* **5**: 477-481.
27. **Coudronniere, N., M. Villalba, N. Englund, and A. Altman.** 2000. NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 3394-3399.
28. **Covacci, A., J. L. Telford, G. Del Giudice, J. Parsonnet, and R. Rappuoli.** 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* **284**: 1328-1333.
29. **Cover, T. L.** 1996. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **20**: 241-246.
30. **Cover, T. L. and M. J. Blaser.** 1992. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **267**: 10570-10575.
31. **Cover, T. L., C. P. Dooley, and M. J. Blaser.** 1990. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect. Immun.* **58**: 603-610.
32. **Cover, T. L., P. I. Hanson, and J. E. Heuser.** 1997. Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *J. Cell. Biol.* **138**: 759-769.

33. **Cover, T. L., U. S. Krishna, D. A. Israel, and R. M. J. Peek.** 2003. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res.* **63**: 951-957.
34. **Cover, T. L., Reddy, L. Y., and M. J. Blaser.** 1993. Effects of ATPase inhibitors on the response of HeLa cells to *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Infect. Immun.* **61**: 1427-1431.
35. **Cover, T. L., M. K. Tummuru, P. Cao, S. A. Thompson, and M. J. Blaser.** 1994. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J. Biol. Chem.* **269**: 10566-10573.
36. **Crabtree, G. R.** 1989. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* **243**: 355-361.
37. **Crabtree, G. R.** 1999. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca^{2+} , calcineurin, and NF-AT. *Cell* **96**: 611-614.
38. **Crabtree, J. E.** 1996. Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **10 Suppl 1**: 29-37.
39. **Crabtree, J. E., A. Covacci, S. M. Farmery, Z. Xiang, D. S. Tompkins, S. Perry, I. J. Lindley, and R. Rappuoli.** 1995. *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J. Clin. Pathol.* **48**: 41-45.
40. **Cunningham, K. W. and G. R. Fink.** 1996. Calcineurin inhibits VCX1-dependent H^{+}/Ca^{2+} exchange and induces Ca^{2+} ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 2226-2237.
41. **Czajkowsky, D. M., H. Iwamoto, T. L. Cover, and Z. Shao.** 1999. The vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 2001-2006.
42. **D'Ellos, M. M., M. Manghetti, F. Almerigogna, A. Amedei, F. Costa, D. Burrioni, C. T. Baldari, S. Romagnani, J. L. Telford, and G. Del Prete.** 1997. Different cytokine profile and antigen-specificity repertoire in *Helicobacter pylori*-specific T cell clones from the antrum of chronic gastritis patients with or without peptic ulcer. *Eur. J. Immunol.* **27**: 1751-1755.

43. **D'Elíos, M. M., M. Manghetti, M. De Carli, F. Costa, C. T. Baldari, D. Burróni, J. L. Telford, S. Romagnani, and G. Del Prete.** 1997. T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J. Immunol.* **158**: 962-967.
44. **de Bernard, M., E. Papini, V. de Filippis, E. Gottardi, J. Telford, R. Manetti, A. Fontana, R. Rappuoli, and C. Montecucco.** 1995. Low pH activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*, which becomes acid and pepsin resistant. *J. Biol. Chem.* **270**: 23937-23940.
45. **Dixon, M. F.** 2001. Pathology of gastritis and peptic ulceration. *Helicobacter pylori: physiology and genetics.* ASM Press: 459-469.
46. **Dorner, B. G., A. Scheffold, M. S. Rolph, M. B. Huser, S. H. Kaufmann, A. Radbruch, I. E. Flesch, and R. A. KroczeK.** 2002. MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 6181-6186.
47. **Drumm, B.** 1990. *Helicobacter pylori.* *Arch.Dis.Child* **65**: 1278-1282.
48. **Dunn, B. E., H. Cohen, and M. J. Blaser.** 1997. *Helicobacter pylori.* *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 720-741.
49. **Eaton, K. A., C. L. Brooks, D. R. Morgan, and S. Krakowka.** 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* **59**: 2470-2475.
50. **Eaton, K. A., D. R. Morgan, and S. Krakowka.** 1992. Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori.* *J. Med. Microbiol.* **37**: 123-127.
51. **El-Omar, E. M., M. Carrington, W. H. Chow, K. E. McColl, J. H. Bream, H. A. Young, J. Herrera, J. Lissowska, C. C. Yuan, N. Rothman, G. Lanyon, M. Martin, J. F. J. Fraumeni, and C. S. Rabkin .** 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* **404**: 398-402.
52. **Elitsur, Y., L. Adkins, D. Saeed, and C. Neace.** 1999. *Helicobacter pylori* antibody profile in household members of children with *H. pylori* infection. *J. Clin. Gastroenterol.* **29**: 178-182.

53. **Ermak, T. H., P. J. Giannasca, R. Nichols, G. A. Myers, J. Nedrud, R. Weltzin, C. K. Lee, H. Kleanthous, and T. P. Monath.** 1998. Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J. Exp. Med.* **188** : 2277-2288.
54. **Evans, D. J. J., D. G. Evans, T. Takemura, H. Nakano, H. C. Lampert, D. Y. Graham, D. N. Granger, and P. R. Kviety.** 1995. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect. Immun.* **63**: 2213-2220.
55. **Fan, X., H. Gunasena, Z. Cheng, R. Espejo, S. E. Crowe, P. B. Ernst, and V. E. Reyes.** 2000. *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J. Immunol.* **165**: 1918-1924.
56. **Fan, X. J., A. Chua, C. N. Shahi, J. McDevitt, P. W. Keeling, and D. Kelleher.** 1994. Gastric T lymphocyte responses to *Helicobacter pylori* in patients with *H. pylori* colonisation. *Gut* **35**: 1379-1384.
57. **Fanger, C. M., M. Hoth, G. R. Crabtree, and R. S. Lewis.** 1995. Characterization of T cell mutants with defects in capacitative calcium entry: genetic evidence for the physiological roles of CRAC channels. *J. Cell. Biol.* **131**: 655-667.
58. **Ferrari, G., H. Langen, M. Naito, and J. Pieters.** 1999. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* **97**: 435-447.
59. **Feske, S., J. Giltane, R. Dolmetsch, L. M. Staudt, and A. Rao.** 2001. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat. Immunol.* **2**: 316-324.
60. **Fischer, W., R. Buhrdorf, E. Gerland, and R. Haas.** 2001. Outer Membrane Targeting of Passenger Proteins by the Vacuolating Cytotoxin Autotransporter of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **69**: 6769-6775.
61. **Fischer, W. and R. Haas.** 2000. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Bacterial Protein Toxins. Handbook of Experimental Pharmacology* **145**: 489-507.
62. **Forsyth, M. H., J. C. Atherton, M. J. Blaser, and T. L. Cover.** 1998. Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. *Infect. Immun.* **66**: 3088-3094.

-
63. **Foryst-Ludwig, A. and M. Naumann.** 2000. p21-activated kinase 1 activates the nuclear factor kappa B (NF-kappa B)-inducing kinase-Ikappa B kinases NF-kappa B pathway and proinflammatory cytokines in *Helicobacter pylori* infection. *J. Biol. Chem.* **275**: 39779-39785.
64. **Fuerst, T. R., E. G. Niles, F. W. Studier, and B. Moss.** 1986. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 8122-8126.
65. **Fujikawa, A., D. Shirasaka, S. Yamamoto, H. Ota, K. Yahiro, M. Fukada, T. Shintani, A. Wada, N. Aoyama, T. Hirayama, H. Fukamachi, and M. Noda.** 2003. Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. *Nat. Genet.* **33**: 375-381.
66. **Galmiche, A., J. Rassow, A. Doye, S. Cagnol, J. C. Chambard, S. Contamin, V. de Thillot, I. Just, V. Ricci, E. Solcia, E. Van Obberghen, and P. Boquet.** 2000. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J.* **19**: 6361-6370.
67. **Geis, G., S. Suerbaum, B. Forsthoff, H. Leying, and W. Opferkuch.** 1993. Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* **38**: 371-377.
68. **Gerhard, M., N. Lehn, N. Neumayer, T. Boren, R. Rad, W. Schepp, S. Miehke, M. Classen, and C. Prinz.** 1999. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 12778-12783.
69. **Glynn, R., S. Akkaraju, J. I. Healy, J. Rayner, C. C. Goodnow, and D. H. Mack.** 2000. How self-tolerance and the immunosuppressive drug FK506 prevent B-cell mitogenesis. *Nature* **403**: 672-676.
70. **Go, M. F.** 1997. What are the host factors that place an individual at risk for *Helicobacter pylori*-associated disease? *Gastroenterology* **113**: 15-20.
71. **Goodman, K. J., P. Correa, A. H. Tengana, H. Ramirez, J. P. DeLany, P. O. Guerrero, Q. M. Lopez, and P. T. Collazos.** 1996. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: a population-based study of transmission pathways. *Am. J. Epidemiol.* **144**: 290-299.

