

Untersuchung der immunstimulatorischen Eigenschaften des
Helicobacter-cysteine-rich protein A
(HcpA)



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der
Naturwissenschaftlichen Fakultät III
–Biologie und Vorklinische Medizin–
der Universität Regensburg

Vorgelegt von
Michael Aigner
aus Deggendorf

Regensburg, 2004

Promotionsgesuch eingereicht am: 20.12.2004

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Norbert Lehn

Prüfungsausschuss:	Vorsitz:	Prof. Dr Günther Hauska
	1. Prüfer	Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer
	2. Prüfer	Prof. Dr. Norbert Lehn
	3. Prüfer	Prof. Dr. Michael Thomm

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Prof. Dr. Norbert Lehn (als Betreuer dieser Arbeit)
2. Dr. Wulf Schneider (als Arbeitsgruppenleiter und Projektleiter SFB 585 TP B3)
3. Dr. Ludwig Deml (als Projektleiter SFB 585 TP B3)

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Michael Aigner
Regensburg, 17.12.04



Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Helicobacter pylori*
(<http://www.infek.lu.se/bakt/english/helicobacter/>)

<u>1</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	4
<u>2</u>	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	7
<u>3</u>	<u>EINLEITUNG</u>	9
<u>3.1</u>	<u>Helicobacter</u>	9
<u>3.1.1</u>	<u>Überblick</u>	9
<u>3.1.2</u>	<u>Helicobacter spp. und Wirtsorganismen</u>	9
<u>3.2</u>	<u>Helicobacter pylori</u>	11
<u>3.2.1</u>	<u>Epidemiologie</u>	11
<u>3.2.2</u>	<u>Transmission</u>	11
<u>3.2.3</u>	<u>Hp assoziierte Erkrankungen</u>	12
<u>3.2.4</u>	<u>Diagnose</u>	13
<u>3.2.5</u>	<u>Therapie</u>	14
<u>3.2.6</u>	<u>Infektionsmodelle</u>	15
<u>3.2.7</u>	<u>Molekularbiologie</u>	16
<u>3.3</u>	<u>Vorarbeiten</u>	25
<u>3.4</u>	<u>Zielsetzung</u>	27
<u>4</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	29
<u>4.1</u>	<u>Verwendete Organismen</u>	29
<u>4.1.1</u>	<u>Genotyp der verwendeten E. coli</u>	29
<u>4.1.2</u>	<u>Hp Stämme</u>	29
<u>4.1.3</u>	<u>Mäusestämme</u>	29
<u>4.1.4</u>	<u>Drosophila-Schneider-2 Zellen</u>	29
<u>4.2</u>	<u>Helicobacter</u>	29
<u>4.2.1</u>	<u>Kultivierung</u>	29
<u>4.2.2</u>	<u>Präparation von Hp Protein-Fractionen</u>	30
<u>4.2.3</u>	<u>Einfluss von Umweltbedingungen</u>	30
<u>4.3</u>	<u>Molekularbiologische Methoden</u>	30
<u>4.3.1</u>	<u>Isolation von Nukleinsäuren</u>	31
<u>4.3.2</u>	<u>DNA-Sequenzierung</u>	31

4.3.3	Reverse Transkription von RNA	32
4.3.4	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	32
4.3.5	Klonierungen	33
4.3.6	Konzentration von proteinhaltigen Lösungen	34
4.3.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	35
4.4	Immunologische Methoden	36
4.4.1	Westernblot	36
4.4.2	Immunisierungen	37
4.4.3	Antikörpertiterbestimmung	38
4.4.4	Infektionsexperimente	38
4.4.5	Stimulationsexperimente	39
4.4.6	Nachweis von Zytokinen	40
4.5	Expressionssysteme	41
4.5.1	Escherichia coli	41
4.5.2	Drosophila-Schneider-2 Zellen	42
4.6	Verwendete Programme und URLs	44
4.7	Darstellung von experimentellen Daten	44
4.8	Geräte	44
4.9	Puffer und Reagenzien	44
5	ERGEBNISSE	47
5.1	HcpA-Regulation in <i>Helicobacter pylori</i>	47
5.1.1	Bestimmung der optimalen FKS Konzentration	47
5.1.2	Wachstum von Hp 2802 unter Stressbedingungen	48
5.1.3	Expression, Transport ins Periplasma und Sekretion von HcpA	49
5.2	Expression von HcpA in Drosophila Schneider-2 Zellen	52
5.2.1	Etablierung des Expressionssystems für HcpA	52
5.2.2	Immunologische Eigenschaften von rekombinantem HcpA	55
5.3	Mechanismen der Immunstimulation durch HcpA	56
5.3.1	Kinetik der Zytokininduktion	56
5.3.2	Abhängigkeit der IFNγ Sekretion von IL-12 und IL-18	56
5.3.3	Untersuchungen an TLR4 defizienten Mäusen	58
5.3.4	Restimulation HcpA immunisierter Mäuse	61

5.3.5	Gerbil-Infektionsmodell	61
5.3.6	Untersuchung von HcpA Mutanten	70
5.3.7	Epitopemapping	73
5.3.8	Zytokininduktion aus humanen PBMCs	86
6	DISKUSSION	89
6.1	HcpA-Regulation in <i>Helicobacter pylori</i>	89
6.2	Expression von HcpA in Drosophila Schneider-2 Zellen	93
6.3	Mechanismen der Immunstimulation durch HcpA	95
6.3.1	Kinetik der Zytokininduktion	95
6.3.2	Abhängigkeit der IFNγ Sekretion von IL-12 und IL-18	96
6.3.3	Untersuchungen an TLR4 defizienten Mäusen	98
6.3.4	Restimulation HcpA immunisierter Mäuse	101
6.3.5	Gerbil-Infektionsmodell	102
6.3.6	Untersuchung von HcpA Mutanten	106
6.3.7	Epitopemapping	107
6.3.8	Zytokininduktion aus humanen PBMCs	114
7	ANHANG	I
7.1	Eigene Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	I
7.1.1	Veröffentlichungen	I
7.1.2	Kongressbeiträge	I
7.2	Verzeichnisse	III
7.2.1	Abbildungsverzeichnis	III
7.2.2	Tabellenverzeichnis	IV
7.2.3	Literaturverzeichnis	V
8	DANKSAGUNG	XLVI

1 Zusammenfassung

Helicobacter pylori (Hp) ist ein gramnegatives Bakterium, das den menschlichen Magen kolonisiert und dabei obligatorisch eine chronische Gastritis induziert. Die Immunreaktion des Wirts besteht immer in der Bildung einer Entzündungsreaktion, die von T-Helfer-Zellen des Typs I (TH1) geprägt wird. Trotz dieser Immunreaktion persistiert das Bakterium ohne antibiotische Behandlung im Normalfall lebenslang. Diese in der Regel asymptomatische Gastritis kann in Abhängigkeit von Wirtsfaktoren wie Interleukin (IL)-1 β Polymorphismen, Hp Virulenzfaktoren wie CagA, VacA oder BabA und Ernährungsgewohnheiten wie vitaminarmer, salzreicher Ernährung verschiedene klinische Manifestationen erreichen. Die Infektion mit Hp kann chronische aktive oder atrophische Gastritiden, peptidische Magengeschwüre und MALTome auslösen. Eine der Grundlagen der Entzündungsreaktion ist das sich im Magen ausbildende Zytokinmilieu, für dessen Polarisierung Interferon γ (IFN γ) als Leitzytokin der TH1 Immunantwort von großer Bedeutung ist.

Helicobacter-cysteine-rich-protein A (HcpA) ist ein von Hp aktiv sezerniertes Protein, das im Rahmen von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe als neuer, immunstimulatorisch wirkender Virulenzfaktor beschrieben wurde. HcpA gehört einer nur in *Helicobacter*, *Campylobacter* und *Wolinella* vorkommenden Familie paraloger Proteine an. Die Stimulation von Splenozyten-Einzelzellsuspensionen aus naiven Mäusen mit in *E. coli* rekombinant exprimiertem HcpA konnte eine der Ko-Kultur mit lebendem Hp vergleichbare Zytokinfreisetzung, insbesondere des entzündungsfördernd wirkenden IFN γ , induzieren. Neben dieser direkten Aktivierung des angeborenen Immunsystems konnten durch serologische Untersuchungen von Hp infizierten Patienten hohe α HcpA Antikörpertiter nachgewiesen werden, was sowohl auf die Expression als auch die Antigenität von HcpA im Rahmen der natürlichen Besiedelung des Magens durch Hp hinweist.

Aufbauend auf diesen Vorarbeiten sollten in dieser Arbeit weitergehende Untersuchungen zur Rolle der Expression und Sekretion von HcpA unter diversen Umweltfaktoren durchgeführt werden. Darüber hinaus sollte ein für Hp Proteine bisher noch nicht verwendetes Protein-Expressionssystem auf der Basis stabil transfizierter Insektenzellen etabliert werden, um sicherzustellen, dass das auf diese Weise gewonnene rekombinante HcpA nicht durch bakterielles LPS kontaminiert ist. Unter Verwendung von LPS-freiem HcpA sollte der Mechanismus der HcpA-abhängigen Immunstimulation in Maus-Splenozyten untersucht und aufgeklärt werden. Hierzu sollte die Bedeutung von Zytokinen, die in der immunologischen Signalkaskade der Sekretion von IFN γ vorgeschaltet sind, untersucht werden, sowie

der putative Rezeptor der HcpA vermittelten Immunantwort identifiziert werden. Zusätzlich sollte durch Verwendung von HcpA-Mutanten die Aufklärung immunologisch relevanter Protein-Abschnitte erfolgen. Die im Maus-Splenozytenmodell beschriebenen immunstimulatorischen Eigenschaften von HcpA auf das angeborene Immunsystem sollten schließlich durch entsprechende Versuche mit humanen PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) auf ihre Übertragbarkeit für das humane angeborene Immunsystem überprüft werden. Aufgrund der nachgewiesenen Antigenität von HcpA sollte der Versuch unternommen werden, in verschiedenen Spezies Epitope für die Antikörperbindung und T-Helferzell-Aktivierung zu identifizieren.

Die meisten der bisher als Modellorganismen für die Hp Pathogenese verwendeten Mausstämme bilden nach Infektion mit Hp keine ausgeprägte Gastritis aus, daher sollte im Hp Infektionsmodell der mongolischen Wüstenrennmaus (Gerbil) der Einfluss einer HcpA Impfung auf die Protektion vor einer Hp induzierten Gastritis ermittelt werden. In diesem Zusammenhang sollte auch eine eventuelle Modulation des lokalen Zytokinmilieus im Magen nach Impfung und anschließender Hp Infektion mittels quantitativer PCR-basierter Genexpressions-Analysen untersucht werden.

Die Untersuchungen zur Expression und Sezernierung von HcpA unter verschiedenen Stimulationsbedingungen ergaben, dass die meisten verwendeten Stimuli keine wesentlichen regulativen Effekte zur Folge hatten. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Expression von HcpA einer Negativregulation durch Nickel-Ionen unterlag, und unabhängig davon die Zugabe Fe^{2+} eine Verminderung der Sekretion von HcpA zur Folge hatte.

Die Expression von rekombinantem HcpA mittels einer stabil transfizierten Drosophila-Schneider-2 Zelllinie (DS-2) konnte erfolgreich etabliert werden. Das DS-2 System erlaubte die Expression großer Mengen von LPS-freiem rekombinantem HcpA, das im wesentlichen die gleichen immunstimulatorischen Eigenschaften wie in *E. coli* rekombinant exprimiertes HcpA aufwies.

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die HcpA induzierte $\text{IFN}\gamma$ Produktion entscheidend von IL-12 und in geringerem Ausmaß von IL-18 abhängig ist. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Erkennung von HcpA durch das Immunsystem und die darauffolgende $\text{IFN}\gamma$ Sekretion über einen direkten oder indirekten Mechanismus vom Vorhandensein eines funktionsfähigen *Toll-like Receptor 4* (TLR4) abhängig ist. Durch Stimulation von murinen Splenozyten mit in definierten Proteinabschnitten verändertem HcpA konnten außerdem Domänen des Proteins ermittelt werden, die für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems

besonders wichtig zu sein scheinen. Bei der Untersuchung der immunstimulatorischen Eigenschaften von rekombinantem HcpA mit humanen PBMCs zeigte sich, dass HcpA auch in diesem humanen System eine starke Aktivierung des angeborenen Immunsystems hervorrufen konnte. Nach Stimulation mit HcpA konnte eine deutlich erhöhte Produktion von $\text{IFN}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ nachgewiesen werden.

Die Etablierung des Gerbilmodells für die Untersuchungen zur Hp induzierten Gastritis nach Immunisierung mit HcpA und nachfolgender Belastung im Infektionsmodell zeigte deutlich erhöhte Zytokinwerte für $\text{IFN}\gamma$, IL-12 und $\text{TNF}\alpha$ in den Mägen der mit HcpA immunisierten Gerbils. Darüber hinaus konnte aber kein Einfluss der HcpA Immunisierung auf den Grad der Gastritis oder der Kolonisation der Gerbil-Mägen durch Hp festgestellt werden.

Mittels überlappender Proteinfragmente, die das ganze HcpA-Protein abbildeten, konnten immunologisch relevante Abschnitte des HcpA Proteins ermittelt werden, die ein *major* B-Zell Epitop und ein T-Zell Epitop enthielten. Hier zeigten sich interessanterweise deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Spezies.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die Expression und Sekretion von HcpA unter physiologischen Bedingungen erstmals untersucht und beschrieben. Die Aufklärung der durch HcpA induzierten Kaskade, die zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems im Mausmodell als auch in humanen PBMC führt, konnte die Bedeutung von HcpA als immunologischem Virulenzfaktor weiter untermauern. Die Identifizierung von B- und T-Zellepitopen ist eine wichtige Voraussetzung für sich jetzt anschließende Untersuchungen zur Entwicklung einer HcpA-basierten, protektiven Vakzinierungsstrategie. Der Befund, dass HcpA über den TLR4 seine Aktivierung des angeborenen Immunsystems direkt oder indirekt vermittelt, stellt ein weiteres zukunftsweisendes Ergebnis dieser Arbeit dar. Der Nachweis einer starken Immunaktivierung durch HcpA in humanen PBMCs zeigt erstmalig, dass die bisher nur im Maus-System beschriebenen immunmodulierenden Eigenschaften von HcpA voll auf den Menschen übertragbar zu sein scheinen. Insgesamt konnte die Arbeit damit einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis eines neuen immunologisch wirkenden Virulenzfaktors von Hp leisten.

2 Abkürzungsverzeichnis

Alum	Aluminium-Hydroxid
APC	<i>Antigen presenting cells</i>
<i>aphA-3</i>	Gen, das Kanamycinresistenz vermittelt
AS	Aminosäure(n)
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BB	Brucella Bouillon
bp	Basenpaare
<i>cag</i>	<i>cytotoxicity associated gene</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFU	<i>Colony forming units</i>
DC	Dendritische Zelle
DENT	Antibiotikamix aus Vancomycin, Trimethoprim, Cefsulodin und Amphotericin B
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FISH	Floureszente <i>in situ</i> Hybridisierung
FKS	Fötales Kälberserum
Hcp	<i>Helicobacter cysteine-rich protein</i>
Hp	<i>Helicobacter pylori</i>
HRP	<i>Horse-Radish</i> Peroxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid Synthetase
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
KANA	Kanamycin
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	Mukosa assoziiertes lymphatisches Gewebe
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MW	Molekulargewicht
NK	Natürliche Killerzellen
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
OMP	<i>Outer membrane protein</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese

PAI	Pathogenitätsinsel
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBP	Penicillin Binde-Protein
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
p.i.	<i>post infectionem</i>
PMA	Phorbol-Myrstitinsäure
PPI	Protonen-Pumpen Inhibitor
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp., spp.	Spezies (Singular, Plural)
TCR	<i>T-Cell Receptor</i>
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
üN	über Nacht
WC	Wilkins Chalgren
α X	anti-X

3 Einleitung

3.1 Helicobacter

3.1.1 Überblick

Das Vorkommen von spiraligen Organismen im Magen wurde erstmals 1893 beschrieben und geriet anschließend wieder in Vergessenheit, da unter den damaligen Bedingungen eine Kultivierung dieses Organismus nicht möglich war (Bizzozero, 1893). Erstmals 1982 gelang die erfolgreiche Anzucht des zuerst als *Campylobacter pyloridis* beschriebenen Bakteriums (Warren *et al.*, 1983). Bei weiteren Untersuchungen wurde klar, dass der neu beschriebene Organismus einer eigenen, neuen Bakteriengattung angehört und wurde daraufhin als *Helicobacter pylori* in einen eigenen Genus ausgegliedert (Romaniuk *et al.*, 1987). *Helicobacter* bezeichnet somit eine relativ junge Gattung von gram-negativen, mikroaerophilen, spiralig gekrümmten, begeißelten Bakterien. Diese sind taxonomisch dem Ast der ϵ -Proteobakterien zugeordnet, und bilden u.a. zusammen mit den nahe verwandten Gattungen *Campylobacter*, *Wolinella* und *Arcobacter* die Ordnung der *Campylobacterales*. *Helicobacter sp.* kolonisieren den Magen, Darm und die Gallengänge vieler Säugerspezies (Marshall, 2002). Der wichtigste Vertreter dieser Gattung ist *Helicobacter pylori* (Hp), da dieser den menschlichen Magen infiziert und eine chronisch persistierende Gastritis auslöst (Blaser *et al.*, 2004). Damit ist Hp der Verursacher der am weitesten verbreiteten chronischen bakteriellen Infektion des Menschen (Moss *et al.*, 2003). Der inzwischen allgemein akzeptierte Zusammenhang zwischen einer Hp Infektion und der Bildung von malignen Veränderungen im Magen führte zur Einstufung von Hp als Klasse I Kanzerogen durch die WHO (Anonym, 1994).

3.1.2 *Helicobacter spp.* und Wirtsorganismen

Seit der Neuschaffung des Genus *Helicobacter* konnten viele neue *Helicobacter spp.* identifiziert werden, die eine ebensogroße Vielzahl von Wirtsorganismen infizieren. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die bisher bekannten Spezies und ihre Wirte. Je nach der Lokalisation der *Helicobacter* Infektion im Wirt sind die *Helicobacter spp.* in gastrische oder enterohepatische *Helicobacter* untergliedert. Es zeigt sich, dass viele Säugerspezies jeweils von eigenen, spezifischen *Helicobacter spp.* infiziert werden können, jedoch ein und dieselbe *Helicobacter sp.* mehrere Wirtspezies infizieren

Spezies	Wirt	gastrisch	enterohepatisch
Candidatus <i>H. bovis</i>	Rind	X	
Candidatus <i>H. suis</i>	Schwein	X	
<i>H. acinonychis</i>	Schimpanse, Tiger	X	
<i>H. aurati</i>	Syrischer Hamster	X	
<i>H. bilis</i>	Maus		X
<i>H. bizzozeronii</i>	Mensch, Hund	X	
<i>H. canadensis</i>	Mensch		X
<i>H. canis</i>	Hund, Bengalische Katzen		X
<i>H. cholecystus</i>	Syrischer Hamster		X
<i>H. cinaedi</i>	Mensch, Hund, Katze, Maus, Hamster		X
<i>H. cinaedi/mainz</i>	Schwein		X
<i>H. felis</i>	Katze, Hund	X	
<i>H. fennelliae</i>	Mensch		X
<i>H. ganmani</i>	Maus		X
<i>H. heilmannii</i> type 1/2	Schwein, Mensch	X	
<i>H. hepaticus</i>	Maus		X
<i>H. mainz</i>	Mensch		X
<i>H. mesocricetorum</i>	Syrischer Hamster		X
<i>H. muridarum</i>	Maus	X	
<i>H. mustelae</i>	Frettchen	X	
<i>H. nemestrinae</i>	Makake	X	
<i>H. pametensis</i>	Seeschwalben, Schwein		X
<i>H. pullorum</i>	Mensch, Geflügel		X
<i>H. pylori</i>	Mensch	X	
<i>H. rodentium</i>	Maus		X
<i>H. salomonis</i>	Hund, Katze	X	
<i>H. sp. flexispira</i>	Hund, Mäuse, Schwein		X
<i>H. spp.</i>	Beuteltiere	?	?
<i>H. spp.</i>	Delphine	X	
<i>H. spp.</i>	Lisztaffe		X
<i>H. suncus</i>	Moschusspitzmaus	X	
<i>H. trogonum</i>	Ratte		X
<i>H. typhlonius</i>	Maus		X
<i>H. westmeadii</i>	Mensch		X
<i>H. winghamensis</i>	Mensch		X

Tabelle 1: *Helicobacter spp.* und Wirtsorganismen

Bisher entdeckte *Helicobacter spp.* und Wirte. Vermutlich kolonisieren *Helicobacter spp.* den Magen aller Säuger. Daten von der *Helicobacter* speziez Database (<http://www.infek.lu.se/bakt/english/helicobacter/hag.html>).

kann (z.B. *H. cinaedi*). Der Nachweis von *Helicobacter spp.* in Vögeln zeigt die weite Verbreitung dieser Bakteriengattung, sodass mittlerweile angenommen wird, dass jede höhere Tierspezies durch eine „eigene“ *Helicobacter sp.* infiziert sein könnte (Dewhirst *et al.*, 1994; Stanley *et al.*, 1994).

3.2 *Helicobacter pylori*

3.2.1 Epidemiologie

Blaser (1998) zeigte, dass eine Besiedlung mit *Helicobacter sp.* Teil der natürlichen Bakterienflora des Menschen ist. So kann man Hp Infektionen weltweit nachweisen, die Prävalenz jedoch schwankt zwischen verschiedenen Ländern und innerhalb verschiedener Populationen einzelner Länder stark (Suerbaum *et al.*, 2002), ist aber gut mit den sozioökonomischen Bedingungen korrelierbar (Malaty *et al.*, 1994). Die Infektionsrate bei Erwachsenen mittleren Alters beträgt in Entwicklungsländern über 80 Prozent, in Industrienationen 20 bis 50 Prozent der Bevölkerung (Suerbaum *et al.*, 2002). Malaty *et al.* (2002) konnte durch eine Langzeitstudie an US-amerikanischen Kindern zwischen 1975 und 1995 zeigen, dass im Alter von 4 bis 5 Jahren die Serokonversionsrate am höchsten ist. Der Zeitpunkt der erstmaligen Infektion mit Hp ist daher während der frühen Kindheit wahrscheinlich. Die Prävalenz von Hp Infektionen ging im Laufe der letzten Jahrzehnte in den Industrienationen dramatisch zurück (Mitchell *et al.*, 2002). Die Anwendung mathematischer Modelle zur Vorhersage von Prävalenzraten in den USA zeigte, dass die im 19. Jhd. beginnende Verbesserung der sanitären Situation einen bis heute anhaltenden Rückgang der Hp Transmissionsrate zufolge hatte, der im Laufe der nächsten 100 Jahre zu der Eliminierung von Hp aus der Bevölkerung der USA führen wird (Rupnow *et al.*, 2000).

3.2.2 Transmission

Die Primär-Infektion mit Hp erfolgt meist im Kindesalter durch orale Aufnahme des Bakteriums (Rowland *et al.*, 1999). Es wird angenommen, dass die Übertragung durch direkten Kontakt zu Erbrochenem, Speichel oder Fäkalien infizierter Personen erfolgt (Parsonnet *et al.*, 1999). Eine intrafamiliäre Übertragung ist wahrscheinlich, wobei einer vorliegenden Hp Infektion der Mutter eine höhere Bedeutung als der Infektion des Vaters zukommt (Tindberg *et al.*, 2001). Mögliche Übertragungswege sind das Stillen (Kitagawa *et al.*, 2001), sowie die Übertragung der oralen Bakterienflora, in der Hp nachgewiesen werden konnte (Karczewska *et al.*, 2002). Eine Übertragung durch Hp im Trinkwasser scheint nur in Entwicklungsländern von Bedeutung zu sein (Goodman *et al.*, 1996), obwohl auch in Industrienationen ein Zusammenhang zwischen der Art der Trinkwasserversorgung und Hp Infektionen

dokumentiert werden konnte (Rolle-Kampczyk *et al.*, 2004). Diskutiert wird auch eine zoonotische Transmission, da Hp gelegentlich in verschiedenen Tierspezies wie z.B. Schafen und Hauskatzen nachgewiesen werden konnte (Handt *et al.*, 1994). Eine Korrelation zwischen der Häufigkeit des Kontakts sowohl mit Haus- als auch Nutztieren und der Infektionsrate mit Hp konnte jedoch nicht gezeigt werden (Brown *et al.*, 2002). Die Möglichkeit, dass Hp sexuell übertragen werden könnte, war Gegenstand mehrerer Metastudien von Eslick *et al.* und konnte nicht ausgeschlossen werden (Eslick, 2004; Eslick, 2002; Eslick, 2000).

3.2.3 Hp assoziierte Erkrankungen

Die Infektion mit Hp wird mit vielen Folgeerkrankungen assoziiert. Eindeutige Zusammenhänge sind vor allem für Erkrankungen des Verdauungstraktes erwiesen. So führt die Infektion des menschlichen Magens mit Hp immer zu einer Gastritis. Die Ausprägung dieser Gastritis kann jedoch von einer oberflächlichen, asymptomatisch verlaufenden Gastritis bis hin zur Entstehung von Ulzera reichen (Dooley *et al.*, 1989; Marshall, 2002). Einige Hp infizierte Individuen entwickeln über Dys- und Metaplasien des Magenepithels auch Karzinome bzw. Lymphome des Mukosa-assoziierten-Gewebes (MALTome) (Parsonnet *et al.*, 1994; Wotherspoon, 1998). Eine graphische Übersicht über die Verteilung dieser Erkrankungen in der Normalbevölkerung und der Hp positiven Population ist in Abbildung 1 gezeigt.

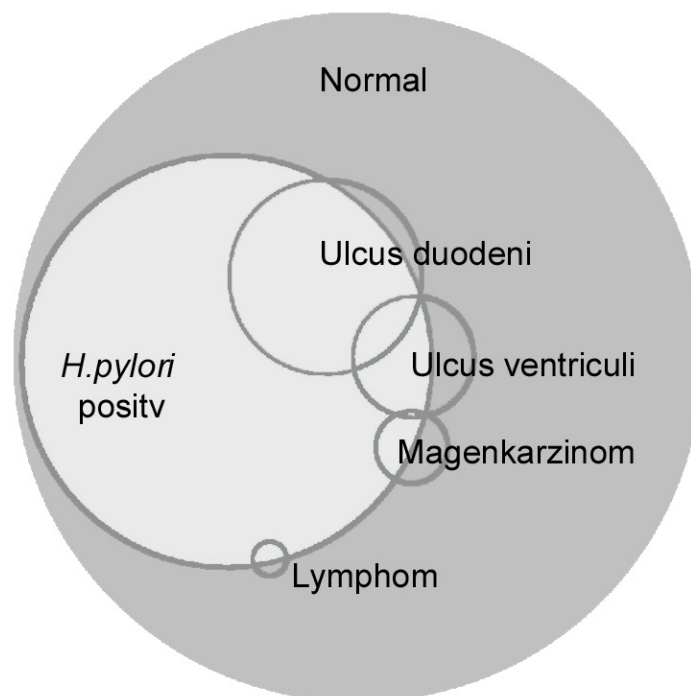


Abbildung 1: Epidemiologie und Hp assoziierte Krankheiten
Dargestellt ist die Verteilung von Ulcus duodeni, Ulcus ventriculi, Magen-Karzinomen und -Lymphomen in der Normalbevölkerung und unter der Hp-infizierten Population. Die meisten Patienten, die die genannten Krankheiten entwickeln, sind Hp positiv, während in der Normalbevölkerung diese Erkrankungen eher selten auftreten. Abbildung nach (Marshall, 2002).

Eine Vielzahl von Erkrankungen, die nicht direkt die Verdauungsorgane betreffen wurde ebenfalls mit dem Vorliegen einer Hp Infektion in Verbindung gebracht. Dazu gehören Gefäßerkrankungen (z.B. ischämische Herzerkrankungen), Atemwegs-Erkrankungen (z.B. Lungentuberkulose, Lungenkrebs, Asthma), Hautkrankheiten (z.B. Rosacea, Alopecia areata) und verschiedene Autoimmunerkrankungen (z.B. Schoenlein-Henoch Syndrom, autoimmun-Thyroiditis) (de Lees *et al.*, 2002; Roussos *et al.*, 2003; Realdi *et al.*, 1999). Auch Leberzirrhose, Wachstumsstörungen, chronische idiopathische Sideropenie, der plötzliche Säuglingstod und Diabetes mellitus werden im Zusammenhang mit Hp diskutiert (Gasbarrini *et al.*, 1999).

Eventuelle protektive Effekte der Hp Infektion sind jedoch nicht ausgeschlossen. Eine vorliegende Hp Infektion könnte möglicherweise vor Reflux-Ösophagitis, sowie dem Barrett-Syndrom und Adenokarzinomen des Ösophagus schützen oder die Inzidenz dieser Erkrankungen senken (Peek, Jr. *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2003; Loffeld *et al.*, 2004; Abe *et al.*, 2004).

3.2.4 Diagnose

Der eindeutigste Nachweis einer Hp Infektion erfolgt auch heute noch durch einen erfolgreichen histologischen Nachweis von Hp in Magenbiopsiematerial. Nur die Anzucht des Bakteriums stellt eine der Histologie ebenbürtige Nachweismethode dar. Anhand einer Bakterienkultur können sämtliche diagnostische Fragestellungen wie Antibiotikaresistenzen, Wachstumsverhalten und biochemische Eigenschaften, beantwortet werden (Makristathis *et al.*, 2004). Auch die Untersuchung neuer antimikrobieller Wirkstoffe und biologischer Interaktionen basiert auf vorliegenden Hp-Kulturen (Takabayashi *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004b; Canizares *et al.*, 2004). Obwohl die Anzucht von Hp aus Stuhl und Erbrochenem gelegentlich erfolgreich ist (Liang *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2004b), sind invasive Methoden, wie die Gewinnung von Biopsiematerial während einer Gastroskopie, die zuverlässigsten Quellen für eine Hp Kultur (Makristathis *et al.*, 2004; Leong *et al.*, 2003).

Molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Hp haben in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Die Durchführung von Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) zur Amplifikation von spezifischer DNA erlaubt die z.B. die Unterscheidung von Hp und *Helicobacter sp.* (Chisholm *et al.*, 2003). Durch die Analyse von PCR-Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) sind Aussagen über das Resistenzverhalten gegenüber Clarithromycin möglich, da dieses auf einer Punktmutation der 23S rRNA beruht (Martin-Araguz *et al.*, 2004). Die Verwendung von DNA-Sonden zur *Flourescence in situ* Hybridisierung (FISH) ermöglicht ebenfalls die akkurate Detektion von Hp DNA, sowie den Nachweis Clarithromycin-resistenter Hp Genotypen in Magenbiopsien (Rüssmann *et al.*, 2003). In zunehmenden Maß findet die *real-time PCR* Verwendung in der Hp Diagnostik. Durch kurze

Bearbeitungszeit, hohe Spezifität und die Möglichkeit des Resistenznachweises weist diese Methode viele Vorteile auf (Makristathis *et al.*, 2004). Eine Studie konnte sogar zeigen, dass die RT-PCR höhere Sensitivität als der Hp Nachweis durch Kultur oder Histologie aufweist (Lascols *et al.*, 2003).

Der serologische Nachweis von α Hp Antikörpern im Blut Infizierter stellt eine weitere einfache und verlässliche Methode der Hp-Diagnose dar. Dabei ist jedoch die Auswahl der untersuchten Antigene sowie die Prävalenz in der Patientenpopulation von entscheidender Bedeutung für die Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse (Nurgalieva *et al.*, 2003; Makristathis *et al.*, 2004), da lokale Variationen der untersuchten Antigene auftreten können, sich z.B. ostasiatische Hp-Stämme von westlichen unterscheiden (Graham *et al.*, 2004a). Außerdem ist die Serologie zur Überprüfung von Therapieerfolgen nur wenig geeignet, sowie bei Kleinkinder nicht verlässlich (Suerbaum *et al.*, 2002).

Besser geeignet zur Kontrolle einer Hp-Eradikation ist der Stuhl-Antigentest, wenn er 5-8 Wochen nach Therapieende durchgeführt wird (Suerbaum *et al.*, 2002; Nurgalieva *et al.*, 2003). Dieser nichtinvasive Test weist mittels ELISA das Vorliegen von Hp spezifischen Antigenen im Stuhl nach (Carvalho Costa *et al.*, 2003; Oderda *et al.*, 2000). Eine weitere nichtinvasive Methode zur Diagnose einer Hp-Infektion ist der Urea-Atem-Test. Dieser beruht auf der enzymatischen Spaltung von ^{13}C oder ^{14}C markiertem Harnstoff durch die Hp-Urease in NH_3 und CO_2 . Der Patient trinkt dabei eine Harnstoff/Citrat Lösung. Im positiven Fall erfolgte der Nachweis von $^{13}\text{CO}_2$ bzw. $^{14}\text{CO}_2$ nach 10-20 Minuten in der Atemluft (Israeli *et al.*, 2003). Jedoch konnte gezeigt werden, dass bei Einnahme von Protonenpumpenhemmern der Atem-Test auch zu falsch negativen Resultaten führen kann (Graham *et al.*, 2004a).

3.2.5 Therapie

Üblicherweise wird die Hp Infektion durch eine „Tripeltherapie“, d.h. einer Kombination eines Protonenpumpen-Inhibitors (PPI) und zwei Antibiotika eradiziert (Suerbaum *et al.*, 2002). Gängige PPI sind dabei Benzimidazol-Derivate wie Omeprazol und Lansoprazol, es finden jedoch auch Histamin H_2 -Rezeptor Antagonisten wie Ranitidine Verwendung. Als Antibiotika werden hauptsächlich Clarithromycin, Amoxicillin und Metronidazol eingesetzt. Dabei sind ca. 90% der Therapien erfolgreich (Bayerdörffer *et al.*, 2004). Die Dauer der Antibiotikatherapie ist unterschiedlich, so wird in Europa meist eine 7-tägige Behandlung vorgezogen, während in den USA eine Therapiedauer von 14 Tagen vorherrscht (Bazzoli, 2001). Eine Meta-Studie konnte zeigen, dass durch die längere Behandlungsdauer eine um 7 bis 9 Prozentpunkte bessere Eradikationsrate erreicht werden kann (Calvet *et al.*, 2000). Bei Vorliegen einer Clarithromycin- oder Metronidazolresistenz sinkt die

Eradikationsrate auf ca. 50% ab (Dore *et al.*, 2000). Die Resistenzraten von Hp sind stark von eventuellen vorherigen, nicht erfolgreichen Therapien abhängig. So steigt die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines Metronidazol-resistenten Hp Stammes von 25% ohne vorherige Therapie auf 97% nach zwei erfolglosen Therapien an, für Clarithromycin von 3% auf 56% (Bayerdörffer *et al.*, 2004). Lediglich gegen Amoxicillin ist bisher keine Resistenzentwicklung zu beobachten. Für die Behandlung von Therapieversagern stehen heute Reservetherapien zur Verfügung. Die sogenannte Quadrupeltherapie, die aus einem PPI zusammen mit Wismutcitrat, Metronidazol und Amoxicillin besteht, war zu 89% auch bei Patienten erfolgreich, die mit Methronidazol-resistenten Hp infiziert waren (de Boer *et al.*, 1995). Die Hochdosis-Dualtherapie mit Omeprazol und Amoxicillin konnte doppelt-resistente Hp Stämme zu mehr als 80% eradizieren (Miehlke *et al.*, 2003).

Die zunehmende Resistenzentwicklung macht die Entwicklung eines Impfstoffs gegen Hp wünschenswert, der sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch eingesetzt werden könnte. In Tiermodellen sind bereits einige wenige Vakzinekandidaten erprobt worden, jedoch geht die Immunisierung mit zum Teil gravierenden Nebenwirkungen einher, sodass an einen Einsatz in der klinischen Praxis noch nicht zu denken ist (Kotloff *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2003).

3.2.6 Infektionsmodelle

Zur Untersuchung der Hp Infektion werden verschiedene Organismen verwendet. Aufgrund der guten Verfügbarkeit werden verschiedenste Stämme der Haus-Maus *Mus musculus* verwendet. Dieses Tiermodell bietet den Vorteil, dass *Mus sp.* immunologisch und molekularbiologisch hervorragend charakterisiert ist, was unter anderem durch die Komplettssequenzierung des Mausgenoms bedingt wurde (Okazaki *et al.*, 2002). Die immunologische Untersuchung von Hp im Mausmodell wird durch das Vorhandensein vieler definierter *knock-out* Mutanten erheblich erleichtert. So existieren Mäuse, die bestimmte Zytokine wie Interleukin (IL) 12 (Hoffman *et al.*, 2003) und Interferon γ (IFN γ) (Panthel *et al.*, 2003; Obonyo *et al.*, 2002), Rezeptoren wie den *Toll-like-receptor* (TLR) 4 (Poltorak *et al.*, 1998) oder Proteine immunologischer Signalkaskaden wie MyD88 (Michelsen *et al.*, 2004) nicht mehr funktionell exprimieren können, sowie Mäuse mit schweren, kombinierten Immundefekten (*severe combined immune deficiency* = SCID) (Eaton *et al.*, 2004). Auch die mongolische Wüstenrennmaus der Art *Meriones unguiculatus* (Gerbil) ist ein geeigneter Modellorganismus, da sich nach Infektion mit Hp reproduzierbar eine Entzündung des Magens mit Ulzera und sogar Karzinomen entwickeln und Gerbils damit eine der humanen Situation vergleichbare Pathogenese der Gastritis

aufweisen (Wirth *et al.*, 1998; Kavermann *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2004). Probleme des Gerbilmodells sind vor allem die geringe Verfügbarkeit von Reagenzien zur molekularbiologischen und immunologischen Untersuchung (Crabtree *et al.*, 2004; Takashima *et al.*, 2001). Zusätzlich weisen Gerbils mindestens einen Unterschied zur bekannten Mausimmunologie auf. So ist die Antikörperproduktion nach Immunisierung im Gerbil derer in CD5⁺ B-Lymphozyten defizienten Mäusen vergleichbar (Mohanty *et al.*, 2002). Möglicherweise bestehen auch noch weitere, bisher unbekannte immunologische Unterschiede zwischen Maus und Gerbil.

Selten werden auch Rhesusaffen (*Macaca mulatta*), Beagles (*Canis familiaris*), Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) oder Ferkel (*Sus scrofa*) als Tiermodelle eingesetzt (Solnick *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2004; Schreiber *et al.*, 2003; Sjunnesson *et al.*, 2003; Akopyants *et al.*, 1995; Krakowka *et al.*, 1991).

Da zur Untersuchung der protektiven Immunisierung gegen Hp bisher keine vollständig verlässlichen Tiermodelle entdeckt wurden, wurden in verschiedenen Studien freiwillige menschliche Probanden mit oder ohne vorhergehende Immunisierung mit Hp infiziert (Kotloff *et al.*, 2001; Graham *et al.*, 2004b).

3.2.7 Molekularbiologie

3.2.7.1 Hp Genom

Das Hp Genom umfasst 1,65 Millionen Basenpaare und kodiert für annähernd 1500 Proteine. Gegenwärtig sind die Genome zweier Hp Stämme vollständig sequenziert (Alm *et al.*, 1999a; Tomb *et al.*, 1997). Dadurch war die Identifikation von etwa 350 Hp spezifischen Genen und ca. 100 stammspezifischen Genen möglich (Ge *et al.*, 1999). Da Hp bezüglich der Aufnahme von DNA natürlich kompetent ist, unterliegt das Genom von Hp während der Infektion einer ständigen Variation durch horizontalen Gentransfer aus anderen, gleichzeitig kolonisierenden Hp Stämmen (Falush *et al.*, 2001; Suerbaum *et al.*, 1998).

3.2.7.2 Immunologische Aspekte

3.2.7.2.1 Angeborene und erworbene Immunantwort

Die Immunreaktion nach Hp-Infektion kann in die angeborene und die erworbene Immunantwort unterteilt werden. Bei der angeborenen Antwort handelt es sich um einen schnellen, unspezifischen Prozess, während dessen vom Immunsystem des Wirtes als fremd erkannte bakterielle Moleküle zur Auslösung von immunologischen Signalkaskaden und der Abtötung von Bakterien führen (Prinz *et al.*, 2003). Die

Erkennung erfolgt dabei u.a. durch die *Toll-like-Rezeptoren* (TLR), die von *antigen-presenting-cells* (APCs) wie Makrophagen und dendritischen Zellen, aber auch von Magenepithelzellen exprimiert werden (Medzhitov, 2001; Schmausser *et al.*, 2004; Smith, Jr. *et al.*, 2003). Der Kontakt von bakteriellen Komponenten mit TLRs induziert die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 , IL-10 und IL-12 (Prinz *et al.*, 2003; Kranzer *et al.*, 2004). Diese führen zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, gefolgt von der Infiltration von B- und T-Lymphozyten und Makrophagen ins epitheliale Gewebe (Goodwin *et al.*, 1986; Crabtree, 1996). Unter dem Einfluss des lokalen Zytokinmilieus differenzieren Monozyten zu Makrophagen, die Hp phagozytieren und anschließend lysieren können (Xia *et al.*, 2004).

Die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort gegen Hp konnte ebenfalls gezeigt werden. Die im Laufe der Infektion von APCs phagozytierten Hp und bakteriellen Proteine werden auf MHCII Molekülen präsentiert und führen so zur Aktivierung antigenspezifischer CD4^+ T-Zellen. So konnten aus infizierten Patienten Hp spezifische T-Zellen isoliert werden (D'Elis *et al.*, 1997). Diese T-Zellen zeigten einen ausgeprägten T-Helfer1 (TH1) Phänotyp, der sich durch die Sekretion von $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$, nicht aber von IL-4 auszeichnet (Smythies *et al.*, 2000; Sommer *et al.*, 1998). $\text{IFN}\gamma$ ist dabei für die Schwere der Entzündung von besonderer Bedeutung, wie durch Immunisierungs- und Infektionsversuche bei gleichzeitiger *in vivo* Neutralisierung von $\text{IFN}\gamma$ im *H. felis* Tiermodell gezeigt werden konnte (Mohammadi *et al.*, 1996). In einem $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ Mausmodell konnte Hp zwar den Magen der Tiere mit einer im Vergleich zum Wildtyp höheren Bakteriendichte kolonisieren, jedoch konnte in der $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ Maus auch nach 15monatiger Infektion keine Inflammation festgestellt werden, wogegen die Wildtyp-Tiere eine ausgeprägte Gastritis entwickelt hatten (Sawai *et al.*, 1999). Diese Befunde führten zu der Annahme, dass eine TH1 Polarisierung für die Ausprägung der Entzündung verantwortlich sei, und dass durch Abwesenheit von $\text{IFN}\gamma$ bzw. durch Induktion einer TH2 polarisierten Immunantwort eine protektive Immunisierung gegen Hp zu erreichen sei. Im Gegensatz dazu konnten neuere Veröffentlichungen zeigen, dass die TH1 Zytokine $\text{IFN}\gamma$ und IL-12 für die Protektion nach Immunisierung entscheidend sind, während den TH2 Zytokinen IL-4 und IL-5 in diesen Studien keine Bedeutung zukam (Akhiani *et al.*, 2002; Garhart *et al.*, 2003b; Garhart *et al.*, 2003a). Die *in vivo* vorliegende TH1 Polarisierung der mukosalen T-Zellen ist jedoch nicht die Immunantwort, die für die erfolgreiche Bekämpfung einer extrazellulären Infektion geeignet ist. Eine TH1 Immunantwort ist bei der Infektion mit intrazellulären Erregern wie Leishmanien oder Chlamydien erfolgreich und damit Ziel der therapeutischen Vakzinierung gegen diese Erreger (Von Stebut *et al.*, 2004; Awasthi *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2004; Berry *et al.*, 2004). Obwohl ein aktives Eindringen von Hp in Epithelzellen *in vivo* und *in vitro*

beschrieben wurde, scheint es aber nur in geringem Umfang stattzufinden und damit für die Infektionssituation nur wenig relevant zu sein (Petersen *et al.*, 2003). Die ermittelte Häufigkeit für eine Invasion von Hp in eukaryote Zellen liegt *in vivo* je nach Studie bei <1% bis zu 10% (Noach *et al.*, 1994; Wyle *et al.*, 1990; Papadogiannakis *et al.*, 2000), *in vitro* je nach untersuchter Zelllinie bei <1% bis 2% (Evans *et al.*, 1992; Birkness *et al.*, 1996). Der weitaus größte Teil der Hp liegt extrazellulär an eukaryote Zellen adhäriert vor und ist damit einer gegen intrazelluläre Erreger gerichteten Immunantwort nicht zugänglich (Petersen *et al.*, 2003). Trotz der starken, von Hp induzierten Stimulation sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems kommt es ohne antibiotische Behandlung der Infektion nicht zu einer erfolgreichen Kontrolle (Moss *et al.*, 2003). Verschiedene *Immune Evasion* Strategien, mit denen sich Hp der Wirts-Immunantwort entzieht, werden für die lebenslang persistierende Infektion und die damit einhergehende Entzündungsreaktion verantwortlich gemacht.

3.2.7.2 Immune Evasion durch Hp

Hp entzieht sich der Immunantwort sehr erfolgreich durch verschiedene *immune escape* Mechanismen. So sind Hp, die sich nicht am Magenepithel sondern im luminalen Mukus aufhalten, einer Immunreaktion räumlich nicht zugänglich (Marshall *et al.*, 1984; Hazell *et al.*, 1986). Wie alle gram-negativen Bakterien verfügt auch Hp über gängige *pathogen-associated-molecular-patterns* (PAMPs) wie Lipopolysaccharide (LPS), Flagelline oder an CpG Motiven methylierte DNA, jedoch sind die Hp spezifischen Vertreter dieser PAMPs immunologisch nahezu inert. Hp LPS zeigte eine im Vergleich zu enterobakteriellem LPS eine um einen Faktor 500 verminderte Toxizität und eine 1000fach niedrigere Mitogenität und Pyrogenizität (Muotiala *et al.*, 1992). Im Vergleich zu *E. coli* O:55 LPS war die 2000 bis 30000fache Menge Hp LPS nötig, um Ratten-Knochenmarks-Makrophagen zu aktivieren (Perez-Perez *et al.*, 1995). Das *Salmonella typhimurium* Flagellenprotein FliC zeigte eine *in vitro* Assays eine 1000fach höhere, TLR5 abhängige, Immunstimulation als Hp FlaA oder FlaB (Gewirtz *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003). Bakterielle DNA enthält methylierte CpG Motive, die als Ligand des TLR9 und damit als Stimulantien des angeborenen Immunsystems beschrieben sind (Cornelie *et al.*, 2004). Hp DNA unterliegt stammspezifisch unterschiedlichsten Methylierungen, jedoch scheint methylierte Hp DNA nur geringe immunstimulatorische Eigenschaften zu besitzen (Takata *et al.*, 2002; Blaser *et al.*, 2004). Auch die direkte Beeinflussung der Immunantwort durch Hp Proteine konnte nachgewiesen werden. So unterdrückt das von Hp gebildete Zytotoxin VacA die Ausbildung von T-Zell-Antworten durch Inhibition der T-Zell Aktivierung und der Antigenpräsentation (Gebert *et al.*, 2003; Gebert *et al.*, 2004; Molinari *et al.*, 1998). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Hp Proteine wie VacA

und Arginase aktiv die T-Zell-Proliferation hemmen und somit die Entstehung einer adaptiven Immunantwort erschweren können (Gebert *et al.*, 2004; Zabaleta *et al.*, 2004). Hp Typ I Stämme können die Phagosomenbildung in Makrophagen beeinträchtigen und in den sich entwickelnden Megasomen intrazellulär mindestens 24h überleben (Allen *et al.*, 2000). Die Expression von Lewis-Blutgruppenantigenen durch Hp stellt eine Form des molekularen Mimikry dar (Wirth *et al.*, 1999). Auch konnte gezeigt werden, dass Hp spezifische T-Zellen Kreuzreaktivität gegen H^+ , K^+ -Adenosintriphosphatase, eine zelluläre Protonenpumpe, aufweisen, die wohl ebenfalls durch molekulare Mimikry ausgelöst wird (D'Elios *et al.*, 2004; Amedei *et al.*, 2003). Durch Variation antigener Proteine kann die Bildung spezifischer Immunreaktionen ebenfalls verhindert werden. Beispielsweise kann die Expression von CagY, das an der Oberfläche des Typ IV Sekretionsapparates vorliegt, durch die Reorganisation repetitiver DNA-Fragmente so stark variiert werden, dass keine Antikörperbildung gegen dieses Antigen nachweisbar ist (Peek, Jr. *et al.*, 2002). Die Expression verschiedener Hp Gene kann durch *slipped strand mispairing* an- und ausgeschaltet werden, und trägt damit zum *immune escape* bei (Jones *et al.*, 1999b). Außerdem kann Hp an MHCII binden und so die Apoptose von MHCII exprimierenden Zellen induzieren (Fan *et al.*, 2000). Zumindest *in vitro* kann Hp VacA und CagA abhängig in Makrophagen Apoptose initiieren. Diese wird durch Spaltung von Procaspase 8 und erhöhte Freisetzung von Zytocrom c aus Mitochondrien ausgelöst (Menaker *et al.*, 2004; Gobert *et al.*, 2002a).

3.2.7.2.3 Zellschädigung durch Hp

Die Hp Infektion der gastrischen Mukosa führt zu histologisch nachweisbaren Zell- und Gewebeschädigungen (Cover *et al.*, 2001). Bekannte Ursachen dieser Schäden sind reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) (Hoit, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Hp die Bildung von ROS und DNA Fragmentation in kultivierten Adenokarzinomzellen und normalen Magenmukosazellen induziert (Bagchi *et al.*, 2002; Bagchi *et al.*, 1996). Weiter konnte nachgewiesen werden, dass wässrige Extrakte von Hp neutrophile Granulozyten aktivieren, was wiederum unter anderem zu erhöhten Konzentrationen von ROS führt (Shimoyama *et al.*, 2003). NO wird durch die hauptsächlich in Makrophagen exprimierte induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase (iNOS) gebildet. In der Mukosa Hp infizierter Patienten waren weniger reduziertes Glutathion und höhere Konzentrationen an Malonsäuredialdehyd nachweisbar als in der Mukosa der nichtinfizierten Kontrollpersonen (Demir *et al.*, 2003). Nach Hp Eradikation gingen die erhöhten iNOS Konzentrationen wieder zurück (Felley *et al.*, 2002). Als Auslöser der erhöhten Expression von iNOS und damit der Bildung von NO durch Makrophagen konnte *in vitro* Hp Urease identifiziert werden (Gobert *et al.*, 2002b). Hp Urease führt zu einer

Verminderung der Expression des zellulären *heat-shock* Proteins Hsp70 und damit zur verstärkten Expression von iNOS (Yeo *et al.*, 2004). Zu Gewebeschädigungen trägt auch die durch Hp-induzierte Apoptose von Epithelzellen bei (Jones *et al.*, 1999a; Fan *et al.*, 2000).

3.2.7.2.4 Virulenzfaktoren

3.2.7.2.4.1 *Cytotoxicity-associated-genes* Pathogenitätsinsel (Cag-PAI)

Die ca. 40 kbp große Pathogenitätsinsel (PAI) kodiert für 27 verschiedene Gene, die einen Typ IV Sekretionsapparat ausbilden können (Fischer *et al.*, 2001). Ebenfalls innerhalb der PAI findet sich mit *cagA* das Gen für das bis vor kurzem einzige bekannte Molekül, das durch den Typ IV Sekretionsapparat in Epithelzellen übertragen werden kann. CagA wird durch den Sekretionsapparat in Magenepithelzellen transloziert, und stellt dort ein Substrat der zellulären Phosphotyrosinkinase Src dar, die in CagA vorhandene Phosphorylierungsmotive erkennt und phosphoryliert (Selbach *et al.*, 2002). Kinasiertes CagA löst eine morphologische Veränderung des Aktinzytoskeletts aus, die als *Hummingbird* Phänotyp beschrieben wurde (Hofreuter *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2003). Die Langzeiteinwirkung von CagA auf Epithelzellen führte zu dysplastischen Veränderungen, der Lockerung der Bindung von apikal-epithelialen *tight junctions* und der Ausprägung eines *Scattering* Phänotyps, der durch erhöhte Zellmotilität gekennzeichnet ist (Amieva *et al.*, 2003; Backert *et al.*, 2001). Außerdem kann phosphoryliertes CagA analog zu dem eukaryonten Wachstumsfaktor Gab an die zelluläre Phosphatase SHP-2 binden, und führt dadurch zur Veränderung der intrazellulären Signalkaskaden. Daher wird die Einstufung von CagA als Oncoprotein diskutiert (Higashi *et al.*, 2002b). Viala *et al.* (2004) konnten ein zweites, durch den Typ IV Sekretionsapparat übertragenes, Molekül identifizieren. Dabei handelt es sich um ein immunstimulatorisches Peptidoglycan, das in Epithelzellen mit dem intrazellulären Nod1 Rezeptor interagiert und so eine Immunantwort auslösen kann. Es ist jedoch unklar, ob die Übertragung dieses Peptidoglycans eher zufällig erfolgt oder ob das Peptidoglycan ein echtes Substrat des Typ IV Sekretionsapparates darstellt.

Hp Stämme werden nach dem Vorhandensein der Cag-Pathogenitätsinsel und des Zytotoxin-Gens *vacA* im Genom in zwei Klassen unterteilt (Xiang *et al.*, 1995). Cag-PAI und VacA positive Hp Stämme werden als Typ I, negative als Typ II Stämme bezeichnet. Die Infektion mit einem Typ I Stamm geht mit einer verstärkten Entzündung und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Magenkrebs einher (Blaser *et al.*, 1995). Typ II Stämme werden üblicherweise mit einer mildereren Gastritis in Verbindung gebracht. Das Vorhandensein der Cag-PAI ist mit einem

virulenteren Genotyp des Toxins VacA (siehe 3.2.7.2.4.2) korrelierbar, obwohl keine direkte Interaktion zwischen der Cag-PAI und VacA besteht (Slater *et al.*, 1999; Atherton *et al.*, 1997). Blaser *et al.* (2004) vermuten, dass toxinbildende Stämme einem Selektionsdruck bezüglich einer funktionellen PAI unterliegen könnten, da die durch VacA induzierte Immunsuppression ohne eine vorhandene Cag-PAI eine für das Hp Wachstum ausreichende Freisetzung von Nährstoffen aus Epithelzellen verhindern könnte. In Entwicklungsländern, wo das Auftreten von Typ I Stämmen sehr viel häufiger ist als in den Industrienationen, sind die statistischen Zusammenhänge zwischen Cag und VacA Status weniger deutlich bis fraglich (Moss *et al.*, 2003).

3.2.7.2.4.2 VacA

VacA ist das von der Mehrheit der Hp Stämme sezernierte 95 kDa vakuolisierende Zytotoxin A (Lupetti *et al.*, 1996). VacA lagert sich als Hexamer in die Membran der Zielzelle ein und bildet einen Anionen-selektiven, spannungsabhängigen Ionenkanal aus, der zum Ausfluss u.a. von Bicarbonat und organischen Anionen führt (Szabo *et al.*, 1999). Rekombinantes VacA konnte durch Steigerung der Permeabilität von Epithelzellen die Ausschüttung von Fe^{3+} und Ni^{2+} hervorrufen (Papini *et al.*, 1998). Zusätzlich kann VacA aus der Mitochondrial-Membran die Ausschüttung von Zytochrom c induzieren und so Apoptose verursachen (Galmiche *et al.*, 2000). Fan *et al.* (2000) konnten eine Heterogenität des *vacA* Gens zeigen, die mit der Expression unterschiedlich stark aktivem VacA verbunden ist. So ist das Vorhandensein des *vacA* s1 Genotyps die Voraussetzung für die Sekretion eines aktiven Zytotoxins, während *vacA* s2 Hp Stämme eine defekte Signalsequenz aufweisen. Hp Stämme des *vacA* s1/m1 Genotyps zeigten *in vitro* eine höhere Zytotoxizität als s1/m2 Stämme. Der Zusammenhang zwischen dem *vacA* Genotyp und dem Ausmaß der Inflammation *in vivo* belegt die klinische Relevanz eines aktiven VacA für die Hp Pathogenese (Atherton *et al.*, 1997).

3.2.7.2.4.3 Urease

Hp Urease katalysiert die Hydrolyse von Harnstoff zu CO_2 und NH_3 und führt dadurch zur Entstehung eines neutralen pH-Mikromilieus, das das Überleben von Hp im sauren Milieu des Magens und damit die Kolonisation erst ermöglicht (Prinz *et al.*, 2003). Urease wird konstitutiv exprimiert und kann bis zu 15% des Gesamtproteingehalts von Hp ausmachen (Mobley *et al.*, 1995). Das durch Urease erzeugte NH_3 kann unter neutralen pH Bedingungen auf Epithelzellen toxisch wirken (Smoot, 1997). Die Regulation der Aktivität der zytoplasmatisch vorliegenden Urease erfolgt durch Öffnen der in der Zytoplasmamembran liegenden Harnstoffkanäle bei pH Werten unter 6,5, was zum Kontakt von Enzym und Substrat führt (Bury-Mone *et*

al., 2001). Das entstehende NH₃ diffundiert dann ins Periplasma und puffert dieses (Weeks *et al.*, 2000).

3.2.7.2.4.4 OipA, NapA

Hp produziert eine Vielzahl von immunstimulatorischen bzw. immunmodulatorischen Proteinen. Neben CagA und VacA sollen hier noch OipA und NapA genannt werden. Das *outer inflammatory protein A* (OipA) gehört einer Proteinfamilie von 32 *outer membrane proteins* (OMPs) in Hp an, zu denen auch die meisten Adhäsine zählen (3.2.7.2.4.5). Durch *knock-out* von OipA konnte die Fähigkeit eines Hp Stammes, eine IL-8 Sekretion aus Epithelzelllinien zu induzieren, um 50% vermindert werden (Yamaoka *et al.*, 2000). Bei Untersuchung von 247 Patienten konnte der *oipA* Status der Hp Stämme mit hoher Bakteriendichte, starker Invasion durch neutrophile Granulozyten und starker mukosalen IL-8 Sekretion korreliert werden (Yamaoka *et al.*, 2002a). Vergleichbare Daten waren auch in Mäuseinfektionsversuchen zu beobachten (Yamaoka *et al.*, 2002b). NapA ist das *neutrophil-activating protein* von Hp. Anfängliche Studien legten den Schluss nahe, dass die Stimulation mit NapA humane neutrophile Granulozyten aktiviert und so eine Rolle in der Immunreaktion gegen Hp spielt (Evans, Jr. *et al.*, 1995). Spätere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass die Hp induzierte Aktivierung von Neutrophilen unabhängig von NapA stattfindet (Leakey *et al.*, 2000), und NapA mit Hp DNA ko-lokalisiert und diese so vor oxidativem Stress schützen kann (Cooksley *et al.*, 2003).

3.2.7.2.4.5 Adhäsine

Die Adhäsion von Hp an die Magenmukosa konnte sowohl *in vivo* und *in vitro* an menschlichen Magenbiopsien, im Tiermodell und an Zelllinien gezeigt werden (Petersen *et al.*, 2003; Logan, 1996). Diese Adhäsion erfolgt mit spezifischen Tropismus an Magenepithelzellen (Noach *et al.*, 1994). Adhäsine spielen eine wichtige Rolle bei der Kolonisierung und der Hp induzierten Pathogenese. Verschiedene Adhärenzfaktoren konnte bisher identifiziert werden. BabA wird von einem Teil der Hp Stämme exprimiert und bindet an das von Epithelzellen exprimierte Lewis^b Blutgruppenantigen (Ilver *et al.*, 1998). Hp Stämme, die das BabA kodierende Gen *babA2* besitzen, konnten öfter aus Patienten mit Ulzera und Karzinomen isoliert werden als Typ I Stämme. Typ I Stämme, die zusätzlich *babA2* positiv sind, waren in Patienten mit intestinaler Metaplasie und atrophischer Gastritis häufiger nachzuweisen als Typ I *babA2* negative Hp Stämme (Prinz *et al.*, 2001; Zambon *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass BabA positive Stämme mehr IL-8 induzieren und höhere Kolonisationsdichten erreichen als negative Stämme, was die Bedeutung von BabA für die Kolonisation unterstreicht (Rad *et al.*, 2002). BabA gehört einer Gruppe von OMPs, zu denen auch die Adhäsine AlpAB zählen. Durch Bindungsstudien an Magenbiopsien konnte die Bedeutung von AlpAB gezeigt

werden (Odenbreit *et al.*, 2002). Weitere beschriebene Adhäsine, z.B. SabA vermitteln die Bindung an Lewis^{x,y} Antigene (Mahdavi *et al.*, 2002). Bei der Untersuchung des Einflusses von OipA, HopA, SabA und SabB konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von SabB und der Häufigkeit von Duodenal-Ulzera gezeigt werden (de Jonge *et al.*, 2004), wobei die Autoren vermuten, dass die Expression von Adhäsinen Auswirkungen auf die Hp-Elimination durch das Immunsystem hat.

3.2.7.2.4.6 HcpA

Helicobacter-cysteine-rich-protein A (HcpA) ist ein Mitglied einer ausschließlich bei Campylobacter, Helicobacter und Wolinella vorkommenden Proteinfamilie. Während bei Campylobacter und Wolinella jeweils nur ein Gen dieser Familie im Genom entdeckt werden konnte, besitzt Hp stammabhängig 6 bis 8 paraloge Gene, die für Hcps kodieren. Durch *Microarray*-Analysen mehrerer Hp Stämme konnte die hohe Konservierung der *hcp* Genfamilie in Hp gezeigt werden, wobei die meisten Mitglieder der Familie in allen untersuchten Stämmen vorhanden waren (Tabelle 2) (Salama *et al.*, 2000). HcpA wurde als aktiv von Hp sekretiertes Protein beschrieben (Cao *et al.*, 1998). Im Serum Hp infizierter Patienten konnten Antikörper gegen HcpA nachgewiesen werden (Mittl *et al.*, 2003b).

Gen	ORF	vorhanden in Hp Stämmen
hcpA	JHP0197, HP0211	100 %
hcpB	HP0336	13,3 %
hcpC	JHP1024, HP1098	100 %
hcpD	JHP0148, HP0160	100 %
hcpE	JHP0220, HP0235	100 %
hcpF	JHP0571, HP0628	100 %
hcpG	JHP1437	80 %
hcpH	JHP0318	13,3 %
hcpX	JHP1045, HP1117	100 %

Tabelle 2: Konservierung von *hcp*-Genen in Hp Stämmen

Durch *Microarray* Untersuchung an 15 Hp Stämmen festgestellter Konservierungsgrad von *hcp*-Genen (Salama *et al.*, 2000). Viele *hcp*-Gene sind in allen untersuchten Isolaten vorhanden. Die Benennung der *hcp*-Gene erfolgte nach Lüthy *et al.* (2002). Die Bezeichnungen der ORFs mit JHP oder HP beziehen sich auf die beiden vollständig sequenzierten Hp Stämme J99 bzw. 26695 (Alm *et al.*, 1999a).

Die Funktion des Proteins war lange Zeit unklar, da keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen vorhanden waren, die eine *in silico* Voraussage ermöglicht hätten. Mittl *et al.* (2000) konnten *in vitro* eine geringe, physiologisch jedoch wahrscheinlich nicht relevante β -Lactamaseaktivität von HcpA zeigen. Dieselbe Gruppe konnte mittlerweile die räumliche Struktur der HcpA Schwesterproteine HcpB

und HcpC aufklären, die jedoch leider keine eindeutigen Rückschlüsse auf die *in vivo* Funktion der Proteine zuließ. Die Autoren nehmen an, dass alle Hcps als *penicillin-binding* Proteine (PBP) anzusehen sind (Lüthy *et al.*, 2002; Lüthy *et al.*, 2004; Krishnamurthy *et al.*, 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen die meisten Mitglieder der Hcp Familie im Serum Hp Infizierter nachweisbar waren, was die antigenen Eigenschaften dieser Proteinfamilie unterstreicht (Mittl *et al.*, 2003b). Für HcpC konnte ein Zusammenhang des Serum-Antikörpertiters mit der Erkrankung an Adenokarzinomen gezeigt werden (Haas *et al.*, 2002). Zusätzlich konnte die Immunisierung mit HcpX im Mausmodell eine protektive Immunität hervorrufen (Hocking *et al.*, 1999). Eine mögliche Funktion als Virulenzfaktor konnte HcpA erstmals zugewiesen werden, nachdem beschrieben wurde, dass HcpA dosisabhängig große Mengen an IFN γ sowie ein der Infektion mit Hp entsprechendes Zytokinprofil aus naiven murinen Splenozyten induziert (Decker, 2000).

3.3 Vorarbeiten

Bereits zwei Arbeiten der Arbeitsgruppe haben sich mit HcpA beschäftigt (Decker, 2000; Aigner, 2001). Es wurden zwei bakterielle Systeme zur Expression von rekombinatem HcpA etabliert. Es konnte sowohl auf die Expression von HcpA als *inclusion bodies* mit anschließender Rückfaltung im pET-System, als auch die native Expression im pRBI-PDI-System zurückgegriffen werden. Mit dem rekombinanten Protein konnte durch Immunisierung ein hochtitriges α HcpA Kaninchenserum erzeugt werden, das mit dem HcpA Schwesterprotein HcpC kreuzreagiert. Mittels dieses Serums konnte gezeigt werden, dass HcpA in fast allen untersuchten Hp Stämmen unabhängig vom Cag-PAI Status exprimiert und sezerniert wird. HcpA hat am N-terminalen Ende eine Sec-Signalsequenz, die für den Transport des Proteins ins Periplasma verantwortlich ist. Ein Stamm wies einen Defekt in der aminoterminalen Signalsequenz auf und lag ausschließlich in der nichtprozessierten 27kDa Form zytoplasmatisch vor. Dadurch wurde die Bedeutung der Signalsequenz für den Export und die Sekretion von HcpA belegt. Trotzdem vermutet Decker (2000), dass der Transport ins Periplasma und die Sekretion auf unterschiedlichen, unabhängigen Mechanismen beruhen, und schreibt einer putativen internen Ribosomen-Bindestelle (IRES) mit internem Start-Kodon größere Bedeutung zu. Die Struktur des HcpA Proteins ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

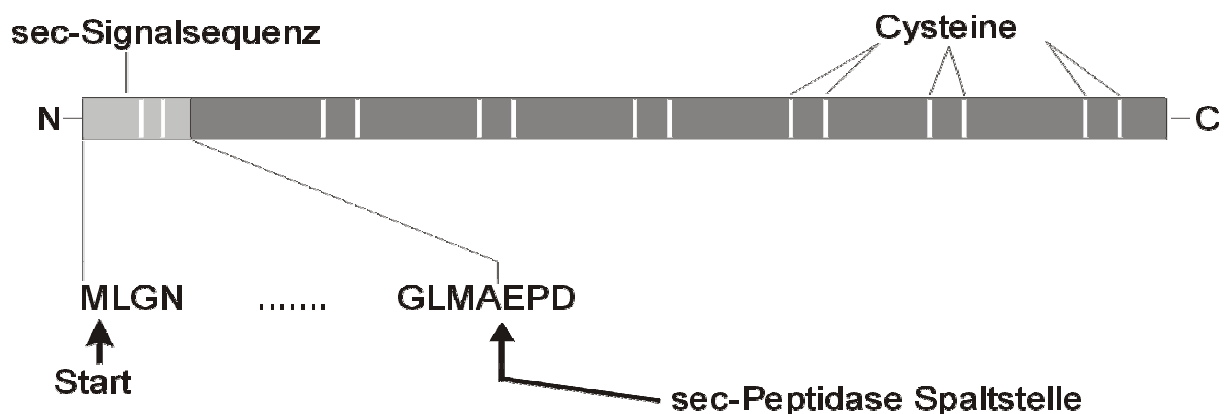


Abbildung 2: Schematische Darstellung des HcpA Proteins

Das HcpA Protein trägt am Aminoterminus eine Sec-Signalsequenz, die von der Signalpeptidase abgespalten wird. Das prozessierte Protein hat ein Molekulargewicht von 24 kDa. Modifiziert nach Decker (2000).

Das zwei Aminosäuren vor der Spaltstelle der Signalpeptidase gelegene Methionin könnte evtl. als alternatives, internes Startkodon für die Expression von rein zytoplasmatischem HcpA dienen, da im Bereich des Signalpeptids *in silico* die putative, interne Ribosomen-Bindestelle nachgewiesen werden konnte (Decker, 2000). Ebenfalls wurden Untersuchungen an Seren Hp infizierter Patienten durchgeführt, die zeigten, dass ein α HcpA ELISA nur geringfügig schlechtere positive

bzw. negative Vorhersagewerte als ein kommerzielles α Hp ELISA System lieferte und damit zum serodiagnostischen Einsatz geeignet wäre.

Die immunstimulatorischen Eigenschaften von HcpA wurden durch Stimulation naiver Splenozyten aus Balb/c Mäusen untersucht. Dabei zeigte sich, dass HcpA dosisabhängig die Sekretion eines TH1 polarisierenden Zytokinprofils mit großen Mengen $\text{IFN}\gamma$ induzieren kann. Durch einen Proteinase-Verdau der HcpA Fraktion konnten die stimulatorischen Eigenschaften zerstört werden. Durch Vergleich der durch HcpA induzierten Zytokinsekretion aus naiven murinen Splenozyten mit der durch Infektion der Splenozyten mit Hp hervorgerufenen Immunstimulation konnte nachgewiesen werden, dass HcpA ein der Stimulation durch Hp entsprechendes TH1 polarisierendes Zytokinprofil induziert. Durch Untersuchungen mit C57BL/6 Mäusen konnte gezeigt werden, dass dieser Mäusestamm aufgrund seiner höheren Suszeptibilität gegenüber TH1 gerichteten Immunantworten in Vergleich zur Balb/c Maus besser als Tiermodell zur Aufklärung Immunstimulation durch HcpA geeignet ist. Mittels Depletionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von *antigen-presenting-cells* (APCs) und *natural-killer* Zellen (NKs) von entscheidender Bedeutung für die Sekretion von $\text{IFN}\gamma$ ist, was zur Aufstellung eines hypothetischen Modells führte (Abbildung 3).

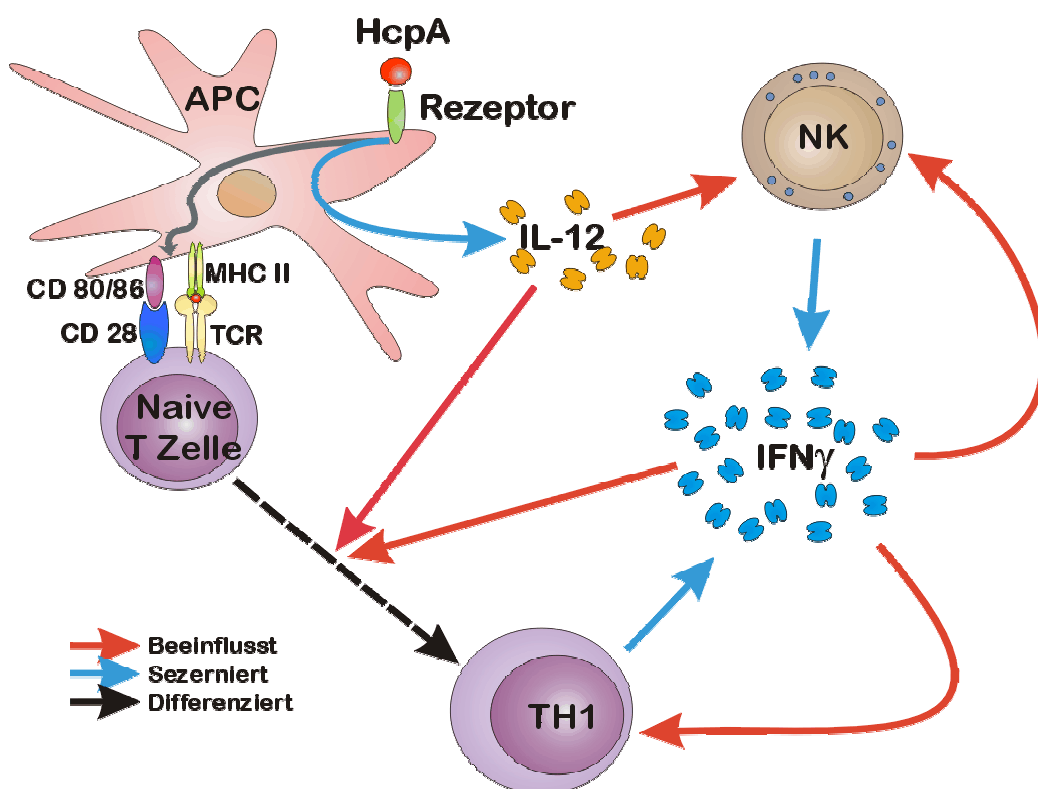


Abbildung 3: Angenommener Mechanismus der $\text{IFN}\gamma$ Induktion durch HcpA

HcpA interagiert mit einem Rezeptor an der Oberfläche von APCs, die daraufhin mit einer IL-12 Sekretion beginnen, die wiederum zur Ausschüttung von $\text{IFN}\gamma$ aus TH1 Zellen und NK-Zellen zur Folge hat. Die theoretische Alternative, eine Stimulation von naiven T-Helfer Zellen, die daraufhin zu TH1 Zellen differenzieren, ist durch die Kürze der Stimulation von 36 h nahezu auszuschließen. Modifiziert nach Medzhitov (2001).

Außerdem wurden zwei verschiedene, durch homologe Rekombination erzeugte *hcpA knock-out* Mutanten des Hp Stamms 2802 auf ihre Fähigkeit zur Induktion von IFN γ *in vitro* untersucht. Anfängliche Daten legten eine entscheidende Bedeutung des *hcpA* Genprodukts für die Hp abhängige IFN γ Sekretion auch im Kontext des Gesamtkeims nahe, jedoch konnten diese Daten nicht reproduziert werden.

Immunisierungsstudien zeigten, dass HcpA als Antigen zur systemischen Immunisierung geeignet ist und dass eine Modulation der α HcpA Antikörper-Antwort durch entweder TH1 oder TH2 polarisierende Adjuvantien möglich ist. HcpA selbst hatte auf die Polarisierung der Antikörperantwort keinen Einfluss und auch ein möglicher adjuvierender Effekt von HcpA konnte nicht nachgewiesen werden.

In der Arbeitsgruppe wurden mittels homologer Rekombination aus dem Stamm Hp 2802 Deletions-*knock-out* Mutanten verschiedener Hp Gene erzeugt, bei denen das entsprechende Gen durch das *aphA-3* Gen, das eine Kanamycinresistenz vermittelt, ersetzt ist.

Das Gerbil-Tiermodell für die Infektion mit Hp wurde von Dr. Ulrike Thalmaier etabliert.

3.4 Zielsetzung

Die Expression und Sekretion von HcpA unter Standardbedingungen konnten in den meisten bisher untersuchten Hp Stämmen nachgewiesen werden. Jedoch ist unbekannt, ob die Expression von HcpA einer Regulation durch externe Einflüsse unterliegt und damit eventuell *in vivo* nur während bestimmter Phasen der Infektion exprimiert wird. Bekannt ist die Expressionsregulation vieler Hp Gene durch Temperatur (*heat-shock* Proteine), Eisenionen-Konzentration (Gene, die dem *fur* Regulon angehören), Veränderungen des O₂-Partialdrucks bzw. des pH Werts. Deshalb soll der Einfluss verschiedener Stressbedingungen auf die Expression und Sekretion von HcpA untersucht werden.

Zur Untersuchung immunologischer Fragestellungen sind rekombinant in Bakterien exprimierte Proteine nur bedingt geeignet, da eine Kontamination der zu untersuchenden Fraktionen mit prokaryontischen, immunstimulatorischen Komponenten wie z.B. LPS nie vollständig ausgeschlossen werden kann. Deshalb soll für die Expression von rHcpA ein eukaryontes Expressionssystem etabliert werden, das den Ausschluss von bakteriellen Komponenten erlaubt. Das so exprimierte HcpA soll in seinen immunologischen Eigenschaften mit dem in *E. coli* exprimierten HcpA verglichen werden, um den beobachteten immunstimulatorischen Effekt zu validieren.

Auch die Mechanismen der Immunstimulation durch HcpA sind nur bruchstückhaft untersucht. Daher sollen ausgehend vom Modell in Abbildung 3 experimentelle Nachweise zur Aufklärung des mit HcpA interagierenden Rezeptormoleküls auf APCs und der Bedeutung von *second-messenger* Zytokinen wie IL-12 und IL-18 geführt werden. Zusätzlich soll durch die Charakterisierung der immunstimulatorischen Eigenschaften verschiedener HcpA Mutanten immunologisch relevante Protein-Domänen aufgeklärt werden.

Ein Einfluss einer prophylaktischen Vakzinierung mit HcpA auf eine spätere Hp Infektion und die Ausprägung der Entzündung kann mit Etablierung des Gerbil-Infektionsmodells erstmals erfolgversprechend untersucht werden. Die Etablierung eines quantitativen *real-time* PCR Verfahrens soll die zur Charakterisierung eines eventuellen protektiven Effekts der Vakzinierung nötigen Messmethoden bereitstellen. Außerdem soll die Ausprägung der nach Hp Infektion im Gerbil auftretenden Antikörperantwort in Bezug auf HcpA und andere bekannte Hp Antigene untersucht werden.

Abschließend sollen Versuche mit humanen PBMCs eine Aussage über die mögliche Übertragbarkeit der im Mausmodell gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen liefern.

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Organismen

1.1.1 Genotyp der verwendeten *E. coli*

<i>E. coli</i>	Genotyp
XL1 Blue	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac; (P2 lysogen)}$
JM83	$F^- \text{ ara } \Delta(\text{lac-proAB}) \text{ rpsL } [\Phi80\Delta\text{lac}\Delta(\text{lacZ})M15]\text{thi}$

Tabelle 3: Genotypen der verwendeten *E. coli* Stämme.

4.1.2 Hp Stämme

Die Hp Stämme 60190 und Tx30a wurden unter den Nummern ATCC 49503 bzw. ATCC 51932 von der ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA) bezogen. Der Stamm P12 ΔcagA wurde freundlicherweise von Dr. Wolfgang Fischer, Max-von-Pettenkofer-Institut, München zur Verfügung gestellt. Verschiedene verwendete Deletionsmutanten des Hp Stammes 2802 wurden am Regensburger Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene hergestellt und überprüft. Alle anderen verwendeten Hp Stämme sind Patientenisolat und am Regensburger Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene konserviert.

4.1.3 Mäusestämme

Die ausschließlich weiblichen Tiere der Mäusestämme Balb/c, C57BL/6, C3H HeN, C3H HeJ, sowie der Spezies *Meriones unguiculatus* (mongolische Wüstenrennmaus, Gerbil) wurden im Alter von 40-44 Tagen von Harlan-Winkelmann, Borcheln, bezogen.

4.1.4 Drosophila-Schneider-2 Zellen

Drosophila-Schneider-2 Zellen (DS-2) wurden von Invitrogen, Karlsruhe, bezogen.

4.2 Helicobacter

4.2.1 Kultivierung

Helicobacter pylori (Hp) Kulturen wurden auf WC-Dent Platten angelegt und bei 36°C unter mikroaerophilen Bedingungen (11% O₂, 9% CO₂, 80% N₂) bebrütet.

Flüssigkulturen wurden in BB-FKS-Dent bei 36°C und unter Schütteln bei 200 rpm in Zellkulturflaschen (Falcon #353108, BD, Heidelberg) ebenfalls unter denselben mikroaerophilen Bedingungen inkubiert.

4.2.2 Präparation von Hp Protein-Fractionen

Gesamtlysat aus 36 h alten Hp Kulturen wurde nach Zentrifugation durch Aufnehmen des Bakterienpellets in Hp-Lysepuffer gewonnen. Ein differenzierterer Aufschluss erfolgte durch Applikation eines osmotischen Schocks. Dazu wurde das Hp-Pellet zuerst in eiskaltem PBS resuspendiert und gewaschen. Nach einer Zentrifugation bei 4000g und 4°C für 6 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml 30mM Tris HCl pH 8 mit 20% (w/v) Saccharose, 1 mM EDTA resuspendiert und 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Pellet in 1ml 5mM MgSO₄ resuspendiert, 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 10 Minuten mit 4000g bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand, das Periplasmalysat, wurde abgezogen und durch Zugabe von Tris HCl pH 8,0 ad 20 mM stabilisiert. Das restliche Pellet wurde in 400 µl Hp-Lysepuffer aufgenommen und stellt die Fraktion des Zytoplasmalysats dar. Überstand von Hp-Flüssigkulturen wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 4000g geerntet.

4.2.3 Einfluss von Umweltbedingungen

Durch Zugabe von Salzen und Säuren in BB-FKS-Dent wurden Stressbedingungen für Hp simuliert. Um den Einfluss von Metallionen zu überprüfen, wurden das Medium mit jeweils 50 mM der Chloriden folgender Kationen substituiert: Cu²⁺, Fe²⁺, Ni²⁺. Die Zugabe von 250 mM NaCl zum Medium diente der Untersuchung von hohen Salz-Konzentrationen. Eine Eisenmangelsituation wurde durch Zugabe von 2 mM Desferal (Deferoxaminmesilat) erreicht, das Eisenionen komplexiert und somit für biologische und chemische Reaktionen unzugänglich macht. Durch die Inkubation bei 38,5°C anstelle von 36°C wurde der Einfluss von temperaturbedingtem Stress untersucht. Als letzter Stressfaktor wurde die Sauerstoffkonzentration erhöht und gleichzeitig der CO₂ Anteil der mikroaeroben Atmosphäre gesenkt. Dazu wurde Hp bei 16% O₂, 4,5% CO₂ und 79% N₂ inkubiert. Alle Stressexperimente fanden mit einem Inokulum von Hp ad OD₆₀₀ =1 für 36 h unter Schütteln bei 200 rpm statt.

4.3 Molekularbiologische Methoden

Gängige molekularbiologischen Methoden (Agarosegel-Elektrophoresen, Kinasierungen von PCR Produkten, Dephosphorylierungen von Restriktions-

fragmenten, Ligationen, Herstellung chemisch kompetenter Zellen, chemische Transformation von *E. coli*) erfolgten, sofern nicht anderweitig angegeben, nach Sambrook *et al.* (2001).

4.3.1 Isolation von Nukleinsäuren

4.3.1.1 Isolation von Hp gDNA

Die Isolation von genomischer Hp DNA erfolgte mittels des DNeasy Tissue Kits von QIAGEN, Hilden, nach dem Protokoll des Herstellers für gram-negative Bakterien.

4.3.1.2 Isolation von *E. coli* Plasmid DNA

Die Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem Minispin Prep Kit von QIAGEN, Hilden, nach Anleitung des Herstellers.

4.3.1.3 Isolation von Gerbil DNA

Die Isolation von genomischer Gerbil DNA erfolgte aus der Schwanzspitze eines Gerbils mittels des DNeasy Tissue Kits von QIAGEN, Hilden, nach dem Protokoll des Herstellers für tierisches Gewebe.

4.3.1.4 Isolation von Gerbil RNA

Die Isolation von Gerbil RNA aus stimulierten Gerbil Splenozyten erfolgte mittels der RNeasy Mini Kits von QIAGEN, Hilden, nach dem Protokoll des Herstellers für kultivierte tierische Zellen. Für die Isolation von RNA aus Magengewebe wurde nach dem Protokoll für tierisches Gewebe verfahren.

4.3.1.5 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Die Isolation von PCR Produkten bzw. restriktionsverdauter DNA erfolgte mittels des QIAquick Gel Extraction Kits von QIAGEN, Hilden, nach Anleitung des Herstellers.

4.3.2 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von Geneart, Regensburg, als „Premium Sequencing Runs“ durchgeführt. Es wurden je Sequenzierungsansatz 200-600 ng DNA und 1 pmol Primer verwendet und das Gesamtvolumen mit ddH₂O auf 8 µl eingestellt. Die

verwendeten Sequenzierprimer sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die Oligo-DNAs wurden von Metabion, Planegg, bezogen.

Plasmid	Primer	Sequenz
pBluescript II	M13for (-20)	GTAAAACGACGGCCAG
	M13rev	GGAAACAGCTATGACCATG
pQE40	pQE 5'	CGGATAACAATTCACACAG
	pQE 3'	GGTCATTACTGGAGTCTTG
pRBI-PDI	pRBI-PDI for	AGCTTCTGAAAAGAACGGGAAG
	pRBI-PDI rev	TTTTTGCCCTCGTTATCTAGAAATTCG

Tabelle 4: Verwendete Sequenzierprimer

4.3.3 Reverse Transkription von RNA

Nach 4.3.1.4 isolierte Gerbil-RNA wurde mit dem AMV-Reverse Transkriptase Kit von Roche Diagnostics, Mannheim, nach Anleitung des Herstellers in cDNA revers-transkribiert.

4.3.4 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

PCRs wurden unter den in Tabelle 5 angegebenen Bedingungen mit der Pwo- (Programm 1), der Pfu- (Programm 2) oder der Taq-Polymerase (Programm 3) durchgeführt (Roche Diagnostics, Mannheim; Invitrogen, Karlsruhe; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

PCR-Programm	Hitzeaktivierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen	Finale Elongation
1	2' 94°C	30'' 94°C	30'' 55°C	1' 72°C	40	6' 72°C
2	2' 94°C	30'' 94°C	30'' 55°C	8' 68°C	18	20' 68°C
3	10' 94°C	30'' 94°C	30'' 55°C	1' 72°C	40	6' 72°C

Tabelle 5: Verwendete PCR-Programme

Alle PCR Programme umfassen die automatische Kühlung der PCR-Produkte auf 4°C nach Ablauf der Reaktion bis zum manuellen Beenden des Programms. Die als Primer verwendeten Oligo-DNAs wurden von Invitrogen, Karlsruhe bezogen.

Tabelle 6 listet die zur Amplifikation der einzelnen DNAs benutzten Oligos und Polymerasen auf. Fp1 bis Fp8 bezeichnet die *hcpA* Genabschnitte, die später durch *in frame* Klonierung in pQE40 zur Expression der HcpA-DHFR Fusionspeptide verwendet wurden (siehe 5.3.6.2).