72. **Granucci, F., C. Vizzardelli, N. Pavelka, S. Feau, M. Persico, E. Virzi, M. Rescigno, G. Moro, and P. Ricciardi-Castagnoli.** 2001. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat. Immunol.* **2**: 882-888.
73. **Griffith, J. P., J. L. Kim, E. E. Kim, M. D. Sintchak, J. A. Thomson, M. J. Fitzgibbon, M. A. Fleming, P. R. Caron, K. Hsiao, and M. A. Navia.** 1995. X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell* **82**: 507-522.
74. **Haas, R., T. F. Meyer, and J. P. van Putten.** 1993. Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **8**: 753-760.
75. **Harris, P. R., H. L. Mobley, G. I. Perez-Perez, M. J. Blaser, and P. D. Smith.** 1996. *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology* **111**: 419-425.
76. **Hemenway, C. S., K. Dolinski, M. E. Cardenas, M. A. Hiller, E. W. Jones, and J. Heitman.** 1995. vph6 mutants of *Saccharomyces cerevisiae* require calcineurin for growth and are defective in vacuolar H(+)-ATPase assembly. *Genetics* **141**: 833-844.
77. **Higashi, H., R. Tsutsumi, S. Muto, T. Sugiyama, T. Azuma, M. Asaka, and M. Hatakeyama.** 2002. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* **295**: 683-686.
78. **Ho, A. M., J. Jain, A. Rao, and P. G. Hogan.** 1994. Expression of the transcription factor NFATp in a neuronal cell line and in the murine nervous system. *J. Biol. Chem.* **269**: 28181-28186.
79. **Hofman, V., V. Ricci, A. Galmiche, P. Brest, P. Auberger, B. Rossi, P. Boquet, and P. Hofman.** 2000. Effect of *Helicobacter pylori* on polymorphonuclear leukocyte migration across polarized T84 epithelial cell monolayers: role of vacuolating toxin VacA and *cag* pathogenicity island. *Infect. Immun.* **68**: 5225-5233.
80. **Holmes, D. S. and M. Quigley.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
81. **Hotchin, N. A., T. L. Cover, and N. Akhtar.** 2000. Cell vacuolation induced by the VacA cytotoxin of *Helicobacter pylori* is regulated by the Rac1 GTPase. *J. Biol. Chem.* **275**: 14009-14012.

-
82. **Hoth, M., C. M. Fanger, and R. S. Lewis.** 1997. Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J. Cell. Biol.* **137**: 633-648.
83. **Hu, L. T. and H. L. Mobley.** 1990. Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **58**: 992-998.
84. **Igarashi, M., Y. Kitada, H. Yoshiyama, A. Takagi, T. Miwa, and Y. Koga.** 2001. Ammonia as an accelerator of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* infection. *Infect. Immun.* **69**: 816-821.
85. **Ikonomov, O. C., D. Sbrissa, T. Yoshimori, T. L. Cover, and A. Shisheva.** 2002. PIKfyve Kinase and SKD1 AAA ATPase define distinct endocytic compartments. Only PIKfyve expression inhibits the cell-vacuolating activity of *Helicobacter pylori* VacA toxin. *J. Biol. Chem.* **277**: 46785-46790.
86. **Ilver, D., A. Arnqvist, J. Ogren, I. M. Frick, D. Kersulyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand, and T. Boren.** 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* **279**: 373-377.
87. **Irvin, B. J., B. L. Williams, A. E. Nilson, H. O. Maynor, and R. T. Abraham.** 2000. Pleiotropic contributions of phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) to T-cell antigen receptor-mediated signaling: reconstitution studies of a PLC-gamma1-deficient Jurkat T-cell line. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 9149-9161.
88. **Isomoto, H., Y. Mizuta, M. Miyazaki, F. Takeshima, K. Omagari, K. Murase, T. Nishiyama, K. Inoue, I. Murata, and S. Kohno.** 2000. Implication of NF-kappaB in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Am. J. Gastroenterol.* **95**: 2768-2776.
89. **Iwashima, M., M. Takamatsu, H. Yamagishi, Y. Hatanaka, Y. Y. Huang, C. McGinty, S. Yamasaki, and T. Koike.** 2002. Genetic evidence for Shc requirement in TCR-induced c-Rel nuclear translocation and IL-2 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 4544-4549.
90. **Jain, J., C. Loh, and A. Rao.** 1995. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 333-342.
91. **Karttunen, R., G. Andersson, K. Poikonen, T. U. Kosunen, T. Karttunen, K. Juutinen, and S. Niemela.** 1990. *Helicobacter pylori* induces lymphocyte activation in peripheral blood cultures. *Clin. Exp. Immunol.* **82**: 485-488.

-
92. **Karttunen, R., T. Karttunen, H. P. Ekre, and T. T. MacDonald.** 1995. Interferon gamma and interleukin 4 secreting cells in the gastric antrum in *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis. *Gut* **36**: 341-345.
 93. **Kehlenbach, R. H., A. Dickmanns, and L. Gerace.** 1998. Nucleocytoplasmic shuttling factors including Ran and CRM1 mediate nuclear export of NFAT In vitro. *J. Cell. Biol.* **141**: 863-874.
 94. **Kim, H. P. and W. J. Leonard.** 2002. The basis for TCR-mediated regulation of the IL-2 receptor alpha chain gene: role of widely separated regulatory elements. *EMBO J.* **21**: 3051-3059.
 95. **Kinoshita, S., B. K. Chen, H. Kaneshima, and G. P. Nolan.** 1998. Host control of HIV-1 parasitism in T cells by the nuclear factor of activated T cells. *Cell* **95**: 595-604.
 96. **Kissinger, C. R., H. E. Parge, D. R. Knighton, C. T. Lewis, L. A. Pelletier, A. Tempczyk, V. J. Kalish, K. D. Tucker, R. E. Showalter, and E. W. Moomaw.** 1995. Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* **378**: 641-644.
 97. **Klauck, T. M., M. C. Faux, K. Labudda, L. K. Langeberg, S. Jaken, and J. D. Scott.** 1996. Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science* **271**: 1589-1592.
 98. **Klee, C. B., H. Ren, and X. Wang.** 1998. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J. Biol. Chem.* **273**: 13367-13370.
 99. **Knipp, U., S. Birkholz, W. Kaup, K. Mahnke, and W. Opferkuch.** 1994. Suppression of human mononuclear cell response by *Helicobacter pylori*: effects on isolated monocytes and lymphocytes. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **8**: 157-166.
 100. **Krauss-Etschmann, S., E. Sammler, S. Koletzko, N. Konstantopoulos, D. Aust, B. Gebert, B. Luckow, D. Reinhardt, and D. J. Schendel.** 2003. Chemokine receptor 5 expression in gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected and noninfected children. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**: 22-29.
 101. **Kuck, D., B. Kolmerer, C. Iking-Konert, P. H. Krammer, W. Stremmel, and J. Rudi.** 2001. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect. Immun.* **69**: 5080-5087.

102. **Kuo, C. H. and W. C. Wang.** 2003. Binding and internalization of *Helicobacter pylori* VacA via cellular lipid rafts in epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**: 640-644.
103. **Labigne, A., V. Cussac, and P. Courcoux.** 1991. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J. Bacteriol.* **173**: 1920-1931.
104. **Lai, M. M., P. E. Burnett, H. Wolosker, S. Blackshaw, and S. H. Snyder.** 1998. Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J. Biol. Chem.* **273**: 18325-18331.
105. **Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto.** 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* **1**: 311-316.
106. **Lara-Tejero, M. and J. E. Galan.** 2000. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science* **290**: 354-357.
107. **Lara-Tejero, M. and J. E. Galan.** 2001. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect. Immun.* **69**: 4358-4365.
108. **Le Deist, F., C. Hivroz, M. Partiseti, F. Rieux-Laucat, K. M. Debatin, D. Choquet, J. P. De Villartay, and A. Fischer.** 1995. T cell activation deficiencies. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **76**: 163-164.
109. **Lee, A., J. O'Rourke, M. C. De Ungria, B. Robertson, G. Daskalopoulos, and M. F. Dixon.** 1997. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* **112**: 1386-1397.
110. **Leunk, R. D., Johnson, P. T., David, B. C., Kraft, W. G., and D. R. Morgan.** 1988. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* **26**, 93-99.
111. **Leying, H., S. Suerbaum, G. Geis, and R. Haas.** 1992. Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol. Microbiol.* **6**: 2863-2874.
112. **Lin, J. and A. Weiss.** 2001. T cell receptor signalling. *J. Cell Sci.* **114**: 243-244.
113. **Lin, J. X. and W. J. Leonard.** 1997. Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus. *Cytokine. Growth Factor Rev.* **8**: 313-332.

114. **Lin, X., R. A. Sikkink, F. Rusnak, and D. L. Barber.** 1999. Inhibition of calcineurin phosphatase activity by a calcineurin B homologous protein. *J. Biol. Chem.* **274**: 36125-36131.
115. **Lindholm, C., M. Quiding-Jarbrink, H. Lonroth, A. Hamlet, and A. M. Svennerholm.** 1998. Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect. Immun.* **66**: 5964-5971.
116. **Logan, R. P.** 1994. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Lancet* **344**: 1078-1079.
117. **Lucas, B., D. Bumann, A. Walduck, J. Koesling, L. Develioglu, T. F. Meyer, and T. Aebischer.** 2001. Adoptive transfer of CD4+ T cells specific for subunit A of *Helicobacter pylori* urease reduces *H. pylori* stomach colonization in mice in the absence of interleukin-4 (IL-4)/IL-13 receptor signaling. *Infect. Immun.* **69**: 1714-1721.
118. **Lundgren, A., E. Suri-Payer, K. Enarsson, A. M. Svennerholm, and B. S. Lundin.** 2003. *Helicobacter pylori*-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to *H. pylori* in infected individuals. *Infect. Immun.* **71**: 1755-1762.
119. **Lupetti, P., J. E. Heuser, R. Manetti, P. Massari, S. Lanzavecchia, P. L. Bellon, R. Dallai, R. Rappuoli, and J. L. Telford.** 1996. Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J. Cell Biol.* **133**: 801-807.
120. **Macian, F., C. Garcia-Rodriguez, and A. Rao.** 2000. Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *EMBO J.* **19**: 4783-4795.
121. **Maeda, S., F. Kanai, K. Ogura, H. Yoshida, T. Ikenoue, M. Takahashi, T. Kawabe, Y. Shiratori, and M. Omata.** 1997. High seropositivity of anti-CagA antibody in *Helicobacter pylori*-infected patients irrelevant to peptic ulcers and normal mucosa in Japan. *Dig. Dis. Sci.* **42**: 1841-1847.
122. **Maeda, S., K. Ogura, H. Yoshida, F. Kanai, T. Ikenoue, N. Kato, Y. Shiratori, and M. Omata.** 1998. Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. *Gut* **42**: 338-343.
123. **Maeda, S., H. Yoshida, K. Ogura, Y. Mitsuno, Y. Hirata, Y. Yamaji, M. Akanuma, Y. Shiratori, and M. Omata.** 2000. *H. pylori* activates NF-kappaB through a signaling pathway involving IkappaB kinases, NF-kappaB-inducing kinase, TRAF2, and TRAF6 in gastric cancer cells. *Gastroenterology* **119**: 97-108.

-
124. **Mahdavi, J., B. Sonden, M. Hurtig, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, J. Angstrom, T. Larsson, S. Teneberg, K. A. Karlsson, S. Altraja, T. Wadstrom, D. Kersulyte, D. E. Berg, A. Dubois, C. Petersson, K. E. Magnusson, T. Norberg, F. Lindh, B. B. Lundskog, A. Arnqvist, L. Hammarstrom, and T. Boren.** 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **297**: 573-578.
125. **Mai, U. E., G. I. Perez-Perez, J. B. Allen, S. M. Wahl, M. J. Blaser, and P. D. Smith.** 1992. Surface proteins from *Helicobacter pylori* exhibit chemotactic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa. *J. Exp. Med.* **175**: 517-525.
126. **Malaty, H. M. and D. Y. Graham.** 1994. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* **35**: 742-745.
127. **Marchetti, M., B. Arico, D. Burrioni, N. Figura, R. Rappuoli, and P. Ghiara.** 1995. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* **267**: 1655-1658.
128. **Marlink, K. L., K. D. Bacon, B. C. Sheppard, H. Ashktorab, D. T. Smoot, T. L. Cover, C. W. Deveney, and M. J. Rutten.** 2003. Effects of *Helicobacter pylori* on intracellular Ca²⁺ signaling in normal human gastric mucous epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **285**: 163-176.
129. **Mattsson, A., M. Quiding-Jarbrink, H. Lonroth, A. Hamlet, I. Ahlstedt, and A. Svennerholm.** 1998. Antibody-secreting cells in the stomachs of symptomatic and asymptomatic *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect. Immun.* **66**: 2705-2712.
130. **Megraud, F., V. Neman-Simha, and D. Brugmann.** 1992. Further evidence of the toxic effect of ammonia produced by *Helicobacter pylori* urease on human epithelial cells. *Infect. Immun.* **60**: 1858-1863.
131. **Meyer-ter-Vehn, T., A. Covacci, M. Kist, and H. L. Pahl.** 2000. *Helicobacter pylori* activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun. *J. Biol. Chem.* **275**: 16064-16072.
132. **Mimuro, H., T. Suzuki, J. Tanaka, M. Asahi, R. Haas, and C. Sasakawa.** 2002. Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol. Cell* **10**: 745-755.

-
133. **Miskin, J. E., C. C. Abrams, L. C. Goatley, and L. K. Dixon.** 1998. A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. *Science* **281**: 562-565.
134. **Molinari, M., C. Galli, M. de Bernard, N. Norais, J. M. Ruyschaert, R. Rappuoli, and C. Montecucco.** 1998. The acid activation of *Helicobacter pylori* toxin VacA: structural and membrane binding studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**: 334-340.
135. **Molinari, M., C. Galli, N. Norais, J. L. Telford, R. Rappuoli, J. P. Luzio, and C. Montecucco.** 1997. Vacuoles induced by *Helicobacter pylori* toxin contain both late endosomal and lysosomal markers. *J. Biol. Chem.* **272**: 25339-25344.
136. **Molinari, M., M. Salio, C. Galli, N. Norais, R. Rappuoli, A. Lanzavecchia, and C. Montecucco.** 1998. Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J. Exp. Med.* **187**: 135-140.
137. **Molkentin, J. D., J. R. Lu, C. L. Antos, B. Markham, J. Richardson, J. Robbins, S. R. Grant, and E. N. Olson.** 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**: 215-228.
138. **Montecucco, C. and M. de Bernard.** 2003. Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes. Infect.* **5**: 715-721.
139. **Morbiato, L., F. Tombola, S. Campello, G. Del Giudice, R. Rappuoli, M. Zoratti, and E. Papini.** 2001. Vacuolation induced by VacA toxin of *Helicobacter pylori* requires the intracellular accumulation of membrane permeant bases, Cl(-) and water. *FEBS Lett.* **508**: 479-483.
140. **Morgan, D. O.** 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* **374**: 131-134.
141. **Nakamura, Y., S. M. Russell, S. A. Mess, M. Friedmann, M. Erdos, C. Francois, Y. Jacques, S. Adelstein, and W. J. Leonard.** 1994. Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature* **369**: 330-333.
142. **Namavar, F., M. Sparrius, E. C. Veerman, B. J. Appelmek, and C. M. Vandenbroucke-Grauls.** 1998. Neutrophil-activating protein mediates adhesion of *Helicobacter pylori* to sulfated carbohydrates on high-molecular-weight salivary mucin. *Infect. Immun.* **66**: 444-447.

-
143. **Negulescu, P. A., N. Shastri, and M. D. Cahalan.** 1994. Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 2873-2877.
144. **Nelson, B. H., J. D. Lord, and P. D. Greenberg.** 1994. Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor beta and gamma chains mediate the signal for T-cell proliferation. *Nature* **369**: 333-336.
145. **Nourse, J., E. Firpo, W. M. Flanagan, S. Coats, K. Polyak, M. H. Lee, J. Massague, G. R. Crabtree, and J. M. Roberts.** 1994. Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* **372**: 570-573.
146. **Obst, B., S. Schutz, S. Ledig, S. Wagner, and W. Beil.** 2002. *Helicobacter pylori*-induced apoptosis in gastric epithelial cells is blocked by protein kinase C activation. *Microb. Pathog.* **33**: 167-175.
147. **Odenbreit, S., B. Gebert, J. Puls, W. Fischer, and R. Haas.** 2001. Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the cag pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell. Microbiol.* **3**: 21-31.
148. **Odenbreit, S., Püls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., and R. Haas.** 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric Epithelial Cells by Type IV Secretion. *Science* **287**: 1497-1500
149. **Odenbreit, S., M. Till, D. Hofreuter, G. Faller, and R. Haas.** 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.
150. **Ogura, K., S. Maeda, M. Nakao, T. Watanabe, M. Tada, T. Kyutoku, H. Yoshida, Y. Shiratori, and M. Omata.** 2000. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J. Exp. Med.* **192**: 1601-1610.
151. **Orsini, B., G. Ciancio, S. Censini, E. Surrenti, G. Pellegrini, S. Milani, H. Herbst, A. Amorosi, and C. Surrenti.** 2000. *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island is associated with enhanced interleukin-8 expression in human gastric mucosa. *Dig. Liver Dis.* **32**: 458-467.
152. **Ota, H., J. Nakayama, M. Momose, M. Hayama, T. Akamatsu, T. Katsuyama, D. Y. Graham, and R. M. Genta.** 1998. *Helicobacter pylori* infection produces reversible glycosylation changes to gastric mucins. *Virchows Arch.* **433**: 419-426.

153. **Padilla, P. I., A. Wada, K. Yahiro, M. Kimura, T. Niidome, H. Aoyagi, A. Kumatori, M. Anami, T. Hayashi, J. Fujisawa, H. Saito, J. Moss, and T. Hirayama.** 2000. Morphologic differentiation of HL-60 cells is associated with appearance of RPTPbeta and induction of *Helicobacter pylori* VacA sensitivity. *J. Biol. Chem.* **275**: 15200-15206.
154. **Pagliaccia, C., M. de Bernard, P. Lupetti, X. Ji, D. Burroni, T. L. Cover, E. Papini, R. Rappuoli, J. L. Telford, and J. M. Reyrat.** 1998. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 10212-10217.
155. **Paliogianni, F., R. L. Kincaid, and D. T. Boumpas.** 1993. Prostaglandin E2 and other cyclic AMP elevating agents inhibit interleukin 2 gene transcription by counteracting calcineurin-dependent pathways. *J. Exp. Med.* **178**: 1813-1817.
156. **Papini, E., Bugnoli, M., de Bernard, M., Figura, N., Rappuoli, R., and C. Montecucco.** 1993. Bafilomycin A1 inhibits *Helicobacter pylori* induced vacuolization of HeLa cells. *Mol. Microbiol.* **7**: 323-327.
157. **Papini, E., B. Satin, C. Bucci, M. de Bernard, J. L. Telford, R. Manetti, R. Rappuoli, M. Zerial, and C. Montecucco.** 1997. The small GTP binding protein rab7 is essential for cellular vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. *EMBO J.* **16**: 15-24.
158. **Papini, E., B. Satin, N. Norais, M. de Bernard, J. L. Telford, R. Rappuoli, and C. Montecucco.** 1998. Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J. Clin. Invest.* **102**: 813-820.
159. **Papini, E., M. Zoratti, and T. L. Cover.** 2001. In search of the *Helicobacter pylori* VacA mechanism of action. *Toxicon* **39**: 1757-1767.
160. **Pappo, J., D. Torrey, L. Castriotta, A. Savinainen, Z. Kabok, and A. Ibraghimov.** 1999. *Helicobacter pylori* infection in immunized mice lacking major histocompatibility complex class I and class II functions. *Infect. Immun.* **67**: 337-341.
161. **Park, S. M., J. Park, J. G. Kim, H. D. Cho, J. H. Cho, D. H. Lee, and Y. J. Cha.** 1998. Infection with *Helicobacter pylori* expressing the *cagA* gene is not associated with an increased risk of developing peptic ulcer diseases in Korean patients. *Scand. J. Gastroenterol.* **33**: 923-927.