Zielsequenz	Template DNA	Polymerase	Primer	PCR Programm
HcpA C-Term	pRBI-PDI hcpA	Pfu	5' AAAGCCTCACAATACTACTCCAA 3' GGCCTGCGCTACGGTAG	2
HcpA N-Term	pRBI-PDI hcpA	Pfu	5' TCAACCTTTTTTAAAATTTTCTACCG 3' TCATTTAGCGTCTTTAGACACG	2
HcpA-coil	pRBI-PDI hcpA	Pfu	5' TCAACCTTTTTTAAAATTTTCTACCG 3' CTCGACTCTAGAGGATCCC	2
Fp1	Hp 2802 gDNA	Pwo	5' CGAACCAGACGCTAAAGAGCTT 3' TTTCCCTTCTTCATAGAACGC	1
Fp2	Hp 2802 gDNA	Pwo	5' CGAAAAAGCATGTGAATTTAAAAGAA 3' GCACCATAACCATCATTTCAA	1
Fp3	Hp 2802 gDNA	Pwo	5' CGGAGTGGGAAAAGACTTGAAAAA 3' TTTAGAGTAATATTGTGAGGCTTTTTTG	1
Fp4	Hp 2802 gDNA	Pwo	5' CAACCTGCTAGGCAATTTATATTATAAC 3' ATAATGGTGTAGGCTTCCTAAGAC	1
Fp5	Hp 2802 gDNA	Pwo	5' CTCTTGTAATTGAACCATGCTGAA 3' ATTAATGCACCCGGGGCTG	1
Fp6	Hp 2802 gDNA	Pwo	5' CTGTACGGTCTTAGGAAGCCTACACCATTAT 3' CCTACCATCGTTCAACTCGCATGCT	1
Fp7	Hp 2802 gDNA	Pwo	5' CTGCATTAATGCGGGATACATGTATGGT 3' ACCTTTTTTAAAGTTTCTACCGCTTGCTT	1
Fp8	Hp 2802 gDNA	Pwo	5' CGATGATGGTAGGGGTGTTATAATTAGGG 3' TTCTATTTTTAATTCCTTGAGAGCGTC	1
IL-2	Gerbil cDNA/ Taq-PCR Produkt	Taq/ Pwo	5' ATGTACAGCAGGCAGCTCGCATCCTGT 3' TTATTGAGTCATTGTTGAGATGGCACT	3/1
IL-4	Gerbil cDNA/ Taq-PCR Produkt	Taq/ Pwo	5' ATGGGTCTCAGCCCCAGCTAGCTGCT 3' TCAACCCTGCCAGTTTTTTCATCTGCAT	3/1
IL-10	Gerbil cDNA/ Taq-PCR Produkt	Taq/ Pwo	5' ATGCCCAGCTCGGCACTGCTTATTGC 3' TCGCTTTTCATTTTGATTGTGATGTATGC	3/1
IL-12p35	Gerbil cDNA/ Taq-PCR Produkt	Taq/ Pwo	5' ATGCGTCAGTCACGCCGCTCTTA 3' TCAGGAGGAGTTCAGATAGCTCATCAC	3/1
IL-18	Gerbil cDNA/ Taq-PCR Produkt	Taq/ Pwo	5' ATGATGGCTGCCACACCAGAAGAAGGC 3' TTAACCTTGATGTAAGGGTGTAAACAGTG	3/1
IFN γ	Gerbil cDNA/ Taq-PCR Produkt	Taq/ Pwo	5' ATGAACGCTACACACTGCATCTTGGCTTTCAG 3' TCAAATAGTGCTGGCAGGATTGTT	3/1
TNF α	Gerbil cDNA/ Taq-PCR Produkt	Taq/ Pwo	5' GGCTTACTGTACTTCGGGGTGTTTGG 3' GGGGCAGCCTTGTCCTTGAAG	3/1
B7.2 (=CD86)	Gerbil cDNA/ Taq-PCR Produkt	Taq/ Pwo	5' ATGGATCCCAGACGCATCATG 3' CTAAGAGACAGATGCCACGCG	3/1
HPRT	Gerbil cDNA/ Taq-PCR Produkt	Taq/ Pwo	5' ATGGCGACCCGAGTCCCAGCATCGTG 3' TTAGGCTTTGTATTTGGCTTTTCCAC	3/1
HcpA	Hp gDNA	Pwo	5' GGAGATATAACCATGCTAGGAAACG 3' GGTTCGTAGGGTTTATGTTTTCC	1

Tabelle 6: Durchgeführte Polymerase-Kettenreaktionen und Primersequenzen

4.3.5 Klonierungen

Im Anschluss an alle Transformationen erfolgte zur Selektion positiver Transformanden das Ausplattieren des gesamten Ansatzes auf LB-Agarplatten, die

mit 100 mg/l Ampicillin substituiert waren und deren Bebrütung üN bei 37°C. Mit eindeutig definierten Einzelkolonien wurden daraufhin geringvolumige Flüssigkulturen LB_{AMP} inokuliert, diese unter Schütteln bei 200 rpm üN bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Plasmidisolation aus den Flüssigkulturen (4.3.1.2) und die Überprüfung der DNA durch Sequenzierung (4.3.2).

Die HcpA Mutanten HcpA C-Terminus, HcpA N-Terminus und HcpA-coil wurden durch Mutagenese PCR aus dem Expressionsvektor pRBI-PDI/*hcpA* hergestellt (Decker, 2000). Im Anschluss an die PCR erfolgte ein DpnI Verdau zur Entfernung von nicht mutagenisierter *template*-DNA. Die PCR Produkte wurden auf einem Agarosegel visualisiert und ausgeschnitten. Nach der Extraktion der PCR-Produkte wurden diese kinasiert, ligiert und in *E. coli* XL-1 transformiert. Nach der Überprüfung durch Sequenzierung wurden korrekte Plasmide in *E. coli* JM83 transformiert.

Die Herstellung HcpA/DHFR Fusionspeptide erfolgte durch Amplifikation der entsprechenden *hcpA*-Abschnitte mittels PCR. Die PCR Produkte wurden auf einem Agarosegel visualisiert und ausgeschnitten. Nach der Extraktion der PCR-Produkte wurden diese kinasiert und mit einem mit SmaI verdauten, dephosphorylierten Expressionsvektor pQE40 ligiert und anschließend in *E. coli* XL-1 transformiert.

Die Klonierung der Gerbil-Zytokine erfolgte aus cDNA (4.3.3), die zuerst als *template*-DNA für eine Taq-PCR (Tabelle 5, Programm 3) diente. Die PCR Produkte wurden auf einem Agarosegel visualisiert und ausgeschnitten. Nach der Extraktion der PCR-Produkte wurden 2 µl von diesen wiederum als *template*-DNA für eine erneute Amplifikation mit Pwo DNA-Polymerase (Tabelle 5, Programm 1) verwendet. Die PCR Produkte wurden wiederum auf einem Agarosegel visualisiert und ausgeschnitten. Nach der Extraktion der PCR-Produkte wurden diese kinasiert und mit einem mit EcoRV verdauten, dephosphorylierten Klonierungsplasmid pBluescript II ligiert und anschließend in *E. coli* XL-1 transformiert.

Zur Untersuchung der Konservierung der *hcpA* Sequenz wurden die *hcpA*-Gene verschiedener Hp Stämme amplifiziert, auf einem Agarosegel visualisiert und ausgeschnitten. Nach der Extraktion der PCR-Produkte wurden diese kinasiert und mit einem mit EcoRV verdauten, dephosphorylierten Klonierungsplasmid pBluescript II ligiert und anschließend in *E. coli* XL-1 transformiert.

4.3.6 Konzentration von proteinhaltigen Lösungen

4.3.6.1 Präzipitation

Die Aufkonzentration von wenig proteinhaltigen Lösungen wurde mittels Präzipitation durch Tri-Chlor-Essigsäure (TCA) und Natrium-Deoxycholat (NaDOC) erreicht. Dazu wurde zu 1 ml der Proteinlösung 2%ige NaDOC Lösung bis zu einer Konzentration

von 0.02% zugegeben und die Mischung bei RT für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde 40% TCA bis zu einer Endkonzentration von 6% zugegeben und auf Eis 1 h inkubiert, danach erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und 21000g für 10 Minuten. Der Überstand wurde daraufhin komplett abgezogen, zum Pellet 200 µl eiskaltes Aceton zugegeben und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wie oben wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei 99°C für 1 Minute getrocknet. Das Pellet wurde dann in 40 µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen.

4.3.6.2 Ultrafiltration

Die Aufkonzentration von proteinösen Lösungen durch Ultrafiltration erfolgte entweder mittels einer Amicon Ultrafiltrations-Rührzelle 250 und einem Filter von 10 kDA Ausschlussgröße, oder mittels Amicon Ultrafiltrations-Zentrifugationseinheiten mit Ausschlussvolumina von 5 kDa bzw. 15 kDa nach Anleitung des Herstellers (Millipore, Bedford, MA, USA).

4.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Verwendet wurden ausschließlich Mini-Protean 3 Gelelektrophorese Apparaturen von Biorad, München. Alle SDS-PA Gele hatten Konzentration von 5% Acrylamid im Sammelgel und 12,5% im Trenngel. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 200 V und 25 mA für ca. 60 Minuten.

4.3.7.1 Färbung von Proteingelen

4.3.7.1.1 Coomassie Blau

Die unspezifische Anfärbung von Proteinbanden in SDS-PA Gelen erfolgte mit Coomassie Blau. Das Polyacrylamidgel wurde dazu in die Coomassie-Färbelösung gelegt und bis zum Kochen der Lösung in der Mikrowelle erhitzt. Nach Erkalten der Lösung auf RT unter Schütteln wurde die Färbelösung verworfen und durch Entfärbelösung ausgetauscht. Die Entfärbung erfolgte unter dreimaligem Wechseln der Entfärbelösung unter Schütteln bei RT bis zur vollständigen Entfärbung des Gelhintergrunds.

4.3.7.1.2 Geldokumentation

Zur Haltbarmachung wurden SDS-PA Gele 1h in Trocknerlösung inkubiert und anschließend mit dem DryEasy System von Novex, San Diego, CA, USA, nach Anleitung des Herstellers in Cellophan fixiert.

4.3.7.1.3 Synthetische Peptide

Synthetische, von HcpA abgeleitete, 15mer Peptide wurden von Jerini Peptide Technologies, Berlin erworben.

4.4 Immunologische Methoden

4.4.1 Westernblot

4.4.1.1 Tank Blotting

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden vom Polyacrylamidgel auf eine Protran® Nitrozellulosemembran (Schleicher&Schuell, Dassel) mittels einer BioRad MiniProtean 3 Transfer Apparatur (Biorad, München) übertragen. Dazu wurde diese nach Anleitung des Herstellers beschickt. Der Transfer fand in Blottingpuffer 1 für 30 Minuten bei 200 V und 350 mA statt.

4.4.1.2 Semi-Dry Blotting

Semi-Dry Blots wurde mit einer Biometra Blot-Apparatur hergestellt (Biometra, Göttingen). Die Beschickung erfolgte nach Anleitung des Herstellers, der Transfer auf eine Protran® Nitrozellulosemembran (Schleicher&Schuell, Dassel) fand unter Verwendung von Blottingpuffer 2 für 30 Minuten bei 200 V und 250 mA statt.

4.4.1.3 Ponceaufärbung und Blocken

Nach dem Transfer wurde durch Anfärbung mit Ponceau M die Gleichmäßigkeit des Blots und des Auftrags überprüft. Dazu wurde die Membran 1 Minute in Ponceau Lösung inkubiert und der Farbstoff anschließend mit H₂O ausgewaschen. Nach vollständiger Entfärbung der Membran wurden die Blots mit 1x Rotiblock (Roth, Karlsruhe) für 30 Minuten bei RT und anschließend üN bei 4°C unter Schütteln inkubiert.

4.4.1.4 Antikörperkonzentrationen

Die Konzentrationen der beim Westernblotting eingesetzten Antikörper ist Tabelle 7 zu entnehmen. Die geblockten Membranen wurden mit den entsprechenden Verdünnungen der Primärantikörper in PBS, 2% Milchpulver für 2 h bei RT inkubiert und anschließend dreimal für jeweils 10 Minuten mit PBS, 0,1% Tween 20 gewaschen. Darauf erfolgte die Inkubation für 1 h mit den entsprechenden sekundären, HRP-gekoppelten Antikörpern in PBS, 2% Milchpulver bei RT. Alle sekundären Antikörper wurden in der Verdünnung 1 zu 3000 eingesetzt. Abschließend wurden die Membranen noch dreimal wie oben gewaschen.

Antikörper	Antigen	Verdünnung
Kaninchen α HcpA	Hp Periplasma, Zytoplasma, Gesamtlysate	1:115.000
Kaninchen α HcpA	Hp Kulturüberstände	1:75.000
Kaninchen α HcpA	rHcpA, rHcpA Mutanten	1:250.000
Kaninchen α RecA	Hp Zytoplasma	1:50.000
Mäuseseren	rHcpA, rHcpA Mutanten	1:250
Rattenseren	rHcpA, rHcpA Mutanten	1:250
Humanseren	rHcpA, rHcpA Mutanten	1:250
Gerbilseren	rHcpA, rHcpA Mutanten, Hp Gesamtlysate	1:250

Tabelle 7: Westernblotting Antikörper-Konzentrationen

Sekundär-Antikörper	Hersteller	Katalognummer
Kaninchen α Maus Ig	Dako, Hamburg	P0260
Ziege α Kaninchen Ig	Biorad, München	170-5046
Kaninchen α Ratte Ig	Abcam, Cambridge, UK	ab6734-1
Ziege α Mensch Ig	Sigma, München	A-8400

Tabelle 8: Verwendete HRP gekoppelte Sekundär-Antikörper

4.4.1.5 Nachweis durch Chemolumineszenz

Der Nachweis der HRP-gekoppelten sekundären Antikörper erfolgte durch Chemolumineszenz mittels der ECL NOWA-Reagentien von MoBiTec, Göttingen. Die Detektion des Lichtsignals erfolgte mit Hyperesa Hyperfilmen von Amersham Biosciences, Little Chalford, UK.

4.4.2 Immunisierungen

Alle Immunisierungen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, dreimal im Abstand von jeweils 2 Wochen.

4.4.2.1 Subkutan

Zur subkutanen Immunisierung von Nagern wurde die Schwanzwurzel der Tiere mit einem Langhaarschneider rasiert. Anschließend erfolgte die subkutane Injektion von 100 µl PBS mit Antigen und Adjuvans.

4.4.2.2 Intranasal

Zur intranasalen Immunisierung von Gerbils wurden diese mit Isofluran kurz betäubt. Während der Narkose wurden 20 µl der Antigen/Adjuvansmischung in PBS pro Tier direkt auf die Nasenlöcher der Tiere pipetiert und so von diesen veratmet.

4.4.3 Antikörpertiterbestimmung

Die Bestimmung spezifischer Antikörpertiter aus Mäuse-, Ratten-, Gerbil-, Kaninchen- und Human-Seren erfolgte durch *antibody-capture* ELISA. Dazu wurden mittelbindende 96-Well ELISA Platten mit F-Boden (Greiner, Frickenhausen) mit 100 ng spezifischem Antigen (Hp Gesamtlysat oder rHcpA) pro Well in Carbonat-*Coating*-Puffer beschickt und üN bei 4°C inkubiert. Dann wurde die Platte 3 mal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und mit PBS, 2% Tween20, 3% FKS für 1 h bei 37°C geblockt. Nach 3 weiteren Waschschritten wie oben erfolgte der Auftrag von 100 µl/Well einer 1:50 Verdünnung der entsprechenden Seren und die erneute Inkubation bei 37°C für 2 h. Daraufhin wurde die Platte wiederum dreimal wie beschrieben gewaschen und mit 100 µl/Well einer 1:3000 Verdünnung des HRP-gekoppelten, entsprechenden Sekundärantikörpers 1 h bei 37°C inkubiert. Nach drei letzten Waschschritten erfolgte der Nachweis von gebundenem Sekundärantikörper durch Zugabe von TMB (Tetra-Methyl-Benzidin)/H₂O₂ Substrat-Lösung (Pharmingen, San Diego, CA). Die Entwicklung fand 15 Minuten im Dunkeln bei RT statt, anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2 N H₂SO₄ gestoppt und die OD₄₅₀ bestimmt.

4.4.4 Infektionsexperimente

Die Infektion der Gerbils erfolgte mit etwa 1x10⁹ CFU Hp pro Tier. Diese wurden in 300 µl PBS aufgenommen und mittels eines oral eingeführten Analbeutelspülers direkt in den Magen der Tiere appliziert. Diese Prozedur wurde dreimal im Abstand von je 2 Tagen durchgeführt. Nach 2-4 Wochen Infektion wurden die Tiere euthanasiert und Magen und Blut entnommen. Die Hälfte des Magens wurde in Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und im Institut für Pathologie der Universität Regensburg von Dr. Frauke Bataille histologisch untersucht. Die andere Hälfte des Magens wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

4.4.5 Stimulationsexperimente

4.4.5.1 Zell-Präparation

4.4.5.1.1 Maus Splenozyten

Zur Gewinnung von Maus Splenozyten wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation euthanasiert. Anschließend wurde die Milz präpariert und in RPMI-Komplettmedium aufgenommen. Durch Zerreiben der Milz auf einem Zellsieb mit 70 µm Porengröße (Falcon #352350, BD, Heidelberg) wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt und 5 Minuten bei 300g abzentrifugiert. Das Pellet wurde einer Erythrozytenlyse unterworfen, die durch Resuspendieren in ACK-RBC Hämlysepuffer und Inkubation bei RT für 5 Minuten stattfand. Nach erneutem Pelletieren wie oben wurden die Zellen noch dreimal mit RPMI-Komplettmedium gewaschen und abzentrifugiert. Die endgültige Resuspension erfolgte in 5 ml RPMI-Komplettmedium pro Milz. Daraufhin wurde die Zellzahl durch Auszählen mit einer „Neubauer improved“ Zählkammer bestimmt. Mittels der ermittelten Zellzahl wurde eine Lösung auf 2×10^6 Zellen pro ml eingestellt und davon je 1 ml pro Well einer 24-Well Zellkulturplatte (Falcon #353047, BD, Heidelberg) ausgesät.

Für die Untersuchung der synthetischen Peptide (siehe 5.3.7) wurden je 10^6 Splenozyten in 100 µl RPMI-Komplettmedium in 1 Well einer 96-Well Zellkulturplatte ausgesät.

4.4.5.1.2 Gerbil Splenozyten

Gerbilsplenozyten wurden analog zu 4.4.5.1.1 gewonnen.

4.4.5.1.3 Humane PBMCs

Humane PBMCs für Stimulationsexperimente wurden aus dem Blut serologisch Hp-negativer, freiwilliger Spender mit dem Leukosept System von Greiner, Frickenhausen nach Anleitung des Herstellers gewonnen. Daraufhin wurde die Zellzahl analog zu 4.4.5.1.1 bestimmt und 1×10^6 Zellen in 1 ml RPMI-Komplettmedium je Well einer 24 Well Zellkulturplatte (Falcon #353047, BD, Heidelberg) ausgesät.

4.4.5.2 Stimulation und Ernte des Zellkultur-Überstands

Das zu untersuchende Stimulans wurde ad 100 µl mit Milzmedium aufgefüllt, diese Mischung jeweils einem Well der ausgesäten Zellen zugegeben und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Die Ernte erfolgte, wenn nicht anders angegeben, nach 36 h durch

Zentrifugation bei 500g für 10 Minuten bei 4°C. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand bei –80°C bis zur Verwendung konserviert.

4.4.5.3 Stimulation von Gerbil-Splenozyten zur RNA Isolation

Zur Klonierung verschiedener Gerbil Zytokin RNAs wurden 2×10^6 Gerbil splenozyten analog zu 4.4.5.2 mit einer Ionomycin/PMA Lösung stimuliert. Nach 36 h wurden die Splenozyten durch Zentrifugation bei 500g für 10 Minuten bei 4°C geerntet. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Präparation von RNA bei –80°C gelagert.

4.4.6 Nachweis von Zytokinen

4.4.6.1 TaqMan®-PCR

Der Nachweis von Zytokin-mRNA aus Gerbil Splenozyten erfolgte mittels quantitativer *real-time* PCR auf einem AbiPrism TaqMan® PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Als Standardbedingungen für alle TaqMan® PCRs wurden 10 Minuten Denaturierung der DNA und Hitzeaktivierung der Taq-Polymerase bei 95°C, gefolgt von 45 Zyklen aus 60 Sekunden Annealing und Elongation bei 60°C und 15 Sekunden Denaturierung bei 95°C verwendet. Die Optimierung der Primer-, Sonden- und $MgCl_2$ -Konzentrationen der einzelnen TaqMan®-Assays für die nachgewiesenen Gerbil cDNAs erfolgte ebenfalls unter diesen Standardbedingungen. Die Sequenzen der verwendeten Oligo-DNAs sind in Tabelle 9 aufgeführt. Alle Sonden waren mit den Fluorophoren Fluorescein-isothiocyanat (FAM) und 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA) markiert. Alle im Zusammenhang mit TaqMan® Assays verwendeten Oligo-DNAs wurden von Metabion, Planegg, bezogen und waren mittels HPLC vom Hersteller überprüft.

	Forward Primer	Sonde	Reverse Primer
IFN γ	GCCATCTGTCACCCAGAGTCA	CCTAAGGAAGCGGAAAAGGAGTCGGTG	TTGCCACCTCCGAAGGCA
TNF α	GGTGTTTGGTCCCCAAAGG	AAGAGAAGTTCCCAAACGGCCTCC	GGCCATGGAGCTGATGATG
IL-12p35	AGCTGATGCAGGCTCTGAATC	TAATGGGCAGACTGTGCCCCGG	GGTCTCTTTCTGCCAGGTAAGG
HPRT	CCCAAAATGGTTAAGGTTGCA	CTTGCTGGTGAAAAGGACCCCTCGA	AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA

Tabelle 9: Sequenzen der bei TaqMan® *real-time* PCR verwendeten Oligo-DNAs

4.4.6.2 ELISA

Zum Nachweis von Zytokinen aus Maus Splenozyten-Kulturüberständen wurden OPTiEIA ELISA Kits von Pharmingen, San Diego, CA, USA, nach Anleitung des Herstellers verwendet.

4.4.6.3 Biorad Luminex Multiplex Zytokin Assay

Zum Nachweis von Zytokinen im Kulturüberstand von humanen PBMCs oder murinen Splenozyten wurde das Luminex Multiplex System von Biorad, München, nach Anweisung des Herstellers verwendet.

4.5 Expressionssysteme

4.5.1 *Escherichia coli*

4.5.1.1 pRBI-PDI System

4.5.1.1.1 Expression

Die Expression von HcpA und einiger HcpA-Deletionsmutanten in *E. coli* erfolgte mittels des von Decker (2000) etablierten pRBI-PDI/*hcpA* Expressionssystems. Der pRBI-PDI Vektor zeichnet sich durch eine *E. coli* spezifische Signalsequenz aus, die den Transport des Proteins ins Periplasma initiiert. Außerdem wird zusammen mit dem *protein-of-interest* bicistronisch eine Disulfid-Isomerase (DsbC) exprimiert, die die Neubildung und Umlagerung von Disulfidbindungen katalysiert und so zur korrekten Faltung des Proteins führt (Pugsley, 1993). Zur Expression wurden transformierte *E. coli* JM83 in LB_{AMP} 1:100 aus einer Übernachtskultur angeimpft, bei 37°C und unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert und regelmäßig die OD₆₀₀ bestimmt. Ab einer OD₆₀₀ 0,7 bis zu einer OD₆₀₀ 1,1 erfolgte die Inkubation bei RT. Die Induktion fand durch Zugabe von 1 mM IPTG statt. Die Reduktion des Mediums zur Stabilisierung der Cystein-Doppelbindungen des exprimierten Proteins erfolgte mit 5 mM NAcCys (N-Acetyl-Cystein). Die Ernte erfolgte nach 18 h Inkubation durch Zentrifugation bei 4°C bei 6000g für 30 Minuten. Das erhaltene Pellet wurde zum Periplasmaaufschluss in 4 ml pro Liter Kultur und OD₆₀₀ eiskalten PolymyxinB-Puffer resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 4°C und 16000g für 30 Minuten wurde das Pellet verworfen. Der Überstand wurde nach drei sukzessiven Hitzefällungsschritten bei 40°C, 50°C und 60°C mit anschließender Zentrifugation bei 16000g gegen 50 mM MOPS pH 6,5 dialysiert.

4.5.1.1.2 Reinigung

Die Reinigung des Dialysats erfolgte durch BioCad 700E FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) über eine Poros CM Säule bei einer Flussrate von 10 ml/min in 50 mM MOPS pH 6,5 als Laufpuffer. Die Elution erfolgte mittels eines steigenden Salzgradienten von 0 bis 1 M NaCl. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Im Anschluss wurden die HcpA positiven Fraktionen gegen 50 mM NaCl, 20 mM Tris HCl pH 7,5 dialysiert.

4.5.1.2 pQE System

4.5.1.2.1 Expression

Die Expression von HcpA-Peptiden erfolgte als Fusionsprotein an Maus Dihydroxyfolatreduktase (DHFR) in einem pQE40 Vektor der Firma QIAGEN, Hilden, nach Protokoll des Herstellers.

4.5.1.2.2 Reinigung

Die Reinigung erfolgte nach Anleitung des Herstellers mittels des QIAGEN Ni-NTA Säulen Systems (QiaExpressionist) von QIAGEN, Hilden.

4.5.2 Drosophila-Schneider-2 Zellen

Die Drosophila-Schneider Zellkultur wurde wie in Deml *et al.* (2004) beschrieben durchgeführt.

4.5.2.1 Zellkulturbedingungen

Drosophila-Schneider-2 (DS-2) Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen (Falcon #353136, BD, Heidelberg) bei 26°C und 5% CO₂ in serumfreien DS-2 Medium inkubiert. Bei normalem Wachstum wurden die Zellen alle 72 h in Verhältnis 1:3 bzw. 1:5 gesplitted.

4.5.2.2 Transfektion und Selektion

Zur Transfektion wurden in DS-2 Medium 2x10⁶ DS-2 Zellen pro Well einer Sechswell-Zellkulturplatte (Falcon #353224, BD, Heidelberg) ausgesät. Nach Waschen der Zellen mit 2 ml Medium erfolgte die Zugabe der Transfektionsmischung (4 µg pMta-*hcpA* und pA5cDHFR im Verhältnis 20:1, 20 µl DOTAP Liposomen (Roche Diagnostics, Mannheim) in 1 ml Medium). Anschließend wurden die Zellen 4 h auf einem Kipp-Schüttler inkubiert und dann das Transfektionsmedium gegen 5 ml DS-2

Medium ausgetauscht. Nach 5 d Wachstum wurde das Medium gegen 2 ml DS-2 Selektionsmedium gewechselt, das anfangs 1 µg/ml Methotrexat enthielt und in mehreren Schritten im Verlauf von 3-6 Wochen auf 8 µg/ml Methotrexat eingestellt wurde.

4.5.2.3 Probeinduktion

Zur Probeinduktion wurde eine 25 cm² Zellkulturflasche (Falcon #353108, BD, Heidelberg) mit transfizierten DS-2 Zellen mit Induktionsmedium überschichtet und 7-10 Tage inkubiert. Anschließend erfolgte die Ernte des Zellkulturüberstands durch Zentrifugation bei 1000g für 10 Minuten bei RT. Der Überstand wurde dann mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot auf das Vorhandensein von HcpA überprüft.

4.5.2.4 Adaption an serumfreies Medium

In der Probeexpression positive Kulturen wurden im Abstand von jeweils 6 Tagen schrittweise durch abnehmende FKS-Konzentrationen im Medium von 10%, 6,6%, 5%, 2,5%, 1% und 0% an serumfreie Wachstumsbedingungen adaptiert.

4.5.2.5 HcpA-Expression und Konzentration

2x10⁶ transfizierte und an serumfreie Wachstumsbedingungen adaptierte DS-2 Zellen wurden pro 75 cm² (Falcon #353136, BD, Heidelberg) Zellkulturflasche in 12 ml DS-2 Medium ausgesät und für 4 h bei RT inkubiert, um die Adhäsion der Zellen zu gewährleisten. Als Negativkontrolle dienten nicht-transfizierte DS-2 Zellen. Anschließend wurde das Medium gegen 12 ml DS-2 Induktionsmedium ausgetauscht und die Zellen bei 26°C für 3-10 Tage inkubiert. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation bei 1000g für 10 Minuten. Der Überstand wurde wie in 4.3.6.2 beschrieben ca. 7fach aufkonzentriert. Das Konzentrat wurde gegen 50 mM MOPS pH 6,5 dialysiert.

4.5.2.6 Reinigung

Die Reinigung des Dialysats mit rekombinant überexprimiertem Protein erfolgte analog wie in 4.5.1.1.2 beschrieben per FPLC.

4.6 Verwendete Programme und URLs

Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen wurden mit den Programmen GeneRunner v3.05 (Hastings Software) und SeqMan II 4.03 (DNASTAR Inc.) bearbeitet und ausgewertet. *Multiple Sequence Alignments* wurden mit BioEdit (Hall, 1999) durchgeführt. Die graphische Darstellung von experimentellen Daten erfolgte mit SigmaPlot 8.0 (SPSS Inc.). Abbildungen wurden mit Corel Draw 8.0 (Corel Corporation) erstellt. Die Auswertung von ELISAs erfolgte mit WinSoftMax (Molecular Devices). Die quantitative Bestimmung von Western-Blot Daten erfolgte mit ScionImage 4.0.2 (Scion Corp.). Das Design der TaqMan® Primer und Sonden wurde mit ABI Primer Express (Applied Biosystems) durchgeführt.

Weitere, internet-basierte Ressourcen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

	URL
NCBI Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Helicobacter species Database	http://www.infek.lu.se/bakt/english/helicobacter/hag.html
Husar Programmpaket	http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/
2D-Proteome Database	http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE/
Pylori Gene Webserver	http://genolist.pasteur.fr/PyloriGene/genome.cgi

Tabelle 10: Übersicht über verwendete URLs

4.7 Darstellung von experimentellen Daten

Dargestellt sind immer repräsentative Versuche einer Versuchsreihe. Alle graphischen Daten stellen die Mittelwerte aus parallelen Dreifachansätzen eines Versuchs dar. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert (SD).

4.8 Geräte

Es wurden laborübliche Geräte verwendet. Gerätetyp und Hersteller sind bei der jeweiligen Anwendung angegeben.

4.9 Puffer und Reagenzien

Es wurden laborübliche Chemikalien (Merck, Darmstadt) in p.a. Qualität verwendet. Alle molekularbiologischen Enzyme stammen von Roche Diagnostics, Mannheim. Die Hersteller aller anderen verwendeten Reagenzien sind bei der jeweiligen

Anwendung angegeben. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen ist in Tabelle 11 aufgeschlüsselt.

Lösung	Zusammensetzung
10x PBS	80 g NaCl 2 g KCl 14,35 g Na ₂ HPO ₄ 2 g KHPO ₄ H ₂ O ad 1 l
1x SDS Laufpuffer	14,4 g Glycin 3 g Tris 1 g SDS H ₂ O ad 1 l
2x SDS Probenpuffer	150 mM Tris-HCl pH 6,8 1,2% (w/v) SDS 30% (v/v) Glycerin 0,005% (w/v) Bromphenolblau 6,6% β-Mercaptoethanol
ACK-RBC Hämolysepuffer	150 mM NH ₄ Cl 1 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA pH 7,2 -7,4
BB-FKS	Brucella Bouillon (Difco, Augsburg, nach Anleitung des Herstellers) 8% Fötiales Kälberserum
Blotpuffer 1	25 mM Tris-HCl pH 8,3 192 mM Glycin 20% (v/v) Ethanol
Blotpuffer 2	25 mM Tris-HCl pH 8,3 150 mM Glycin 10% (v/v) Ethanol
Carbonat-Beschichtungspuffer für ELISA Platten	13 ml 0,2 M Na ₂ CO ₃ 37 ml 0,2 M NaHCO ₃ frisch vor Verwendung angesetzt
Coomassie Färbelösung	45% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma, München)
DENT (Oxoid, Basingstoke, UK)	5 mg Vancomycin 2,5 mg Trimethoprim 2,5 mg Cefsulodin 2,5 mg Amphotericin B ad 500 ml Medium
DS-2 Induktionsmedium	Insect Express High Five Medium 50 µg/l Kanamycin 200 µM CuSO ₄
DS-2 Selektionsmedium	Insect Express High Five Medium 50 µg/l Kanamycin 1-8 µg/l Methotrexate 10% (v/v) FKS

Lösung	Zusammensetzung
DS-Medium	Insect Express High Five Medium 50 µg/l Kanamycin 10% (v/v) FKS
DS-Medium serumfrei	Insect Express High Five Medium 50 µg/l Kanamycin
ELISA-Waschpuffer	PBS 0,05% (v/v) Tween 20
Entfärber-Lösung	10% (v/v) Essigsäure 45% (v/v) Ethanol
Fixierpuffer	45% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure
FKS	Fötiales Kälberserum (Gibco, Eggenstein) 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert
HP-Lysepuffer	8 M Urea 10 mM Tris HCl pH 8 100 mM Na ₂ HPO ₄
LB _{AMP}	Luria-Bertani Medium 100 mg/l Ampicillin
PolymyxinB Puffer	10 mM MOPS pH 6,8 150 mM NaCl 5 mM EDTA 1 mg/ml Polymyxin B
Ponceau Rot	0,2 g Ponceau S 3 g Trichloressigsäure 3 g Sulfosalicylsäure ad 100 ml Wasser
RPMI-Komplettmedium	RPMI 1640 (PAN Biotech, Aidenbach) 5% (v/v) FKS 20 mM HEPES 50 µM β-Mercaptoethanol
WC	Wilkins-Chalgren Agar (Oxoid, Basingstoke, UK, nach Anleitung des Herstellers) 10 % (v/v) lysiertes Pferdeblut

Tabelle 11: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

5 Ergebnisse

5.1 HcpA-Regulation in *Helicobacter pylori*

Hp Gene sind häufig durch Umweltfaktoren reguliert. Das Eisen-Aufnahmeregulator Protein Fur (*ferric uptake Regulator*) bindet in Gegenwart von Fe^{2+} an die *fur box* bakterieller Promotoren und reprimiert deren Genexpression (Lee *et al.*, 2004a). Andere Gene zeigen eine Salz- oder pH-abhängige Expression (Merrell *et al.*, 2003a; Spohn *et al.*, 1999). Für das HcpA Paraloge HcpG konnte gezeigt werden, dass eine von Eisen, Temperatur und pH regulierte Expression stattfindet (de Vries *et al.*, 2003; de Vries *et al.*, 2001). Die Regulation der HcpA-Expression ist bisher jedoch noch nicht untersucht. Ebenso unbekannt ist der Mechanismus der Sekretion des Proteins in den Zellkulturüberstand. Cao *et al.* (1998) zeigten, dass HcpA von Hp aktiv in den Überstand sezerniert wird. Decker (2000) wies das Vorhandensein einer aminoterminalen Signal-Sequenz nach, die für den Sec-abhängigen Transport des Proteins ins Periplasma nötig ist. Der Mechanismus der Sekretion vom Periplasma in den Überstand ist jedoch bisher unbekannt.

Um mögliche Mechanismen und Abhängigkeiten festzustellen, wurde der Einfluss von Eisen-, Kupfer-, Nickel- und Natrium-Ionenkonzentrationen im Medium, des pH Wertes, sowie von Temperatur- und Sauerstoff-bedingtem Stress auf die Expression, den Transport ins Periplasma und die Sekretion von HcpA untersucht. Dazu wurde Hp 2802 in Flüssigmedium ad $\text{OD}_{600} = 0,1$ inokuliert und für 36 h inkubiert. Die Verwendung von Desferal sollte die im Medium vorhandenen Eisen-Ionen komplexieren und so biologisch unzugänglich machen. Durch Zugabe der Chloride verschiedener Metalle wie Eisen, Kupfer, Nickel und Natrium im Medium wurde die jeweiligen Ionenkonzentration erhöht. Mit NaOH bzw. HCl wurden das Medium von ursprünglich pH 7,5 auf die pH-Werte 6,5 und 8,5 eingestellt. Außerdem wurde der Einfluss von einer im Vergleich zu den Standardinkubationsbedingungen (11% O_2 , 9% CO_2 , 80% N_2) im Sauerstoffanteil erhöhten und im CO_2 Gehalt verminderten Atmosphäre untersucht (16% O_2 , 4,5% CO_2 , 79,5% N_2). Zur Erzeugung von Temperatur-bedingtem Stress wurde Hp 2802 bei 38,5°C inkubiert.

5.1.1 Bestimmung der optimalen FKS Konzentration

Nach der Inkubation wurde als Wachstumskontrolle ein Aliquot der Kultur zur Messung der OD_{600} verwendet. Der Rest der Kultur wurde nach Ernte des Bakterienpellets differenziell aufgeschlossen, d.h. durch osmotischen Schock in eine peri- und eine zytoplasmatische Fraktion getrennt. Der Kulturüberstand wurde mittels TCA/NaDOC/Aceton gefällt. Alle drei Präparationen wurden einer SDS-PAGE mit

anschließendem α HcpA Westernblot unterzogen. Dabei erwies sich der FKS Gehalt des normalen Flüssigmediums von 10% aufgrund des hohen Proteingehalts als problematisch für die Proteinfällung (Daten nicht gezeigt). Daher wurde versucht, Hp 2802 in FKS-freiem Medium zu inkubieren, was jedoch zu keinem messbaren Wachstum führte (vgl. Abbildung 4, % FKS=0). Also wurde durch Titration der FKS Konzentration im Medium die Bedingung ermittelt, die bei minimaler FKS Konzentration ein ausreichendes Wachstum von Hp 2802 gewährleistete (Abbildung 4). Die im weiteren verwendete Konzentration an FKS im Medium betrug 1%.

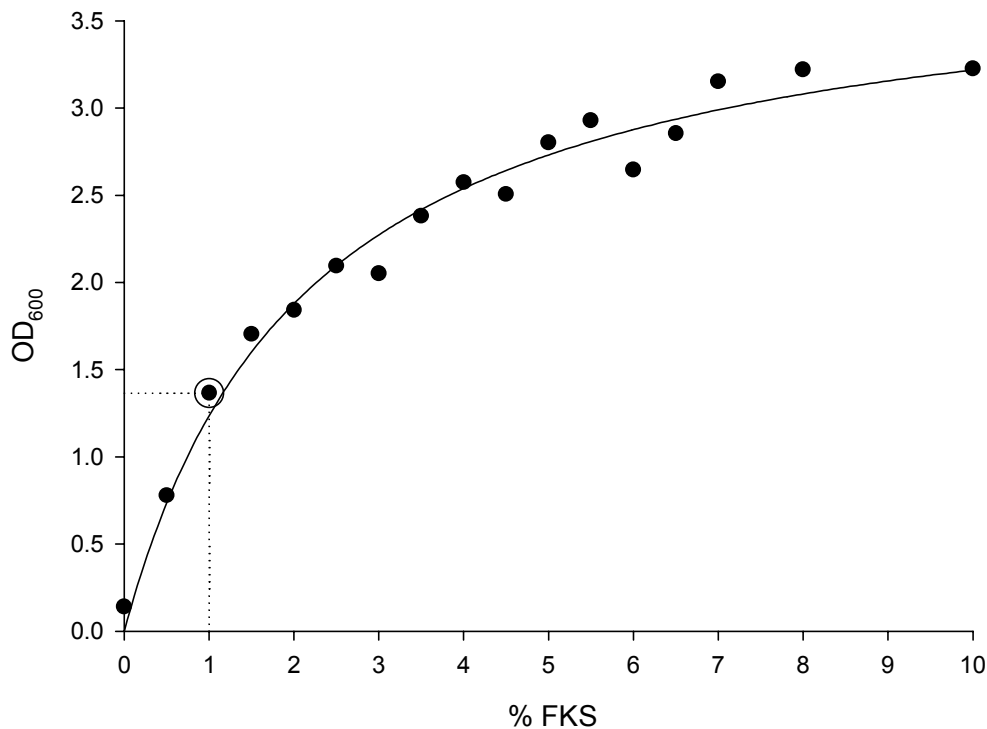


Abbildung 4: Abhängigkeit des Hp 2802 Wachstums von der FKS Konzentration im Medium. Aufgetragen sind die ausgehend von einer Inokulation mit Hp 2802 ad $OD_{600} = 0,1$ nach 36 h Inkubation ermittelten OD_{600} Werte für unterschiedliche FKS Konzentrationen.

5.1.2 Wachstum von Hp 2802 unter Stressbedingungen

Die in BB-Dent 1% FKS ermittelten OD_{600} nach Inkubation unter Stressbedingungen sind in Abbildung 5 dargestellt. Es zeigte sich ein massiver Einfluss der Stressoren auf das Wachstumsverhalten von Hp 2802. Die beiden anderen verwendeten Stämme Hp 2802 Δ hcpA und Hp 2802 Δ virB11 sind isogene *knock-out* Mutanten von Hp 2802 bezüglich des jeweiligen Gens und sollten als Kontrolle des Westernblots bzw. des Einflusses der in beiden *knock-outs* vorhandenen Kanamycin-Resistenz vermittelnden *aphA-3* Kasette dienen. Die stärkste Beeinflussung des Wachstums fand durch Temperaturerhöhung bzw. durch Zugabe von Desferal statt. Erhöhte Konzentrationen an Eisen, Kupfer und Nickel-Ionen beeinträchtigten das Wachstum von Hp 2802 nicht. Eine hohe Kochsalzkonzentration, ein niedriger pH Wert und die

Erhöhung der Sauerstoffkonzentration jedoch sorgten für ein im Vergleich zum Wildtyp schlechteres Wachstum. Die isogenen *knock-out*-Mutanten konnten die beim Wildtyp gemessene OD₆₀₀ nicht ganz erreichen.

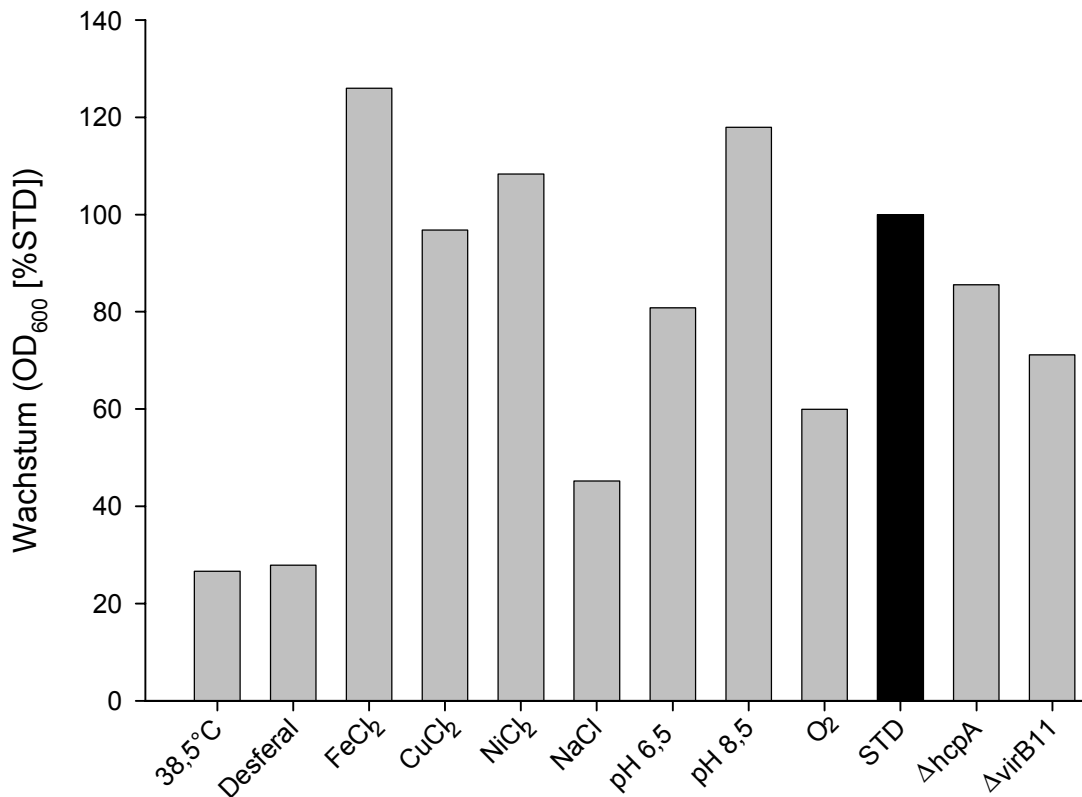


Abbildung 5: Wachstum von Hp 2802 unter Stressbedingungen

Relatives Hp 2802 Wachstum in Abhängigkeit von verschiedenen Stressfaktoren im Verhältnis zu Standardbedingungen (schwarz hervorgehoben). Die Erhöhung der Temperatur auf 38,5°C bzw. die Herbeiführung einer Eisenmangelsituation durch Zugabe von Desferal führten zu massiven Wachstumseinschränkungen. Eine hohe Konzentration an NaCl sowie die Inkubation von Hp 2802 unter 16% O₂, 4,5% CO₂ zeigten ein im Vergleich zu dem unter Standardbedingung inkubierten Hp 2802 (=STD) inhibiertes Wachstum. Die beiden isogenen *knock-out* Mutanten Hp 2802 Δ hcpA und Hp 2802 Δ virB11 zeigten ein gegenüber dem Wildtyp (=STD) leicht schlechteres Wachstum. Die Daten zeigen ein repräsentatives Experiment.

5.1.3 Expression, Transport ins Periplasma und Sekretion von HcpA

Es wurden je Ansatz das Bakterienkulturvolumen ermittelt, das 7×10^8 CFU Hp 2802 beinhaltet. Aus dem daraus geernteten Bakterienpellet wurde zur Überprüfung der Expression und des Sec-abhängigen Transports von HcpA die Präparation von Zyto- und Periplasma vorgenommen und davon anschließend gleiche Volumina für SDS-PAGE und Westernblot aufgetragen. Als Kontrolle des gleichmäßigen Auftrags der Zytoplasmafraktion diente ein α RecA Westernblot, da RecA ausschließlich zytoplasmatisch vorliegt (Daten nicht gezeigt). Zum Nachweis der Sekretion von HcpA wurde der Bakterienkultur-Überstand der 7×10^8 CFU Hp 2802 schließlich gefällt, in je 40 μ l 1xSDS Ladebuffer resuspendiert und davon jeweils 15 μ l für SDS-PAGE und Westernblot eingesetzt (Abbildung 6).