-
162. **Parsonnet, J., G. D. Friedman, N. Orentreich, and H. Vogelman.** 1997. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* **40**: 297-301.
163. **Parsonnet, J., S. Hansen, L. Rodriguez, A. B. Gelb, R. A. Warnke, E. Jellum, N. Orentreich, J. H. Vogelman, and G. D. Friedman.** 1994. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **330**: 1267-1271.
164. **Perrin, B. J. and A. Huttenlocher.** 2002. Calpain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**: 722-725.
165. **Pfeifhofer, C., K. Kofler, T. Gruber, N. G. Tabrizi, C. Lutz, K. Maly, M. Leitges, and G. Baier.** 2003. Protein kinase C theta affects Ca²⁺ mobilization and NFAT cell activation in primary mouse T cells. *J. Exp. Med.* **197**: 1525-1535.
166. **Phadnis, S. H., D. Ilver, L. Janzon, S. Normark, and T. U. Westblom.** 1994. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **62**: 1557-1565.
167. **Pohlner, J., R. Halter, K. Beyreuther, and T. F. Meyer.** 1987. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**: 458-462.
168. **Prinz, C., M. Schoniger, R. Rad, I. Becker, E. Keiditsch, S. Wagenpfeil, M. Classen, T. Rosch, W. Schepp, and M. Gerhard.** 2001. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res.* **61**: 1903-1909.
169. **Quiding-Jarbrink, M., B. S. Lundin, H. Lonroth, and A. M. Svennerholm.** 2001. CD4+ and CD8+ T cell responses in *Helicobacter pylori*-infected individuals. *Clin. Exp. Immunol.* **123**: 81-87.
170. **Radcliff, F. J., Ramsay, A. J., and A. Lee.** 1996. Failure of immunization against *Helicobacter pylori* infection in IL-4 deficient mice: evidence for a Th2 immune response as the bias for protective immunity. *Gastroenterology* **110**: A997.

171. **Ramirez-Ramos, A., R. H. Gilman, R. Leon-Barua, S. Recavarren-Arce, J. Watanabe, G. Salazar, W. Checkley, J. McDonald, Y. Valdez, L. Cordero, and J. Carrasco.** 1997. Rapid recurrence of *Helicobacter pylori* infection in Peruvian patients after successful eradication. Gastrointestinal Physiology Working Group of the Universidad Peruana Cayetano Heredia and The Johns Hopkins University. Clin. Infect. Dis. **25**: 1027-1031.
172. **Rao, A.** 1994. NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. Immunol. Today **15**: 274-281.
173. **Rao, A., C. Luo, and P. G. Hogan.** 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. Annu. Rev. Immunol. **15**: 707-747.
174. **Rektorschek, M., D. Weeks, G. Sachs, and K. Melchers.** 1998. Influence of pH on metabolism and urease activity of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology **115**: 628-641.
175. **Reyrat, J. M., S. Lanzavecchia, P. Lupetti, M. de Bernard, C. Pagliaccia, V. Pelicic, M. Charrel, C. Olivieri, N. Norais, X. Ji, V. Cabiaux, E. Papini, R. Rappuoli, and J. L. Telford.** 1999. 3D imaging of the 58 kDa cell binding subunit of the *Helicobacter pylori* cytotoxin. J. Mol. Biol. **290**: 459-470.
176. **Ricci, V., C. Ciacci, R. Zarrilli, P. Sommi, M. K. Tummuru, B. Del Vecchio, C. B. Bruni, T. L. Cover, M. J. Blaser, and M. Romano.** 1996. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell migration and proliferation in vitro: role of VacA and CagA. Infect. Immun. **64**: 2829-2833.
177. **Ricci, V., A. Galmiche, A. Doye, V. Necchi, E. Solcia, and P. Boquet.** 2000. High cell sensitivity to *Helicobacter pylori* VacA toxin depends on a GPI-anchored protein and is not blocked by inhibition of the clathrin-mediated pathway of endocytosis. Mol. Biol. Cell **11**: 3897-3909.
178. **Rock, M. T., W. H. Brooks, and T. L. Roszman.** 1997. Calcium-dependent signaling pathways in T cells. Potential role of calpain, protein tyrosine phosphatase 1b, and p130Cas in integrin-mediated signaling events. J. Biol. Chem. **272**: 33377-33383.
179. **Rock, M. T., A. R. Dix, W. H. Brooks, and T. L. Roszman.** 2000. Beta1 integrin-mediated T cell adhesion and cell spreading are regulated by calpain. Exp. Cell Res. **261**: 260-270.

180. **Rossi, G., D. Fortuna, L. Pancotto, G. Renzoni, E. Taccini, P. Ghiara, R. Rappuoli, and G. Del Giudice.** 2000. Immunohistochemical study of lymphocyte populations infiltrating the gastric mucosa of beagle dogs experimentally infected with *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **68**: 4769-4772.
181. **Rothermel, B., R. B. Vega, J. Yang, H. Wu, R. Bassel-Duby, and R. S. Williams.** 2000. A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J. Biol. Chem.* **275**: 8719-8725.
182. **Rupnow, M. F., R. D. Shachter, D. K. Owens, and J. Parsonnet.** 2000. A dynamic transmission model for predicting trends in *Helicobacter pylori* and associated diseases in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **6**: 228-237.
183. **Ryffel, B., J. L. Willcocks, N. Brooks, and G. Woerly.** 1995. Interleukin-2 receptor (CD25) upregulation on human T-lymphocytes: sensitivity to immunosuppressants is defined by the mode of T-lymphocyte activation. *Immunopharmacology* **30**: 199-207.
184. **Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich .** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
185. **Salama, N. R., G. Otto, L. Tompkins, and S. Falkow.** 2001. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect. Immun.* **69**: 730-736.
186. **Saldinger, P. F., N. Porta, P. Launois, J. A. Louis, G. A. Waanders, H. Bouzourene, P. Michetti, A. L. Blum, and I. E. Corthesy-Theulaz.** 1998. Immunization of BALB/c mice with *Helicobacter pylori* urease B induces a T helper 2 response absent in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* **115**: 891-897.
187. **Sambrook, J.** 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
188. **Satin, B., G. Del Giudice, B. V. Della, S. Dusi, C. Laudanna, F. Tonello, D. Kelleher, R. Rappuoli, C. Montecucco, and F. Rossi.** 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.

-
189. **Schmitt, W. and R. Haas.** 1994. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol.* **12**: 307-319.
190. **Schraw, W., Y. Li, M. S. McClain, F. G. van der Goot, and T. L. Cover.** 2002. Association of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) with lipid rafts. *J. Biol. Chem.* **277**: 34642-34650.
191. **Schreiber, S. L. and G. R. Crabtree.** 1992. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today* **13**: 136-142.
192. **Schwartz, R. H.** 1997. T cell clonal anergy. *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 351-357.
193. **Scott, E. S., S. Malcomber, and P. O'Hare.** 2001. Nuclear translocation and activation of the transcription factor NFAT is blocked by herpes simplex virus infection. *J. Virol.* **75**: 9955-9965.
194. **Segal, E. D., J. Cha, J. Lo, S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 1999. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 14559-14564.
195. **Segal, E. D., C. Lange, A. Covacci, L. S. Tompkins, and S. Falkow.** 1997. Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 7595-7599.
196. **Selbach, M., S. Moese, C. R. Hauck, T. F. Meyer, and S. Backert.** 2002. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **277**: 6775-6778.
197. **Selbach, M., S. Moese, R. Hurwitz, C. R. Hauck, T. F. Meyer, and S. Backert.** 2003. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J.* **22**: 515-528.
198. **Seto, K., Y. Hayashi-Kuwabara, T. Yoneta, H. Suda, and H. Tamaki.** 1998. Vacuolation induced by cytotoxin from *Helicobacter pylori* is mediated by the EGF receptor in HeLa cells. *FEBS Lett.* **431**: 347-350.
199. **Shao, F., P. M. Merritt, Z. Bao, R. W. Innes, and J. E. Dixon.** 2002. A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* **109**: 575-588.

200. **Shapiro, V. S., K. E. Truitt, J. B. Imboden, and A. Weiss.** 1997. CD28 mediates transcriptional upregulation of the interleukin-2 (IL-2) promoter through a composite element containing the CD28RE and NF-IL-2B AP-1 sites. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 4051-4058.
201. **Shaw, J. P., P. J. Utz, D. B. Durand, J. J. Toole, E. A. Emmel, and G. R. Crabtree.** 1988. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* **241**: 202-205.
202. **Shibuya, H., M. Yoneyama, J. Ninomiya-Tsuji, K. Matsumoto, and T. Taniguchi.** 1992. IL-2 and EGF receptors stimulate the hematopoietic cell cycle via different signaling pathways: demonstration of a novel role for c-myc. *Cell* **70**: 57-67.
203. **Shirin, H., E. M. Sordillo, S. H. Oh, H. Yamamoto, T. Delohery, I. B. Weinstein, and S. F. Moss.** 1999. *Helicobacter pylori* inhibits the G1 to S transition in AGS gastric epithelial cells. *Cancer Res.* **59**: 2277-2281.
204. **Smith, K. A.** 1989. The interleukin 2 receptor. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**: 397-425.
205. **Sommer, F., G. Faller, P. Konturek, T. Kirchner, E. G. Hahn, J. Zeus, M. Rollinghoff, and M. Lohoff.** 1998. Antrum- and corpus mucosa-infiltrating CD4(+) lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis display a Th1 phenotype. *Infect. Immun.* **66**: 5543-5546.
206. **Sommi, P., V. Ricci, R. Fiocca, M. Romano, K. J. Ivey, E. Cova, E. Solcia, and U. Ventura.** 1996. Significance of ammonia in the genesis of gastric epithelial lesions induced by *Helicobacter pylori*: an in vitro study with different bacterial strains and urea concentrations. *Digestion* **57**: 299-304.
207. **Stein, M., F. Bagnoli, R. Halenbeck, R. Rappuoli, W. J. Fantl, and A. Covacci.** 2002. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol. Microbiol.* **43**: 971-980.
208. **Stein, M., R. Rappuoli, and A. Covacci.** 2000. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 1263-1268.
209. **Stellrecht, K. A., K. Sperber, and B. G. Pogo.** 1992. Stimulation of lymphokines in Jurkat cells persistently infected with *vaccinia virus*. *J. Virol.* **66**: 2046-2050.