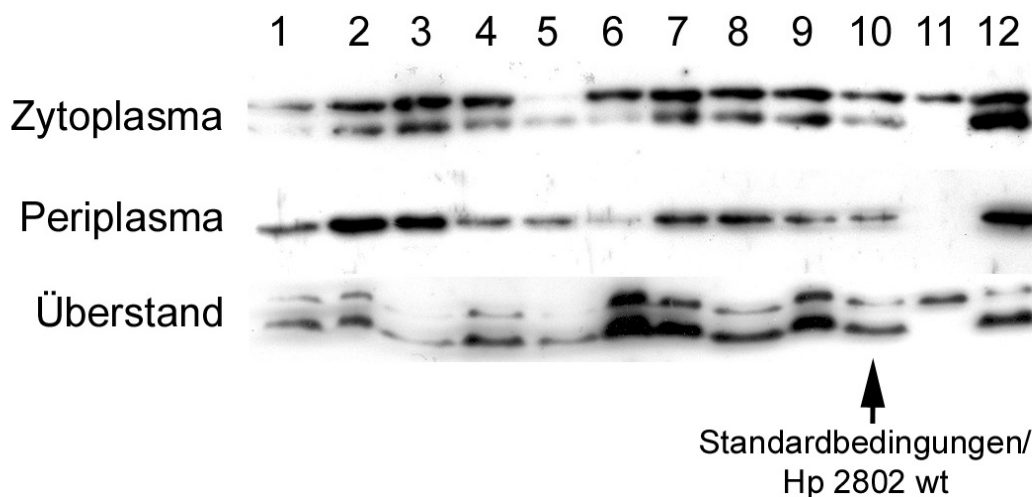


Abbildung 6: Einfluss von Stress auf Expression, Transport und Sekretion von HcpA in Hp 2802
 Hp 2802 wurde unter verschiedenen Stressbedingungen für 36 h in BB-Dent 1% FKS inkubiert. Anschließend wurde das Peri- und Zytoplasma getrennt präpariert, der Überstand der Bakterien-Kultur geerntet und gefällt. Es wurden in jeder Spur gleiche Volumina für SDS-PAGE und Westernblot verwendet. Entwickelt wurden die Westernblots mit α HcpA Kaninchenserum. Die je Spur verwendeten Präparationen wurden unter folgenden Stressbedingungen inkubiert: 1) 38,5°C, 2) Desferal, 3) FeCl₂, 4) CuCl₂, 5) NiCl₂, 6) NaCl, 7) pH=6,5, 8) pH=8,5, 9) O₂, 10) Standardbedingungen bzw. Hp 2802 wt, 11) Hp 2802 Δ hcpA, 12) Hp 2802 Δ virB11. Die obere der beiden Banden der Zytoplasmafraktion und des Überstands ist HcpC, gegen das α HcpA Kaninchenserum eine Kreuzreaktivität aufweist und das nicht periplasmatisch vorliegt (Decker, 2000). Der unregelmäßige Lauf der Überstandsfraktion beruht auf den stark unterschiedlichen Salzkonzentrationen im Medium.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Zytoplasma	HcpC	0,56	1,56	1,99	1,50	0,09	1,37	1,86	1,49	1,48	1,00	0,70	1,96
	HcpA	0,28	1,72	2,90	1,41	0,51	0,65	2,44	1,94	2,11	1,00	0,00	4,50
Periplasma													
	HcpA	1,19	2,99	2,59	1,17	0,87	0,45	2,02	2,18	1,34	1,00	0,00	3,26
Überstand													
	HcpC	0,77	2,03	0,37	1,24	0,44	4,35	3,79	1,46	3,28	1,00	2,61	0,78
	HcpA	1,08	1,39	0,50	1,36	1,03	2,61	2,16	1,62	2,08	1,00	0,00	1,26

Legende: ≤0,5 0,51 - 1,99 ≥2,0 -fache Änderung der Protein-Konzentration

Tabelle 12: Quantitative Auswertung der Westernblots aus Abbildung 6

Dargestellt sind die durch densitometrische Bestimmung der in Abbildung 6 gezeigten Westernblots erhaltenen Werte für die Expression von HcpA und HcpC. Die Beschriftung der Spalten erfolgte analog zu Abbildung 6. Die Werte wurden auf die unter Standardbedingungen mit Hp 2802 wt (Spur 10) erhaltenen Proteinmengen normalisiert (1,0) und geben die n-fache Änderung in der jeweiligen nachgewiesenen Proteinkonzentration an. Hervorgehoben sind die Felder, deren Proteinkonzentrationen sich um einen Faktor 2 oder mehr von Spur 10 unterscheiden.

Unter allen hier untersuchten Bedingungen wird HcpA exprimiert, ins Periplasma transportiert und sezerniert. Jedoch fand eine Regulation der einzelnen Schritte statt. Alle folgenden Spalten-Angaben beziehen sich auf Tabelle 12. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Regulation von HcpC, die aufgrund der Kreuzreaktivität des verwendeten α HcpA Serums gegen HcpC ebenso verfolgt

werden konnte (Decker, 2000). Eine deutliche Hemmung der HcpA Expression wurde durch Inkubation von Hp bei 38,5°C erreicht, die Expression von HcpC war ebenfalls, wenn auch nicht so stark, beeinträchtigt (Spalte 1). Die Verminderung des für Hp verfügbaren Eisens durch Komplexierung mit Desferal führte zu einem verstärkten Transport von HcpA ins Periplasma und zu erhöhten HcpC Konzentrationen im Überstand (Spalte 2). Bei Substitution des Mediums mit FeCl₂ waren Expression von HcpA und HcpC erhöht und HcpA wurde vermehrt ins Periplasma transportiert (Spalte 3). Der Export von HcpA und HcpC aus dem Periplasma bzw. Zytoplasma in den Überstand konnte durch Eisenionen stark gehemmt werden. Kupferionen hatten keinen eindeutig nachweisbaren regulativen Einfluss (Spalte 4). Durch Steigerung der Nickelionen-Konzentration sank die nachweisbare HcpA Proteinmenge im Zytoplasma etwas, HcpC konnte fast nicht mehr nachgewiesen werden (Spalte 5). NaCl im Medium führte zu einer starken Zunahme der im Überstand vorliegenden HcpA und HcpC und ging mit einer geringeren HcpA-Menge in der periplasmatischen Fraktion einher (Spalte 6). Bei einem niedrigen pH-Wert konnte eine verstärkte Expression, Transport und Sekretion von HcpA ebenso wie von HcpC festgestellt werden (Spalte 7). Die Inkubation von Hp bei leicht basischem pH führte ebenso wie Sauerstoffstress zu einer Steigerung der Expression, des Transports ins Periplasma und der Sekretion von HcpA (Spalte 8 und 9). HcpC wurde unter erhöhtem O₂-Partialdruck verstärkt in der Kulturüberstand sezerniert. Der *hcpA knock-out* Stamm zeigte erwartungsgemäß keine Expression von HcpA und diente als Kontrolle (Spalte 11). Der durch Deletion von *virB11* generierte Stamm Hp 2802 $\Delta virB11$ zeigte eine deutliche Steigerung der HcpA Expression und des Sec-abhängigen Transports ins Periplasma. Im Überstand dieses Stamms waren jedoch keine erhöhten Proteinmengen von HcpA oder HcpC nachzuweisen (Spalte 12).

5.2 Expression von HcpA in Drosophila Schneider-2 Zellen

5.2.1 Etablierung des Expressionssystems für HcpA

Die Expression von HcpA in *E. coli* pRBI-PDI System liefert gute Ausbeuten an nativem, funktionellem Protein. Zum Ausschluss einer möglichen Kontamination mit immunstimulatorischen, bakteriellen Komponenten ist jedoch ein eukaryontes Expressionssystem für die Untersuchung immunologischer Eigenschaften von Proteinen vorzuziehen. Als Expressionssystem wurden in FKS-freiem Medium wachsende, stabil transfizierte Drosophila Schneider-2 Zellen verwendet, die auf einem Plasmid unter der Kontrolle des durch Schwermetallionen wie Cu^{2+} und Cd^{2+} induzierbaren Metallothionein-Promotors das *hcpA* Gen tragen. Eine auf dem Plasmid befindliche eukaryonte Signalsequenz sorgt für die Sekretion des exprimierten Proteins ins Zellkulturmedium. Die transfizierten DS-2 Zellen waren auch nach mehr als 30 Passagen noch in der Lage nach Induktion HcpA zu produzieren und konnten damit als stabil transfiziert angesehen werden. Die Expression von HcpA wurde durch Induktion für 10 Tage und anschließende Ernte der Zellkulturüberstände mittels Western-Blot mittels des polyklonalen αHcpA Kaninchenserums mehrfach überprüft (Daten nicht gezeigt).

Zu Beginn der Expressionsexperimente wurde die optimale Dauer der Induktion empirisch bestimmt. Dazu wurden unterschiedlich lange induzierte DS-2 Kulturen

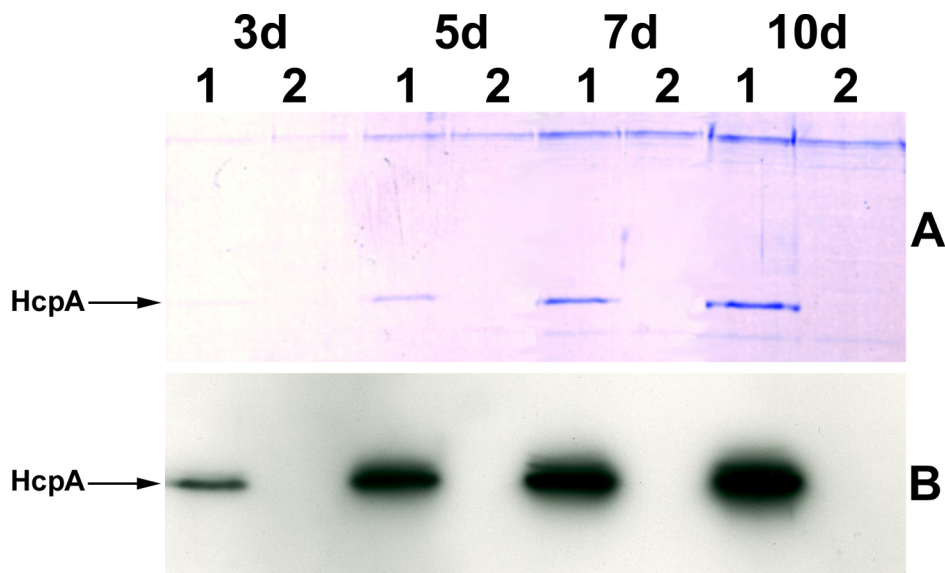


Abbildung 7: Überprüfung der Induktionsdauer auf die Expression von HcpA in DS-2 Zellen
Aufgetragen wurden je 5 μl von abzentrifugiertem DS-2 Zellkultur Überstand zu den angegebenen Zeitpunkten nach Induktion. In Spur 1 wurde jeweils der Überstand der stabil transfizierten Zelllinie DS-2 pMta/*hcpA* aufgetragen, in Spur 2 jeweils der Überstand der nicht-transfizierten, aber ebenfalls induzierten Zelllinie. A) ist ein Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, B) der αHcpA -Western Blot.

geerntet und deren Überstände mittels unspezifischer Coomassie-Proteinfärbung sowie Westernblotting überprüft (Abbildung 7). Als optimale Induktionsdauer wurde der Zeitpunkt von 7 Tagen Induktion bestimmt, da dann schon größere Mengen HcpA im Überstand vorliegen und der Anteil an unspezifischen zellulären Proteinen noch nicht so hoch ist wie nach 10 Tagen Induktion. Im Gegensatz zu Expression in *E. coli* konnten im Westernblot keine mit dem Kaninchen-Antiserum kreuzreagierenden Proteine im Ausgangsmaterial der Proteinreinigung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Bestimmung der Ausbeute an rekombinantem HcpA aus DS-2 Zellen wurde ein quantitativer Westernblot durchgeführt. Dazu wurden definierte Mengen in *E. coli* exprimiertem, aufgereinigtem HcpA eingesetzt und diese mit 2,5 μ l bzw. 5 μ l unbehandeltem DS-2 Zellkulturüberstand verglichen (Abbildung 8). Die Auswertung ergab eine Ausbeute von ca. 63 mg rHcpA pro Liter DS-2 Zellkultur. Im Vergleich lieferte die Expression von HcpA in *E. coli* im pET bzw. pRBI-PDI System nur ca. 10 mg rHcpA pro Liter *E. coli* Kultur (Decker, 2000).

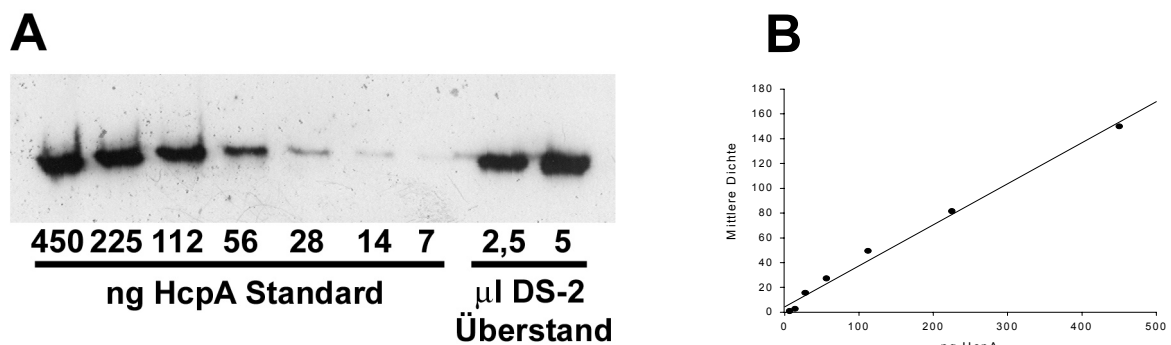


Abbildung 8: Quantitativer Westernblot mit α HcpA Kaninchen-Serum

A) zeigt den Westernblot; aufgetragen wurden definierte rHcpA Mengen als Standard (450 bis 7 ng / Spur), die letzten beiden Spuren enthielten 2,5 bzw. 5 μ l unbehandelten DS-2 Zellkulturüberstand nach 7 Tagen Induktion. B) zeigt den Verlauf der Standardkurve, die zur Berechnung der HcpA Menge im DS-2 Zellkultur-Überstand verwendet wurde.

Die Reinigung von in DS-2 Zell exprimiertem HcpA erfolgte größtenteils analog zur Aufreinigung von in *E. coli* exprimiertem HcpA. Nach Abzentrifugation des Zellkulturüberstandes wurde dieser mittels einer Amicon-Ultra-15 Zentrifugationseinheit mit einer molekularen Ausschlussgröße von 5 kDa aufkonzentriert und dann entsprechend der Reinigung des bakteriell überexprimierten HcpAs in mehreren Schritten hitzefällt, dialysiert und abschließend durch Kationenaustauscher-Chromatographie isoliert (Abbildung 9)(Decker, 2000).

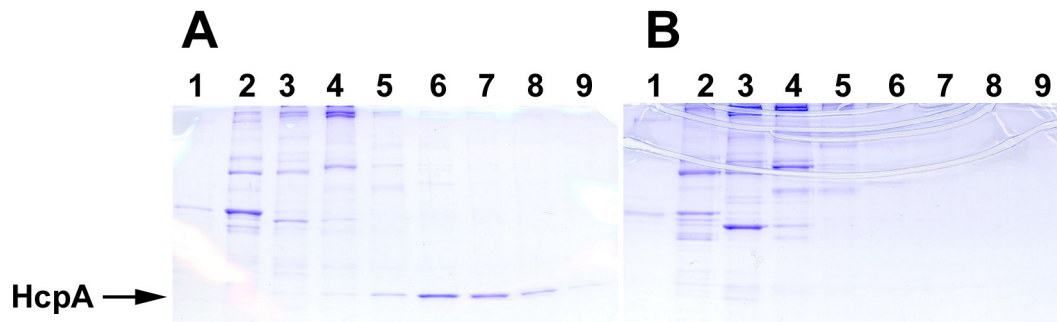


Abbildung 9: HcpA-Expression in DS-2 Zellen

DS-2 Zellkultur Überstand wurde nach 7 Tagen Induktion wie beschrieben geerntet, konzentriert, dialysiert, und per FPLC gereinigt. In den Spuren 1 bis 9 wurden die verschiedenen, nach FPLC erhaltenen Fraktionen in einem Coomassie gefärbten SDS-PA Gel aufgetragen A) zeigt die Fraktionen der mit pMta/hcpA transfizierten DS-2 Zellen, B) die entsprechenden Fraktionen der Negativkontrolle (nicht-transfizierte, induzierte DS-2 Zellen). In Gel A) sind in den Spuren 5 bis 8 deutlich die HcpA-Banden in den Eluatsfraktionen zu erkennen.

Da der DS-2 Zellkulturüberstand im Verhältnis zur *E. coli* Periplasmapräparation weniger Fremdproteine beinhaltet, konnten die nötigen Schritte zur Aufreinigung von HcpA optimiert werden. So war zwar eine zusätzliche Aufkonzentration des Zellkulturüberstands nötig, um gut handhabbare Volumina zu erhalten. Der zeitliche und arbeitstechnische Aufwand konnte im Vergleich zur Aufreinigung von HcpA aus *E. coli* durch anschließende Diafiltration verringert werden. Der Grad der erreichbaren Reinheit war aus prokaryontischen wie aus dem DS-2 Expressionssystem vergleichbar, beide liefern nach Aufreinigung Coomassie bandenreines rHcpA (Abbildung 10).

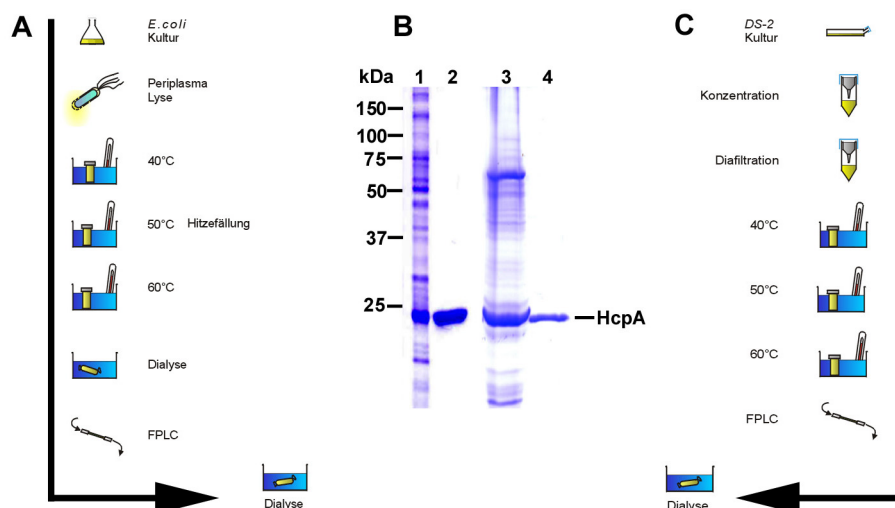


Abbildung 10: Aufreinigungsschema für beide Expressionssysteme

A) und C) zeigen schematisch die jeweils nötigen Aufreinigungsschritte, um aus der Kultur Coomassie-bandenreines HcpA zu erhalten. B) stellt ein Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel dar, auf das in Spur 1 *E. coli* JM83 pRBI-PDI/hcpA Gesamtlysat nach Induktion, Spur 2 aufgereinigtes, in *E. coli* exprimiertes HcpA aufgetragen wurde. Spur 3 enthielt 7-fach konzentrierten DS-2 Zellkulturüberstand nach Induktion, Spur 4 aufgereinigtes, in DS-2 Zellen exprimiertes HcpA.

5.2.2 Immunologische Eigenschaften von rekombinantem HcpA

Um eventuelle Unterschiede in den immunologischen Eigenschaften der in DS-2 bzw. *E. coli* exprimierten HcpA Präparationen aufzuzeigen, wurden parallele Immunisierungs- und Stimulationsexperimente durchgeführt. Es zeigte sich, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen der Verwendung von prokaryontisch und eukaryontisch exprimiertem HcpA bestanden. Beide Proteine zeigten in Balb/c Mäusen nach 3-maliger subkutaner Immunisierung mit je 10 µg HcpA unter der Adjuvierung mit CpG Oligo-DNA vergleichbare α HcpA-Antikörpertiter. Auch die Stimulation muriner Splenozyten aus naiven C57BL/6 Mäusen mit beiden Proteinpräparationen führte zur Ausprägung eines gleichartigen TH1 polarisierenden Zytokinprofils mit der dominanten Sekretion von IFN γ und ohne nachweisbare Sekretion von IL-4 in den Splenozyten Überstand (Abbildung 11).

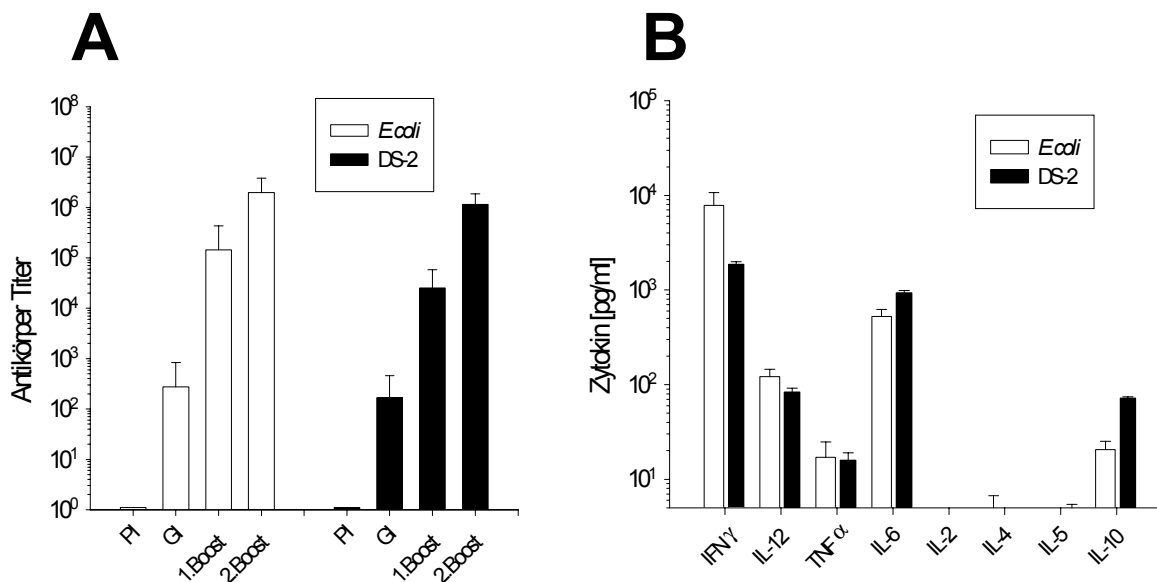


Abbildung 11: Immunologische Eigenschaften von in *E. coli* und in DS-2 Zellen exprimiertem HcpA
 A) zeigt den Verlauf des α HcpA Antikörpertiters in Balb/c Mäusen bei Immunisierungen mit gleichen Mengen HcpA und Adjuvierung mit CpG Oligo-DNA (PI= Präimmunsersum; GI= nach Grundimmunisierung; 1. bzw. 2. Boost = nach 1. bzw. 2. Boosterimmunisierung). B) zeigt die nach Stimulation mit rekombinantem HcpA erfolgte Zytokinsekretion von Splenozyten aus naiven C57BL/6 Mäusen.

5.3 Mechanismen der Immunstimulation durch HcpA

In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass HcpA immunstimulatorische Eigenschaften besitzt. Diese bestehen in der Induktion eines TH1 polarisierendem Zytokinprofils aus naiven Maussplenozyten, das dem durch ganze, lebende Hp induzierbarem Zytokinprofil gut entsprach (Decker, 2000; Aigner, 2001). Weitere Untersuchungen sollten den Mechanismus dieser Immunstimulation beleuchten.

5.3.1 Kinetik der Zytokininduktion

Um Rückschlüsse auf die an der Immunreaktion gegen HcpA beteiligten Zellen ziehen zu können und um eine mögliche Kontamination mit bakteriellem LPS auszuschließen, wurde der zeitliche Verlauf der Zytokinproduktion aus naiven murinen C57BL/6 Splenozyten nach Stimulation mit entweder 2 µg rekombinantem HcpA aus *E. coli* oder 5 µg *E. coli* O55:B5 LPS gemessen. Bestimmt wurden dabei die Zytokine IFN γ , IL-12 und TNF α , da deren Produktion durch beide Stimulantien angeregt wird.

Dabei zeigten sich für IFN γ und IL-12 keine Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Kurven, lediglich die absolute Menge an produzierten Zytokinen differierte (Abbildung 12). Der Sekretionsverlauf von TNF α hingegen weist deutlich unterschiedliche Zeitpunkte für die maximale Sekretion auf. So wird durch Stimulation mit *E. coli* LPS sehr schnell (bereits nach 4 Stunden) die maximale Konzentration an TNF α im Zellkulturmedium erreicht, während bei der Stimulation mit HcpA zu diesem Zeitpunkt noch kein TNF α nachzuweisen ist. Die HcpA induzierte TNF α Sekretionskurve hat ihr Maximum erst nach 24 Stunden erreicht, wenn die durch LPS induzierte TNF α Konzentration bereits wieder rückläufig ist.

5.3.2 Abhängigkeit der IFN γ Sekretion von IL-12 und IL-18

Durch Neutralisierungsexperimente sollte die Bedeutung der der IFN γ Produktion vorausgehenden IL-12 Sekretion untersucht werden. Dazu wurden naive Maussplenozyten mit Hp 2802 MOI=1 und 1 µg HcpA stimuliert. Gleichzeitig erfolgte die Zugabe von α IL-12 Antikörpern bzw. α IL-2 Antikörpern als Kontrolle. Zu beobachten war unabhängig vom verwendeten Stimulans eine dosisabhängige, signifikante Abnahme der Konzentration von IFN γ im Medium nach Neutralisation von IL-12, nicht jedoch bei Neutralisation von IL-2 (Abbildung 13A). Um den Einfluss des IL-12 Analogons IL-18 auf die IFN γ Produktion zu bestimmen wurde wie oben eine Splenozytenstimulation unter Zugabe von α IL-2, α IL-12 und

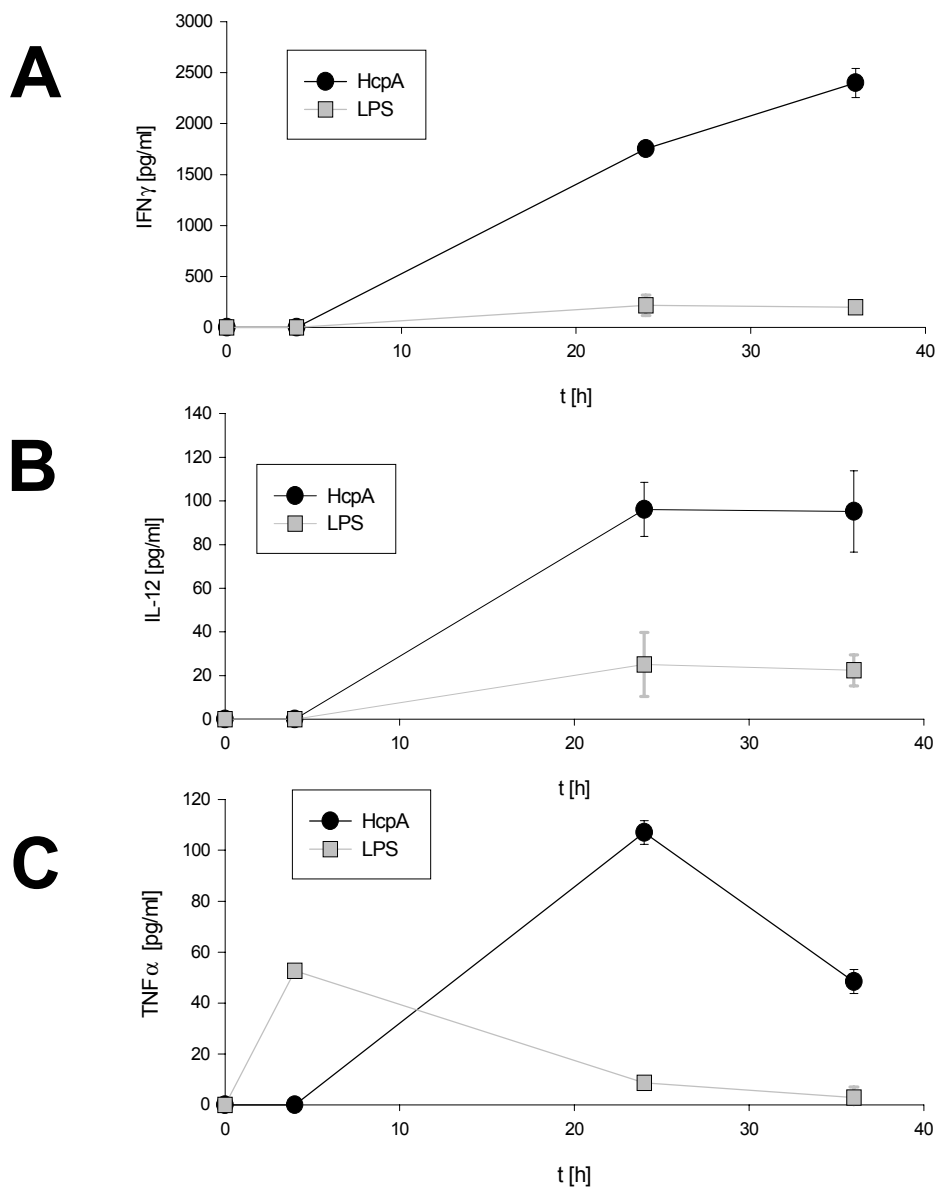


Abbildung 12: Zytokinexpressions-Kinetiken von Splenozyten nach Stimulation mit HcpA bzw. LPS. Stimuliert wurde mit 2 μg HcpA bzw. 5 μg LPS. Gemessen wurde die Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand nach 4 h, 24 h und 36 h Stimulation. A) zeigt den zeitlichen Verlauf der $\text{IFN}\gamma$ Sekretion, B) IL-12 und C) $\text{TNF}\alpha$.

$\alpha\text{IL-18}$ Antikörpern durchgeführt. Da zwischen HcpA und Hp keine immunologischen Unterschiede zu beobachten waren, wurde in diesem Versuch nur HcpA als Stimulans verwendet. Es zeigte sich, dass zwar eine Verringerung der $\text{IFN}\gamma$ Produktion mit der Zugabe von $\alpha\text{IL-18}$ Antikörpern erreicht werden konnte, diese jedoch in keinem Falle zu einer stärkeren Inhibition als mit $\alpha\text{IL-12}$ Antikörpern führte. Um synergistische Effekte der beiden proinflammatorischen, TH1 begünstigenden Zytokine auszuschließen, wurden gleichzeitig $\alpha\text{IL-12}$ und $\alpha\text{IL-18}$ Antikörper zugegeben. Dabei konnte kein über das mit $\alpha\text{IL-12}$ Antikörpern alleine

erreichbare Ausmaß hinausgehender Effekt der Doppelinhibition beobachtet werden (Abbildung 13B).

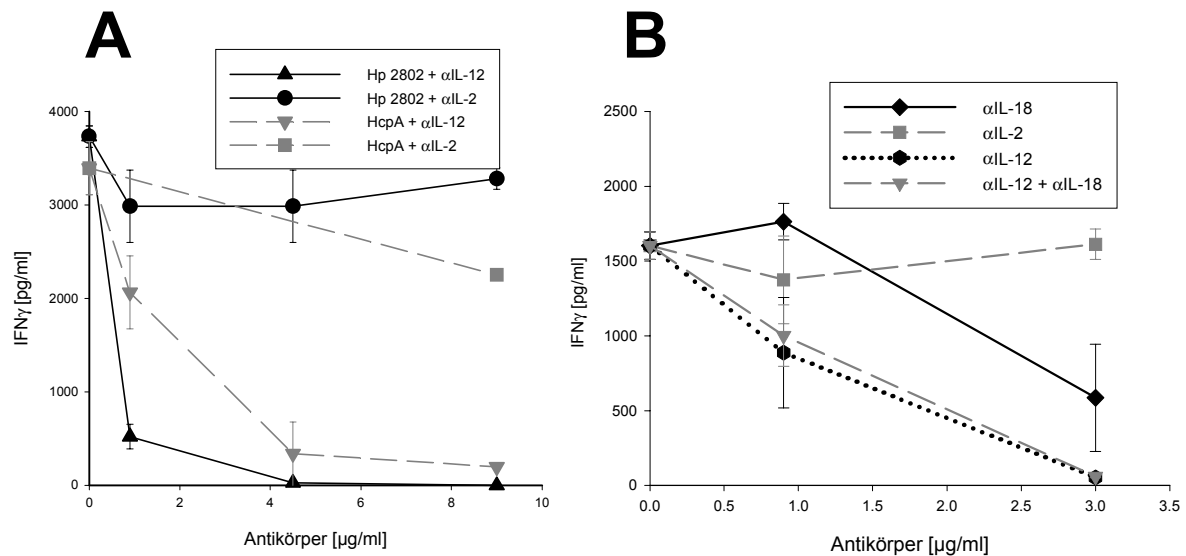


Abbildung 13: Einfluss von neutralisierenden Antikörpern auf die IFN γ Sekretion

A) Die Stimulation erfolgte mit je 1 μ g rHcpA bzw. Hp 2802 mit einer MOI=1 unter Standardbedingungen. Zu den Ansätzen wurde jeweils gleichzeitig mit dem Stimulans die angegebene Menge an neutralisierenden Antikörpern zugegeben. B) Als Stimulans wurde 1 μ g rHcpA verwendet. Die Zugabe von α IL-18 Antikörpern führt zu einer Abnahme der IFN γ Produktion, die nicht so drastisch verläuft wie bei Zugabe von α IL-12 Antikörpern. Auch die Kombination von beiden Antikörpern führt zu keinem stärkeren Absinken der IFN γ Konzentration im Medium als die alleinige Zugabe von α IL-12 Antikörpern.

Die Messung von weiteren Zytokinen neben IFN γ zeigte, dass die Inhibition der Zytokinexpression durch neutralisierende Antikörper außer auf die direkt beeinflussten Zytokine nur auf IL-6 und IFN γ einen Einfluss zu haben scheint. Dabei war zu beobachten, dass IL-18 stärker als IL-12 die IL-6 Sekretion beeinflusst, und umgekehrt IL-12 entscheidender als IL-18 für die IFN γ Sekretion ist (Abbildung 14).

5.3.3 Untersuchungen an TLR4 defizienten Mäusen

Toll-like-Rezeptoren (TLRs) spielen eine große Rolle bei der Erkennung von *pathogen-associated-molecular-patterns* (PAMPs), wie z.B. LPS, Flagellinen, und prokaryontischer DNA (Medzhitov, 2001). Damit stellen sie einen möglichen Rezeptor für die Erkennung von HcpA durch naive Mauszellen dar. Untersucht wurde der Einfluss von TLR4, dessen bekanntester Ligand bakterielles LPS darstellt, auf die HcpA induzierte Zytokinsekretion aus Splenozyten. Dazu wurden Milzzellen aus Mäusen der Stämme C3H HeN und C3H HeJ verwendet. Die Mäuse des Wildtyp-Stamms C3H HeN verfügen einen intakten TLR4, während die C3H HeJ Mäuse keinen funktionsfähigen TLR4 mehr exprimieren können, und damit LPS hyposensitiv sind. Ein durch eine spontane Punktmutation hervorgerufener Austausch eines

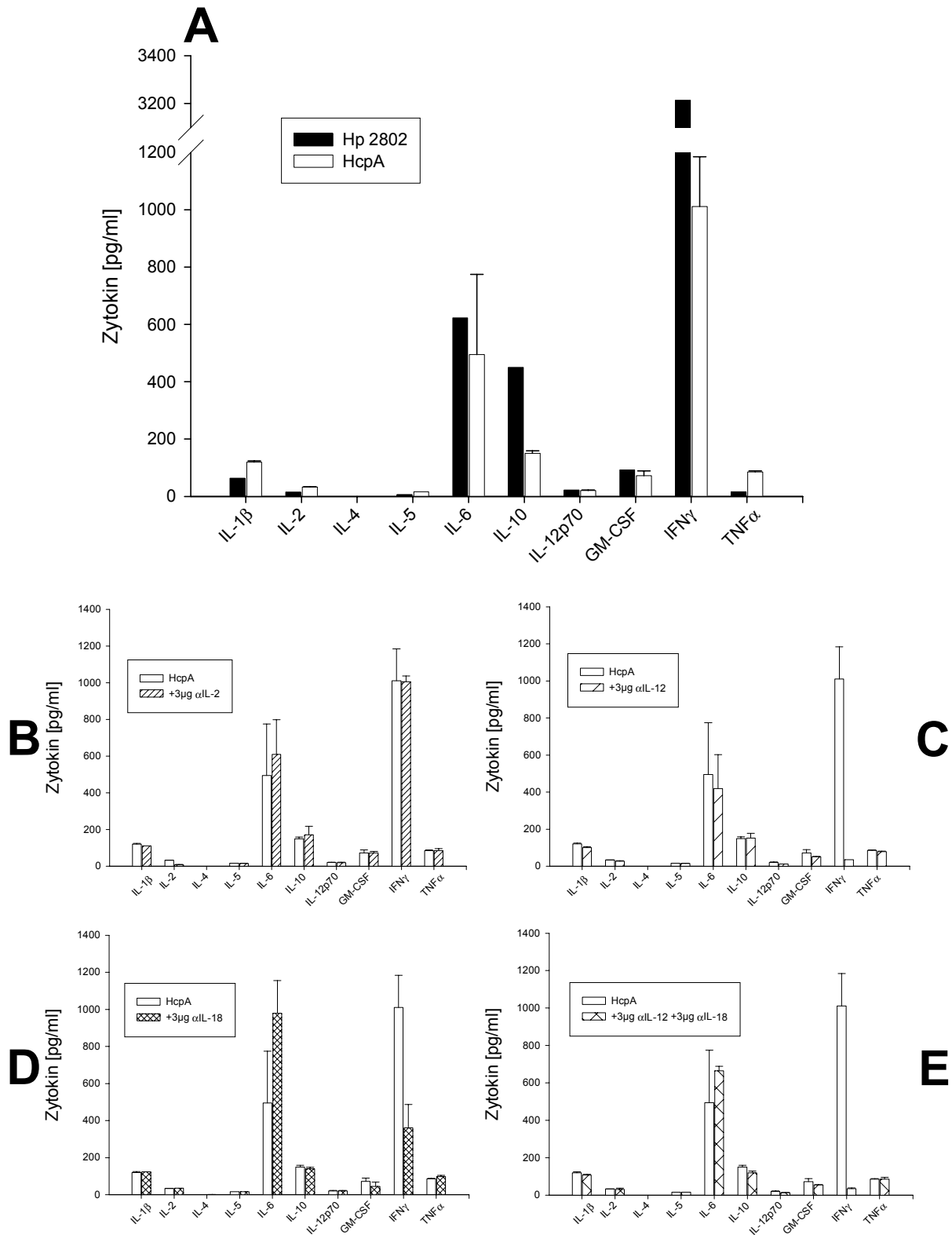


Abbildung 14: Wirkung neutralisierender Antikörper auf das Zytokinprofil

A) Zeigt den Vergleich der durch Hp 2802 MOI=1 und 1 μ g HcpA induzierten Zytokinprofile aus murinen Splenozyten. B) bis E) zeigen die Auswirkungen der Neutralisation von IL-2, IL-12 und IL-18 auf die anderen Zytokine. Es zeigt sich, dass außer den direkt durch Zugabe von Antikörpern beeinflussten Zytokinen nur IL-6 und IFN γ dem Einfluss von IL-12 und IL-18 unterliegen, wobei die Abhängigkeit der IL-6 Sekretion durch IL-18 stärker ausgeprägt ist als durch IL-12 und umgekehrt die IFN γ Produktion deutlicher durch die IL-12 als durch die IL-18 Neutralisation inhibiert wird.

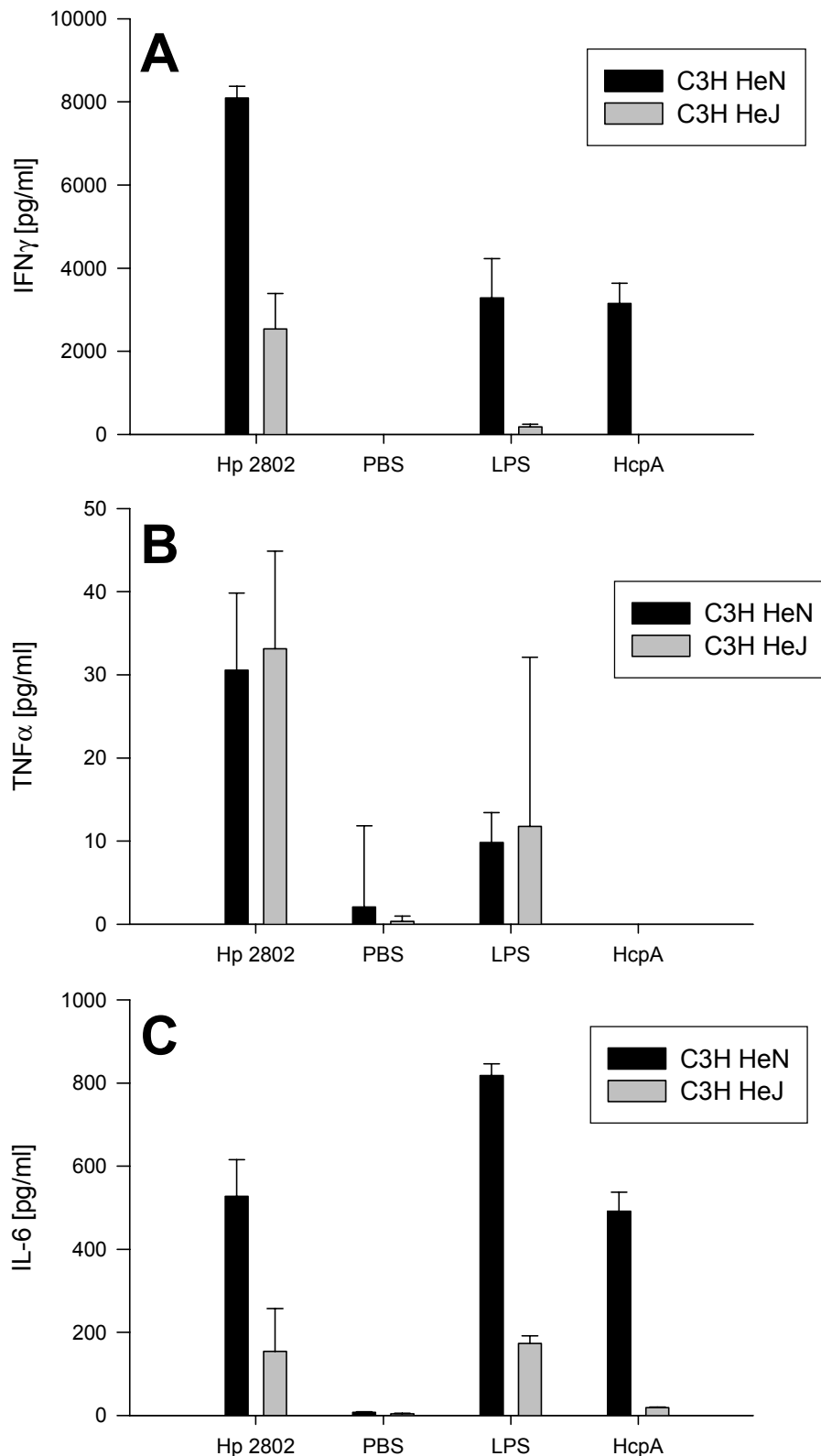


Abbildung 15: Bedeutung des TLR4 für die immunologische Erkennung von HcpA
 Stimuliert wurden Splenozyten aus TLR4 positiven (C3H HeN) Mäusen und aus TLR4 defizienten (C3H HeJ) Mäusen. A) zeigt die gemessenen Konzentrationen an IFN γ , B) TNF α und C) IL-6.

strukturell wichtigen Prolins zu Histidin im zytoplasmatischen Teil des C3H HeJ TLR4 führte zu dessen Funktionsverlust (Poltorak *et al.*, 1998). Die Splenozyten aus beiden

Mäusestämmen wurden unter Standardbedingungen gewonnen und mit Hp 2802 MOI=1 bzw. 1 µg HcpA stimuliert. Als Negativkontrolle wurde PBS verwendet, als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 5 µg *E. coli* LPS.

Alle verwendeten Stimulantien zeigten eine signifikant niedrigere IFN γ - und IL-6-Produktion bei Verwendung von TLR4 *knock-out* Splenozyten. Eine vollständige Reduktion der IFN γ Sekretion war jedoch nur bei Stimulation mit HcpA zu beobachten, sowohl Hp 2802 als auch LPS konnten aus TLR4 *knock-out* Splenozyten noch nachweisbare Mengen an IFN γ induzieren. Die TNF α Sekretion schien unabhängig von verwendeten Donor-Mäusestamm und damit vom Vorhandensein eines funktionellen TLR4 zu sein (Abbildung 15).

5.3.4 Restimulation HcpA immunisierter Mäuse

Um eventuelle Unterschiede zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort gegen HcpA zu untersuchen wurden je drei C57BL/6 Mäuse mit 10 µg HcpA zusammen mit verschiedenen Adjuvantien zweimal immunisiert. 5 Tage nach der zweiten Immunisierung wurden aus den Milzen der Mäuse Splenozytenkulturen hergestellt und diese mit Hp 2802 MOI=1 infiziert oder mit 1 µg HcpA (re-)stimuliert. 5 µg *E. coli* LPS und PBS dienten als Positiv- bzw. Negativkontrollen. Nach 36 h Infektion bzw. Stimulation wurden die Zellkultur-Überstände geerntet und auf IFN γ und IL-5 untersucht. Eine IL-5 Sekretion war in keinem Ansatz nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Alle verwendeten Stimulantien konnten aus allen Splenozytenpräparationen IFN γ in erheblichem Ausmaß induzieren (Abbildung 16). Ein Einfluss der Adjuvantien ließ sich nicht zeigen. Splenozyten aus PBS immunisierten Mäusen reagierten mit einer geringeren IFN γ Sekretion auf die Stimulation mit HcpA als die restimulierten Splenozyten von HcpA immunisierten Mäusen.

5.3.5 Gerbil-Infektionsmodell

Da die experimentelle Infektion von Balb/c und C57BL/6 Mäusen mit Hp wenig bis keine beobachtbare histologische Veränderungen zufolge hatte (Denk, 2003), jedoch die mongolische Wüstenrennmaus *Meriones unguiculatus* als gutes, d.h. Hp suszeptibles, Tiermodell bekannt ist, wurde dieses Tiermodell der Hp Infektion am Regensburger Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene von U. Thalmaier etabliert. Dazu wurden mehrere Patientenisolate an den Gerbil adaptiert und deren Histopathologie untersucht. Als am besten geeignet erwies sich der Hp Stamm Ca117 (persönliche Mitteilung von U. Thalmaier), dessen an die Wüstenrennmaus

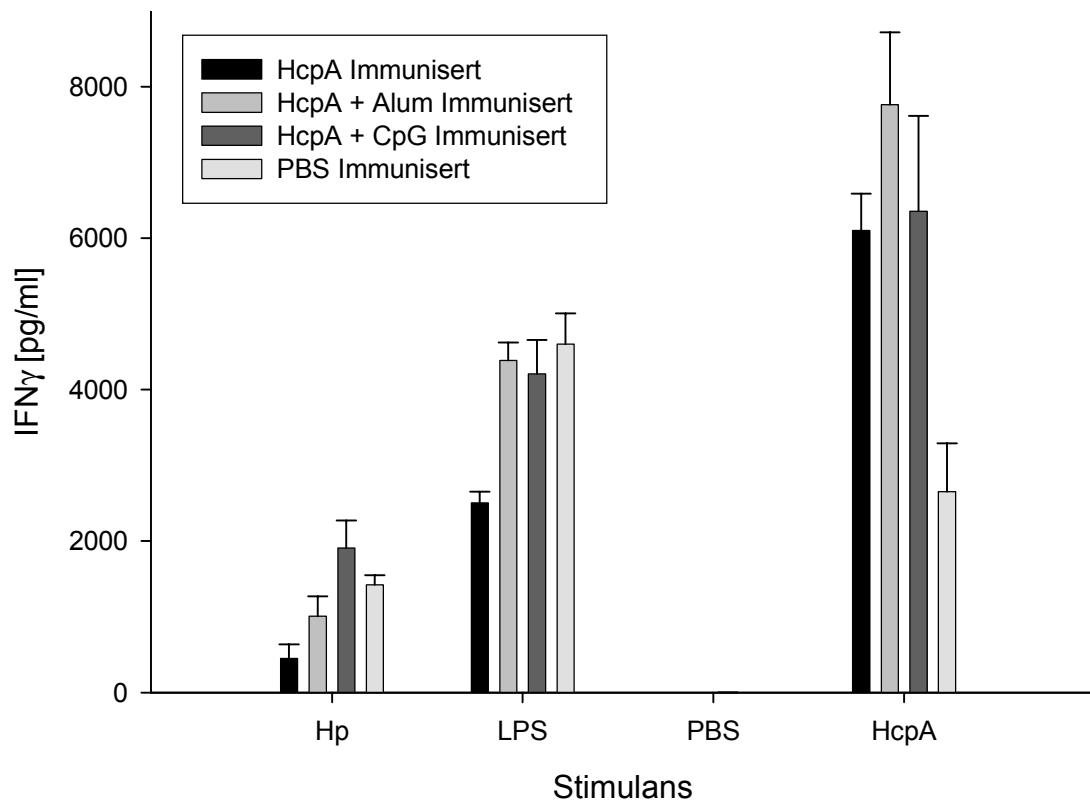


Abbildung 16: Restimulation von Splenozyten unterschiedlich immunisierter Mäuse

Die verwendeten Mäuse wurden je zweimal mit HcpA immunisiert. Als Adjuvantien wurden Alum und CpG Oligo DNA verwendet. Die aus den immunisierten Mäusen gewonnenen Splenozyten wurden in verschiedenen Ansätzen restimuliert. Alle Stimulantien führten zu einer Freisetzung von IFN γ ins Zellkulturmedium. Splenozyten von PBS immunisierten Mäuse sekretierten weniger IFN γ nach Stimulation mit HcpA als die Splenozyten der anderen Immunisierungs-Gruppen.

adaptierte Variante Ca117G in allen vorliegenden Infektionsexperimenten verwendet wurde. Durch PCR und Westernblot erfolgte die Überprüfung des Isolats Ca117G auf Vorhandensein des *hcpA* Gens und HcpA Expression. Beide Tests waren positiv (Daten nicht gezeigt).

5.3.5.1 Infektion und Antikörpertiter Entwicklung

4 Wochen nach der Infektion mit Hp Ca117G war histologisch bereits eine ausgeprägte Gastritis nachzuweisen (persönliche Mitteilung von U. Thalmaier). Zur Bestimmung der Antikörpertiter wurden die Tiere 2, 3 oder 4 Wochen nach Infektion euthanasiert und Serum aus Herzpunktat gewonnen. Die Bestimmung der Antikörpertiter erfolgte mittels eines mit Gerbil Antikörpern kreuzreagierenden α Maus-Ig-Gesamt Antikörpers. Es wurden die Antikörpertiter gegen Ganzkeimlysat des Infektionsstammes Ca117G und gegen HcpA bestimmt. Dabei war über den Infektionszeitraum eine kontinuierliche Zunahme der α Ca117G Lysat Antikörper in Serum der infizierten Tiere zu beobachten. Ein α HcpA Titer konnte jedoch in keinem der infizierten Tiere 4 Wochen nach Infektion nachgewiesen werden (Abbildung 17).

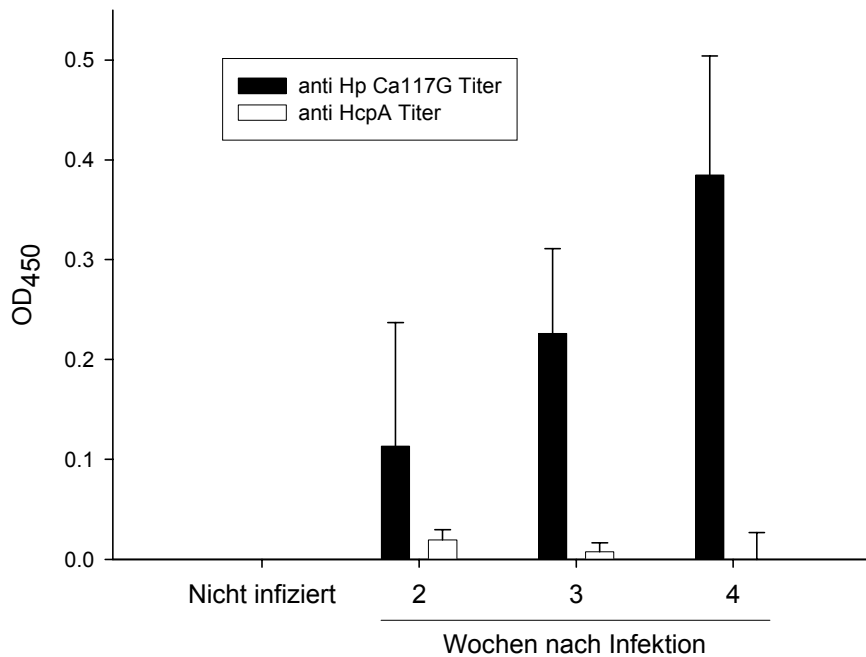


Abbildung 17: Entwicklung der α HcpA und α Hp Antikörpertiter im Gerbil nach Hp Infektion. Während der Antikörpertiter gegen Gesamtlisat des Infektionskeims Ca117G mit zunehmender Infektionsdauer ansteigt, blieb der α HcpA Titer unter der Nachweisgrenze.

Die Entwicklung des Antikörpertiters wurde auch mittels Westernblot verfolgt. Dabei zeigten sich prominente Banden, die zu definierten Zeitpunkten auftraten (Abbildung 18). Die diesen Banden entsprechenden, nicht näher identifizierten Proteine wurden nach ihrem Molekulargewicht p20, p23, p30 und p125 benannt. Bereits 2 oder 3 nach Wochen nach Infektion waren Antikörper gegen p23 und p30 nachzuweisen, während Antikörper gegen p125 frühestens nach 3 Wochen Infektion auftraten. Der Beginn der Antikörperbildung gegen p20 erfolgte nach 3 Wochen, die deutliche Ausprägung erst nach 4 Wochen.

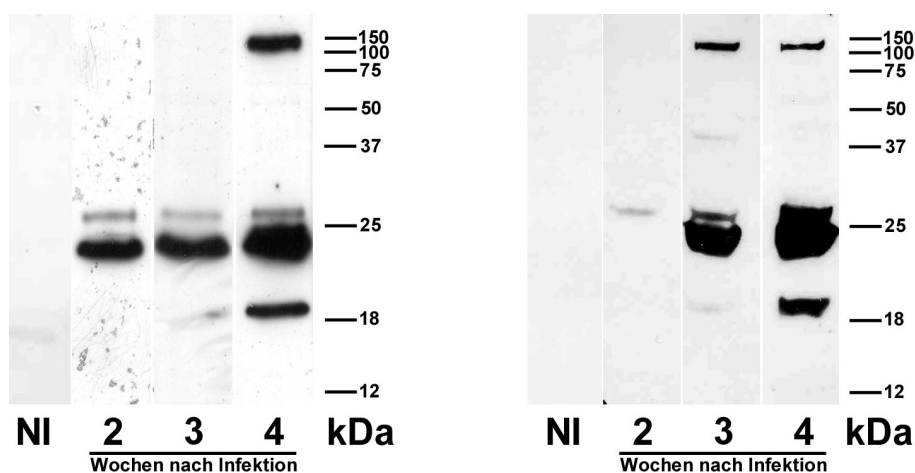


Abbildung 18: Westernblots der Antikörperentwicklung im Gerbil nach Infektion. Gezeigt sind die Westernblots der Seren zweier Gerbil Infektionsreihen. Als Antigen diente Hp Ca117G Gesamtlisat. NI bezeichnet Seren von nichtinfizierten Gerbils, 2, 3 und 4 sind Seren von Gerbils nach 2, 3 und 4 Wochen Infektion mit Hp Ca117G.

Zur Klärung der Fragestellung, um welche Antigene es sich bei den durch die Gerbilseren erkannten Proteine es sich handeln könnte, wurde ein Vergleich mit der 2D-PAGE Proteome Database des MPI für Infektionsbiologie, Berlin, durchgeführt. Dabei wurde die Suche auf Proteine mit entsprechenden Molekulargewichten, die als Antigen beschrieben sind, beschränkt (Tabelle 13). So konnte vermutet werden, dass es sich bei p125 um CagA und bei p30 um UreA handeln könnte, die beide starke Antigene darstellen.

HcpA als beschriebenes Antigen fehlt auf dieser Liste, da keine α HcpA Titer in den entsprechenden Gerbilseren festgestellt werden konnten und auch der Westernblot gegen rHcpA negativ war (Daten nicht gezeigt).

Protein	theoretisches MW [kDa]	beobachtetes MW [kDa]
CagA	132.3	132.4
CeuE	37.1	33.9
LytB	30.9	33.3
RplA	25.2	32.9
HpaA	28.3	30.5
HcpC	31.5	30.2
HP0231	29.4	30.0
UreA	26.5	28.9
HP1564	30.1	28.5
RplE	20.2	19.2
HP0305	20.3	14.0
Lpp20	19.1	

Tabelle 13: Bekannte Hp Antigene mit theoretischem und beobachtetem Molekulargewicht. Durch Vergleich mit <http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE/> (Proteome 2D-PAGE database MPI Berlin) und (Cao *et al.*, 1998; Keenan *et al.*, 2000b) ermittelte bekannte Hp Antigene, deren Molekulargewicht den Banden der Westernblots in Abbildung 18 in etwa entspricht.

Einige theoretisch ermittelte Antigene wurden durch Westernblotting von Gesamtlysaten verschiedener Hp Stämme auf Reaktivität mit Gerbilserum überprüft. Die dabei verwendeten Stämme sind zusammen mit ihren genetischen Besonderheiten in Tabelle 14 gezeigt.

Da die, für die Untersuchung der Antikörpertiter Entwicklung nach Infektion verwendeten, Seren aufgebraucht waren, wurde dieser Westernblot mit einem anderem Serum eines 4 Wochen mit Ca117G infizierten Gerbils entwickelt. Dieses Serum wies zusätzlich Antikörper gegen ein Antigen der Größe ca. 50kDa auf (p50). Dabei bestätigte sich, dass es sich bei p125 um CagA handelt, da alle CagA-negativen Hp Lysate diese Bande verloren hatten (Abbildung 19). Die p50 Bande trat

Hp Stamm	#	Cag-PAI	CagA	deletiertes Gen
Ca117G	1	+	+	-
2802	2	+	+	-
2802 Δ hcpA	3	+	+	hcpA
2802 Δ virB11	4	+	+	virB11
2802 Δ comB9	5	+	+	comB9
P12 Δ cagA	6	+	-	cagA
Tx30a	7	-	-	-
Ca77G	8	-	-	-

Tabelle 14: Genetische Eigenschaften der verwendeten Hp Stämme

Hp Stämme, deren Gesamtlysate auf Reaktivität gegen Gerbilseren getestet wurden, um verschiedene mögliche Antigene zu überprüfen.

ebenfalls trat nur bei den *cagA* positiven Hp Stämmen auf. Das Lysat des Hp Stammes Tx30a (Spur 7), zeigte keine Antikörperbindung an p30 wie der Rest der Lysate. Die restlichen untersuchten Gene hatten keinen Einfluss auf das sich ausprägende Bandenmuster. Dies lässt den Schluss zu, das die Produkte dieser Gene nicht die gesuchten Antigene sein können.

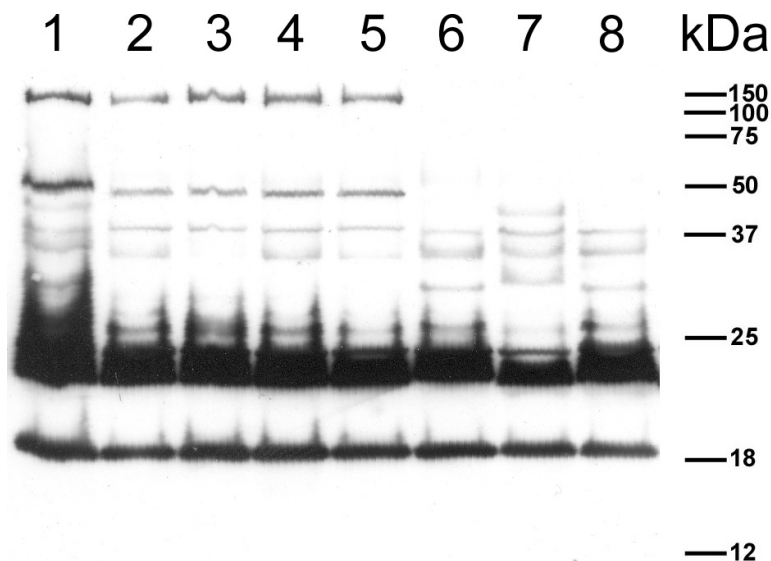


Abbildung 19: Westernblot mit Gerbilserum gegen Gesamtlysate verschiedener Hp Stämme

Die Nummerierung der Hp Stämme erfolgte entsprechend Tabelle 14. Es wurden jeweils 10 μ g Gesamtlysate je Spur aufgetragen. Die Stämme 1 bis 5 sind *CagA*⁺, während 6 bis 8 *CagA*⁻ sind (vgl. Tabelle 14).

5.3.5.2 Immunisierung

Je 5 Gerbils pro Gruppe wurden wie im Schema dargestellt intranasal mit entweder 10 μ g HcpA, 10 μ g Ca117G Gesamtlysate oder PBS jeweils mit CpG Oligo DNA als Adjuvans immunisiert (Abbildung 20). Nach der Immunisierung wurde aus den Tieren Serum gewonnen, bevor diese anschließend mit Ca117G infiziert wurden. Nach 4 Wochen Infektion wurde die Tiere getötet, erneut Serum gewonnen, sowie der

Magen präpariert. Die Seren wurden auf Antikörpertiter gegen HcpA und Ca117G untersucht. Die Mägen wurden für die histologische Untersuchung, für die Re kultivierung von Hp und zur Isolation von RNA und anschließendem TaqMan® Assay, um die relative Anzahl an Zytokin mRNAs zu bestimmen (siehe 5.3.5.4.3), aufgeteilt.

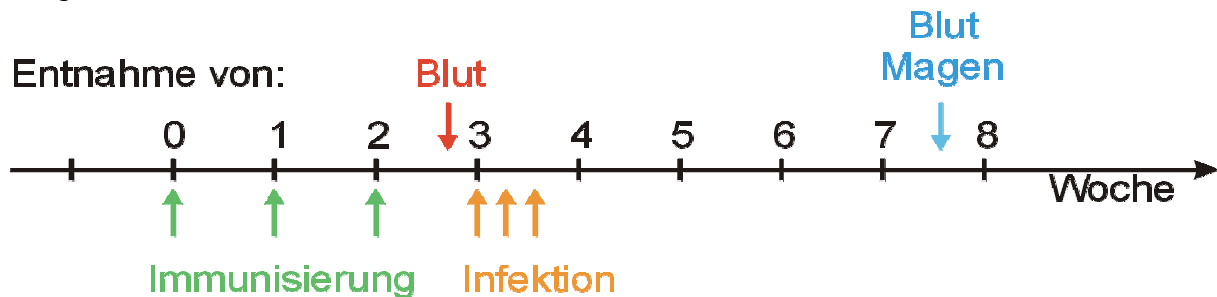


Abbildung 20: Schema der intranasalen Immunisierung und Infektion von Gerbil

Zum Zeitpunkt 0,1 und 2 Wochen erfolgte die intranasale Immunisierung, 5 Tage nach der letzten Immunisierung wurde den Tieren Blut aus der Schwanzvene entnommen. 3 Wochen nach der ersten Immunisierung wurden die Gerbils dreimal im Abstand von jeweils 2 Tagen mit 1×10^9 CFU Hp infiziert.

Alle Seren zeigten im Vergleich zu den nur mit PBS immunisierten Gerbils weder nach Immunisierung noch nach Infektion erhöhte Antikörpertiter gegen HcpA. Die mit Ca117G Lysat immunisierten Tiere hatten nach der Immunisierung bereits einen höheren α Lysat Antikörpertiter als die Kontrollgruppe. Die Seren der mit HcpA immunisierten Gerbils wiesen erst nach Infektion leicht höhere α Gesamtlisat-Titer auf als die PBS-immunisierten Kontrolltiere (Abbildung 21).

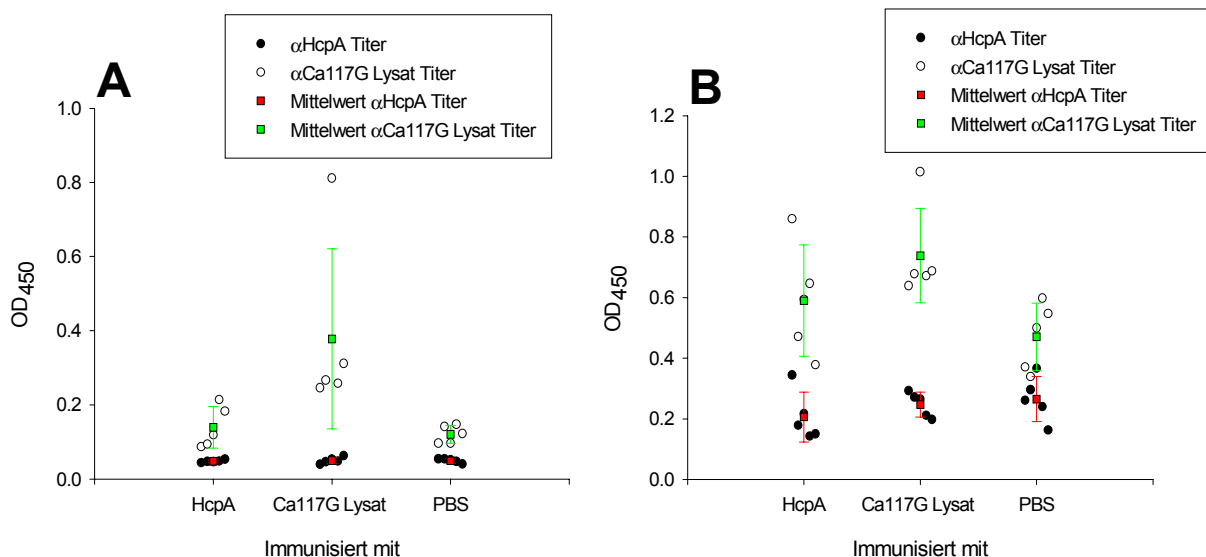


Abbildung 21: Gerbil Antikörpertiter nach Immunisierung und anschließender Infektion

A) zeigt die Antikörpertiter der Gerbils 5 Tage nach dreimaliger Immunisierung. B) zeigt die Antikörpertiter nach 4 Wochen Infektion mit Ca117G.

5.3.5.3 Hp Kultur und Histologie der Gerbilmägen

Sowohl die Rekultivierung von Hp aus den Mägen der Ca117G infizierten Gerbils, als auch die histologische Untersuchung der Mägen zeigte keine Unterschiede zwischen den Immunisierungsgruppen. Hp konnte aus allen Gerbils in gleicher Dichte kultiviert werden und alle Gerbils hatten eine chronische lymphozytäre Gastritis gleicher Ausprägung (persönliche Mitteilung von F. Bataille, Daten nicht gezeigt).

5.3.5.4 Zytokinbestimmung mittels qRT-PCR (TaqMan®)

Der molekularbiologische Nachweis von Antikörpern, Zytokinen wie auch zellulären Oberflächenmarkern aus Gerbils ist aufgrund der fehlenden Reagenzien schwierig. Eigentlich zu erwartende Kreuzreaktivitäten von Antikörpern gegen entsprechende Moleküle anderer Nager traten nicht bzw. nur selten auf. So zeigte ein α Maus IgGesamt Antikörper Kreuzreaktionen mit Gerbil-Ig, was die Bestimmung von Antikörpertitern erst ermöglichte (siehe 5.3.5.1). Die Zytokinbestimmung aus Gerbilsplenozyten Kulturüberstand mit ELISA Systemen für Maus- wie auch Rattenzellen war vollständig negativ (Daten nicht gezeigt). Auch die durchflusszytometrische Analyse mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen zelluläre Oberflächenmarker wie CD80 und CD86 von Mäusen und Ratten hatte keinen Erfolg (persönliche Mitteilung A. Eckhardt). Aus diesem Grunde wurde die Bestimmung von Zytokinen und Oberflächenmarkern auf Transkriptionsebene mittels quantitativer *real-time* PCR im TaqMan® System etabliert.

Gen-Produkt	cDNA [bp]
IL-2	468
IL-4	432
IL-10	537
IL-12p35	633
IL-18	588
IFN γ	522
TNF α	303
B7.2 (=CD86)	870
HPRT	657

Tabelle 15: Klonierte Gerbil cDNAs

Alle aufgeführten cDNAs konnten in pBlueScript II kloniert und dort durch Sequenzierung validiert werden. Sie stehen somit als Template für weitere Experimente zur Verfügung. Von allen Zytokinen außer TNF α liegt die Vollängensequenz vor, bei TNF α handelt es sich lediglich um eine partielle Sequenz. B7.2 ist der einzige Oberflächenmarker, dessen Klonierung gelang. HPRT (Hypoxanthin Phosphoribosyl-Transferase) ist ein Haushaltsgen, das ubiquitär in Gerbil-Zellen vorliegt und somit als Kontrolle für die quantitative Bestimmung von mRNA Kopien pro Zelle dienen kann.

5.3.5.4.1 Klonierung von Gerbil cDNAs

Zur Herstellung eines mRNA Pools wurden 10^7 Gerbilplenozyten mit Ionomycin/PMA für 36 h stimuliert und anschließend daraus Gesamt-RNA isoliert. Nach reverser Transkription mit unspezifischen Oligohexamernukleotid-Primern wurden PCRs mit spezifischen Primern durchgeführt und die Produkte in einen pBlueScript II Vektor kloniert und sequenziert. In Tabelle 15 sind die klonierten Gerbil cDNAs aufgeführt.

5.3.5.4.2 Etablierung des TaqMan® Systems

Zur Etablierung eines TaqMan® Assays wurden zuerst die optimalen Konzentrationen für die jeweiligen Primer, Sonde und $MgCl_2$ durch Titrationsreihen bestimmt. Diese sind Tabelle 16 zu entnehmen.

Assay	Primer		Sonde	$MgCl_2$
	forward	reverse		
	nM	nM	nM	mM
IFN γ	900	900	250	6,5
IL12p35	900	300	200	4
TNF α	300	300	250	4
HPRT	900	300	200	4

Tabelle 16: Ermittelte optimale Konzentrationen für neu etablierte Gerbil-Zytokin TaqMan® Assays

Unter diesen experimentell festgestellten optimalen Reaktionsbedingungen wurden die entsprechenden Tests durchgeführt. Die dabei erhaltenen Standardkurven zeigten einen linearen Verlauf von 10^9 bis 10^1 Kopien. Zum Vergleich ist in Abbildung 22 die typische Standardkurve eines Maus IFN γ ELISAs dargestellt, die von 2000 pg/ml bis 31,625 pg/ml linear verläuft.

Da für den Gerbil nur cDNA Sequenzen verfügbar sind, konnte beim Design der TaqMan® Primer/Sonden-Kombinationen keine Exon/Intron Grenze berücksichtigt werden. Somit sind die verwendeten Primer theoretisch auch in der Lage genomische DNA nachzuweisen. Da in aus Gewebe isolierter RNA immer auch noch DNA vorhanden ist, wurde überprüft, ob ein DNaseI Verdau vor der reversen Transkription nötig ist. Dazu wurde genomische Gerbil-DNA als Kontrolle verwendet. Abbildung 23 zeigt, dass der TaqMan® IFN γ Assay tatsächlich in der Lage ist, genomische IFN γ DNA zu amplifizieren. Ein DNaseI Verdau reduziert jedoch die vorhandenen Kopien an genomischer DNA um 99,98% von ca. 4×10^5 auf 58. Ein Kontroll-RT-Ansatz mit aufgereinigter RNA ohne reverse Transkriptase enthielt noch

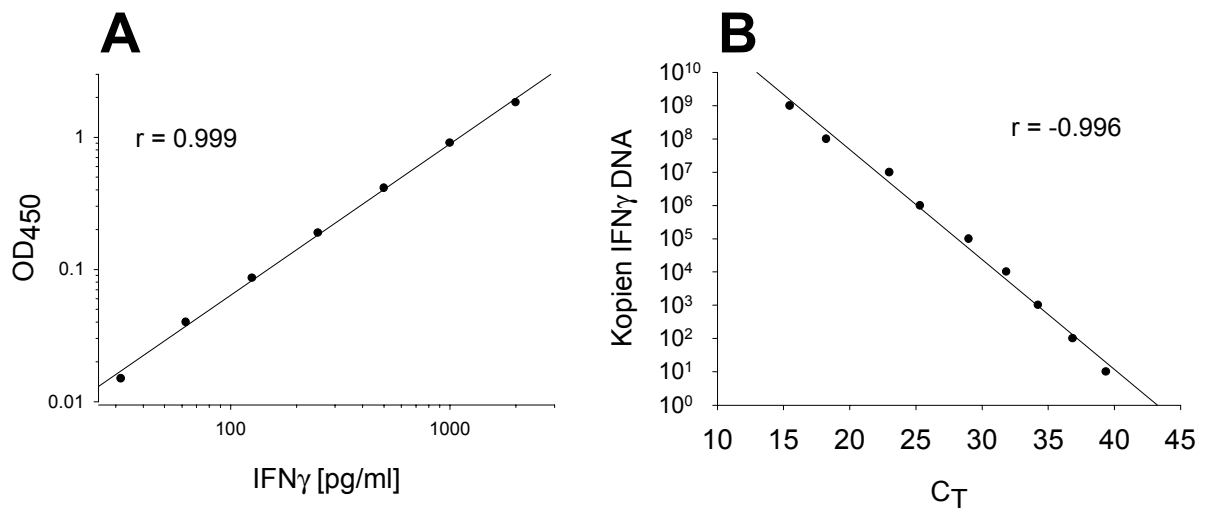


Abbildung 22: Beispiele für Standard-Kurven für ELISA und qRT-PCR

Dargestellt sind zwei typische Standardregressionsgeraden für die Bestimmung von $\text{IFN}\gamma$. A) Standardgerade eines Maus $\text{IFN}\gamma$ ELISAs über einen Bereich von 31 bis 2000 pg $\text{IFN}\gamma/\text{ml}$ mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=0,999$. B) Standardgerade einer quantitativen RT-PCR mittels des TaqMan® Systems. Aufgetragen sind die Anzahl der eingesetzten DNA Kopien gegen den jeweiligen C_T Wert ($C_T = \text{threshold cycle}$), d.h. der Zyklus in dem der zur Berechnung festgesetzte Grenzwert überschritten wurde. Diese Gerade hat über einen Bereich von 10^9 bis 10^1 Kopien $\text{IFN}\gamma$ DNA/Ansatz einen Korrelationskoeffizienten von $r=-0,996$.

ca. 3×10^5 Kopien gDNA, die durch DNaseI Verdau auf 46 nachweisbare Kopien pro Ansatz verringert werden konnten (ebenfalls 99,98%). Die Durchführung der reversen Transkription mit RNA, die zuvor mit DNaseI behandelt wurde oder nicht, zeigte ebenfalls eine Reduktion der Kopienzahl um ca. 3×10^5 von $1,6 \times 10^6$ auf $1,3 \times 10^6$ (16,12%).

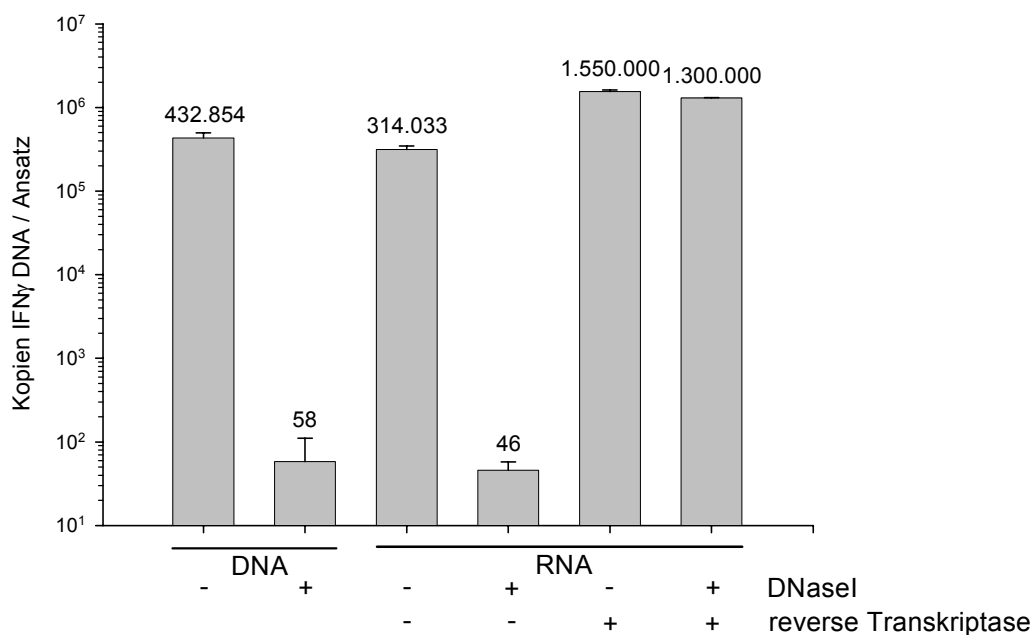


Abbildung 23: Einfluss von DNaseI auf die nachgewiesene Kopienzahl im TaqMan® Assay
Über den Balken ist der Mittelwert der Anzahl der gemessenen Kopien Gerbil $\text{IFN}\gamma$ DNA des TaqMan® Assays dargestellt. Gezeigt sind verschiedene Kombinationen von DNaseI Verdau und reverser Transkription. Genomische Gerbil DNA diente als Kontrolle.

5.3.5.4.3 Zytokinbestimmung aus Gerbilmägen

Aus den in 5.3.5.2 präparierten Mägen von immunisierten und anschließend mit Hp Ca117G infizierten Gerbils wurde Gesamt-RNA isoliert. Mit Hilfe der etablierten TaqMan® Assays wurde die Kopienzahl von IFN γ , TNF α , IL12p35 und HPRT mRNA nach DNaseI Verdau und reverser Transkription ermittelt. Anschließend wurde für jede Zytokin mRNA das Verhältnis zur HPRT mRNA im Ansatz bestimmt (Abbildung 24).

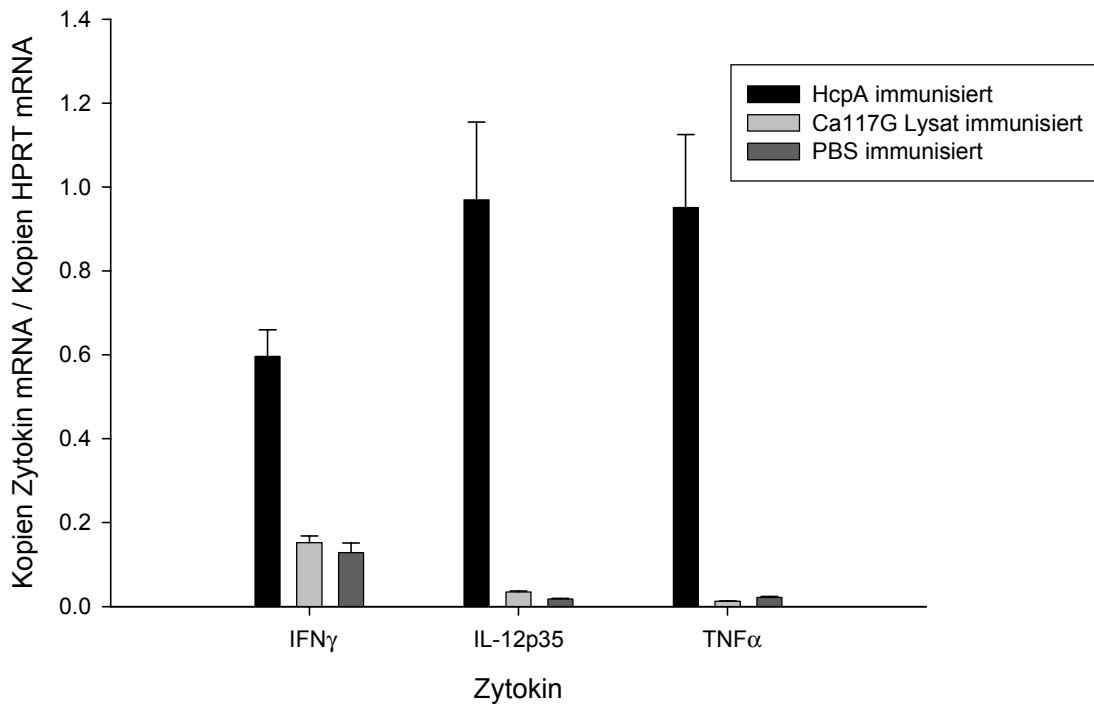


Abbildung 24: Transkription von Zytokin-Genen im Gerbilmagen nach Immunisierung und Infektion. Aufgetragen ist die relative Anzahl an Zytokin-Gen Transkripten im Verhältnis zu der Anzahl Transkripte eines Haushaltsgens (HPRT). Dargestellt sind die Mittelwerte der Einzel-Quotienten Zytokin-Gen/HPRT der einzelnen Gerbilmägen.

Es zeigte sich bei den HcpA immunisierten Tieren ein deutlich höheres Verhältnis von Zytokin-cDNAs zu HPRT cDNA als bei den mit Ca117G Lysat oder mit PBS immunisierten Gerbils.

5.3.6 Untersuchung von HcpA Mutanten

5.3.6.1 Carboxyterminus und HcpA-coil

Zur näheren Charakterisierung des HcpA Proteins und eventueller funktionaler Domänen wurde der prokaryontische Expressionsvektor pRBI-PDI/*hcpA* durch *site directed mutagenesis* dahingehend verändert, dass nur der aminoterminaler bzw. carboxyterminale Teil von HcpA exprimiert wurde. Die entstandenen HcpA Derivate wurden mit N-Terminus respektive C-Terminus bezeichnet. Zusätzlich wurde eine

HcpA Mutante generiert, die aus dem Wildtyp-Gen besteht, das lediglich am carboxyterminalen Ende um ein *in silico* vorhergesagtes *coiled-coil* Motiv deletiert wurde (HcpA-coil). Schematisch sind diese Mutanten in Abbildung 25 dargestellt.

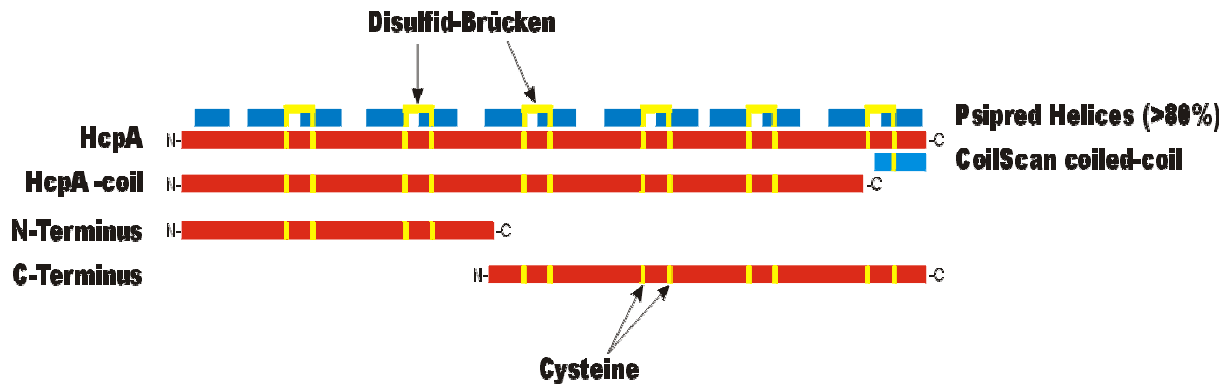


Abbildung 25: Übersicht über die hergestellten HcpA Mutanten. Eingezeichnet sind die mittels Psipred *in silico* vorhergesagten Bereiche, die mit mehr als 80% Wahrscheinlichkeit eine Helix bilden, sowie der von CoilScan prognostizierte *coiled-coil* Abschnitt am carboxyterminalen Proteinende. Auffallend ist eine regelmäßige Struktur von Helix-Disulfid-Bindung-Helix Motiven, die für alle Hcps charakteristisch ist.

Die grundlegenden biochemischen Eigenschaften dieser Mutanten sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

	MW [kDa]	pI	Ladung
HcpA	24,7	8,0	+4,2
HcpA-coil	22,6	8,1	+3,2
N-Terminus	10,2	7,7	+1,0
C-Terminus	14,5	8,2	+4,2

Tabelle 17: Eigenschaften der generierten HcpA Mutanten. Mittels Generunner *in silico* berechnete biochemische Eigenschaften der hergestellten HcpA Mutanten.

Stimulationsexperimente konnten jedoch nur mit den Mutanten HcpA-coil und C-Terminus erfolgen, da die Mutante N-Terminus in *E. coli* nicht exprimiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Bestimmung von naiven murinen Splenozyten sekretiertem IFN γ nach Stimulation mit 1 μ g der Protein-Mutanten zeigte, dass der Carboxyterminus von HcpA eine dem Gesamtprotein entsprechende immunstimulatorische Eigenschaft besaß. Die durch Deletion des vorhergesagten *coiled-coil* Motivs entstandene Mutante induzierte nur noch ca. die Hälfte des von vollständigem HcpA induzierten IFN γ (Abbildung 26).

5.3.6.2 HcpA-DHFR Fusionspeptide

5.3.6.2.1 Klonierung und Expression von DHFR-HcpA Fusionspeptiden

Die genauere Bestimmung immundominanter Domänen sollte durch Herstellung

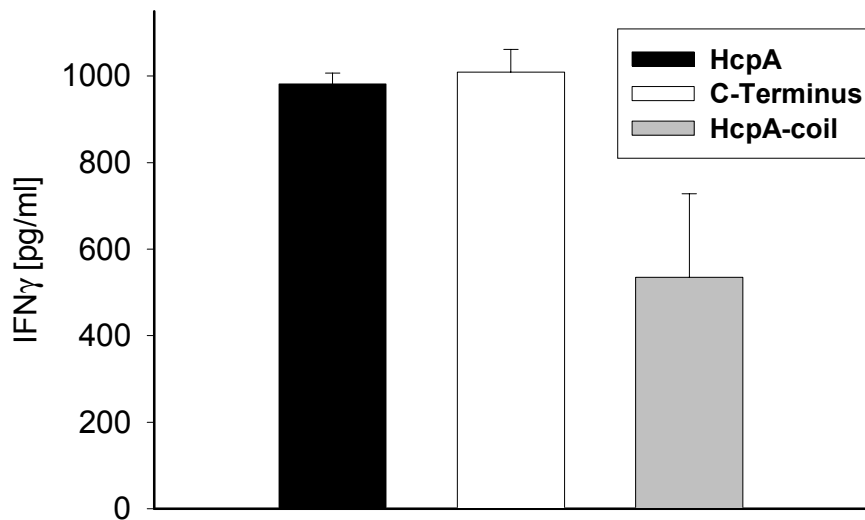


Abbildung 26: Durch HcpA Mutanten erzeugte IFN γ Ausschüttung aus naiven murinen Splenozyten. Als Stimulans wurde jeweils 1 μ g der rekombinant exprimierten, aufgereinigten Proteinfraction verwendet.

einer Gruppe von HcpA abgeleiteten Peptiden erfolgen. Dazu wurde das Protein in acht jeweils ca. 50 Aminosäuren große, überlappende Oligopeptide unterteilt (Abbildung 27). Um die Stabilität dieser kurzen Peptide zu gewährleisten wurden DNA-Abschnitte aller Oligopeptide durch *in frame* Klonierung mit dem auf dem Expressionsvektor pQE40 liegenden Gen für Maus-DHFR (Di-Hydroxy-Folat-Reduktase) fusioniert und in *E. coli* XL-1 *blue* durch Induktion mit IPTG (Isopropyl- β -thio-galaktosid) exprimiert. Die Aufreinigung der exprimierten Fusionspeptide erfolgte mittels des aminoterminalen 6x-HIS-Tags von DHFR durch Nickel-Affinitätschromatographie.