210. **Stromberg, E., A. Edebo, A. M. Svennerholm, and C. Lindholm.** 2003. Decreased epithelial cytokine responses in the duodenal mucosa of *Helicobacter pylori*-infected duodenal ulcer patients. Clin. Diagn. Lab. Immunol. **10**: 116-124.
211. **Suerbaum, S., C. Josenhans, and A. Labigne.** 1993. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter pylori* mustelae flaB flagellin genes and construction of *H. pylori* flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. J. Bacteriol. **175**: 3278-3288.
212. **Suzuki, J., H. Ohnishi, A. Wada, T. Hirayama, H. Ohno, N. Ueda, H. Yasuda, T. Iiri, Y. Wada, M. Futai, and H. Mashima.** 2003. Involvement of syntaxin 7 in human gastric epithelial cell vacuolation induced by the *Helicobacter pylori*-produced cytotoxin VacA. J. Biol. Chem. **278**: 25585-25590.
213. **Suzuki, J., H. Ohnishi, H. Shibata, A. Wada, T. Hirayama, T. Iiri, N. Ueda, C. Kanamaru, T. Tsuchida, H. Mashima, H. Yasuda, and T. Fujita.** 2001. Dynamin is involved in human epithelial cell vacuolation caused by the *Helicobacter pylori*-produced cytotoxin VacA. J. Clin. Invest. **107**: 363-370.
214. **Suzuki, M., S. Miura, M. Suematsu, D. Fukumura, I. Kurose, H. Suzuki, A. Kai, Y. Kudoh, M. Ohashi, and M. Tsuchiya.** 1992. *Helicobacter pylori*-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. Am. J. Physiol. **263**: 719-725.
215. **Svennerholm, A. M. and M. Quiding-Jarbrink.** 2003. Priming and expression of immune responses in the gastric mucosa. Microbes. Infect. **5**: 731-739.
216. **Szabo, I., S. Brutsche, F. Tombola, M. Moschioni, B. Satin, J. L. Telford, R. Rappuoli, C. Montecucco, E. Papini, and M. Zoratti.** 1999. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. EMBO J. **18**: 5517-5527.
217. **Telford, J. L., A. Covacci, P. Ghiara, C. Montecucco, and R. Rappuoli.** 1994. Unravelling the pathogenic role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer: potential new therapies and vaccines. Trends. Biotechnol. **12**: 420-426.
218. **Teneberg, S., H. Miller-Podraza, H. C. Lampert, D. J. J. Evans, D. G. Evans, D. Danielsson, and K. A. Karlsson.** 1997. Carbohydrate binding specificity of the neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori*. J. Biol. Chem. **272**: 19067-19071.

219. **Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzgerald, N. Lee, M. D. Adams, and J. C. Venter.** 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**: 539-547.
220. **Tombola, F., C. Carlesso, I. Szabo, M. de Bernard, J. M. Reyrat, J. L. Telford, R. Rappuoli, C. Montecucco, E. Papini, and M. Zoratti.** 1999. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. *Biophys. J.* **76**: 1401-1409.
221. **Verweij, C. L., C. Guidos, and G. R. Crabtree.** 1990. Cell type specificity and activation requirements for NFAT-1 (nuclear factor of activated T-cells) transcriptional activity determined by a new method using transgenic mice to assay transcriptional activity of an individual nuclear factor. *J. Biol. Chem.* **265**: 15788-15795.
222. **Wang, J., E. G. Brooks, K. B. Bamford, T. L. Denning, J. Pappo, and P. B. Ernst.** 2001. Negative selection of T cells by *Helicobacter pylori* as a model for bacterial strain selection by immune evasion. *J. Immunol.* **167**: 926-934.
223. **Warren, J. R. and B. J. Marshall.** 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **1**: 1273-1275.
224. **Webb, P. M., J. E. Crabtree, and D. Forman.** 1999. Gastric cancer, cytotoxin-associated gene A-positive *Helicobacter pylori*, and serum pepsinogens: an international study. The Eurogst Study Group. *Gastroenterology* **116**: 269-276.
225. **Weeks, D. L., S. Eskandari, D. R. Scott, and G. Sachs.** 2000. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* **287**: 482-485.
226. **Weiss, D. L. and M. A. Brown.** 2001. Regulation of IL-4 production in mast cells: a paradigm for cell-type-specific gene expression. *Immunol. Rev.* **179**: 35-47.
227. **Whitehouse, C. A., P. B. Balbo, E. C. Pesci, D. L. Cottle, P. M. Mirabito, and C. L. Pickett.** 1998. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. *Infect. Immun.* **66**: 1934-1940.

228. **Willhite, D. C., T. L. Cover, and S. R. Blanke.** 2003. Cellular vacuolation and mitochondrial cytochrome c release are independent outcomes of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin activity that are each dependent on membrane channel formation. *J. Biol. Chem.* *in press*
229. **Wirth, H. P., M. H. Beins, M. Yang, K. T. Tham, and M. J. Blaser.** 1998. Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant *Helicobacter pylori* strains. *Infect. Immun.* **66**: 4856-4866.
230. **Wotherspoon, A. C.** 1998. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *Br. Med. Bull.* **54**: 79-85.
231. **Xiang, Z., S. Censini, P. F. Bayeli, J. L. Telford, N. Figura, R. Rappuoli, and A. Covacci.** 1995. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect. Immun.* **63**: 94-98.
232. **Yahiro, K., T. Niidome, M. Kimura, T. Hatakeyama, H. Aoyagi, H. Kurazono, K. Imagawa, A. Wada, J. Moss, and T. Hirayama.** 1999. Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase beta. *J. Biol. Chem.* **274**: 36693-36699.
233. **Yahiro, K., A. Wada, M. Nakayama, T. Kimura, K. Ogushi, T. Niidome, H. Aoyagi, K. Yoshino, K. Yonezawa, J. Moss, and T. Hirayama.** 2003. Protein-tyrosine phosphatase alpha, RPTP alpha, is a *Helicobacter pylori* VacA receptor. *J. Biol. Chem.* **278**: 19183-19189.
234. **Yamazaki, S., A. Yamakawa, Y. Ito, M. Ohtani, H. Higashi, M. Hatakeyama, and T. Azuma.** 2003. The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. *J. Infect. Dis.* **187**: 334-337.
235. **Yao, T., J. Meccas, J. I. Healy, S. Falkow, and Y. Chien.** 1999. Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, *yopH*. *J. Exp. Med.* **190**: 1343-1350.
236. **Ye, D. and S. R. Blanke.** 2000. Mutational analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin amino terminus: identification of amino acids essential for cellular vacuolation. *Infect. Immun.* **68**: 4354-4357.

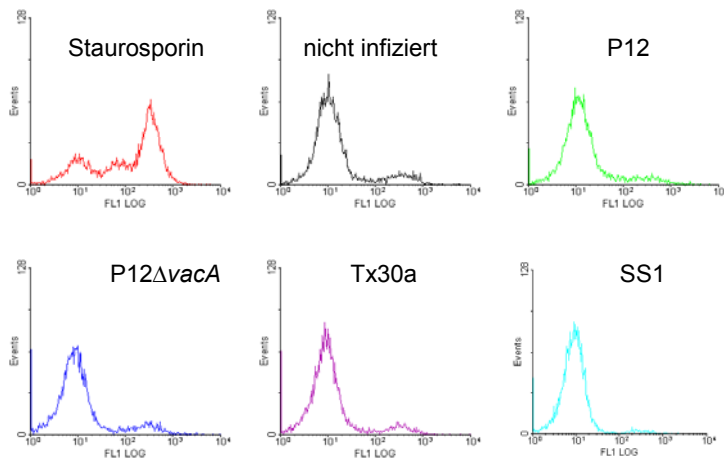
237. **Ye, D., D. C. Willhite, and S. R. Blanke.** 1999. Identification of the minimal intracellular vacuolating domain of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J. Biol. Chem.* **274**: 9277-9282.
238. **Yoshida, T., I. Ishikawa, Y. Ono, T. Imai, R. Suzuki, and O. Yoshie.** 1999. An activation-responsive element in single C motif-1/lymphotactin promoter is a site of constitutive and inducible DNA-protein interactions involving nuclear factor of activated T cell. *J. Immunol.* **163**: 3295-3303.
239. **Yoshiyama, H., H. Nakamura, M. Kimoto, K. Okita, and T. Nakazawa.** 1999. Chemotaxis and motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *J. Gastroenterol.* **34 Suppl 11**: 18-23.
240. **Zheng, P. Y. and N. L. Jones.** 2003. *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. *Cell. Microbiol.* **5**: 25-40.

VII Anhang

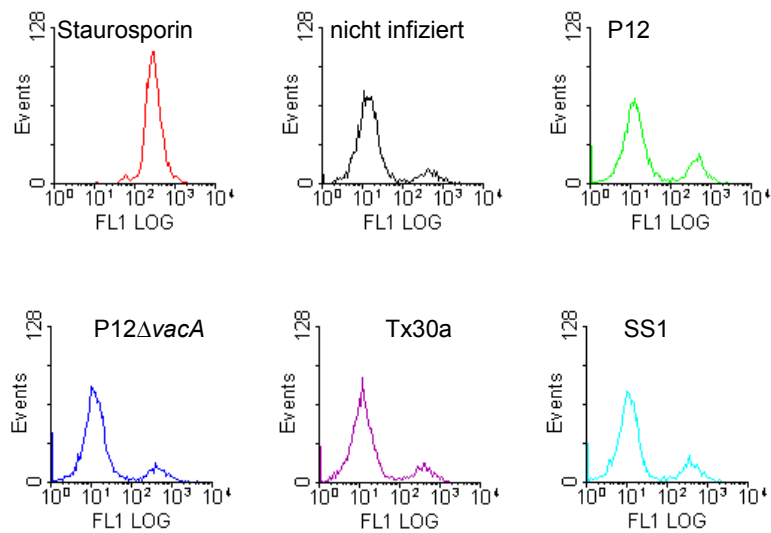
1 Apoptose

Ergänzung zu Abb. III.12: Analyse der apoptotischen Zellen nach Behandlung der Jurkat T-Zellen mit 1 μ M Staurosporin bzw. Infektion mit *H. pylori* P12, P12 Δ vacA, Tx30a oder SS1.

A 6 h Infektion



B 22 h Infektion



2 Microarray

Liste der differentiell regulierten Gene nach Behandlung der Jurkat T-Zellen mit 25 nM FK506 bzw. 1 µg/ml gereinigtem VacA-Toxin.

| Affy_ID | Genbank | Name | Expression Group | mean_Mock | mean_FK506 | mean_VacA | Ratio_FK506 | Ratio_VacA |
|-------------|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-----------|------------|-----------|-------------|------------|
| 207768_at | NM_001965.1 | early growth response 4 | 1 | 64,24 | 133,90 | 80,17 | 2,08 | 1,25 |
| 221755_at | BG334196 | Homo sapiens mRNA for FLJ00043 protein, partial cds | 1 | 68,37 | 145,40 | 88,42 | 2,13 | 1,29 |
| 203395_s_at | NM_005524.2 | hairly homolog (Drosophila) | 1 | 198,78 | 499,22 | 324,08 | 2,51 | 1,63 |
| 208071_s_at | NM_021708.1 | leukocyte-associated Ig-like receptor 1 | 1 | 51,62 | 118,93 | 91,60 | 2,30 | 1,77 |
| 205267_at | NM_006235.1 | POU domain, class 2, associating factor 1 | 2A | 1026,39 | 227,18 | 426,22 | 0,22 | 0,42 |
| 203760_s_at | U44403.1 | Src-like-adaptor | 2A | 2180,03 | 898,56 | 1180,21 | 0,41 | 0,54 |
| 201489_at | BC005020.1 | peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F) | 2A | 2281,42 | 861,30 | 1294,99 | 0,38 | 0,57 |
| 205681_at | NM_004049.1 | BCL2-related protein A1 | 2A | 862,36 | 215,84 | 495,17 | 0,25 | 0,57 |
| 206914_at | NM_019604.1 | class-I MHC-restricted T cell associated molecule | 2A | 253,27 | 83,09 | 145,77 | 0,33 | 0,58 |
| 204896_s_at | NM_000958.1 | prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4) | 2A | 527,12 | 198,50 | 309,23 | 0,38 | 0,59 |
| 207533_at | NM_002981.1 | chemokine (C-C motif) ligand 1 | 2A | 348,71 | 149,94 | 204,74 | 0,43 | 0,59 |
| 202431_s_at | NM_002467.1 | v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) | 2A | 722,84 | 282,85 | 427,63 | 0,39 | 0,59 |
| 202859_x_at | NM_000584.1 | interleukin 8 | 2A | 163,28 | 59,35 | 97,90 | 0,36 | 0,60 |
| 201490_s_at | NM_005729.1 | peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F) | 2A | 2069,02 | 837,00 | 1295,89 | 0,40 | 0,63 |
| 205599_at | NM_005658.1 | TNF receptor-associated factor 1 | 2A | 408,42 | 160,09 | 267,59 | 0,39 | 0,66 |
| 205390_s_at | NM_000037.2 | ankyrin 1, erythrocytic | 2A | 196,94 | 47,27 | 130,46 | 0,24 | 0,66 |
| 216781_at | AB051538.1 | KIAA1751 protein | 2A | 167,86 | 73,85 | 113,51 | 0,44 | 0,68 |
| 213150_at | NM_018951.1 | homeo box A10 | 2A | 244,29 | 113,51 | 165,63 | 0,46 | 0,68 |
| 205475_at | NM_007281.1 | scrapie responsive protein 1 | 2A | 76,51 | 36,52 | 52,79 | 0,48 | 0,69 |
| 205671_s_at | NM_002120.1 | major histocompatibility complex, class II, DO beta | 2A | 131,79 | 57,50 | 91,92 | 0,44 | 0,70 |
| 204952_at | NM_014400.1 | GPI-anchored metastasis-associated protein homolog | 2A | 312,99 | 146,98 | 219,09 | 0,47 | 0,70 |
| 206150_at | NM_001242.1 | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7 | 2A | 337,15 | 157,45 | 241,96 | 0,47 | 0,72 |
| 204921_at | NM_001481.1 | growth arrest-specific 11 | 2A | 481,13 | 235,35 | 346,34 | 0,49 | 0,72 |
| 220423_at | NM_012400.1 | phospholipase A2, group IID | 2A | 248,90 | 102,50 | 180,44 | 0,41 | 0,72 |
| 219580_s_at | NM_024780.1 | hypothetical protein FLJ13593 | 2A | 859,54 | 417,10 | 625,07 | 0,49 | 0,73 |
| 218983_at | NM_016546.1 | complement C1r-like proteinase precursor, | 2A | 311,94 | 119,67 | 227,01 | 0,38 | 0,73 |
| 208028_s_at | NM_003996.2 | glutathione peroxidase 5 (epididymal androgen-related protein) | 2A | 588,26 | 290,47 | 437,76 | 0,49 | 0,74 |
| 207681_at | NM_001504.1 | chemokine (C-X-C motif) receptor 3 | 2A | 84,60 | 35,25 | 63,21 | 0,42 | 0,75 |
| 211719_x_at | BC005858.1 | fibronectin 1 | 2A | 496,99 | 227,78 | 384,27 | 0,46 | 0,77 |
| 219102_at | NM_020650.1 | hypothetical protein LOC57333 | 2A | 221,69 | 108,73 | 171,62 | 0,49 | 0,77 |
| 214625_s_at | AF218033.1 | Misshapen/NIK-related kinase | 2A | 579,35 | 272,34 | 450,72 | 0,47 | 0,78 |
| 214945_at | AW514267 | KIAA0752 protein | 2A | 306,54 | 141,69 | 238,55 | 0,46 | 0,78 |
| 220875_at | NM_018576.1 | ESTs, Highly similar to AF118094_20 PRO1900 [Homo sapiens] [H.sapiens] | 2A | 199,33 | 98,36 | 156,38 | 0,49 | 0,78 |
| 217323_at | AF005487.1 | major histocompatibility complex, class II, DR beta 6 (pseudogene) | 2A | 156,09 | 73,71 | 124,48 | 0,47 | 0,80 |
| 213711_at | NM_002281.1 | keratin, hair, basic, 1 | 2A | 750,26 | 362,48 | 602,68 | 0,48 | 0,80 |
| 216328_at | AF287892 | Consensus includes gb:AF287892 /DEF=Homo sapiens sialic acid binding immunoglobulin-like lectin 8 long splice variant (Siglec8) gene, complete cds /FEA=mRNA /DB_XREF=gi:9837432 /UG=Hs.279751 sialic acid binding Ig-like lectin 8 | 2A | 725,18 | 316,93 | 585,37 | 0,44 | 0,81 |
| 214228_x_at | AJ277151 | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4 | 2A | 760,41 | 372,36 | 629,71 | 0,49 | 0,83 |
| 214567_s_at | NM_003175.1 | chemokine (C motif) ligand 2 | 2B | 769,98 | 29,34 | 72,44 | 0,04 | 0,09 |
| 206366_x_at | U23772.1 | chemokine (C motif) ligand 1 | 2B | 1086,46 | 29,34 | 149,17 | 0,03 | 0,14 |
| 204103_at | NM_002984.1 | chemokine (C-C motif) ligand 4 | 2B | 1184,97 | 68,05 | 203,94 | 0,06 | 0,17 |
| 205114_s_at | NM_002983.1 | chemokine (C-C motif) ligand 3 | 2B | 358,31 | 46,45 | 84,75 | 0,13 | 0,24 |
| 207849_at | NM_000586.1 | interleukin 2 | 2B | 102,04 | 29,34 | 29,34 | 0,29 | 0,29 |
| 209757_s_at | BC002712.1 | v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian) | 2B | 269,37 | 68,68 | 80,35 | 0,25 | 0,30 |
| 204897_at | NM_000958.1 | prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4) | 2B | 1388,10 | 542,94 | 687,83 | 0,39 | 0,50 |
| 210162_s_at | U08015.1 | nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 | 2B | 563,26 | 265,68 | 294,14 | 0,47 | 0,52 |
| 203761_at | NM_006748.1 | Src-like-adaptor | 2B | 2979,45 | 1341,35 | 1633,99 | 0,45 | 0,55 |
| 209843_s_at | BC002824.1 | SRY (sex determining region Y)-box 10 | 3 | 349,11 | 106,70 | 293,90 | 0,31 | 0,84 |
| 214292_at | AA808063 | integrin, beta 4 | 3 | 386,08 | 149,56 | 325,97 | 0,39 | 0,84 |
| 222377_at | AI674138 | ESTs, Highly similar to TX10_HUMAN T-box transcription factor TBX10 (T-box protein 10) [H.sapiens] | 3 | 385,70 | 118,13 | 327,48 | 0,31 | 0,85 |
| 207369_at | Z97632 | bombesin-like receptor 3 | 3 | 271,49 | 105,01 | 231,04 | 0,39 | 0,85 |
| 220106_at | NM_013389.1 | NPC1 (Niemann-Pick disease, type C1, gene)-like 1 | 3 | 1395,63 | 652,87 | 1195,95 | 0,47 | 0,86 |
| 209758_s_at | U37283.1 | Microfibril-associated glycoprotein-2 | 3 | 463,98 | 217,30 | 397,86 | 0,47 | 0,86 |
| 207581_s_at | NM_002367.1 | melanoma antigen, family B, 4 | 3 | 724,21 | 317,89 | 628,43 | 0,44 | 0,87 |
| 210660_at | AF025529.1 | leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 1 | 3 | 1124,19 | 465,98 | 988,00 | 0,41 | 0,88 |
| 218801_at | NM_020121.2 | UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 2 | 3 | 208,91 | 102,44 | 184,16 | 0,49 | 0,88 |
| 221163_s_at | NM_015977.1 | gb:Nm_015977.1 /DEF=Homo sapiens Williams-Beuren syndrome chromosome region 14 (WBSCR14), mRNA. /FEA=mRNA /GEN=WBSCR14 /PROD=WBSCR14 protein /DB_XREF=gi:7705745 /UG=Hs.285681 Williams-Beuren syndrome chromosome region 14 /FL=gb:AF056184.1 gb:Nm_015977.1 | 3 | 354,78 | 146,25 | 315,70 | 0,41 | 0,89 |
| 216881_x_at | X07882 | Consensus includes gb:X07882 /DEF=Human PRB4 gene for proline-rich protein Po, allele S /FEA=mRNA /DB_XREF=gi:35647 /UG=Hs.103972 | 3 | 746,02 | 308,29 | 663,85 | 0,41 | 0,89 |
| 220139_at | NM_013369.1 | DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-like | 3 | 1668,68 | 794,49 | 1485,60 | 0,48 | 0,89 |
| 219059_s_at | AL574194 | extracellular link domain containing 1 | 3 | 498,37 | 232,34 | 449,63 | 0,47 | 0,90 |
| 208100_x_at | NM_030913.1 | sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6C | 3 | 484,44 | 157,39 | 438,17 | 0,32 | 0,90 |
| 214532_x_at | AF268615.1 | Homo sapiens POU 5 domain protein (POU5FLC20) mRNA, complete cds | 3 | 791,47 | 384,53 | 718,81 | 0,49 | 0,91 |
| 203657_s_at | NM_003793.2 | cathepsin F | 3 | 472,92 | 231,73 | 431,22 | 0,49 | 0,91 |
| 219271_at | NM_024572.1 | hypothetical protein FLJ12691 | 3 | 239,78 | 89,92 | 222,57 | 0,38 | 0,93 |
| 205021_s_at | AA860806 | checkpoint suppressor 1 | 3 | 660,20 | 328,92 | 613,02 | 0,50 | 0,93 |
| 207752_x_at | NM_005039.1 | proline-rich protein BstNI subfamily 1 | 3 | 451,79 | 192,60 | 419,66 | 0,43 | 0,93 |
| 215539_at | AK021967.1 | Homo sapiens cDNA FLJ11905 fis, clone HEMBB1000050 | 3 | 556,24 | 276,12 | 519,90 | 0,50 | 0,93 |
| 207900_at | NM_002987.1 | chemokine (C-C motif) ligand 17 | 3 | 360,03 | 155,89 | 337,27 | 0,43 | 0,94 |
| 210597_x_at | K03206.1 | proline-rich protein BstNI subfamily 1 | 3 | 392,94 | 183,74 | 368,70 | 0,47 | 0,94 |