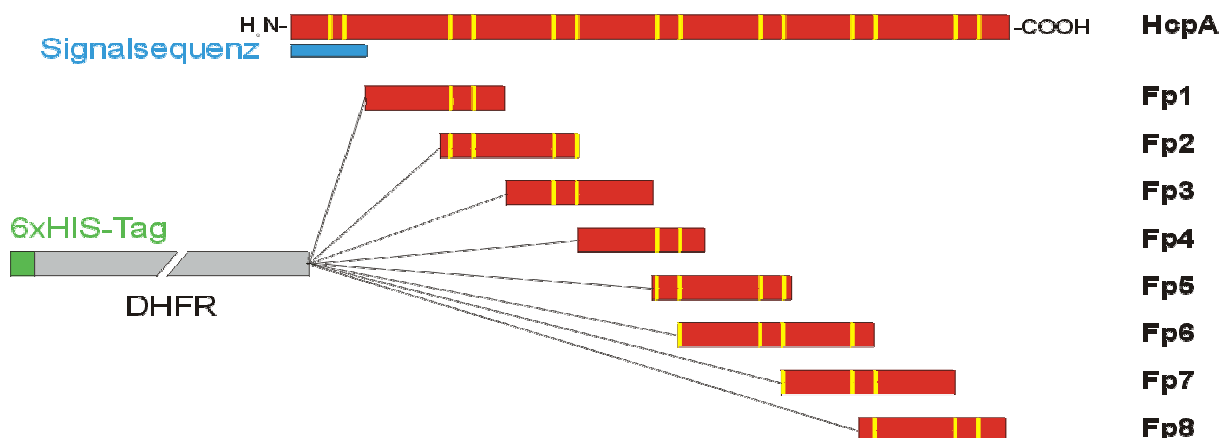


Abbildung 27: Hergestellte HcpA/DHFR Fusionspeptide. Schematisch sind die hergestellten HcpA-Oligopeptide dargestellt. Die acht überlappenden Fusionspeptide (Fp1-Fp8) beginnen nach der Signalsequenz von HcpA, da diese im *in vivo* prozessierten, sekretierten Protein abgespalten ist. Außer den ca. 25 Aminosäuren am jeweiligen Ende des HcpA Proteins ist jede Aminosäure in mindestens zwei unterschiedlichen Fusionspeptiden repräsentiert. Der aminoterminalen 6x-HIS-Tag von DHFR dient der einfachen Aufreinigung der exprimierten Proteine durch Nickel-Affinitätschromatographie.

Als Kontrolle wurde Maus-DHFR ohne ein Fusionspeptid exprimiert und entsprechend gereinigt. Die die gereinigten Fusionspeptide enthaltenden Fraktionen wurden anhand einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung visualisiert (Abbildung 28).

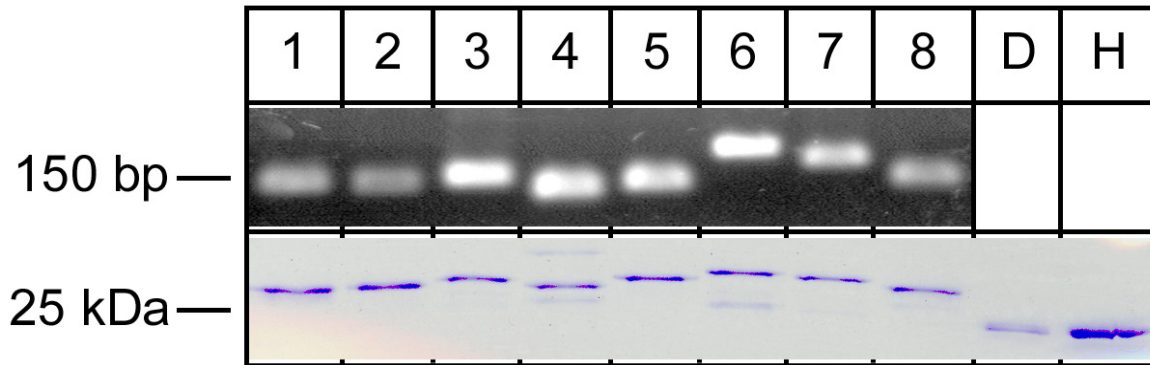


Abbildung 28: Klonierung und Expression von HcpA/DHFR Fusionspeptiden
Gezeigt ist in der oberen Hälfte ein Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel mit den durch PCR erhaltenen *hcpA* Fragmenten, sowie in der unteren Hälfte ein Coomassie gefärbtes SDS-PA Gel mit den klonierten, exprimierten und gereinigten HcpA/DHFR Fusionspeptiden. Die Spuren 1-8 enthalten jeweils das amplifizierte *hcpA* Fragment bzw. das entsprechende Fusionspeptid, die Spur D zeigt die als Kontrolle exprimierte DHFR, in Spur H ist rekombinantes HcpA aufgetragen.

5.3.6.2.2 Stimulation mit HcpA/DHFR Fusionspeptiden

Je 1 μg der erhaltenen HcpA-Fusionspeptide wurden zur Stimulation naiver Maus-splenozyten aus C57BL/6 Mäusen verwendet. Negativkontrollen waren Maus-DHFR, der Elutionspuffer der Nickel-Affinitäts-Chromatographie Proteinreinigung und PBS. *E. coli* LPS, sowie HcpA dienten als Positivkontrollen. Dabei konnten in Abhängigkeit vom verwendeten Fusionspeptid signifikante $\text{IFN}\gamma$ Konzentrationen im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (Abbildung 27), jedoch kein IL-5 (Daten nicht gezeigt). Das Fusionspeptid Fp6 führte zu einer dem vollständigen HcpA Protein entsprechenden Stimulation der $\text{IFN}\gamma$ Sekretion, während alle anderen Fusionspeptide nur schwächere immunstimulatorische Eigenschaften zeigten. Maus-DHFR ebenso wie die anderen Negativkontrollen führten zu einer kaum nachweisbaren $\text{IFN}\gamma$ Ausschüttung aus den Milzzellen.

5.3.7 Epitopemapping

Da offensichtlich zum Teil beträchtliche Unterschiede in den immunstimulatorischen Eigenschaften der unterschiedlichen HcpA-Abschnitte vorlagen, sollte durch *Epitopemapping* die genaue Lage von antigenen Determinanten innerhalb von HcpA bestimmt werden.

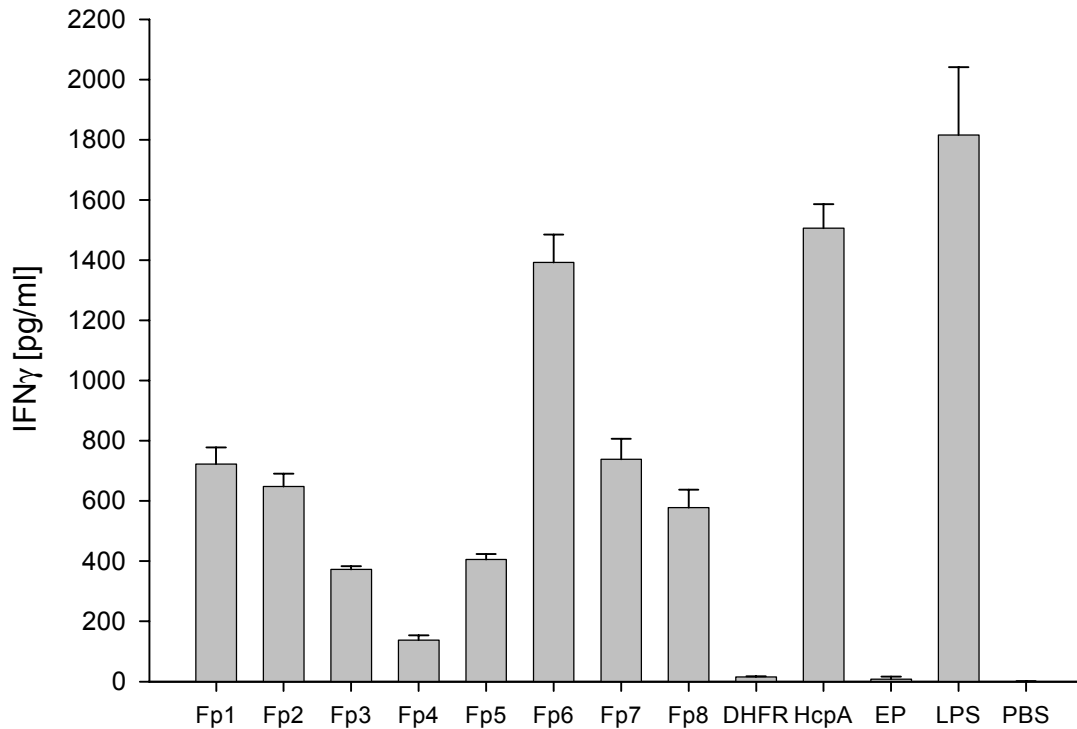


Abbildung 29: Induktion der IFN γ Sekretion durch HcpA-Fusionspeptide

Das Fusionspeptid Fp6 induziert dem HcpA-Protein entsprechende IFN γ Konzentrationen. Maus-DHFR, sowie der Elutionspuffer (EP) und PBS erzeugten eine kaum nachweisbare Immunreaktion.

5.3.7.1 B-Zell Epitopemapping

B-Zell Epitope sind räumlich eng begrenzte Regionen von Antigenen, die von Antikörpern erkannt und gebunden werden. Aufgrund der räumlichen Struktur der Antigene können B-Zell Epitope entweder aus der in der Primärstruktur festgelegten linearen Abfolgen bestimmter Aminosäuren (lineare Epitope), oder durch die räumliche Struktur bedingt benachbarter Aminosäuren bestehen (Konformations- oder strukturelle Epitope). Deshalb mussten zwei unterschiedliche Herangehensweisen zur Bestimmung dieser Epitope verwendet werden. Zum einen wurden die bereits zur Stimulation von naiven Maussplenozyten verwendeten HcpA/DHFR Fusionspeptide verwendet. Diese können aufgrund ihrer Größe strukturelle Epitope bilden, aber auch lineare Epitope beinhalten. Jedoch ist aufgrund der Größe von ca. 50 Aminosäuren keine sehr genaue Zuordnung der Epitope möglich. Deshalb wurde eine HcpA Peptidbank verwendet, die aus 72 synthetischen 14mer Peptiden besteht. Diese überlappen um jeweils 11 Aminosäuren mit den benachbarten Peptiden. Damit ist eine deutlich genauere Möglichkeit zur Bestimmung von linearen Epitopen gegeben, jedoch können sich durch die Kürze der Peptide keine strukturellen Epitope bilden und daher damit auch nicht nachgewiesen werden.

5.3.7.1.1 Seren von HcpA immunisierten Tieren

Die Bestimmung der antigenen Determinanten erfolgte durch Westernblot Analyse und im ELISA System. Verwendet wurden Seren von HcpA immunisierten Mäusen, Ratten und Kaninchen. Der Westernblot zeigte, dass in allen immunisierten Tieren Antikörper gegen die Fusionspeptide 1 und 8 gebildet worden waren. Aufgrund des Aufbaus der Fusionspeptide ist damit der Bereich für die jeweiligen Epitope auf die amino- bzw. carboxyterminalen Enden des HcpA Proteins eingeschränkt, da sonst auch eine Reaktion gegen die benachbarten Peptide hätte stattfinden müssen (vgl. Abbildung 27). Das Kaninchenserum wies noch zusätzlich Antikörper gegen die Fusionspeptide Fp5 und Fp6 auf, was auf ein B-Zell Epitop in dem von beiden Peptiden überspannten Bereich hindeutet. Die Peptide Fp3 und Fp4 konnten Antikörper aus dem Rattenserum binden, womit für das Rattenserum ein Epitop im Bereich der Überlappung zwischen Fp3 und Fp4 gezeigt werden konnte.

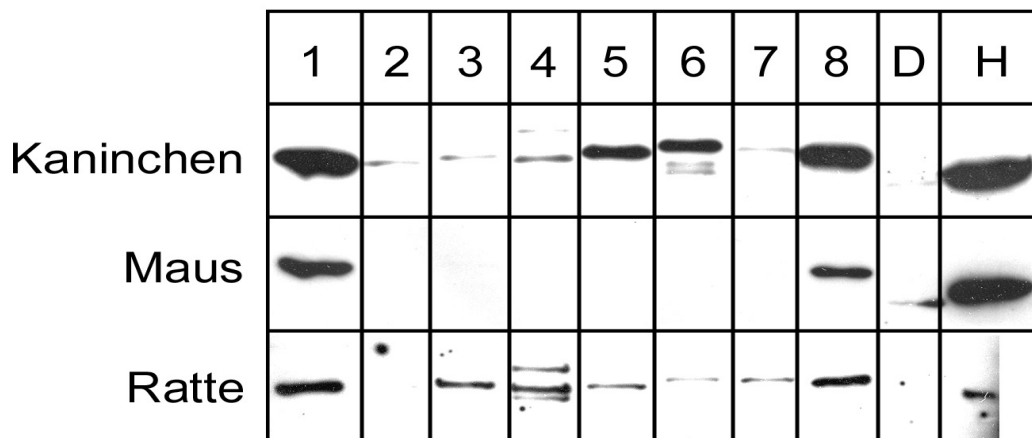


Abbildung 30: Westernblots der HcpA/DHFR Fusionspeptide mit unterschiedlichen Seren. Gezeigt sind die Reaktivitäten von Seren HcpA immunisierter Tiere gegen die durch SDS-PAGE aufgetrennten exprimierten HcpA/DHFR Fusionspeptide. Die Spuren 1 bis 8 beinhalten dabei die Fusionspeptide 1-8. Spur D enthält Maus DHFR, und Spur H rHcpA (vgl. Abbildung 28). Die Beschriftung rechts gibt den Spenderorganismus des entsprechenden α HcpA Serums an. Die Seren aller HcpA immunisierter Tiere zeigten Reaktivität gegen die Fusionspeptide 1 und 8, sowie gegen rHcpA. Die Spur H des Westernblots mit Rattenserum ist aus technischen Gründen nur zur Hälfte zu erkennen.

Mit den synthetischen 14mer Peptide wurde ein Dot-Westernblot durchgeführt, d.h. die Peptide wurden nicht zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennt, sondern direkt auf die Nitrozellulosemembran aufgetropft. Als Kontrolle aller Versuche mit synthetischen Peptiden wurde ein in diesem Zusammenhang immunologisch irrelevantes, synthetisches Peptid mit der Aminosäuresequenz GAGAGAGAGAGA (= (GA) \times 7) verwendet. Der Nachweis der Bindung von Antikörpern war mit dem Kaninchenserum erfolgreich, es konnte eine Bindung spezifischer linearer Epitope gezeigt werden. Vor allem die Peptide 10, 26, 34, 35, 43, 46, 48 und 64 zeigten eindeutige Bindung der Antikörper (Abbildung 31). Alle anderen verwendeten Seren

zeigten im Dot-Westernblot keine Reaktion gegen die linearen 14mer Peptide (Daten nicht gezeigt).

synthetische Peptide

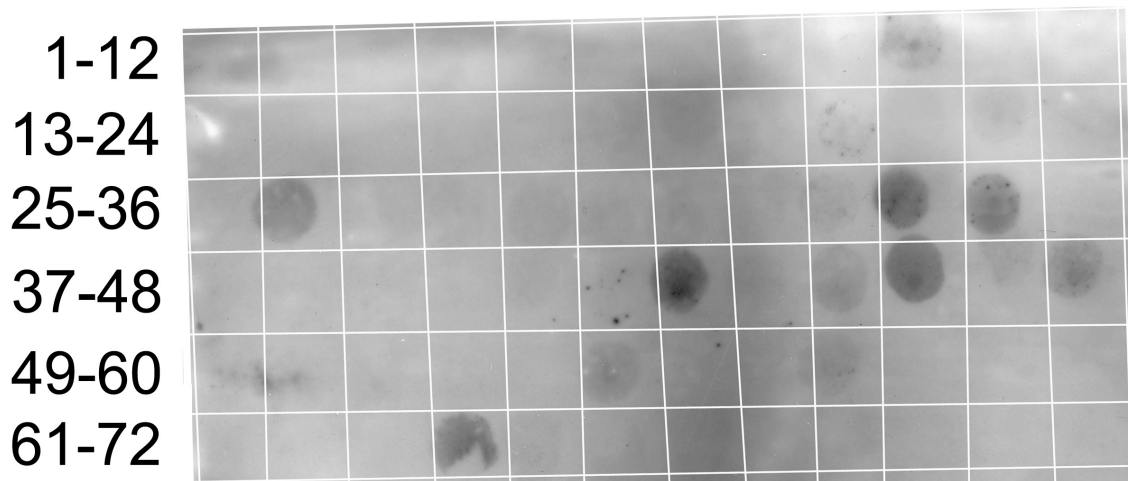


Abbildung 31: Dot-Westernblot der synthetischen Peptide mit α HcpA Kaninchenserum
Von links nach rechts und von oben nach unten wurden die 72 synthetischen Peptide aufgetragen. Je Dot wurden 2 μ g 14mer Peptid direkt auf die Membran aufgebracht, geblockt und anschließend entsprechend einem Westernblot mit Kaninchenserum inkubiert. Die Peptide 10, 26, 34, 35, 43, 46, 48 und 64 reagierten mit den Antikörpern und zeigten so lineare B-Zell Epitope auf.

Die Überprüfung der Ergebnisse der Westernblot-Versuche fand durch *antibody-capture* ELISAs statt. Dabei wird das Antigen an der ELISA-Platte immobilisiert und anschließend mit Serum inkubiert. Abschließend wird die Menge der gebundenen Antikörper nachgewiesen. Als Antigene wurden sowohl die HcpA/DHFR Fusionspeptide sowie die synthetischen 14mer Peptide verwendet. Mit diesem System konnten die mit den Westernblots erhaltenen Daten gut reproduziert werden, wobei das Kaninchenserum eine besonders hohe Reaktivität gegen die linearen synthetischen Peptide 9, 10, 34, 35, 42, 43, 46, 47, 63, 64 und 65 zeigte. Damit konnten für das Kaninchenserum eindeutig bestimmte Aminosäuresequenzen als lineare B-Zell Epitope definiert werden. Die Sequenzen, die den überlappenden, reaktiven Peptiden gemeinsam waren, wurden als Epitope angesehen. Diese Vorgehensweise bei der Ermittlung der Epitope ist in Tabelle 18 beispielhaft für das Epitop der synthetischen Peptide 9/10 gezeigt.

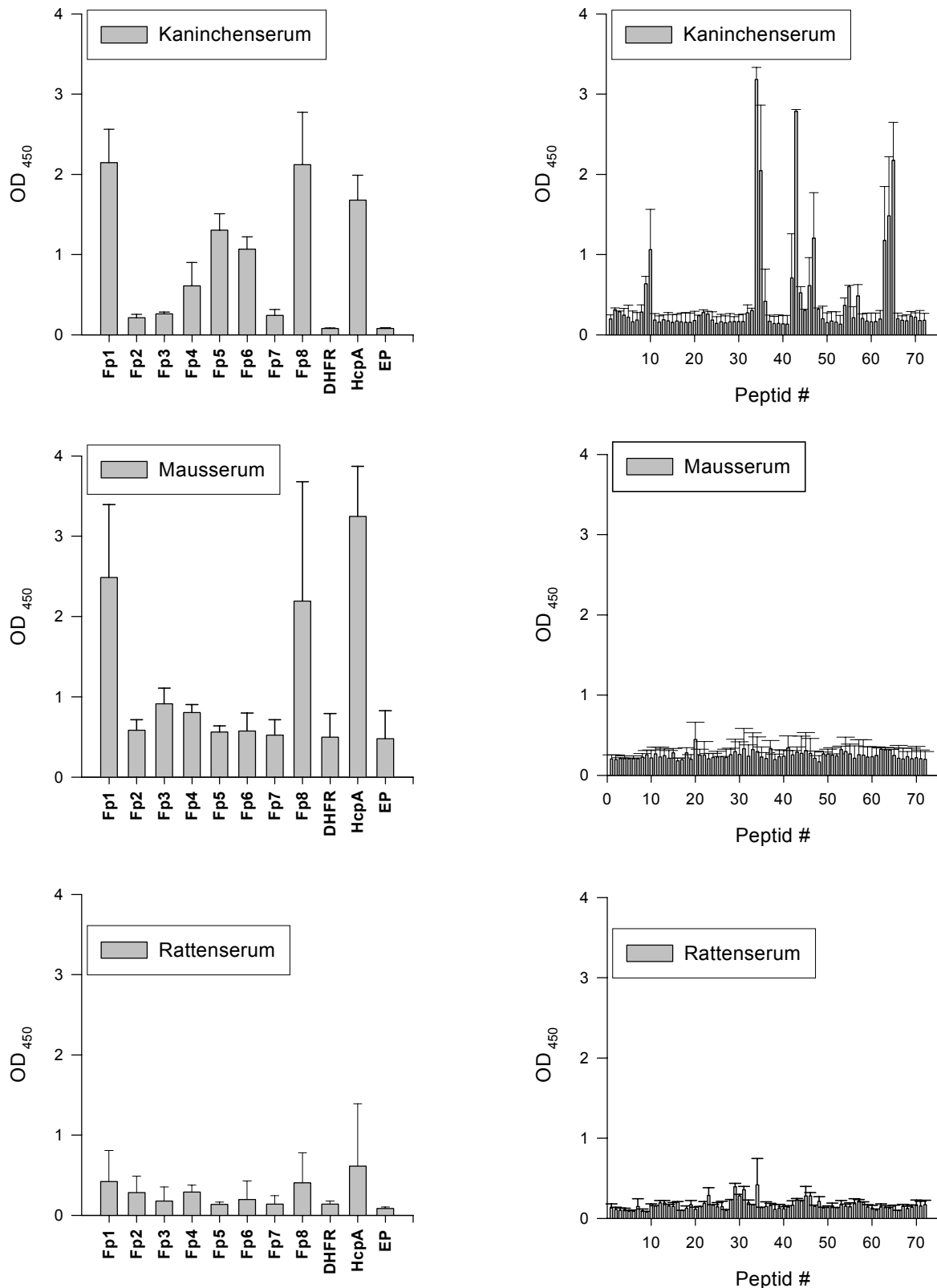


Abbildung 32: HcpA B-Zell Epitope in Seren immunisierter Tiere
 In der linken Spalte sind die Ergebnisse der ELISAs gegen die HcpA/DHFR Fusionspeptide dargestellt, rechts die ELISAs der entsprechenden Seren unter Verwendung der 14mer Peptide. Fp1 bis Fp8 bezeichnet die HcpA/DHFR Fusionspeptide 1 bis 8, EP steht für den Elutionspuffer der Proteinaufreinigung und bildet damit zusammen mit aufgereinigter Maus-DHFR (DHFR) die Negativkontrolle der Reaktion. Die nachgewiesene Reaktivität der Seren war den mit den (Dot-)Westernblots erhaltenen Ergebnissen vergleichbar (vgl. Abbildung 30, Abbildung 31).

Peptid #	AS-Sequenz	Reaktivität	lineares Epitop
8	FAQAKTHFEKACEL	-	
9	AKTHFEKACELKEG	+	HFEKACELKEG
10	HFEKACELKEGFGC	+	
11	KACELKEGFGCVFL	-	

Tabelle 18: Beispiel der Bestimmung von B-Zell Epitopen

Durch Vergleich der benachbarten Peptide wurde die Aminosäuren-Sequenz bestimmt, die in benachbarten, überlappenden und zugleich reaktiven Peptiden vorlag. Daraus ergab sich die Sequenz des linearen B-Zell Epitops.

Durch Anwendung dieser Methode konnten für alle reaktiven synthetischen Peptide, sowie für die HcpA/DHFR Fusionspeptide die entsprechenden antikörperbindenden Bereiche ermittelt werden. Die mit den synthetischen Peptiden aufgezeigten linearen Epitope wurden LBE1 bis LBE5 genannt, die durch die Fusionspeptide entdeckten entweder strukturellen oder linearen Epitope SLBE1 bis SLBE3. Diese sind in Tabelle 19 aufgelistet.

Epitop	Ermittelt aus	AS-Sequenz
LBE1	Peptide 9/10	HFEKACELKEG
LBE2	Peptide 34/35	KSCELNHAEGC
LBE3	Peptide 42/43	HKDLRKALDLY
LBE4	Peptide 46/47	KACDLKDSPGC
LBE5	Peptide 63/64/65	GTAKDEKQ
SLBE1	Fp1/Fp2	PDAKELVNLGIESAKKQDFAQAKTHF
SLBE2	Fp5/Fp6	CTVLGSLHHYGVGTHKDLRKALDLYEKACDLKDSPGCIN
SLBE3	Fp7/Fp8	CKSGVKEACDELKELKIEL

Tabelle 19: Mit Kaninchenserum ermittelte B-Zell Epitope in HcpA

Durch die unterschiedliche Anzahl der benachbarten, reaktiven Peptide ergibt sich die unterschiedliche Länge der linearen Epitope LBE1 bis LBE5. Die strukturellen oder linearen Epitope SLBE1 bis SLBE3 variieren entsprechend der Länge der Überlappung der HcpA/DHFR Fusionspeptide (vgl. Abbildung 27).

Es fällt auf, dass SLBE2 in seiner Sequenz auch die Sequenzen der linearen Epitope LBE3 und LBE4 beinhaltet, während sich sonst keine Überlagerung zwischen linearen und strukturellen Epitopen feststellen lässt. Daher konnte geschlossen werden, dass SLBE1 und SLBE3 tatsächliche strukturelle Epitope sind, während SLBE2 zwei lineare Epitope enthält, die für die antigenen Eigenschaften dieses Proteinabschnitts verantwortlich sind.

Die so definierten Aminosäuresequenzen wurden mit der Protein-Datenbank des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) verglichen. Dabei zeigte sich, dass diese Sequenzen mit guten Übereinstimmungen ausschließlich in der Familie der Hcps zu finden waren (Tabelle 20). Wie zu erwarten war, wiesen alle Epitope

nahezu 100-prozentige Übereinstimmungen mit in der Datenbank hinterlegten Sequenz für HcpA auf. Sieben der acht festgestellten Epitope zeigten aber auch signifikante Ähnlichkeiten mit HcpC Abschnitten, Epitop LBE4 ist sogar vollständig Teil dieses Proteins.

Epitop	Identitätswerte / Ähnlichkeitswerte in %				
	HcpA	HcpC	HcpE	HcpG	HcpH
LBE1	100	88 / 100		77 / 88	
LBE2	100	63 / 90		72 / 90	
LBE3	100		90 / 90		
LBE4	100	100			
LBE5	100	87 / 87			
SLBE1	100	64 / 76			
SLBE2	97 / 97	71 / 82	48 / 64	48 / 67	56 / 66
SLBE3	100	72 / 77		75 / 81	

Tabelle 20: Durch Datenbankvergleich erhaltene Treffer für die jeweiligen Epitop-Sequenzen Mittels eines BLASTp Datenbankvergleichs erhaltene Identitätswerte der Aminosäuresequenzen der einzelnen bestimmten Epitope. Alle Sequenzen wiesen entsprechend den oben angegebenen Werten identische oder ähnliche Aminosäuresequenzen wie andere Hcps auf. Diese beschränkten sich aber auf die in der Tabelle angegebenen. Hier nicht genannte Hcps beinhalteten keine übereinstimmenden Sequenzen.

5.3.7.1.2 Serum von Hp infizierten Gerbils

Da die Seren von für 4 Wochen mit Ca117G infizierten ebenso wie die Seren von intranasal mit HcpA immunisierten Gerbils keine nachweisbaren α HcpA Antikörper-Titer aufwiesen (5.3.5), zeigten die Seren, wie zu erwarten, auch keinerlei Reaktivität gegen sämtliche HcpA Derivate (Daten nicht gezeigt).

5.3.7.1.3 Seren von Hp infizierten Patienten

Decker (2000) konnte durch Bestimmung von α Hp und α HcpA Titern aus 452 Patientenserum bereits zeigen, dass viele Hp infizierte Patienten auch hohe α HcpA Serotiter aufweisen. Da für die Bestimmung von B-Zell Epitopen hochtitrige Seren von Vorteil sind, wurde eine Reihe von humanen Seren per ELISA und Westernblot auf α HcpA Antikörpertiter untersucht (Abbildung 33). Dabei konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der gemessenen α Hp Titer und den α HcpA Titern festgestellt werden. Nur die α Hp negativen Seren waren auch α HcpA negativ. Für die Untersuchung der von humanen Seren nach Hp Infektion erkannten B-Zell Epitope wurden zwei Seren ausgewählt, die hohe α HcpA Titer aufwiesen (Humanserum A und B).

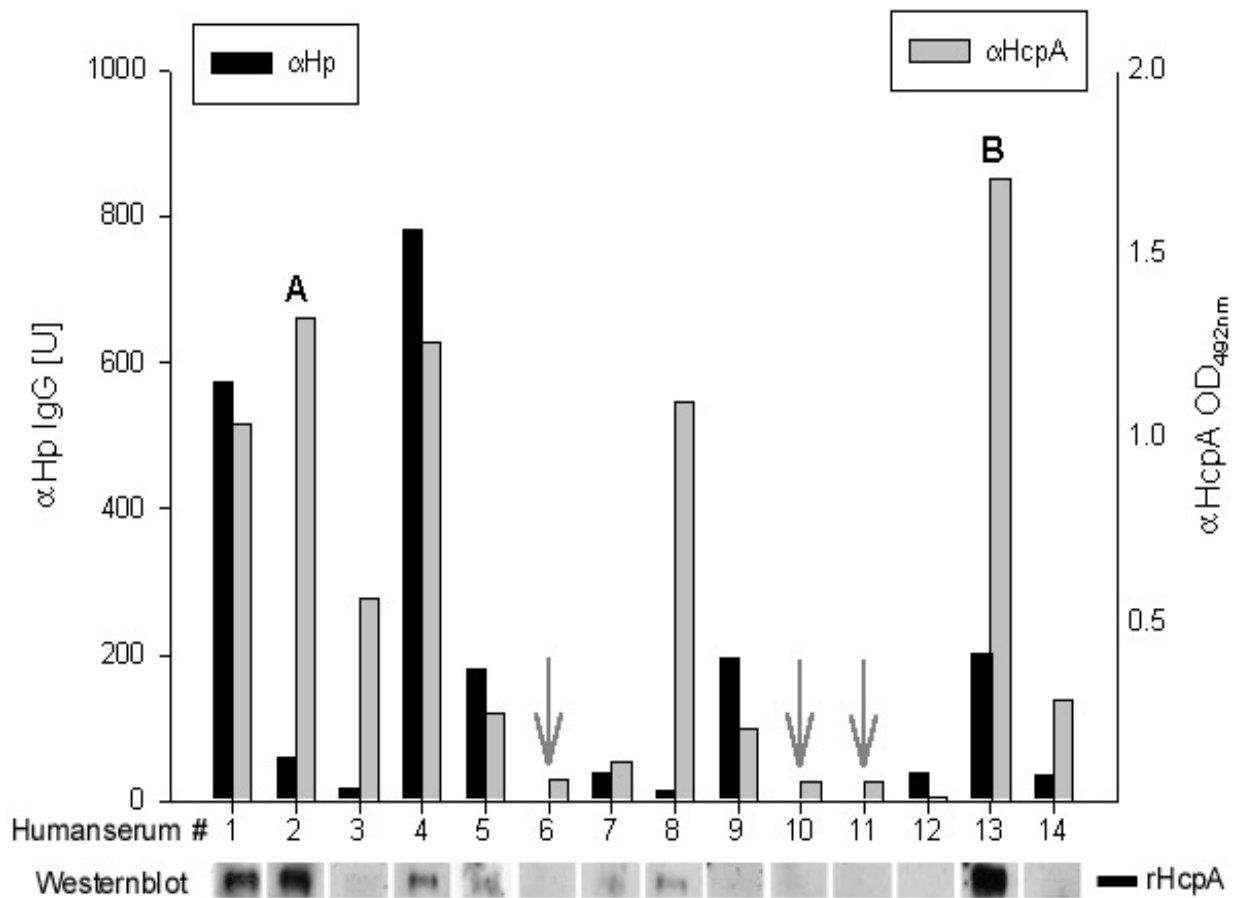


Abbildung 33: α Hp ELISA und α HcpA ELISA und Westernblot von Human-Seren

Vergleich der α Hp Titer mit den α HcpA Titern von 14 Humanseren. Die linke Skala bzw. die schwarzen Balken zeigen die mit einem kommerziellen α Hp ELISA bestimmten Titer. Die rechte Skala bezieht sich auf die grauen Balken mit den α HcpA Titern. Unter dem Graphen ist der Westernblot der jeweiligen Seren gegen rHcpA dargestellt. Die durch Pfeile gekennzeichneten Seren (6,10,11) sind Negativ-Kontrollseren. Seren A und B weisen hohe α HcpA Titer auf und wurden für das B-Zell Epitopemapping verwendet.

Die ausgewählten Humanseren wurden entsprechend den Seren der immunisierten Tiere (5.3.7.1.1) auf Reaktivität gegen die linearen synthetischen Peptide und die HcpA/DHFR Fusionspeptide untersucht (Abbildung 34). Beide Seren reagierten mit Fp8, Humanserum B zeigte zusätzlich Reaktivität gegen die Fusionspeptide Fp5 und Fp6. Eine signifikante Antikörperbindung an die linearen synthetischen Peptide fand nicht statt. Somit erkennen beide Human-Seren das bereits mit dem Kaninchenserum identifizierte Epitop SLBE3. Humanserum B konnte auch an SLBE2 binden. SLBE3 wurde somit von allen getesteten Seren aus allen Organismen unabhängig von der Immunisierung bzw. vom Infektions-Status erkannt und stellt damit ein *major structural* Epitop dar, während SLBE2 wohl ein *minor structural* Epitop ist, d.h. von vielen, aber nicht allen, Seren erkannt wird.

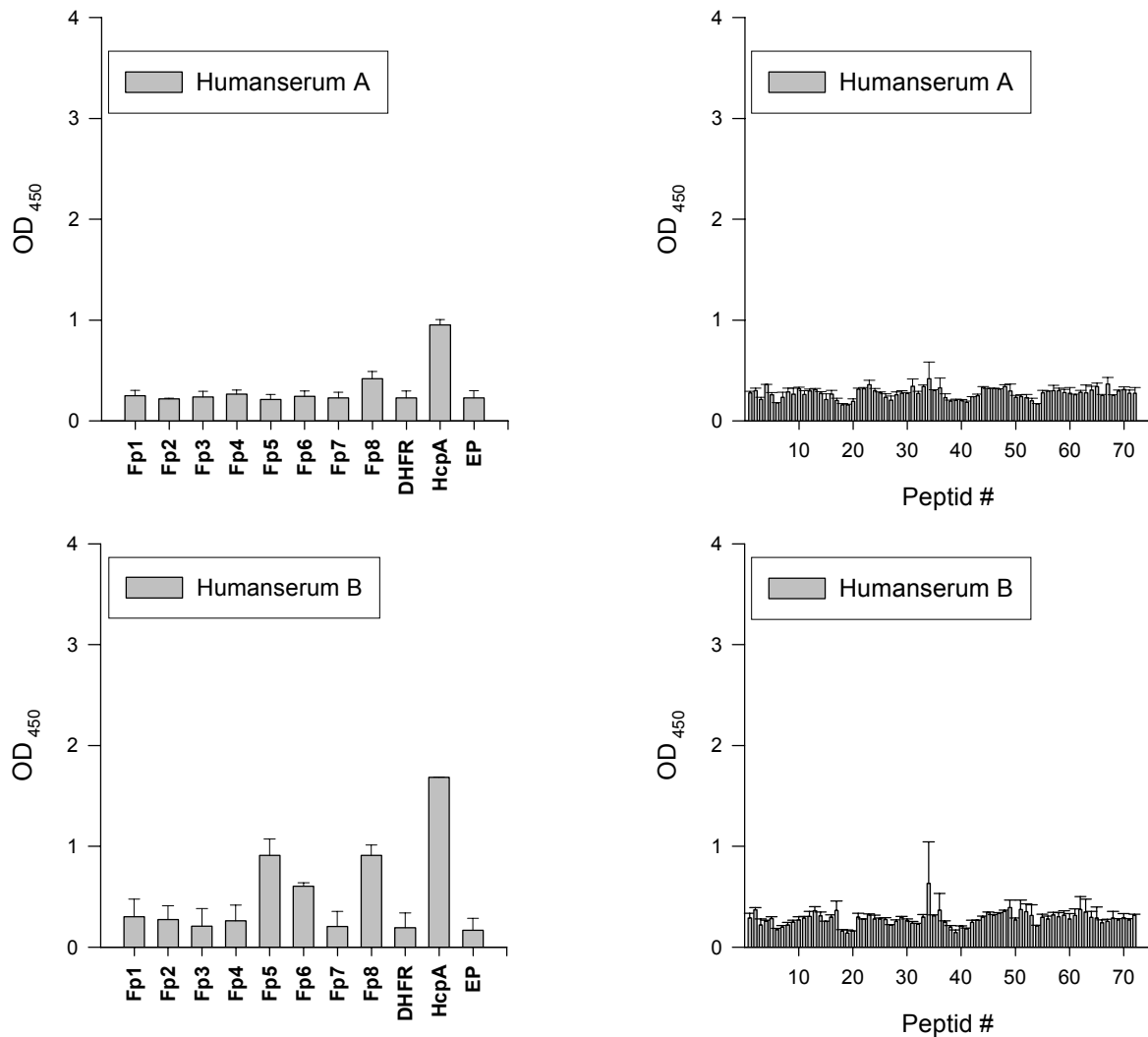


Abbildung 34: HcpA B-Zell *Epitopemapping* mit Seren infizierter Patienten

Links ist die gemessene Bindung von Antikörpern aus Humanseren an die HcpA/DHFR Fusionspeptide (EP = Elutionspuffer) gezeigt, rechts die Reaktivität der Seren gegen die synthetischen Peptide. Beide Seren zeigten wenig Affinität zu den linearen Peptiden, jedoch wiesen beide Seren Antikörper gegen Fp8 und damit gegen SLBE3 auf. Serum B hatte zusätzlich Antikörper gegen SLBE2.

5.3.7.2 T-Zell *Epitopemapping*

Die Bestimmung von putativen T-Zell Epitopen ist für das Verständnis der immunstimulatorischen Eigenschaften des Hcp Proteins unerlässlich. Während Antikörperantworten nur wenig oder keinen Einfluss auf die Hp-bedingte Pathogenese haben, ist die zelluläre Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen ($CD8^+$) und das sich während der Infektion im Magen durch T-Helferzellen ($CD4^+$) ausprägende Zytokinmilieu für die Pathogenität, aber auch die Eradikation von Hp von entscheidender Bedeutung. In den bisherigen Experimenten mit naiven Mäusen wurde die angeborene und nicht die erworbene Immunreaktion untersucht. Zur Untersuchung der T-Zell Antwort auf HcpA mussten daher HcpA-immunisierte Tiere verwendet werden und deren Milzzellen restimuliert werden.

5.3.7.2.1 Restimulation

Die Immunisierung der Mäuse erfolgte subkutan an der Schwanzwurzel im Abstand von 14 Tagen. Es wurden je Tier und Immunisierung 10 µg HcpA injiziert. Die Untersuchung des Einflusses von Adjuvantien erfolgte durch Zugabe von Alum oder CpG Oligo-DNA zur Immunisierungslösung im Vergleich zu HcpA ohne Adjuvans. Als Kontrolle wurden Mäuse nur mit PBS immunisiert. 4 Tage nach der zweiten Immunisierung wurden den Mäusen die Milzen entnommen, je Immunisierungsgruppe zusammengefasst und wie üblich Splenozyten präpariert. Diese Splenozyten wurden zusammen mit je 1 µg der synthetischen Peptide, sowie der HcpA/DHFR Fusionspeptide bzw. HcpA für 36 h inkubiert. 5 µg Bakteriellens LPS diente als Positivkontrolle, das Peptid (GA)_{x7}, Maus-DHFR, der Elutionspuffer der Proteinreinigung und PBS als Negativkontrollen.

Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand der Zellen geerntet und damit Zytokin-ELISAs durchgeführt. Getestet wurden die Sekretion von IFN γ und IL-5 aus den restimulierten Splenozyten, um eine TH1 oder TH2 Ausprägung der Immunantwort nachzuweisen. Kein Stimulans konnte eine IL-5 Sekretion hervorrufen (Daten nicht gezeigt). Die Splenozyten von PBS oder mit HcpA ohne Adjuvans immunisierten Mäusen reagierten nicht bzw. nur sehr schwach auf die synthetischen linearen Peptide, während die Splenozyten aus Mäusen, die HcpA mit Alum oder CpG Adjuvierung erhalten hatten, eine deutliche IFN γ Sekretion nach Stimulation mit bestimmten Peptiden zeigten (Abbildung 35). In diesen beiden Splenozyten-Präparationen konnte dabei das synthetische Peptid #54 die IFN γ Produktion stimulieren. Die Sequenz dieses Peptids enthält somit ein T-Zell Epitop (Tabelle 21). Die HcpA/DHFR Fusionspeptide sowie HcpA selbst konnten ebenfalls Adjuvans-unabhängig eine IFN γ Produktion aus den Splenozyten der immunisierten Mäuse erzeugen, jedoch war auch hier auch keinerlei IL-5 Induktion nachweisbar. Das lineare Epitop LTE1 ist auch in den beiden Fusionspeptiden Fp6 und Fp7 repräsentiert, die auch in allen Ansätzen eine verstärkte IFN γ Sekretion hervorriefen. Zusätzlich konnte das aminoterminalende Ende von HcpA enthaltende Fp1 alle Splenozyten stimulieren. Dieses Ergebnis konnte mit den synthetischen Peptiden jedoch nicht eindeutig bestätigt werden. Lediglich das Peptid #10 konnte ebenso wie das Peptid #07 in einer Wiederholung dieses Experiments eine schwache IFN γ Sekretion hervorrufen (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, dass auch Milzzellen nicht mit HcpA immunisierter Tiere auf die HcpA/DHFR Fusionspeptide, nicht aber auf die

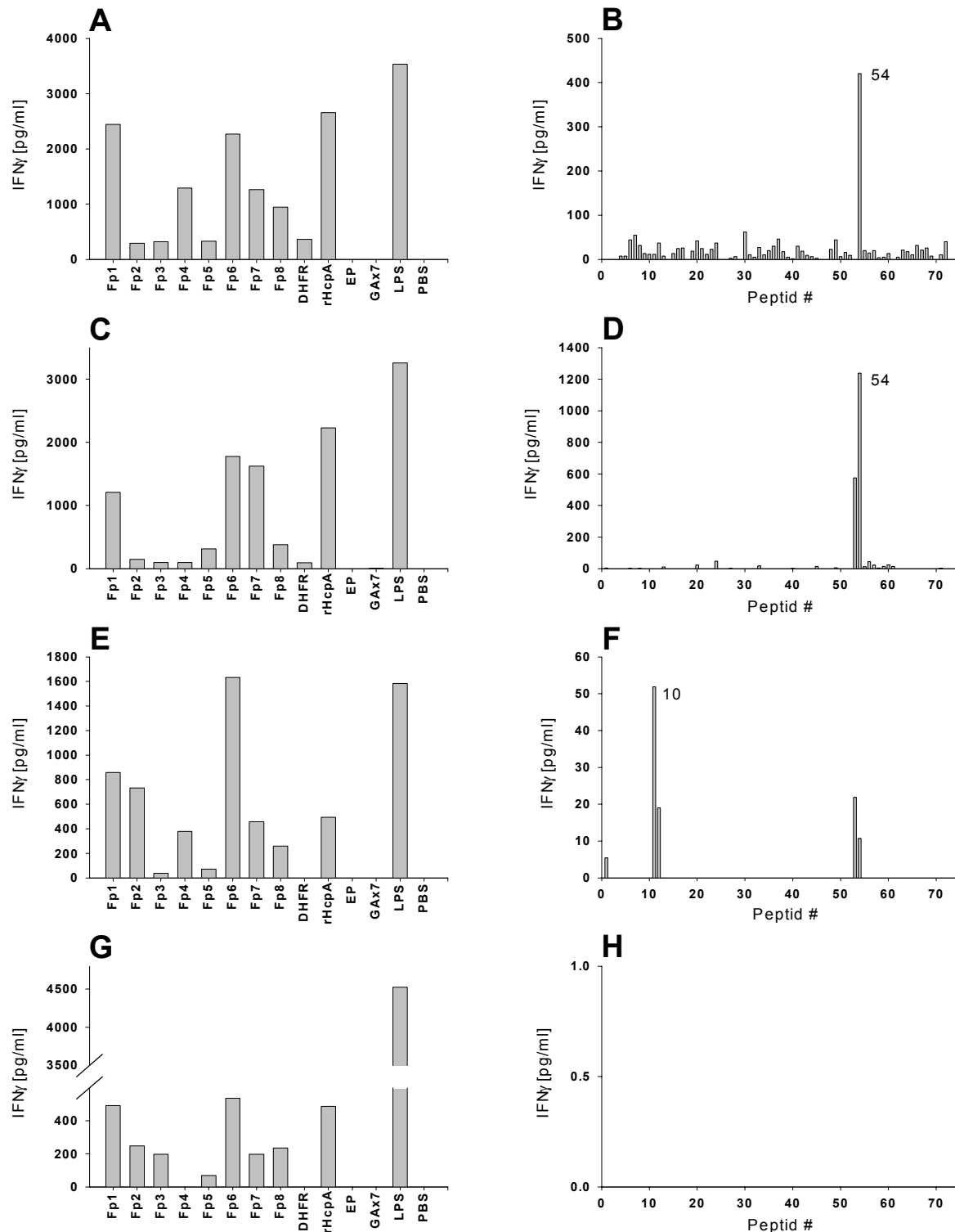


Abbildung 35: Restimulation der Splenozyten mit HcpA immunisierter Mäuse

Gezeigt sind die IFN γ ELISA-Werte aus Splenozyten-Überständen nach 36 h Inkubation mit den entsprechenden Stimulantien (ein repräsentativer Versuch). Die linke Spalte zeigt die Reaktion auf HcpA/DHFR Fusionspeptide, rechts ist die IFN γ Produktion nach Stimulation mit den linearen synthetischen Peptiden gezeigt. Als Immunogene wurden zur Immunisierung verwendet: Bei A) und B) HcpA + Alum, C) und D) HcpA + CpG Oligo DNA, E) und F) HcpA ohne Adjuvantien. Die Experimente G) und H) wurden mit Splenozyten aus nur mit PBS immunisierten Mäusen durchgeführt. Als Kontrollen dienten Maus-DHFR (DHFR), Elutionspuffer (EP), das synthetische Kontrollpeptid (GA)x7 und PBS sowie *E. coli* LPS als Positivkontrolle. In der rechten Spalte ist jeweils das synthetische Peptid in jedem Graphen noch zusätzlich beschriftet, das den höchsten IFN γ Wert induzieren konnte.