| | | | | | | | | |
|-------------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---------|--------|---------|------|------|
| 207385_at | NM_016521.1 | E2F-like protein | 3 | 968,95 | 413,59 | 918,17 | 0,43 | 0,95 |
| 215332_s_at | AW296309 | CD8 antigen, beta polypeptide 1 (p37) | 3 | 541,95 | 245,03 | 515,15 | 0,45 | 0,95 |
| 216655_s_at | AF041811.2 | ets variant gene 6 (TEL oncogene) | 3 | 135,21 | 60,48 | 128,61 | 0,45 | 0,95 |
| 201289_at | NM_001554.1 | cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 | 3 | 197,72 | 37,49 | 188,43 | 0,19 | 0,95 |
| 219610_at | NM_022448.1 | hypothetical protein FLJ21817 similar to Rhoip2 | 3 | 261,50 | 119,75 | 249,44 | 0,46 | 0,95 |
| 210475_at | L26494.1 | POU domain, class 3, transcription factor 1 | 3 | 248,09 | 35,78 | 237,02 | 0,14 | 0,96 |
| 213525_at | AC002310 | similar to hypothetical protein MGC13138 | 3 | 970,73 | 483,27 | 928,01 | 0,50 | 0,96 |
| 219327_s_at | NM_022036.1 | G protein-coupled receptor, family C, group 5, member C | 3 | 503,71 | 240,19 | 483,10 | 0,48 | 0,96 |
| 210454_s_at | U24660.1 | potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6 | 3 | 140,46 | 58,85 | 134,73 | 0,42 | 0,96 |
| 208131_s_at | NM_000961.1 | prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase | 3 | 328,96 | 154,52 | 315,92 | 0,47 | 0,96 |
| 204502_at | NM_015474.1 | SAM domain and HD domain 1 | 3 | 872,96 | 420,06 | 838,83 | 0,48 | 0,96 |
| 210335_at | AF056209.1 | peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase COOH-terminal interactor | 3 | 170,21 | 55,21 | 164,56 | 0,32 | 0,97 |
| 214788_x_at | AA731713 | KIAA0749 protein | 3 | 490,86 | 242,05 | 475,67 | 0,49 | 0,97 |
| 206243_at | NM_003256.1 | tissue inhibitor of metalloproteinase 4 | 3 | 1991,07 | 962,03 | 1932,02 | 0,48 | 0,97 |
| 222298_at | AA129909 | ESTs, Weakly similar to hypothetical protein FLJ20489 [Homo sapiens] [H.sapiens] | 3 | 995,49 | 465,23 | 973,81 | 0,47 | 0,98 |
| 219090_at | NM_020689.2 | solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 3 | 3 | 194,34 | 58,74 | 190,61 | 0,30 | 0,98 |
| 205618_at | NM_000950.1 | proline-rich Gla (G-carboxylglutamic acid) polypeptide 1 | 3 | 356,43 | 175,03 | 357,61 | 0,49 | 1,00 |
| 220318_at | NM_017957.1 | epsin 3 | 3 | 114,85 | 43,92 | 115,23 | 0,38 | 1,00 |
| 220377_at | NM_014151.1 | HSPC053 protein | 3 | 1313,81 | 636,31 | 1321,81 | 0,48 | 1,01 |
| 217459_at | AL137292.1 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434L1016 (from clone DKFZp434L1016) | 3 | 244,63 | 117,83 | 246,89 | 0,48 | 1,01 |
| 211484_x_at | AF023450.1 | Down syndrome cell adhesion molecule | 3 | 502,58 | 253,72 | 507,91 | 0,50 | 1,01 |
| 206083_at | NM_001702.1 | brain-specific angiogenesis inhibitor 1 | 3 | 928,78 | 418,79 | 938,82 | 0,45 | 1,01 |
| 203005_at | NM_002342.1 | lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3) | 3 | 857,44 | 325,69 | 873,95 | 0,38 | 1,02 |
| 205189_s_at | NM_000136.1 | Fanconi anemia, complementation group C | 3 | 745,79 | 372,00 | 768,96 | 0,50 | 1,03 |
| 208862_s_at | AW073672 | catenin (cadherin-associated protein), delta 1 | 3 | 327,74 | 135,64 | 338,38 | 0,41 | 1,03 |
| 213967_at | AI634532 | Homo sapiens clone 24468 mRNA sequence | 3 | 283,09 | 142,44 | 295,13 | 0,50 | 1,04 |
| 217409_at | Z22957.1 | myosin VA (heavy polypeptide 12, myosin) | 3 | 292,34 | 140,93 | 305,60 | 0,48 | 1,05 |
| 207669_at | NM_002282.1 | keratin, hair, basic, 3 | 3 | 275,30 | 107,53 | 290,20 | 0,39 | 1,05 |
| 215297_at | AK022806.1 | Homo sapiens cDNA FLJ31922 fis, clone NT2RP7005219 | 3 | 274,06 | 134,96 | 289,48 | 0,49 | 1,06 |
| 206122_at | NM_006942.1 | SRY (sex determining region Y)-box 15 | 3 | 225,48 | 119,38 | 239,32 | 0,53 | 1,06 |
| 215477_at | H49077 | Consensus includes gb:H49077 /FEA=EST /DB_XREF=gi:988918 /DB_XREF=est:yq18c05.s1 /CLONE=IMAGE:274160 /UG=Hs.159179 Homo sapiens mRNA sequence, IMAGE clone 446411 | 3 | 204,22 | 107,43 | 217,30 | 0,53 | 1,06 |
| 36564_at | W27419 | Homo sapiens, clone IMAGE:4447884, mRNA, partial cds | 3 | 616,77 | 286,47 | 660,67 | 0,46 | 1,07 |
| 213717_at | AA211481 | LIM domain binding 3 | 3 | 1364,36 | 614,20 | 1463,15 | 0,45 | 1,07 |
| 211336_x_at | AF009007.1 | leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1 | 3 | 519,29 | 255,92 | 559,62 | 0,49 | 1,08 |
| 206573_at | NM_004519.1 | potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 3 | 3 | 326,12 | 156,04 | 352,69 | 0,48 | 1,08 |
| 211131_s_at | AF061193.1 | ectodermal dysplasia 1, anhidrotic | 3 | 203,01 | 88,91 | 219,84 | 0,44 | 1,08 |
| 206260_at | NM_003241.1 | transglutaminase 4 (prostate) | 3 | 364,72 | 174,79 | 397,36 | 0,48 | 1,09 |
| 221134_at | NM_015985.1 | angiopoietin 4 | 3 | 338,52 | 182,87 | 370,17 | 0,54 | 1,09 |
| 205927_s_at | NM_001910.1 | cathepsin E | 3 | 403,57 | 211,51 | 442,33 | 0,52 | 1,10 |
| 217316_at | AC005255 | Consensus includes gb:AC005255 /DEF=Homo sapiens chromosome 19, CIT-HSP-146e8 /FEA=CDS_1 /DB_XREF=gi:3289998 /UG=Hs.247716 Homo sapiens chromosome 19, CIT-HSP-146e8 | 3 | 964,19 | 478,83 | 1066,86 | 0,50 | 1,11 |
| 221292_at | NM_003738.1 | patched homolog 2 (Drosophila) | 3 | 473,06 | 244,49 | 523,71 | 0,52 | 1,11 |
| 219704_at | NM_015982.1 | germ cell specific Y-box binding protein | 3 | 283,70 | 153,94 | 314,18 | 0,54 | 1,11 |
| 220854_at | NM_014123.1 | PROO246 protein | 3 | 192,65 | 51,70 | 213,42 | 0,27 | 1,11 |
| 204239_s_at | NM_005386.1 | neuronatin | 3 | 494,45 | 252,53 | 553,86 | 0,51 | 1,12 |
| 214676_x_at | AF113616 | mucin 3B | 3 | 866,02 | 449,57 | 970,16 | 0,52 | 1,12 |
| 216995_x_at | X06409.1 | v-rf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1 | 3 | 312,37 | 173,98 | 350,10 | 0,56 | 1,12 |
| 216424_at | S79267.1 | CD4 receptor (exons 1 and 2) [human, T-lymphocyte, mRNA, 3429 nt] | 3 | 360,91 | 155,83 | 405,93 | 0,43 | 1,12 |
| 220152_at | NM_024886.1 | hypothetical protein FLJ14280 | 3 | 547,58 | 290,82 | 615,98 | 0,53 | 1,12 |
| 207911_s_at | NM_004245.1 | transglutaminase 5 | 3 | 257,44 | 129,92 | 289,66 | 0,50 | 1,13 |
| 207404_s_at | NM_000865.1 | 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1E | 3 | 191,30 | 86,17 | 216,39 | 0,45 | 1,13 |
| 213415_at | AI768628 | chloride intracellular channel 2 | 3 | 252,45 | 128,12 | 286,33 | 0,51 | 1,13 |
| 206869_at | NM_001267.1 | chondroadherin | 3 | 683,00 | 377,98 | 774,71 | 0,55 | 1,13 |
| 209841_s_at | AL442092.1 | leucine-rich repeat protein, neuronal 3 | 3 | 295,30 | 164,67 | 336,54 | 0,56 | 1,14 |
| 214898_x_at | AB038783.1 | mucin 3B | 3 | 874,13 | 432,98 | 997,94 | 0,50 | 1,14 |
| 216688_at | AL137495.1 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434C2331 (from clone DKFZp434C2331) | 3 | 474,13 | 238,47 | 543,36 | 0,50 | 1,15 |
| 207281_x_at | NM_016378.1 | variable charge protein on X with two repeats | 3 | 299,92 | 144,92 | 345,52 | 0,48 | 1,15 |
| 77508_r_at | AW001436 | hypothetical protein FLJ23282 | 3 | 1724,38 | 913,90 | 2010,40 | 0,53 | 1,17 |
| 206679_at | NM_001163.1 | amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 1 (X11) | 3 | 309,63 | 180,55 | 361,74 | 0,58 | 1,17 |
| 207104_x_at | NM_006669.1 | leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1 | 3 | 477,22 | 228,69 | 559,29 | 0,48 | 1,17 |
| 206582_s_at | NM_005682.1 | G protein-coupled receptor 56 | 3 | 367,48 | 178,25 | 434,76 | 0,49 | 1,18 |
| 220665_at | NM_016383.1 | HOM-TES-85 tumor antigen | 3 | 114,96 | 66,30 | 143,16 | 0,58 | 1,25 |
| 216808_at | AL354915 | Consensus includes gb:AL354915 /DEF=Human DNA sequence from clone RP11-392A19 on chromosome 13. Contains ESTs, STSs and GSSs. Contains a novel pseudogene and a KRT18 (keratin type 1 cytoskeletal 18, cytokeratin 18) pseudogene /FEA=CDS_2 /DB_XREF=gi:101294 | 3 | 260,65 | 70,05 | 338,34 | 0,27 | 1,30 |
| 222012_at | AA535066 | hypothetical protein BC002926 | 3 | 448,74 | 157,38 | 598,89 | 0,35 | 1,33 |
| 209241_x_at | AB041926.1 | Misshapen/NIK-related kinase | 3 | 267,31 | 177,00 | 380,89 | 0,66 | 1,42 |
| 210560_at | AF118452.1 | gastrulation brain homeo box 2 | 3 | 112,32 | 64,75 | 163,30 | 0,58 | 1,45 |
| 206680_at | NM_005894.1 | CD5 antigen-like (scavenger receptor cysteine rich family) | 3 | 51,34 | 34,29 | 75,61 | 0,67 | 1,47 |
| 202897_at | AB023430.1 | protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1 | 3 | 96,78 | 77,78 | 156,67 | 0,80 | 1,62 |
| 205698_s_at | NM_002758.1 | mitogen-activated protein kinase kinase 6 | 3 | 198,91 | 158,97 | 371,24 | 0,80 | 1,87 |