T-Zell Epitop	ermittelt aus Peptid #	AS-Sequenz
LTE1 ?	07	KQDFAQAKTHFEKA
LTE2 ?	10	HFEKACELKEGFGC
LTE3	54	KNFKEAIVRYSKAC

Tabelle 21: Aus Maussplenozyten bestimmte T-Zell Epitope

Auf Splenozyten aus HcpA immunisierten Mäusen immunstimulatorisch wirkende synthetische, lineare Peptide, und daraus abgeleitete T-Zell Epitope LTE1 bis LTE3. LTE1 und LTE2 sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet, da diese nur in einer von zwei Versuchsreihen IFN γ in geringem Ausmaß induzieren konnten.

linearen synthetischen Peptide reagierten, bestätigt die experimentellen Befunde, dass HcpA direkt das angeborene Immunsystem stimuliert und zusätzlich die Ausbildung einer TH1 gerichteten, adaptiven Immunantwort propagiert.

5.3.7.3 Sequenzvergleich von HcpAs verschiedener Hp Stämme

Durch Sequenzvergleich von 13 *hcpA*-Genen bzw. deren Proteinsequenzen aus verschiedenen Hp Isolaten wurden die durch *Epitopemapping* identifizierten B- und T-Zell Epitop-Sequenzen überprüft. Dazu wurden aus der gDNA der einzelnen Hp Stämme der *hcpA* Genlocus amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die erhaltenen DNA Sequenzen wurden *in silico* translatiert. Alle Stämme verfügten über das komplette Protein umfassende ORFs und aminoterminalen Sec-Signalsequenzen (vgl. Abbildung 2, Daten nicht gezeigt). Die Aminosäuresequenzen der Proteine ab dem putativen, internen Startkodon kurz vor der Spaltstelle der Sec-Signalpeptidase, wurden zusammen mit den in Datenbanken verfügbaren Sequenzen der beiden vollständig sequenzierten Hp Stämme einem *multiple-sequence-alignment* mittels des ClustalW Algorithmus unterworfen (Alm *et al.*, 1999a). Das *Alignment* zeigte eine starke, in manchen Bereichen nahezu 100%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz in allen untersuchten Stämmen (Abbildung 36). Dennoch weist jeder Hp Stamm eine einzigartige HcpA Aminosäure-Sequenz auf. 95 - 99,6% aller Aminosäuren der einzelnen HcpA Proteine sind im Bezug auf das HcpA des Typstammes 26695 identisch. Die für die Hcp Proteinfamilie namensgebenden Cysteinmotive sind in allen HcpAs höchst konserviert. Ebenso auffällig ist eine sehr starke Übereinstimmung vor allem des carboxyterminalen Endes von HcpA. So tritt im Bereich zwischen der Aminosäure 176 und dem Carboxyterminus des Proteins (AS 227) nur eine nichtkonservative Mutation, nämlich der Austausch von Serin 212 zu Glycin, auf. Die ermittelten B- und T-Zell Epitope liegen in HcpA Abschnitten, die in allen Stämmen fast unverändert nachgewiesen werden konnten. Eine *in silico* Vorhersage von möglichen B- und T-Zell Epitopen lieferte für ca. 50% der HcpA Gesamtsequenz hohe Wahrscheinlichkeiten und war daher von nur geringer Aussagekraft (Daten nicht gezeigt).

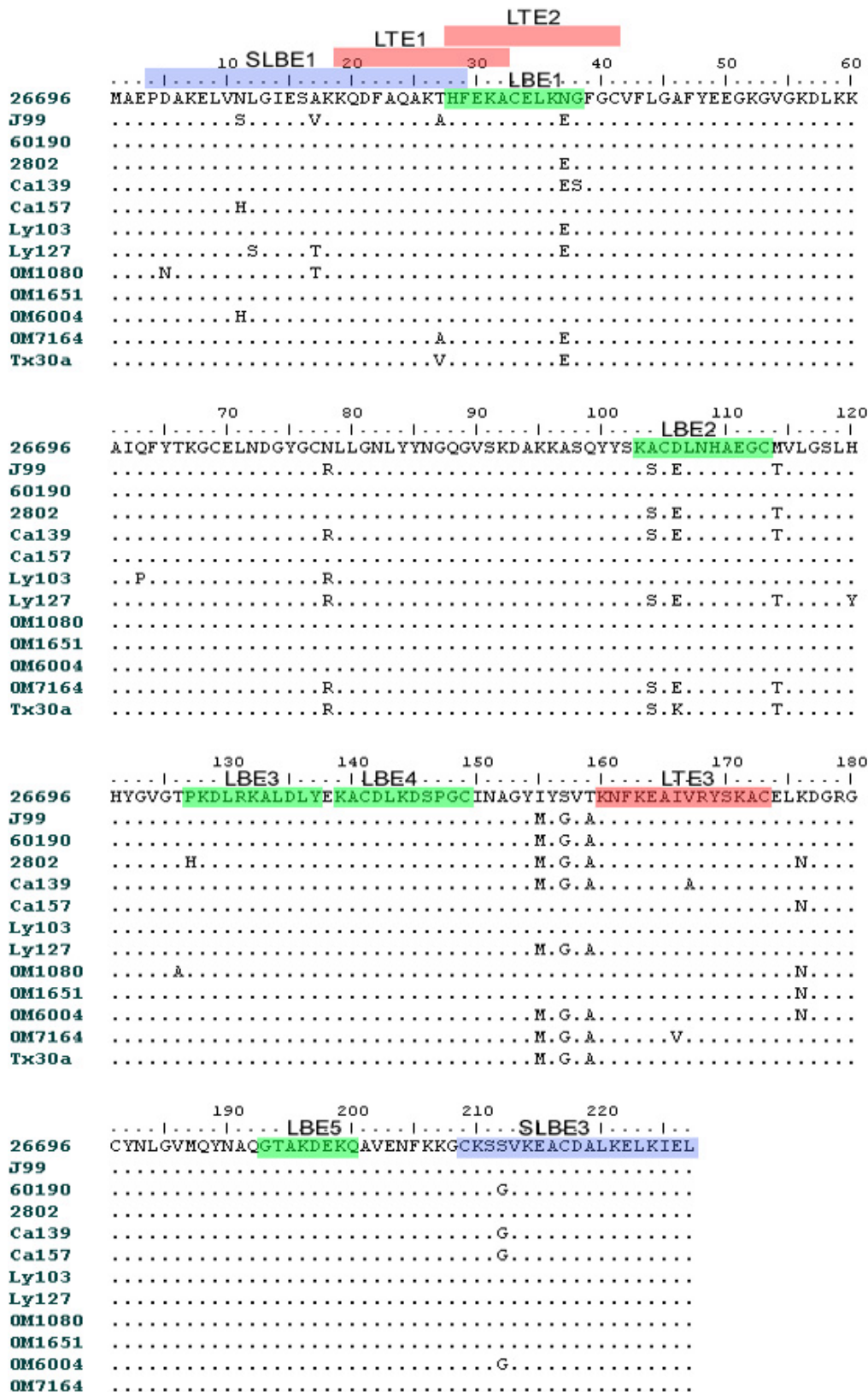


Abbildung 36: *Multiple Sequence Alignment* von HcpA aus verschiedenen Hp Stämmen
Conservation Plot der Aminosäuresequenz von HcpA aus unterschiedlichen Hp Stämmen. Die Stammbezeichnung ist jeweils rechts der entsprechenden Sequenz angegeben. Hp 26695 und Hp J99 sind die beiden vollständig sequenzierten *Helicobacter pylori* Stämme, der Rest sind Patientenisolat. Für die vorliegenden Versuche bezüglich der HcpA/DHFR Fusionspeptide und der synthetischen Peptide wurde das HcpA des Stammes Hp 2802 verwendet. Eingezeichnet sind die durch *Epitopemapping* definierten immunologisch aktiven Bereiche des Proteins. Die Bezeichnungen entsprechen Tabelle 19 und Tabelle 21.

Die linearen B-Zell Epitope LBE1, LBE2 und LBE4 liegen im Bereich der Disulfidbrücken, d.h. sie beinhalten beide beteiligten Cysteine oder liegen so, dass nur ein Cystein in die Sequenz des Epitops fällt. Die für LBE3 festgestellte Aminosäuresequenz ist in allen sequenzierten Stämmen mit der Ausnahme von einer einzelnen Aminosäure in nur einem Hp Stamm (Austausch von Prolin 127 zu Methionin) ebenso wie die Sequenz von LBE5 vollständig konserviert. Die Sequenz von SLBE1 konnte in 4 von 13 Stämmen unverändert nachgewiesen werden. Das am äußersten Carboxyterminus des Proteins liegende SLBE2 zeigt bis auf den oben bereits erwähnten Austausch von Serin 212 zu Glycin in etwa der Hälfte der untersuchten Stämme eine extreme Konservierung der Primärsequenz. Dies unterstreicht die Bedeutung dieses *major*-B-Zell Epitops (5.3.7.1) und der festgestellten immunstimulatorischen Eigenschaften des carboxyterminalen Endes von HcpA sowie des postulierten *coiled-coil* Motivs, die sich mit der Sequenz des SLBE3 deckt (5.3.6.1).

Die definierten linearen T-Zell Epitope LTE1 und LTE2 sind am aminoterminalen Ende von HcpA zu finden und überschneiden sich dort mit den B-Zell Epitopen SLBE1 und LBE1. LTE2 und LTE3 liegen ebenso wie die oben erwähnten B-Zell Epitopsequenzen in unmittelbarer Umgebung der strukturell wichtigen und stammunabhängig konservierten Cystein-Cystein Motive.

5.3.8 Zytokininduktion aus humanen PBMCs

Da Hp in erster Line ein humanpathogenes Bakterium darstellt und alle bisherigen immunologischen Untersuchungen von HcpA abgesehen von α HcpA Antikörper-Titerbestimmungen aus dem Serum infizierter Patienten an Mäusen durchgeführt wurden, stellte sich die Frage der Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf die Hp-Infektionssituation im Menschen (Decker, 2000). Um die Bedeutung von HcpA für humane Zellen zu untersuchen, wurden monozytäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) freiwilliger, serologisch Hp negativer Spender gewonnen und damit den Versuchen mit murinen Splenozyten entsprechende Stimulationsexperimente durchgeführt. Die Stimulation erfolgte mit Hp 2802 MOI=1 bzw. 1 μ g HcpA. Als Positiv-Kontrollen wurden 5 μ g bakterielles LPS bzw. 1 μ g Ionomycin/PMA verwendet. Negativkontrollen waren PBS bzw. die der HcpA Fraktion entsprechend gereinigte Fraktion aus induzierten, nicht-transfizierten DS-2 Zellen (Abbildung 37).

Nicht bzw. nur mit PBS stimulierte PBMCs zeigen relativ hohe Konzentrationen von sekretiertem IL-8 im Medium. Auch die Stimulation mit der verwendeten Negativ-Kontrolle der HcpA Expression und Reinigung, dem Überstand aus nicht-transfizierter, induzierter DS-2 Zellkultur, führte zur Produktion von IL-1 β , IL-6,

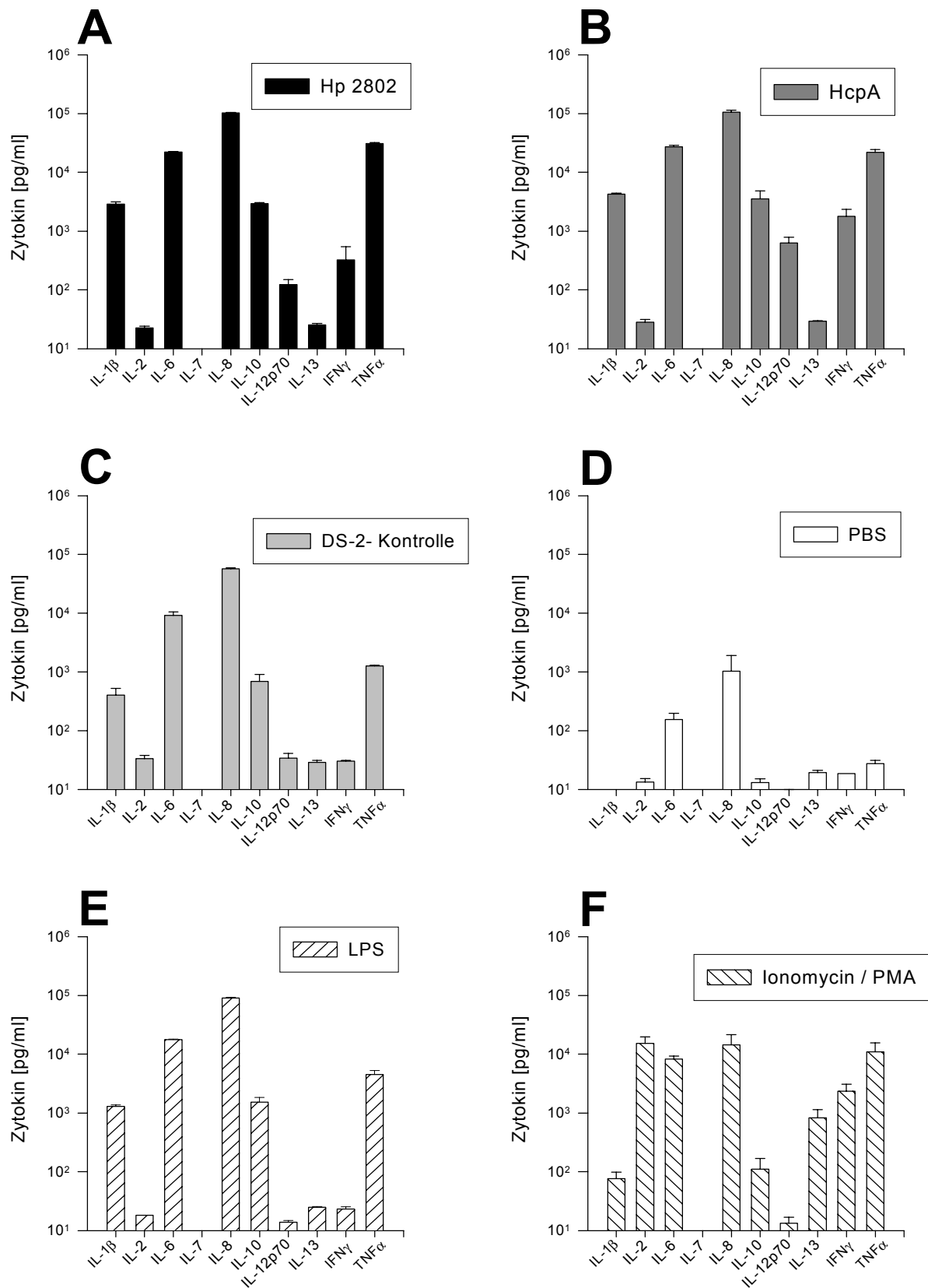


Abbildung 37: Von Hp 2802 bzw. HcpA induzierte Zytokine aus humanen PBMCs
 Als Stimulantien wurden verwendet: A) Hp 2802 MOI=1, B) HcpA 1 μ g, C) entsprechendes Volumen der induzierten nicht-transfizierten DS-2 Kontroll-Zelllinie, D) PBS, E) 5 μ g *E. coli* LPS und F) Ionomycin/PMA.

IL-8, IL-10 sowie $\text{TNF}\alpha$. Die Stimulation mit HcpA hingegen zeigte ebenso wie die Stimulation mit Hp im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Konzentration an IL-12p70, $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$. LPS und Ionomycin/PMA induzierten ihrerseits eine deutliche Ausschüttung von IL-1 β bzw. IL-2, IL-13 und $\text{IFN}\gamma$.

Um den ausschließlich durch die Stimulantien erzeugten Effekt zu verdeutlichen, wurde ein bereinigtes Zytokinprofil erstellt. Dabei wurden die durch Stimulation mit Negativkontrollen (Überstand aus induzierter, nicht-transfizierter DS-2 Zellkultur, sowie PBS) gemessenen Zytokinkonzentrationen von den durch Hp 2802 bzw. HcpA stimulierten PBMCs produzierten Konzentrationen subtrahiert (Abbildung 38). Beide verwendeten Stimulantien konnten aus humanen PBMCs wie auch schon aus murinen Splenozyten eindeutige TH1 polarisierende Zytokinprofile mit vor allem IL-1 β , IL-8, IL-12, $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ induzieren. Eine mögliche Restimulation bereits vorhandener TH1 Zellen ist durch die Verwendung von PBMCs von serologisch Hp negativen Spendern ausgeschlossen.

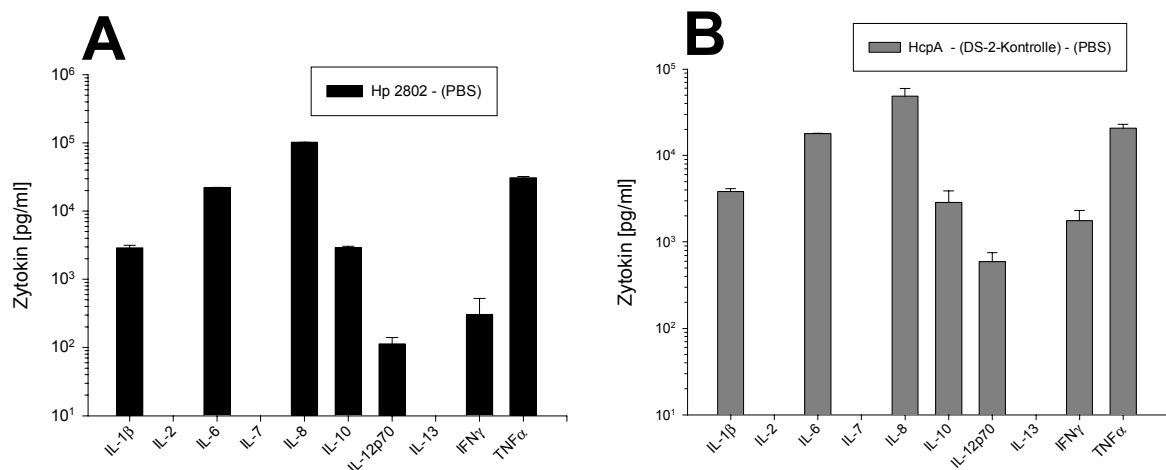


Abbildung 38: Netto-Zytokinproduktion aus humanen PBMCs durch Hp 2802 und HcpA
Dargestellt sind die aus humanen PBMCs stimulierten Zytokine. A) Stimulation durch Hp 2802 abzüglich der durch PBS induzierten Zytokinkonzentrationen. B) Stimulation durch HcpA, abzüglich der durch die beiden Negativkontrollen (DS-2 Kontrolle und PBS) induzierten Zytokine

6 Diskussion

6.1 HcpA-Regulation in *Helicobacter pylori*

In dieser Arbeit wurde die Regulation der Expression, des Transports ins Periplasma und der Sekretion von HcpA und HcpC untersucht. Eine Regulation der Genexpression findet in Hp für viele, aber nicht für alle Gene statt. Ubiquitär und konstitutiv exprimierte Gene sind häufig *housekeeping* bzw. *housecleaning* Gene, wie beispielsweise *nudA*, das für NudA, ein der Proteinfamilie der Nudix (*nucleosid diphosphate linked to some other moiety X*) Hydrolasen zugehöriges Protein kodiert (Lundin *et al.*, 2003). Die Transkriptionsanalyse auf der Basis von DNA-Microarrays oder quantitativer RT-PCR und darauf gründende Schlussfolgerungen auf die Expression der betreffenden Gene ist die für die Untersuchung der Genregulation nahezu ausschließlich verwendete Methode (Merrell *et al.*, 2003b; Beier *et al.*, 1997; Merrell *et al.*, 2003a; Graham *et al.*, 2002).

Einige Hp Gene werden in Abhängigkeit von der Wachstumsphase in ihrer Transkription reguliert. So konnte beispielsweise für das Flagellin-Gen *flaA* eine verstärkte Expression und deren Regulation über LuxS während der log-Phase im Vergleich zur stationären Phase gezeigt werden (Loh *et al.*, 2004).

Einen weiteren, die Hp Genexpression beeinflussenden, Faktor stellt der Kontakt mit Epithelzellen dar. Nach Inkubation von Hp mit einer Magenzelllinie konnte eine verstärkte Transkription von Virulenzgenen (*cag3*) und *outer-membrane*-Proteinen (*omp6*, *omp19*), sowie die Minderung der Motilität durch Expression veränderter Flagellin-Gene wie *pflA* (*paralysed flagella*) und *flgB* festgestellt werden (Kim *et al.*, 2004).

Die Fähigkeit auf temperaturbedingten Stress mit der Expression von *heat-shock*-Proteinen (Hsp) reagieren zu können, ist für Mikroorganismen entscheidend. Hsp weisen meist Chaperon-Eigenschaften auf, d.h. wirken stabilisierend auf andere Proteine. Für Hp konnte, wie auch in praktisch alle Prokaryonten, eine solche Regulation verschiedener *heat-shock*-Protein Gene wie *groESL*, des *hrcA-grpE-dnaK* Operons und des *cbpA-hspR* Operons durch die hitzeinduzierbaren *heat-shock*-Regulator-Proteine HspR und HrcA gezeigt werden (Spohn *et al.*, 2004).

Das jedoch für Hp am besten untersuchte Beispiel der Genregulation stellt das Fur (*ferric uptake regulator*) Regulon dar. Diesem gehören verschiedenste Gene an, die über die Bindung des Fur Proteins an die Konsensus-Sequenz (AATAATNNTNA) der *fur*-abhängigen-Promotoren in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Eisenionen in ihrer Expression beeinflusst werden (Delany *et al.*, 2003; Merrell *et al.*, 2003b). Eine

verstärkte Transkription von u.a. *vacA*, *napA* und *cagA* konnte *in vitro* durch eine Eisenmangelsituation induziert werden (Merrell *et al.*, 2003b). Im Säugerorganismus sind die extra-zellulären Eisenionen-Konzentrationen durch vielfältige Systeme zur Eisenbindung wie Transferrine, Häm-Gruppen und Lactoferrine niedrig gehalten, auch um Eisenionen dem Stoffwechsel potentieller bakterieller Pathogene zu entziehen und damit das Wachstum von Prokaryonten zu verlangsamen (Otto *et al.*, 1992; Nuijens *et al.*, 1996). Eisenmangel induziert in Hp die Expression von Virulenzfaktoren, was zu einer besseren Verfügbarkeit von Eisen für Hp führt, da diese Proteine durch Schädigung der Wirtszelle die Freisetzung von Eisen bewirken können. So kann VacA die Durchlässigkeit der Membran von Epithelzellen für Eisen- und Nickelionen erhöhen, NapA hat *in vitro* eine hohe, Bacterioferritinen vergleichbare, Affinität zu Eisenionen und kann diese binden (Papini *et al.*, 1998; Tonello *et al.*, 1999). Dies deckt sich mit klinischen Befunden, die Eisenmangelercheinungen bzw. eine verminderte Eisenabsorption mit einer vorliegenden Hp Infektion in Verbindung bringen (Ciacci *et al.*, 2004; Jeon *et al.*, 2004).

Temperaturanstieg und eine niedrige Eisenkonzentration können für pathogene Mikroorganismen ein Signal für das Eindringen in einen Wirt darstellen, was die differentielle Expression von Virulenzgenen erforderlich macht (Beier *et al.*, 1997). Im Falle von Hp gehört zu diesen Signalen sicherlich auch der sehr niedrige pH Wert im Magenumen. So überrascht es nicht, dass unter mild-sauerer Bedingungen (pH=5,5) die Expression von Hp Proteinen induziert wird, die zur Säuretoleranz des Bakteriums beitragen (z.B. Urease), aber auch eine verstärkte Expression von bekannten Virulenzfaktoren wie Flagellinen und Adhäsinen stattfindet (Merrell *et al.*, 2003a). Die Regulatorproteine NikR und Fur, die eigentlich für die Nickel- bzw. Eisenionen-abhängige Transkriptionsregulation verantwortlich sind, werden durch niedrige pH Werte ebenso wie durch die entsprechenden Metallionen aktiviert, was einen engen Zusammenhang zwischen der metall- und der säureabhängigen Expressionsregulation zeigt (Bury-Mone *et al.*, 2004).

Die Aktivierung von NikR durch Ni^{2+} führt zu einer der säureinduzierten vergleichbaren Expressionregulation, da sich zumindest Teile der Regulationskaskade überschneiden (van Vliet *et al.*, 2004). Die Steuerung der Transkription bestimmter Gene durch andere Metallionen konnte am Beispiel des Kupfertransportproteins CopA, das mit der Sensitivität von Hp gegen Cu^{2+} assoziiert ist, gezeigt werden (Bayle *et al.*, 1998). Da *copA* in vielen untersuchten *Helicobacter spp.* gut konserviert ist, wird angenommen, dass CopA Teil eines allen *Helicobacter spp.* gemeinsamen Kupfer-Resistenzmechanismus ist (Ge *et al.*, 1996). Die Analyse

des Operons, dem *copA* angehört, zeigte, dass der Promotor dieses Operons sowohl nach Zugabe von Cu^{2+} als auch nach einem Hitzeschock eine verstärkte Transkription initiiert (Beier *et al.*, 1997). Der molekulare Mechanismus dieser Aktivierung ist jedoch noch nicht bekannt.

Ebenso wie durch Hitzeschock konnte auch ein durch Erhöhung der NaCl Konzentration ausgelöster osmotischer Schock die Transkription von verschiedenen Chaperonen steigern (Spohn *et al.*, 1999; Spohn *et al.*, 2002). Wie im Falle der Eisenionen besteht auch ein klinischer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Salzaufnahme und dem Risiko einer Hp Infektion (Beevers *et al.*, 2004). So konnte im Maus-Tiermodell gezeigt werden, dass eine Hoch-Salzdiät die Anfälligkeit der Mäuse für eine Kolonisation mit Hp steigert (Fox *et al.*, 1999).

Bisher konnte für kein Mitglied der Familie der *Helicobacter-cysteine-rich-proteins* eine von pH, Temperatur, Nickel-, Kupfer- oder Kochsalzkonzentration abhängige Expressionsregulation nachgewiesen werden (Merrell *et al.*, 2003a). Eine genomweite DNA-Microarray Analyse konnte nur während der logarithmischen Wachstumsphase von Hp eine Zunahme der Transkription von *hcpF* um einem Faktor 2,5 unter dem Einfluss von sehr niedrigen Eisenkonzentrationen im Medium nachweisen (Merrell *et al.*, 2003b).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse weisen auf eine differentielle Expressionsregulation der *hcp*-Gene hin. Nach Substitution des Wachstumsmediums mit FeCl_2 konnten für HcpA deutlich und für HcpC leicht erhöhte Expressionsraten nachgewiesen werden. Dies lässt auf eine Regulation über das Fur-Regulatorprotein schließen. Da aber das kein *hcp*-Gen die Promotor-Konsensus-Sequenz des Fur-Regulons aufweist, ist eine direkte Regulation über Fur nicht anzunehmen (Merrell *et al.*, 2003b), sondern eher von einer indirekten Regulation über direkt Fur regulierte Genprodukte auszugehen, wie dieses beispielsweise auch von *feoB2/3* vermutet wird (Delany *et al.*, 2001; van Vliet *et al.*, 2002).

Außerdem konnte durch Zugabe von NiCl_2 die Expression von HcpA und vor allem HcpC stark reprimiert werden, was durch die Aktivierung der Repressorfunktionen von NikR in Anwesenheit von Ni^{2+} erklärbar wäre.

Eine verstärkte Expression von HcpA konnte auch bei Inkubation unter mild saurem pH, sowie unter dem Einfluss von O_2 festgestellt werden. Die Expression von *hcpA* unter sauren Bedingungen stützt die Vorstellung von HcpA als Virulenzfaktor, da Hp als gastrisches Pathogen *in vivo* mit einem sauren Milieu konfrontiert ist und gerade diese Situation die Expression von Virulenzfaktoren erforderlich macht.

Die verstärkte Expression von HcpA und der vermehrte Transport ins Periplasma, der beim Stamm Hp 2802 $\Delta comB9$ auftritt, konnte keinem bisher bekannten Regulationsmechanismus zugeordnet werden und bleibt daher unklar.

Der Sec-abhängige Transport von HcpA ins Periplasma scheint unter allen getesteten Bedingungen ähnlich gut zu funktionieren, d.h. es ist eine eindeutige Korrelation zwischen den zytoplasmatischen und den periplasmatischen Fraktionen von HcpA festzustellen. Jedoch ist unklar, warum HcpC, das ebenfalls über eine Sec-Signalsequenz verfügt, periplasmatisch nicht nachzuweisen ist. Dies deutet aber auf eine differentielle Sekretion von HcpA und HcpC hin. Decker (2000) vermutete, dass es sich beim Transport ins Periplasma und Sekretion von Hcps um unterschiedliche, unzusammenhängende Phänomene handelt. Ein rein Sec-abhängiger Mechanismus würde kein zytoplasmatisch vorliegendes Protein erwarten lassen. Das steht im Widerspruch zu der unterschiedlichen intrazellulären Lokalisation von HcpA und HcpC, die stark homologe Sec-Signalsequenzen aufweisen. Als möglicher Weg zur Sekretion von HcpA und HcpC wird daher das *membrane budding* von Hp vorgeschlagen, das zur Bildung Protein-beinhaltenender *outer membrane vesicles* führt und so einen möglichen Weg zur Übertragung bakterieller Proteine ins Magenepithel darstellt (Fiocca *et al.*, 1999; Keenan *et al.*, 1998; Keenan *et al.*, 2000a).

Eine weitere Regulation der HcpA Sekretion erfolgt offensichtlich erst mit dem terminalen Schritt der Sekretion. Dies zeigt sich bei Betrachtung der Ansätze mit $FeCl_2$ oder NaCl im Medium. Bei Erhöhung der Eisenionen Konzentration konnte zwar eine deutliche Zunahme des intrabakteriellen HcpA und HcpC beobachtet werden, die sekretierte Menge an beiden Proteinen war jedoch im Vergleich zum unter Standardbedingungen inkubierten Hp Stamm stark vermindert. Im Gegensatz dazu konnte im Falle der Zugabe von NaCl keine Zunahme der zytoplasmatischen Proteinkonzentrationen nachgewiesen werden: Periplasmatisch war HcpA nur in vermindertem Maße vorhanden, extrazellulär waren jedoch deutlich erhöhte Mengen an HcpA und HcpC detektierbar. Dies führt zu der Annahme, dass die Sekretion beider Hcps in Anwesenheit von Eisenionen nur stark vermindert stattfindet, während ein höherer Salzgehalt die Sekretion beider Genprodukte verstärkt. Das wiederum lässt eine Regulation der an der Sekretion beteiligten Proteine und Strukturen vermuten. Die niedrige Konzentration von HcpC im Kulturüberstand unter dem Einfluss von Nickelionen kann auf die insgesamt geringe Expression dieses Proteins zurückgeführt werden.

Die Mechanismen der Sekretion bei gram-negativen Bakterien und bei Hp speziell sind (mit Ausnahme des Typ IV Sekretionsapparates der *Cag-PAI*) nicht gut genug untersucht, um hier klare Aussagen über die beteiligten Proteine und deren

Regulation treffen zu können. Lediglich allgemeine Daten zur Komplexität der bakteriellen Sekretion sind bekannt (Pugsley, 1993). Dennoch zeigen die hier erhaltenen Daten eindeutig die Bedeutung der Sekretion für die physiologisch vorliegenden Proteinmengen. Damit stellt sich natürlich auch die Frage nach der Relevanz der häufig verwendeten Transkriptionsanalysen, da die *in vivo* vorliegenden Proteinkonzentrationen offensichtlich unabhängig von der Transkription der entsprechenden Gene sein können. Daher ist in diesem Zusammenhang der Nachweis der zu untersuchenden Gen-Produkte im Bakterium und dem extrabakteriellen Lumen mittels immunologischer Methoden der Transkriptionsanalyse vorzuziehen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Expression der Hcp-Gene *hcpA* und *hcpC* einer positiven Regulation durch FeCl_2 und einer Repression durch NiCl_2 unterliegen, wenn auch eine direkte Regulation über die Effektor Proteine Fur und NikR nicht angenommen werden kann. Darüber hinaus scheint der Sec-abhängige Transport von HcpA ins Periplasma nicht durch die hier untersuchten Bedingungen beeinflusst zu werden. Die Sekretion beider Proteine ist jedoch unabhängig von der Regulation der Expression reguliert. So wird die Sekretion Eisenionen-abhängig vermindert, sowie durch hohe Osmolarität des Wachstumsmediums verstärkt.

6.2 Expression von HcpA in Drosophila Schneider-2 Zellen

In dieser Arbeit konnte erstmals die Expression eines Hp Proteins mittels einer Drosophila Schneider-2 (DS-2) Zelllinie beschrieben werden. Hp Proteine wurden bisher in einigen unterschiedlichen Expressionssystemen, meistens jedoch in *E. coli*, exprimiert. Die beschriebene Expression von rekombinanten Hp Proteinen ist in zwei große Gruppen zu unterteilen. Einige Experimente hatten die funktionelle Charakterisierung von Effekten ohne Aufreinigung der entsprechenden Proteine zum Ziel. Beispielsweise wurde eine Magenepithel-Zelllinie mit *cagA* transfiziert, um *in vitro* von CagA bedingte Effekte zu studieren (Higashi *et al.*, 2002a). Auch die Verwendung von genetisch modifizierten *Salmonella typhimurium*, die die UreB Untereinheit von Hp exprimieren, als eventuelle Lebendvakzine und die Klonierung und Untersuchung des Hp Harnstofftransporters Urel in *Yersinia pseudotuberculosis* zählen hierzu (Liu *et al.*, 2002; Sebbane *et al.*, 2002). Bei dieser Methode kann aber eine Beeinflussung der erhaltenen Versuchsergebnisse durch sekundäre bakterielle Produkte nicht ausgeschlossen werden, was die Verfügbarkeit von biochemisch möglichst rein vorliegenden Proteinen wünschenswert macht. Zur serologischen Untersuchung von Patientenkollektiven wurde Hp Proteine in *Bacillus brevis* und *E. coli* exprimiert (Chiba *et al.*, 2002; Oliaro *et al.*, 2000). Auch die bereits erwähnte

Studie von Mittl *et al.* (2003b), die die Untersuchung von α Hcp Titern zum Ziel hatte, verwendete in *E. coli* exprimierte Antigene für *antibody-capture* ELISAs. Die Strukturaufklärung von HcpB und HcpC, die von derselben Gruppe publiziert wurden, fand mit dem gleichen Material statt (Lüthy *et al.*, 2002; Lüthy *et al.*, 2004). Die Aufklärung aller bekannter Proteinstrukturen von Hp Proteinen wurde mit prokaryontisch exprimierten Proteinen durchgeführt (Zanotti *et al.*, 2002; Freigang *et al.*, 2002; Yeo *et al.*, 2000). Hp Stoffwechselproteine wie HypA und HypB wurden ebenso in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt wie Hp *outer-membrane* Proteine und *heat-shock* Proteine (Mehta *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2002; Peck *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2000). Eine Studie, die sich mit der Untersuchung der Stoffwechselwege von Hp beschäftigte, verwendete mit *Saccharomyces cerevisiae* ein eukaryontes Expressionssystem zur rekombinanten Herstellung von *GDP-I-fucose-synthesizing-enzymes* (GMD and GMER) Proteinen (Jarvinen *et al.*, 2001). Auch immunologische Fragestellungen wurden mit *E. coli* Material untersucht. Verschiedene Vakzinekandidaten wie beispielsweise Hp Urease stammten aus *E. coli* (Lee *et al.*, 1999). Immunstimulatorische Eigenschaften konnten dem in *E. coli* exprimierten HP-MP1 (Membranprotein 1) zugewiesen werden, nachdem das rekombinante Protein Monozyten aktivieren konnte und die Freisetzung von IL-1 α , TNF α , IL-8 und MIF-1 α aus diesen induzierte (Yoshida *et al.*, 1999). Bei immunologischen Experimenten muss jedoch immer die Frage nach der Reinheit der Proteinpräparation gestellt werden, da eventuell kontaminierende bakterielle Produkte wie *E. coli* LPS den beobachteten Effekten sehr ähnliche immunstimulatorische Reaktionen auslösen können (Kobayashi *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2004).

DS-2 Zellen sind in der Literatur bereits als gut geeignetes System zur rekombinanten Expression von viralen Antigenen und humanen Proteinen für diagnostische, therapeutische und präventive Anwendungen beschrieben (Deml *et al.*, 1997; Gardsvoll *et al.*, 2004). Im Vergleich zu Baculovirus-Expressionssystemen hat die Verwendung von stabil transfizierten DS-2 Zellen Vorteile bezüglich der Stabilität der Expressionszelllinie, der erreichbaren Protein-Ausbeute und der relativen Kosten (Bernard *et al.*, 1994). Die verwendete DS-2 Zelllinie, die mit dem pMta/hcpA Plasmid stabil transfiziert wurde, zeigte eine über viele Passagen gleichbleibende Eignung zur Expression von HcpA in großen Mengen. Die Aufreinigung des rekombinanten Proteins gestaltete sich sowohl in Aufwand als auch der erreichbaren Reinheit HcpA aus *E. coli* vergleichbar. Die pro Liter Kultur erhaltenen Mengen an Coomassie-bandenreinem Protein waren mit dem DS-2 Expressionssystem deutlich höher als bei Expression in *E. coli.*, was aufgrund des Spezies-spezifischen *codon-bias* und der damit zusammenhängenden Translationseffizienz nicht zu erwarten gewesen wäre (Stenstrom *et al.*, 2001; Duret

et al., 1999; Freeland *et al.*, 1998). Zudem kann bei Expression in diesem eukaryonten System eine Kontamination mit bakteriellem LPS mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Dass HcpA unabhängig vom verwendeten Expressionssystem vergleichbare immunologische und immunstimulatorische Eigenschaften zeigte, lässt auch die Möglichkeit eines LPS-bedingten Effekts der *E. coli* HcpA Präparation unwahrscheinlich erscheinen. Eventuelle posttranslationale Modifikationen, beispielsweise eine N-Glycosylierung, wie sie für in DS-2 Zellen exprimierte Proteine beschrieben wurden, konnten für HcpA nicht beobachtet werden, oder spielten für die Funktion keine Rolle (Benting *et al.*, 2000).

Damit stellen stabil transfizierte DS-2 Zelllinien ein für die Expression immunologisch zu untersuchender Proteine ein prinzipiell höchst geeignetes System dar.

6.3 Mechanismen der Immunstimulation durch HcpA

Als Problem aller in dieser Arbeit gezeigten immunologischen Assays sei hier erwähnt, dass trotz Verwendung von theoretisch genetisch homogenen Inzucht-Mäusestämmen eine zum Teil deutliche Interassay-Varianz auftrat, d.h. die bei Versuchswiederholungen gemessenen Zytokinwerte konnten in ihren absoluten Werten trotz vergleichbarer qualitativer Aussagen so stark schwanken, dass eine mathematisch statistische Zusammenfassung mehrerer unabhängiger Versuchsansätze nicht sinnvoll erschienen wäre. Daher sind die dargestellten Daten immer Ergebnisse eines für die jeweilige Versuchsreihe repräsentativen Experiments. Diese Problematik bei immunologischen Tier-Experimenten ist jedoch bekannt und beschrieben (Decker, 2000; Aigner, 2001).

6.3.1 Kinetik der Zytokininduktion

Sowohl *E. coli* LPS als auch HcpA sind in der Lage aus naiven murinen Splenozyten $\text{IFN}\gamma$, IL-12 und $\text{TNF}\alpha$ zu induzieren. Jedoch unterscheiden sich die Kinetiken der Zytokinsekretion für $\text{TNF}\alpha$. Nach Stimulation mit LPS konnte ein sehr schneller Anstieg des sekretierten $\text{TNF}\alpha$ im Zellkulturmedium nachgewiesen werden, der nach 4 h den Maximalwert erreicht hatte und anschließend über den restlichen Zeitraum des Experiments wieder abnahm. Diese extrem schnelle immunologische Reaktion von Mausplenozyten auf bakterielles LPS ist bekannt und ausführlich untersucht. So konnten Zhou *et al.* (2003) bereits 2 h nach Stimulation mit LPS maximale $\text{TNF}\alpha$ mRNA Konzentrationen nachweisen, während 4 h bis 8 h nach Stimulation eine deutliche Abnahme der $\text{TNF}\alpha$ mRNA Transkription auftrat. Nach Stimulation mit HcpA wurde der maximale $\text{TNF}\alpha$ Wert erst nach 24 h gemessen und fiel dann bis zum Zeitpunkt 36 h wieder ab. Dies weist zum einen auf unterschiedliche

Wirkmechanismen von HcpA und LPS hin und zeigt indirekt die LPS-Freiheit des verwendeten rekombinanten Materials. Die $\text{TNF}\alpha$ Freisetzung nach Stimulation mit HcpA könnte ein Effekt der HcpA induzierten IL-12 Sekretion sein. APCs wie Monozyten und dendritische Zellen reagieren auf Stimulation mit der Freisetzung von IL-12 und können damit Makrophagen aktivieren, die ihrerseits daraufhin $\text{TNF}\alpha$ sezernieren. $\text{TNF}\alpha$ sowie IL-12 induzieren wiederum die Produktion und Ausschüttung von $\text{IFN}\gamma$ aus NK und T-Zellen (Abbas *et al.*, 2000).

Die hier wie in allen weiteren Experimenten verwendete LPS Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ ist relativ hoch, jedoch nicht unüblich. Da murine Splenozyten z.B. im Vergleich zu humanen Zellen deutlich insensitiver gegenüber einer Stimulation mit LPS sind, führt dies zur Verwendung hoher LPS Konzentrationen. So sind Mengen von 5-50 $\mu\text{g/ml}$ *E. coli* LPS als Positivkontrolle in murinen Assay-Systemen beschrieben (Freudenberg *et al.*, 1991; Smithwick *et al.*, 2003; Zediak *et al.*, 2003).