Expressionswerte von 136 Genen, die statistisch signifikant (False Discovery rate $\leq 0.82\%$) differentiell um den Faktor 2 oder höher exprimiert werden. Affy_ID: Affymetrix Probe Set-Nummer; Genbank: Entsprechende GenBank/RefSeq-Zugangsnummer; Name: Gen-Name oder -Beschreibung; Expression Group: Einteilung in Expressionsgruppen (siehe III.1.9)

mean_*, Mittlerer Expressionswert (errechnet aus drei unabhängigen Experimenten) bei der angegebenen Behandlung der Zellen, Ratio: Verhältnis zwischen angegebener Behandlung und Kontrolle.

Eine Ratio < 1 zeigt eine Repression des Gens im Vergleich zur Kontrolle an, Ratio = 1 bedeutet keine Veränderung der Genexpression, Ratio > 1 zeigt eine höhere Expression des Gens im Vergleich zur Kontrolle an.

3 Abkürzungen

| | |
|------------|----------------------------------------------------------------|
| Amp | Ampicillin |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| AP-1 | Aktivator-Protein 1 |
| AS | Aminosäure(n) |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BAPTA | 1,2-Bis (2-Aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure |
| BCIP | 5-Brom-3-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CaM | Calmodulin |
| Cam | Chloramphenicol |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> , Oberflächenmarker |
| CnA | Calcineurin A |
| CnB | Calcineurin B |
| C-Terminus | Carboxyterminaler Teil eines Proteins |
| CypA | Cyclophilin A |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreit |
| dTTP | Desoxythymidintriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | Epidermaler Wachstumsfaktor |
| ELISA | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| Erm | Erythromycin |
| F | Farad |
| FACS | <i>Fluorescent activated cell sorter</i> , Durchflusszytometer |
| FCS | Fötale Kälberserum |
| FITC | Fluoreszein-isothiocyanat |
| FKBP12 | FK506-bindendes Protein 12 |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IL-2R | IL-2 Rezeptor |

| | |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-triphosphat |
| kD | Kilo-Dalton |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MOI | <i>multiplicity of infection</i> ; Anzahl der Bakterien/Viren pro Wirtszelle |
| Neo | Neomycin |
| NFAT | Nukleärer Faktor von aktivierten T-Zellen |
| NF-κB | Nukleärer Faktor kappa B |
| N-Terminus | Aminoterminaler Teil eines Proteins |
| OD ₅₅₀ | Optische Dichte bei Wellenlänge 550 nm |
| orf | Offener Leserahmen |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PAI | Pathogenitätsinsel |
| PBLC | periphere Blutlymphozyten |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PHA | Phytohämagglutinin |
| PKC | Protein-Kinase C |
| PMA | Phorbol-12-myristat-13-Acetat |
| PMN | Polymorphkernige Neutrophile |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| POX | Meerrettichperoxidase |
| P-Tyr | Phosphotyrosin |
| Rb | Retinoblastom-Protein |
| RE/AP | zusammengesetztes Element aus <i>CD28 responsive element</i> und NF-IL-2B AP-1 Stelle, Bindungsmotiv für Transkriptionsfaktoren |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin |
| Tn | Transposon |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor α |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Unit |
| WT | Wildtyp |
| α- | anti- |
| β-Gal | β-Galaktosidase |

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Bakteriologie am Max-von-Pettenkofer Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. R. Haas im Zeitraum April 2000 bis November 2003 angefertigt.

Für die unkomplizierte Übernahme der Vertretung dieser Arbeit an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanke ich mich bei Prof. Dr. A. Böck.

Daneben gilt mein Dank ganz besonders Prof. Dr. R. Haas für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, seine stete Diskussionsbereitschaft und für sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Evelyn für ihren unermüdlichen Einsatz bedanken und für ihre nahezu endlose Geduld, wenn mal alles nicht so klappte wie es sollte. Ihre Motivation hat ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Dr. Reinhard Hoffmann danke ich für die Durchführung und Auswertung der Microarray-Experimente, sowie für frühmorgendliches Blutabnehmen für anstehende Lymphozyten-Präparationen.

Wolfgang danke ich für die Mitarbeit bei der Klonierung diverser Mutanten, für hilfreiche Auskünfte bei größeren und kleineren Problemen des Laboralltags, sowie für die kritische Durchsicht dieses Manuskripts.

Bedanken möchte ich mich auch bei Klaus, der mit gerade am Anfang sehr geholfen hat, mich in die immunologische Thematik einzuarbeiten.

Für interessante Diskussionen (vor allem über den *Helicobacter pylori*-Tellerrand hinaus) und Anregungen bedanke ich mich ganz herzlich bei Luisa.

Bei allen anderen, nicht namentlich erwähnten „Hasen“ bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|---------------------|------------------------------------|
| Name | Bettina Christiane Gebert |
| Anschrift | Eichenstrasse 2c 86504 Merching |
| Geburtsdatum | 12. Februar 1975 |
| Geburtsort | München |
| Familienstand | ledig |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |

Schulische Bildung

| | |
|-------------|----------------------------------------------------|
| 1980 – 1985 | Grundschule Mering |
| 1985 – 1994 | Gymnasium Maria Stern, Augsburg, Abschluss: Abitur |

Akademische Ausbildung

| | |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nov. 1994 - Jan. 2000 | Biologie-Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität München; Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Biochemie, Pharmakologie und Toxikologie, Medizinische Mikrobiologie Diplomarbeit „Charakterisierung der Rolle der <i>cag</i> -Pathogenitätsinsel für die Interaktion von <i>Helicobacter pylori</i> mit professionellen Phagozyten“ am Max-von-Pettenkofer Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie in München unter Anleitung von Prof. Dr. R. Haas |
| April 2000 – Nov. 2003 | Promotion „Die Funktion des vakuolisierenden Cytotoxins (VacA) und die Prozessierung des Cytotoxin-assoziierten Antigens (CagA) von <i>Helicobacter pylori</i> in Immunzellen“ am Max-von-Pettenkofer Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie in München unter Anleitung von Prof. Dr. R. Haas |