6.3.2 Abhängigkeit der $\text{IFN}\gamma$ Sekretion von IL-12 und IL-18

Die Bedeutung einer TH1 polarisierten Immunantwort auf die Hp Infektion und von $\text{IFN}\gamma$ als TH1-Leitzytokin für die Ausprägung einer chronisch inflammatorischen Infektionssituation im Magen ist ausführlich beschrieben. So konnten in $\text{IFN}\gamma$ -defizienten Mäusen nach Hp Infektion zwar erhöhte Kolonisationsdichten nachgewiesen werden, eine Entzündungsreaktion bzw. die Infiltration der Mukosa mit mononukleären Zellen unterblieb völlig (Sawai *et al.*, 1999). Auch konnte im Mausmodell nach Infektion mit *H. felis* durch die *in vivo* Neutralisation von $\text{IFN}\gamma$ die Ausprägung einer Gastritis signifikant reduziert werden (Mohammadi *et al.*, 1996). Die Hp Infektion hat die erhöhte Transkription der Gene für IL-12p40, $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ und iNOS im Magen zur Folge (Garhart *et al.*, 2003a). Die molekulare Signalkaskade, die Hp-abhängig zur $\text{IFN}\gamma$ Freisetzung führt, ist noch unbekannt, jedoch ist anzunehmen, dass TH1 polarisierende Zytokine wie IL-12, IL-18 und die Mitglieder der IL-12 Zytokinfamilie IL-23 und IL-27 entscheidend daran beteiligt sind. IL-18 ist ein von Makrophagen produziertes Zytokin, das synergistisch mit IL-12 die $\text{IFN}\gamma$ Produktion von NK und T-Zellen anregt (Abbas *et al.*, 2000). Eine Hp Infektion verstärkt die Sekretion von IL-18 im Magen (Fera *et al.*, 2002; Tomita *et al.*, 2001). IL-18 *knock-out* Mäuse hatten nach Infektion mit Hp niedrigere gastrische $\text{IFN}\gamma$ -Werte und weniger infiltrierende CD4^+ T-Zellen im Magen (Akhiani *et al.*, 2004).

Durch *in vitro* Untersuchungen von naiven murinen Splenozyten konnten diese Befunde auch für die Hp Infektion und die Stimulation mit HcpA bestätigt werden. Als neutralisierende Antikörper wurden polyklonale Seren gegen IL-2, IL-12 und IL-18 verwendet. Es konnte nachgewiesen werden, dass IL-12 das für die Ausprägung der TH1 polarisierenden Immunantwort durch Hp und HcpA das weitaus wichtigste

Zytokin darstellt, dessen Neutralisation zum fast vollständigen Ausfall der nachgeschalteten IFN γ Sekretion führt. IL-2 als T-Zell aktivierendes Zytokin und Proliferations-Signal hatte auf die Sekretion von IFN γ nur wenig Einfluss. Durch Neutralisation von IL-18 konnte gezeigt werden, dass dieses Zytokin auch in dem hier verwendeten Assay-System eine Bedeutung für die TH1 Polarisation und damit für die Sekretion von IFN γ hat, jedoch war diese in jedem Falle geringer als der von IL-12. Ein möglicher synergistischer Effekt von IL-12 und IL-18 konnte durch gleichzeitige Neutralisation von beiden Zytokinen ausgeschlossen werden, auch hier dominierte der durch Neutralisation von IL-12 allein erreichte Effekt. Die Überprüfung der Spezifität der Neutralisation von IL-12, IL-18 und IL-2 erfolgte durch die Untersuchung der Zytokinprofile der Ansätze. So konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der Messgenauigkeit tatsächlich jeweils nur das durch die entsprechenden Antikörper beeinflusste Zytokin und IFN γ beeinflusst wurden.

Dabei muss berücksichtigt werden, dass gegenwärtig nicht für alle potentiell in diesem Zusammenhang relevanten Zytokine Reagenzien existieren, die einen immunologischen Protein-Nachweis von beispielsweise IL-18, IL-23 und IL-27 ermöglichen würden. Dennoch muss die mögliche Rolle dieser Zytokine berücksichtigt werden. Vor allem IL-23 und IL-27 könnten in der durch Hp und HcpA gleichermaßen induzierten Signalkaskade wichtige Rollen einnehmen. Strukturell sind alle Mitglieder dieser Proteinfamilie sehr ähnlich, zum Teil sogar aus identischen Untereinheiten aufgebaut (Holscher, 2004). Die große Proteinuntereinheit von IL-12, IL-12p40 bildet zusammen mit der kleinen Untereinheit p35 biologisch aktives IL-12p70, mit einer anderen kleinen Untereinheit (p19) jedoch funktionelles IL-23 (Holscher, 2004). So verwundert es nicht, dass diese strukturell sehr ähnlichen Proteine auch viele Teile von Signalkaskaden gemeinsam nutzen und ähnliche immunologische Funktionen wie die autokrine Aktivierung von APCs ausüben können (Puccetti *et al.*, 2002). IL-23 wird ähnlich wie IL-12 vor allem aus aktivierten DCs freigesetzt und konnte die Ausschüttung von IFN γ aus einer Splenozyten-Einzelzellsuspension induzieren (Oppmann *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003). Dennoch konnten immunologische, hauptsächlich die Zielzellen von IL-12 und IL-23 betreffende, Unterschiede zwischen diesen Zytokinen festgestellt werden. IL-12 wirkt auf naive CD4⁺ T-Zellen, während IL-23 Gedächtnis-CD4⁺ T-Zellen aktiviert (Lankford *et al.*, 2003). Nur durch IL-23, nicht durch IL-12, kann die IL-17 Sekretion aus Gedächtnis-CD4⁺ Zellen angeregt werden (Aggarwal *et al.*, 2003). Auch einige funktionelle Unterschiede konnten in letzter Zeit beschrieben werden. So bindet IL-23 besser an Maus-DCs als IL-12, beide führen zu IL-12 Sekretion, aber nur IL-23 konnte die Antigenpräsentation von CD8 α ⁺ DCs verstärken (Belladonna *et al.*, 2002). Als drittes Zytokin der IL-12 Familie ist IL-27 bereits genannt worden. IL-27 setzt sich aus dem IL-12p40-related protein EBI-3 und dem IL-12p35-related protein

p28 zusammen (Holscher, 2004). Durch IL-27 konnte die verstärkte Expression des IL-12 Rezeptors und Aktivierung von naiven TH Zellen, sowohl in murinen als auch humanen Zellen induziert werden (Cordoba-Rodriguez *et al.*, 2003).

Wegen der großen Homologie von IL-12, IL-23 und IL-27 besteht die Möglichkeit, dass als IL-12-neutralisierend beschriebene Antikörper auch mit IL-23 oder IL-27 kreuzreagieren und diese Zytokine beeinflussen können (Vandenbroeck *et al.*, 2004). Daher kann gegenwärtig durch IL-12 Neutralisierungsexperimente alleine die Bedeutung dieses Zytokins nicht eindeutig belegt werden, sondern es muss immer die Möglichkeit einer Abhängigkeit von IL-23 und/oder IL-27 in Betracht gezogen werden.

Im vorliegenden Fall von Hp und HcpA ist jedoch die Wahrscheinlichkeit hoch, dass IL-12 tatsächlich das entscheidende Zytokin ist. Da IL-23 vor allem auf Gedächtnis-T-Zellen wirkt, in den vorliegenden Experimenten jedoch naive Mäuse verwendet wurden und die Splenozyten nur für einen kurzen Zeitraum von 36 Stunden stimuliert wurden, der für die Ausbildung von Gedächtnis-T-Zellen in jedem Falle zu kurz ist, ist eine Beteiligung von IL-23 unwahrscheinlich (Abbas *et al.*, 2000). Ein möglicher Effekt von IL-27 kann hier nicht ausgeschlossen werden, jedoch ist die Wahrscheinlichkeit für eine mögliche Kreuzreaktivität der α IL-12 Antikörper gegen IL-27 aufgrund der Zusammensetzung von IL-27 aus IL-12 nur ähnlichen, nicht identischen Untereinheiten, gering.

6.3.3 Untersuchungen an TLR4 defizienten Mäusen

Toll-like-receptors (TLRs) sind angehörige einer Familie von Typ I Transmembran Rezeptoren, die einen extrazellulären *leucin-rich-repeat* und eine intrazelluläre Toll/IL-1 Rezeptor (TIR)-Domäne aufweisen (Rock *et al.*, 1998). Zuerst bei *Drosophila sp.* als für die Ausbildung der dorsoventralen Achse verantwortliches Gen entdeckt, dessen Signalkaskade Ähnlichkeiten mit dem IL-1 Signalmechanismus von Säugern aufwies, konnten später Homologe dieses Rezeptors in Mensch und Maus und deren Zugehörigkeit zum unspezifischen Immunsystem nachgewiesen werden (Medzhitov *et al.*, 1997). Zur Zeit sind 10 TLRs bekannt, die eine große Bandbreite von Liganden erkennen, wobei einzelne TLR unterschiedliche, auch strukturell verschiedene Liganden binden und eine angeborene Immunantwort auslösen können (Medzhitov, 2001). Einige TLRs können außer den bisher bekannten Homodimeren auch untereinander Heterodimere bilden, deren Funktionalität oder Liganden noch unbekannt sind (Janssens *et al.*, 2003).

Hier wurde der Einfluss von TLR4 auf die von HcpA und Hp induzierte Immunantwort untersucht. Bisher identifizierte Liganden von TLR4 sind das LPS gram-negativer

Bakterien, Lipoteichonsäuren und das *Respiratory-syncytial-virus* Protein F (Kurt-Jones *et al.*, 2000; Medzhitov, 2001).

Die verwendeten Mäuse des Stammes C3H HeJ tragen in der TIR-Domäne ihres TLR4 eine Mutation, die zu einem funktionalen Verlust der TLR4-Signaltransduktion führt (Poltorak *et al.*, 1998). Diese Mäuse wurden im Vergleich zum isogenen Wildtypstamm C3H HeN als LPS hyposensitiv beschrieben. Ein völliger Ausfall der LPS-induzierbaren Immunantwort ist jedoch nicht zu beobachten und auch nicht zu erwarten. Bereits früher konnten mit *Lipopolysaccharid-bindig-protein* (LBP) und CD14 LPS-Rezeptor-Moleküle identifiziert werden, die zusätzlich mit TLR4 die Immunreaktion gegen LPS gram-negativer Bakterien vermitteln (Kato *et al.*, 2004; Heumann *et al.*, 2003; Heumann *et al.*, 2002). In 293T-Zellen kann Nod1, ein intrazelluläres Signalprotein, die LPS-induzierte Signaltransduktion unabhängig von TLR4 und MyD-88 übernehmen (Inohara *et al.*, 2001).

TLR4 wird von vielen Zellen des Immunsystems wie Makrophagen und DCs, aber auch Magenepithelzellen exprimiert (Shiratsuchi *et al.*, 2004; Rothfuchs *et al.*, 2004; Uronen-Hansson *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2003). Die Expression von TLR4 ist jedoch stark reguliert und von den verwendeten Zelltypen und vom Aktivierungszustand der jeweiligen Zellen abhängig (Janssens *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2003). Als Co-Rezeptor für TLR4 ist inzwischen lösliches bzw. membranständiges MD-2 identifiziert worden (Medzhitov, 2001). MD-2 bildet mit LPS einen stabilen Komplex und erst dieser stellt den Liganden von TLR4 dar (Kennedy *et al.*, 2004).

Nach Stimulation von TLR4 defizienten Splenozyten mit Hp 2802 konnten im Vergleich zu Splenozyten aus dem Wildtyp-Mäusestamm nur geringere IFN γ Werte gemessen werden. Auch hier war ein vollständiges Ausbleiben der Immunreaktion aufgrund der Komplexität des mit dem Gesamtbakterium dargebotenen Stimulans nicht zu erwarten. Eine Reduktion des ausgeschütteten IFN γ um ca. 75% in den C3H HeJ Mäusen nach Infektion mit Hp im Vergleich zum Wildtyp-Stamm demonstrierte die Bedeutung von TLR4 für die von Hp induzierte Immunantwort. Die Stimulation mit HcpA konnte keinerlei IFN γ Sekretion aus den TLR4 defizienten Mäusen induzieren. Die nach Stimulation mit bekannt immunstimulatorischem *E. coli* LPS deutlich geringeren Mengen des von den entsprechenden Milzzellen sezernierten IFN γ und IL-6 im Vergleich zum Wildtyp zeigte die erwartete Hyposensitivität des TLR4 defizienten Mausstammes.

Dies bedeutet, dass HcpA den immunstimulatorischen Effekt direkt oder indirekt über TLR4 ausübt. Die Signalkaskade über die TIR von auf der Zytoplasmamembran lokalisiertem TLR4 und MyD88 ist jedoch sehr schnell (Palsson-McDermott *et al.*, 2004) und kann nur die mit LPS beobachtete Zytokinkinetik (vgl. 6.3.1), nicht die mit HcpA beobachtete verzögerte Stimulation von Splenozyten erklären. Eine mögliche

Erklärung hierfür liefert der Befund, dass TLR4 in einigen Zelltypen auch bzw. ausschließlich intrazellulär vorliegt und dabei mit dem Golgi-Apparat und Mikrotubuli assoziiert ist (Uronen-Hansson *et al.*, 2004; Latz *et al.*, 2002). Bei Untersuchung von humanen DCs konnte festgestellt werden, dass diese im Gegensatz zu Makrophagen auf der Zelloberfläche kein TLR4 und TLR2 tragen, und die Fähigkeit von DCs zur Produktion von IL-12 nach Phagozytose von Erregern durch Zerstörung der Mikrotubuli vollständig verloren geht (Uronen-Hansson *et al.*, 2004). Auch für TLR9, den Rezeptor für bakterielle DNA und deren unmethylierte CpG Motive konnte nachgewiesen werden, dass die CpG DNA erst internalisiert werden und anschließend eine Maturierung des Endosoms erfolgen muss, damit eine Aktivierung von TLR9 stattfinden kann (Ahmad-Nejad *et al.*, 2002).

Alternativ ist auch eine indirekte Aktivierung des TLR4 durch HcpA denkbar. Hp kann die Expression von eukaryonten *heat-shock* Proteinen (Hsp) aus Mukosazellen induzieren (Yeo *et al.*, 2004; Rokutan, 2000). Diese Hsp wiederum sind kürzlich als endogene Liganden von TLR4 beschrieben worden und können so Signalkaskaden auslösen (Tsan *et al.*, 2004b; Tsan *et al.*, 2004a). HcpA könnte nun über einen stressabhängigen Mechanismus die Freisetzung von Hsp induzieren, die ihrerseits die TLR-abhängige Signaltransduktion verursachen.

Diese hypothetischen Mechanismen der IFN γ Induktion durch HcpA sind in Abbildung 39 schematisch dargestellt.

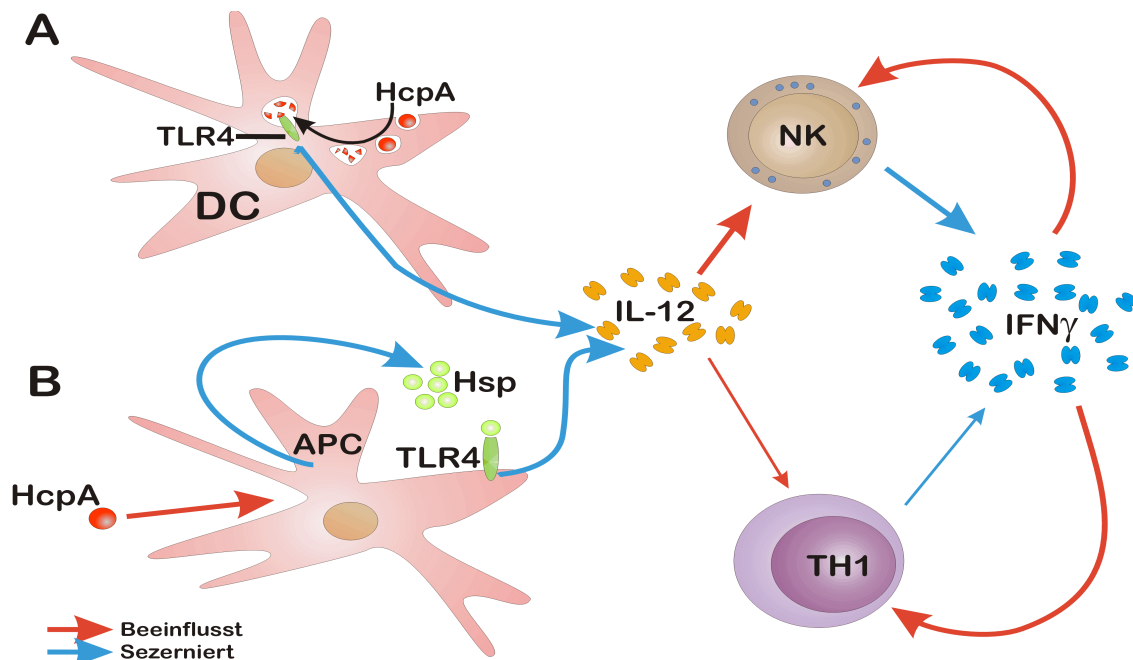


Abbildung 39: Modifizierte, putative Mechanismen der IFN γ Induktion durch HcpA

Nach den neuen Erkenntnissen angepasste hypothetische Modellvorstellungen der Immunstimulation durch HcpA (vgl. Abbildung 3). A) HcpA wird von DCs endozytiert, prozessiert und kann dann über intrazellulär vorliegende TLR4 die Signaltransduktion stimulieren. Daraufhin sezernieren die DCs IL-12, das vor allem NKs zur Produktion von IFN γ anregt. B) HcpA induziert die Bildung und Freisetzung von Hsp, diese binden daraufhin an TLR4 und induzieren die Sekretion von IL-12, das die Produktion von IFN γ aus NK zur Folge hat.

Eine Signaltransduktion von HcpA über in DCs intrazellulär vorliegenden TLR4 nach Aufnahme durch Pino- bzw. Phagozytose und anschließender endosomaler Prozessierung könnte die beobachtete Zeitverzögerung der HcpA induzierten TNF α Freisetzung im Vergleich zu LPS erklären, das ja aus Makrophagen über den auf der Zytoplasma-Membran liegenden TLR4 sehr schnell immunologische Reaktionen auslösen konnte. Zur Untersuchung dieser Hypothese wäre eine Nachweismöglichkeit für IL-23 wünschenswert, da dieses Zytokin der IL-12 Familie die Unterscheidung von aktivierten Makrophagen und DCs und damit die Identifizierung der HcpA Zielzelle erlauben würde (Oppmann *et al.*, 2000). Auch der indirekte Mechanismus der IL-12 Induktion durch HcpA induzierte Hsps könnte die beobachtete zeitliche Verzögerung zwischen der LPS und der HcpA induzierten TNF α Freisetzung erklären.

6.3.4 Restimulation HcpA immunisierter Mäuse

Die Verwendung von Adjuvantien kann die gegen das Antigen gerichtete Immunantwort in ihrer Ausprägung entscheidend beeinflussen. Bekannte Adjuvantien wie *Freund's complete* und *incomplete* Adjuvans, Titermax Gold und Alum führen zur Ausbildung einer TH2 Immunantwort mit hohen IgG1 Serotitern, Monophosphoryl-Lipid und CpG Oligo DNA unterstützen dagegen eine TH1 Polarisierung der Immunantwort mit dominanter IgG2a Antikörperbildung (Weeratna *et al.*, 2000). Decker (2000) und Aigner (2001) konnten zeigen, dass die Immunisierung von Balb/c und C57BL/6 Mäusen mit HcpA unter Adjuvierung von CpG Oligo DNA eine ausgeprägte TH1 Antikörperantwort zur Folge hatte. Bei Verwendung von Alum als Adjuvans konnte jedoch keine deutlich polarisierte TH2 Antwort, sondern nur ein ausgewogener TH0 Antikörpertiter gegen HcpA beobachtet werden. Dies zeigt eine, mit der nach Stimulation von naiven Maussplenozyten durch HcpA übereinstimmende, TH1 polarisierende Eigenschaft des HcpA Proteins.

Die hier untersuchte Immunreaktion von Maussplenozyten nach vorrausgehender Immunisierung der Tiere mit HcpA konnte diese auf humoraler Ebene erhaltenen Ergebnisse auch für die zelluläre Immunantwort bestätigen. Naive Mäuse reagieren wie HcpA-immunisierte Mäuse unabhängig vom verwendeten Adjuvans bei Restimulation durch HcpA mit einer starken IFN γ Sekretion, die für eine TH1 Reaktion typisch ist. Die Sekretion von IL-5, die bei einer TH2 Reaktion zu erwarten gewesen wäre, konnte nicht nachgewiesen werden. Splenozyten aus immunisierten Mäusen reagierten jedoch auf eine Restimulation mit HcpA im Vergleich zur Stimulation naiver Splenozyten mit einer verstärkten Sekretion von IFN γ , was zeigt, dass die von HcpA ausgelöste, TH1-begünstigende Antwort des unspezifischen

Immunsystems durch eine spezifische, adaptive TH1 Immunreaktion noch weiter verstärkt werden kann.

Nur mit HcpA ohne Adjuvans immunisierte Mäuse zeigten nur sehr geringe Serum-Antikörpertiter (Decker, 2000). Bei Restimulation der Splenozyten aus diesen Mäusen mit HcpA war jedoch bezüglich aller gemessenen Zytokine kein Unterschied zu mit HcpA und Adjuvantien immunisierten Tiere festzustellen. Reproduzierbar war jedoch eine verminderte Freisetzung von IFN γ von Splenozyten aus nur mit HcpA immunisierten Mäusen auf die Stimulation mit lebendem Hp und *E. coli* LPS zu beobachten, die bei Immunisierung mit HcpA und Adjuvantien nicht auftrat. Die Ursache für dieses Phänomen ist unklar.

6.3.5 Gerbil-Infektionsmodell

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer HcpA-Immunisierung auf die Ausprägung der Entzündung nach Infektion mit Hp im Gerbil-Tiermodell untersucht. Die Verwendung von Gerbils als Tiermodell für die Hp Infektion ist weit verbreitet (Tatematsu *et al.*, 2003; Sagar *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004; Higuchi *et al.*, 2003). In Langzeitstudien konnte gezeigt werden, dass die Hp Infektion in Gerbils reproduzierbar ursächlich für Ausbildung von Adenokarzinomen des Magens ist (Zheng *et al.*, 2004). Crabtree *et al.* (2004) konnten einen Zusammenhang mit dem Geschlecht der verwendeten Gerbils und der Ausprägung der immunologischen Reaktion auf Hp nachweisen. Dabei sind weibliche Tiere aufgrund einer grundsätzlich stärkeren TH1 Antwort für die Untersuchung der Hp Infektionssituation besser geeignet als männliche Tiere. Außerdem konnte in diesen Studien nachgewiesen werden, dass weibliche Gerbils 4 Wochen Infektion bereits eine ausgeprägte Antrum-Gastritis aufwiesen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den hier an ausschließlich weiblichen Gerbils erzielten Ergebnissen.

Ein prinzipielles Problem der serologischen und immunologischen Untersuchung von Gerbils stellt der Mangel an geeigneten Reagenzien dar. Eine Studie wurde mit selbst hergestellten α Gerbil-Ig Antikörpern durchgeführt (Yan *et al.*, 2001). Beschrieben ist jedoch auch die Kreuzreaktivität von eines kommerziellen α Maus-IgGesamt Antikörpers mit Gerbil-Serumantikörpern (Mohanty *et al.*, 2002). Dieser Antikörper wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Eine Differenzierung von Immunglobulin-Subklassen zur Bestimmung der Polarisierung der B-Zell-Immunantwort ist mit diesem Antikörper aber nicht möglich.

Über den untersuchten Zeitraum von 4 Wochen *post infectionem* (p.i.) konnte eine stetige Zunahme von α Hp Gesamtlysat Antikörpern im Serum beobachtet werden. Dagegen waren praktisch keine α HcpA Antikörpertiter nachweisbar, obwohl HcpA als Antigen, das nach Infektion mit Hp Serotiter in Mensch und Maus herruft, bekannt ist

(Decker, 2000; Mittl *et al.*, 2003b; Cao *et al.*, 1998). Dies kann auf die Kürze des experimentellen Zeitraums zurückzuführen sein. Die Ausbildung einer vollständigen Antikörper-Antwort kann zum Teil sehr lange Zeiträume beanspruchen. Beispielsweise konnten erstmals 17 Wochen p.i. Antikörpertiter gegen die Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase, ein Hp Antigen, detektiert werden und nahmen dann bis zur 26. Woche p.i. zu (Yan *et al.*, 2001).

Die Infektion von Gerbils mit Hp Ca117G führte zur Bildung von Antikörpern, die im Westernblot spezifisch mit Hp Proteinen reagierten. Sehr früh traten Antikörper gegen die Proteine p23 und p30 auf, während gegen die Proteine p20 und p125 erst 3-4 Wochen nach Infektion Antikörper im Serum vorlagen. Diese von der Infektionsdauer abhängige Entwicklung spezifischer Antikörper ist im Gerbil und beim Menschen bekannt (Guruge *et al.*, 1990). Kumagai *et al.* (2001) konnten im Gerbilmodell zeigen, dass 2-8 Wochen p.i. eine primäre IgG Antwort gegen kleine Moleküle (20, 25 und 30kDa) auftrat, jedoch erst 12 Wochen nach Inokulation Antikörper gegen Proteine mit Molekulargewichten von 63, 66, 80, 110, 120, 150 und 160 kDa zu beobachten waren, wobei ein Zusammenhang zwischen der Antikörperantwort gegen die kleinen Proteine und der histologischen Situation im Magen zu verzeichnen war. Antikörper gegen die kleinen Proteine waren häufiger bei Tieren mit Ulzera zu finden als in der Gruppe, die hyperplastische Polypen entwickelte. Diese Gruppe konnte auch das „*early-reactive*“ 30 kDa Protein durch N-terminale Sequenzierung als UreA identifizieren. Dieses Protein entspricht wahrscheinlich dem in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nachgewiesenen p30, gegen das bereits 2 Wochen nach Infektion ein Antikörpertiter nachzuweisen war. Durch Vergleich der Immunreaktivität der Gerbilseren mit Lysaten verschiedener Hp Stämme konnte hier zusätzlich das p125 Immunogen als CagA identifiziert werden.

Die nasale Immunisierungsrouten hat viele beschriebene Vorteile. Dazu zählen das praktisch nicht vorhandene Risiko von unerwünschten Infektionen und die leichte Zugänglichkeit der Nase (Davis, 2001). Die Bildung von Serum-Antikörpertitern gegen HcpA nach nasaler Immunisierung von Gerbils mit HcpA bzw. Ca117G Gesamtlisat ließ sich jedoch nicht zeigen. Die mukosale Immunisierung hat aber auch vor allem die Bildung von sekretorischem IgA zum Ziel, das nur ca. 10% des im Serum vorliegenden Gesamt-Ig ausmacht und dessen Nachweisbarkeit mit den verwendeten kreuzreaktiven α Maus-Antikörper zusätzlich fraglich ist (Kayser *et al.*, 1998; Abbas *et al.*, 2000). Die Immunisierung erfolgte unter Verwendung von CpG Oligo DNA als Adjuvans, da Aluminiumsalze bei oraler oder nasaler Immunisierung als ineffektiv beschrieben sind (Petrovsky *et al.*, 2004). Nach 4-wöchiger Infektion waren die Serum-Antikörpertiter gegen Gesamtlisat des Infektionsstammes Hp Ca117G, wie schon zuvor beobachtet, erhöht.

Histologisch und bezüglich der Hp Kolonisationsdichte konnte kein Unterschied zwischen immunisierten und nur mit PBS immunisierten Gerbils festgestellt werden. Auch hier ist für einen Einfluss der Immunisierung der gewählte Zeitraum eventuell zu kurz, da sich histologische Veränderungen zu Teil erst nach Monaten manifestieren (Wirth *et al.*, 1998; Sutton *et al.*, 2004).

Wie oben erwähnt, ist die Verfügbarkeit von Reagenzien zum immunologischen Nachweis von Gerbil-Proteinen, wie zellulären Oberflächenmarkern und Zytokinen, sehr gering. Daher findet häufig die quantitative *real-time* PCR Verwendung, um die differentielle Gen-Transkription als Surrogatmarker für die Expression verschiedener Proteine nachzuweisen (Crabtree *et al.*, 2004; Rieder *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnten verschiedene cDNAs immunologisch relevanter Gerbil-Gene kloniert werden. Zum Nachweis von Gerbil-Zytokin mRNAs aus den Mägen der Hp Ca117G infizierten Tiere wurden verschiedene TaqMan® Assays etabliert und optimiert. Das Hauptaugenmerk lag auf den proinflammatorischen beziehungsweise TH1-fördernden Zytokinen TNF α , IFN γ und IL-12. Da biologisch aktives IL12p70 aus zwei Protein-Untereinheiten besteht, konnte dieses nicht über Nukleinsäurenachweise detektiert werden. Von den Genen für die beiden Untereinheiten, IL-12p35 und IL-12p40, wird üblicherweise das Gen für IL-12p40 als Maß für die Ausbildung einer proinflammatorischen Zytokinantwort herangezogen (Duret *et al.*, 1999; Garhart *et al.*, 2003a). IL-12p40 cDNA konnte jedoch in dieser Arbeit nicht erfolgreich kloniert werden. Daher wurde hier die Transkription von IL-12p35 untersucht.

Die Transkription und Expression von IL-12p35 und IL-12p40 ist abhängig vom untersuchten Organismus und Zelltyp stark unterschiedlich reguliert (Cheng *et al.*, 2001; Alleva *et al.*, 2001; Goodridge *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2002). Dies ist möglicherweise die Folge der von IL-12p40 gebildeten, unterschiedlichen Dimere. IL-12p40 bildet mit IL-12p35 funktionelles IL-12p70, mit p19 IL-23 und kann zudem ein Homodimer (IL-12p80) bilden (Holscher, 2004). Während IL-23 IL-12p70-ähnliche immunologische Funktionen erfüllt, kann das IL-12p80 Homodimer durch Bindung an den IL-12 Rezeptor diesen antagonistisch inhibieren (Holscher, 2004). Das erklärt auch die Befunde, dass durch starke Expression von IL-12p40 das Ausmass der Entzündung und der IL-18 Sekretion bei einer durch 2,4,6-Trinitrobenzol-Sulfonsäure (TNBS) induzierten Kolitis gesenkt wird und die externe Zuführung von IL-12p80 die nach Stimulation mit TNF α produzierten Mengen an IFN γ und IL-12p35 verringert (Camoglio *et al.*, 2002; Rothe *et al.*, 1997). IL-12p35 stellt dagegen den limitierenden Faktor der Synthese von IL-12p70 dar (Vaidyanathan *et al.*, 2003). In humanen DCs konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-12p40 nicht mit der Expression von IL-12p35 oder der beobachtbaren Menge an sezerniertem IL-12p70 korreliert (Kalinski *et al.*, 2001). Der *IFN-regulatory-factor* (IRF)-1 reguliert in Makrophagen die Expression von IL-12p35 und damit die Bildung von IL-12p70, nicht jedoch die

Expression von IL-12p40. Damit ist der hier verwendete Nachweis von IL-12p35 mRNA für Rückschlüsse auf die Sezernierung von aktiven IL-12p70 besser geeignet als IL-12p40.

Zur Normalisierung der durch quantitative PCR erhaltenen Werte wurde das Gen für Hypoxanthin Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) als interne Kontrolle verwendet, da dieses Haushaltsgen im Gerbil konstitutiv exprimiert wird (Mai *et al.*, 1998).

Die etablierten TaqMan® Assays sind zur Messung der Zytokin-Gen Transkription sehr gut geeignet. Unter den optimierten Bedingungen konnte ein linearer Messbereich über Konzentrationsstufen von 8 Zehnerpotenzen erreicht werden, während mit der ELISA-Technik nur ca. 2 Zehnerpotenzen in einem Assay nachweisbar waren. Das Problem der TaqMan® Assays besteht jedoch darin, dass nur die veröffentlichten cDNA Sequenzen der Gerbil Zytokin-Gene zur Verfügung standen, jedoch keine Information über die gDNA. Daher konnten sonst übliche Vorgehensweisen beim Design von qRT-PCR Oligo-DNAs (Primer und Sonden), wie das Überspannen von Exon/Intron Grenzen, die die Amplifikation von gDNA verhindern sollen, nicht angewendet werden. Deswegen sind die verwendeten Primer/Sonden-Kombinationen auch in der Lage, noch nach RNA Aufreinigung kontaminierende gDNA zu detektieren. Dieses Problem konnte jedoch durch einen, der reversen Transkription vorgeschalteten, DNaseI Verdau minimiert werden. Bei typischen Werten von ca. 4×10^4 nachgewiesenen Kopien pro Ansatz stellen die auch nach DNaseI Verdau vorliegenden ca. 100 Kopien von gDNA einen vernachlässigbaren Fehler von 0,25% dar.

Trotz keinerlei histologisch und mikrobiologisch feststellbarer Unterschiede zeigten sich bei Messung der Zytokin-mRNAs in den Mägen der immunisierten und infizierten Gerbils deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Immunisierungsgruppen. So konnte ein eindeutiger Einfluss der HcpA Immunisierung auf die Transkription der Gene von $\text{IFN}\gamma$, IL-12p35 und $\text{TNF}\alpha$ im Magen nachgewiesen werden. Die Mägen der HcpA immunisierten Tiere wiesen deutlich erhöhte Mengen aller gemessenen Zytokin-mRNAs auf, während zwischen den mit Hp Ca117G Lysat und nur mit PBS immunisierten Tieren keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Zytokin-Gene auftraten. Offensichtlich wird durch mukosale Immunisierung mit HcpA die Ausprägung der gastrischen TH1 polarisierten Immunantwort nach Hp Infektion deutlich verstärkt. Die Auswirkung dieser Verstärkung auf die Pathogenese und das Kolonisationsverhalten scheinen gering. Doch ist zu bedenken, dass in dem hier durchgeführten Kurzzeitversuch später auftretende Effekte nicht nachzuweisen sind. So könnte die verstärkte TH1 Immunantwort längerfristig zu einer erfolgreichen Bekämpfung von Hp durch das Immunsystem führen, jedoch ist eine Verschlimmerung der pathologischen Situation im Magen ebenso denkbar. Die Klärung dieser Fragestellung kann nur mit Hilfe von Langzeitexperimenten erfolgen.

6.3.6 Untersuchung von HcpA Mutanten

Die Verwendung von definierten HcpA Mutanten sollte der genaueren Aufklärung immunstimulatorischer Bereiche von HcpA dienen. Außer eines *in silico* vorhergesagten *coiled-coil* Motivs am carboxyterminalen Ende des Proteins waren aufgrund des regelmäßigen Aufbaus aus α/α Helices keine sich eindeutig vom restlichen Protein abgrenzenden Bereiche bekannt (Mittl *et al.*, 2000). Deshalb wurde durch *site directed mutagenesis* der HcpA Expressionsvektor dahingehend verändert, dass zwei, in etwa gleich große, Fragmente von HcpA getrennt voneinander exprimiert werden sollten. Außerdem wurde in einer hcpA Mutante der *coiled-coil* Abschnitt deletiert. Fast alle Mutanten konnten in *E. coli* erfolgreich exprimiert werden. Lediglich die HcpA Mutante „N-Terminus“ zeigte keine nachweisbare Expression, was wahrscheinlich auf die geringe Größe dieses Polypeptids zurückzuführen ist. Die theoretische Länge des N-Terminus Fragments beträgt 94 Aminosäuren. Es ist bekannt, dass Peptide unter 100 Aminosäuren Größe in *E. coli* nur schwierig stabil zu exprimieren sind, da diese oft sehr schnell intrazellulär degradiert werden (Sambrook *et al.*, 2001).

Die Stimulation von Maus-Splenozyten ergab, dass der carboxyterminale Teil von HcpA ausreicht, um eine dem Wildtyp-Protein entsprechende IFN γ Sekretion hervorzurufen. Dies zeigt die Bedeutung des Carboxyterminus für die immunologische Funktion von HcpA. Die hcpA Mutante ohne *coiled-coil* Sequenz induzierte nur eine um die etwa die Hälfte geringere IFN γ Produktion als vollständiges HcpA. Der *coiled-coil* Bereich scheint somit ebenfalls wichtige, wenn auch nicht entscheidende Aufgaben für die immunstimulatorischen Eigenschaften von HcpA zu erfüllen. *Coiled-coil* Bereiche vermitteln oft Protein-Protein Interaktionen wie Di- und Oligomerisierungen (Gilmour *et al.*, 2003; De Crescenzo *et al.*, 2004; Rahaman *et al.*, 2004). Diese Funktion der Protein-Protein Wechselwirkung wird auch für das HcpA paraloge Protein HcpC postuliert (Mittl *et al.*, 2003a; Lüthy *et al.*, 2004). Für dieses Protein konnte beispielsweise eine Homologie zu dem *E. coli* *Hsp70/Hsp90 heat shock organizing* Protein Hop gezeigt werden. Hop vermittelt die Bildung eines stabilen Komplexes der Chaperone Hsp70 und Hsp90, und fungiert damit selbst als Ko-Chaperon (Agarraberes *et al.*, 2001; Eustace *et al.*, 2004; Frydman *et al.*, 1997). Somit könnte das HcpA *coiled-coil* Motiv eine ähnliche Aufgabe erfüllen. Die putativen Partner der Wechselwirkung mit HcpA oder HcpC sind jedoch nicht bekannt, eine Dimerisierung konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (Lüthy *et al.*, 2004; Mittl *et al.*, 2000).

Um die Aufklärung der immunologisch relevanten Bereiche von HcpA weiter zu verfeinern, wurde das Protein in acht überlappende, jeweils ca. 50 Aminosäuren große Peptide, unterteilt. Um die oben erwähnten Probleme bei der Expression kleiner Polypeptide zu umgehen, wurden diese Bereiche nicht alleine, sondern als

Fusionsprotein zusammen mit Maus-DHFR exprimiert. Dadurch konnte eine stabile Expression in ausreichenden Mengen erreicht werden. Um eine immunologische Beeinflussung der Experimente durch DHFR selbst auszuschließen, wurde dieses Protein auch ohne HcpA-Fragmente exprimiert, entsprechend gereinigt und als Negativkontrolle verwendet.

Alle HcpA-Fusionspeptide zeigten immunstimulatorische Eigenschaften. Die stärkste Stimulation war mit dem Fusionspeptid Fp6 zu erreichen, diese war der durch HcpA vergleichbar. Dieser Befund stimmt mit der durch die HcpA Mutante C-Terminus induzierten Immunstimulation überein, da die Mutante C-Terminus die Aminosäure-Sequenz des Fusionspeptids Fp6 vollständig beinhaltet.

Diese Ergebnisse stehen jedoch im Kontrast zu dem beobachteten Einfluss des *coiled-coil* Abschnittes von HcpA, da dieser in den verwendeten Fusionspeptiden nur in Fp8 repräsentiert ist, allen anderen Fusionspeptiden jedoch fehlt. Möglicherweise kann das *coiled-coil* Motiv im vollständigen Protein sowie in der Mutante C-Terminus eine stabilisierende Funktion ausüben, die bei den Fusionspeptiden von DHFR übernommen wird. Es konnten jedoch zumindest durch PAGE unter denaturierenden Bedingungen keine Unterschiede zwischen HcpA-coil und HcpA bezüglich der Stabilität festgestellt werden. Doch ist zu bedenken, dass eventuelle schwache, nicht kovalente Wechselwirkungen, mit dieser Methode nicht beobachtet werden könnten.

6.3.7 Epitopemapping

Durch *Epitopemapping* konnten Bereiche von HcpA identifiziert werden, die für die Interaktion von HcpA mit Antikörpern und T-Zellen verantwortlich sind. Unter *Epitopemapping* versteht man die Identifizierung von definierten Abschnitten von Antigenen, die für deren immunologischen Eigenschaften bestimmend sind. Meistens sind die Antigene dabei Proteine, aber auch alle anderen Moleküle, wie beispielsweise langkettige Zucker, chemische Verbindungen oder Farbstoffe können Epitope beinhalten und so Immunreaktionen auslösen (Beezhold *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 1999). Die Kartierung dieser Epitope gibt Aufschluss über die molekularen Wirkungsmechanismen, die der Erkennung bestimmter Antigene durch das Immunsystem zugrundeliegen. Beim Design von Vakzinen können schwach immunstimulatorisch wirkende Substanzen molekularbiologisch oder biochemisch so verändert werden, dass eine Immunreaktion gegen diese verstärkt wird oder durch geschickte Wahl des Immunogens spezifische Zellpopulationen angesprochen werden (Kjerrulf *et al.*, 1997; Sherev *et al.*, 2003). Klinisch ist die Kenntnis von antigenen Determinanten interessant, da Erkennung von bestimmten Epitopen durch das Immunsystem oft Rückschlüsse auf eine vorliegende Erkrankung bzw. deren Ausprägung ermöglicht (van der Geld *et al.*, 2004; Mealey *et al.*, 2003). Auf Basis von definierten Epitopen können diagnostische Tests wie Immunoassays zum

serologischen Nachweis von Antikörpern etabliert bzw. verfeinert werden. Chemisch synthetisierte Peptide können in großer Menge und Reinheit produziert werden. Durch ihre Verwendung anstelle von rekombinant exprimierten Proteinen oder größtenteils undefinierten Mischungen von Antigenen, wie sie in Ganzkeimlysaten vorliegen, sinkt die Gefahr von ungewollten unspezifischen Wechselwirkungen drastisch (Mahler *et al.*, 2003).

Zur Aufklärung von Epitopen existiert ein breites Spektrum an Methoden. *Phage display* Antigen Bibliotheken oder genomische Expressions-Bibliotheken mit Peptidlängen von 10 bis 100 Aminosäuren erlauben die genomweite Suche nach unbekanntem Antigenen und deren Epitopen (Jenne *et al.*, 1998; Henics *et al.*, 2003). Wenn das zu untersuchende Antigen als solches bereits bekannt ist, wird am häufigsten die sogenannte PEPSCAN Methode verwendet (Sospedra *et al.*, 2003; Geysen *et al.*, 1987). Dabei wird die in Frage kommende Protein-Primärsequenz in viele, sich überlappende, synthetische Oligo-Peptide unterteilt und diese einzeln, meist im Mikrotiterplatten-Maßstab, auf Reaktivität hin untersucht. Der Vorteil dieser Methode ist, dass durch die kommerzielle Verfügbarkeit von synthetischen Peptiden eine sehr schnelle Identifizierung von Epitopen ermöglicht wird (Routsias *et al.*, 2004). Diese Methode wurde bereits erfolgreich zur Identifizierung von Epitopen aus vielen Pathogenen wie Rinderpest-Virus, HIV, Chlamydien, Mycobakterien, Trypanosomen, *Anaplasma marginale*, *Streptokokkus sp.* und auch Hp eingesetzt (Choi *et al.*, 2004; Draenert *et al.*, 2003; Miles *et al.*, 1989; Pereira *et al.*, 2004; Garcia-Garcia *et al.*, 2004; Goetsch *et al.*, 2003; Bogdanos *et al.*, 2004; McClain *et al.*, 2001). Bei Anwendung der PEPSCAN Methode ist jedoch zu beachten, dass die optimale Länge der Peptide und des jeweils mit dem nächstfolgenden Peptid überlappenden Anteils vom vorgesehenen Verwendungszweck abhängig ist (Kammerer *et al.*, 1997). Am häufigsten werden synthetische Peptide mit 11-16 Aminosäuren verwendet (Choi *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2004; Tolfvenstam *et al.*, 2000). Diese erlauben die Kartierung von sowohl B- als auch T-Zellepitopen, wobei 15mer Peptide, die sich um jeweils 11 Aminosäuren überlappen, momentan als optimal angesehen werden (Hoffmeister *et al.*, 2003). Nach diesen Kriterien wurden auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Peptide ausgewählt. Die PEPSCAN Methode wurde hier mit 15mer Peptiden durchgeführt, die aus jeweils 14 spezifischen Aminosäuren und einem aus technischen Gründen bedingtem, carboxyterminalen Glycin bestehen. Benachbarte Peptide überlappten um 11 Aminosäuren. Probleme der PEPSCAN Methode sind, dass sich aufgrund der Kürze der verwendeten Peptide kaum Sekundärstrukturen und keine Tertiär- oder Quartärstrukturen ausbilden können und deshalb nur lineare B-Zell Epitope nachgewiesen werden können (Routsias *et al.*, 2004). Außerdem ist bekannt, dass in intakten Proteinstrukturen eingebettete Peptide andere antigene Eigenschaften

aufweisen können als frei vorliegende Peptide (Martineau *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997). Daher sollte die Überprüfung von durch PEPSCAN identifizierten Epitopen mittels einer zweiten *Epitopemapping* Strategie erfolgen. Dafür stehen die enzymatische Degradation von vollständigen Proteinen und die Untersuchung der erhaltenen Peptide, sowie die molekulargenetische Herstellung von rekombinant exprimierten, aus Stabilitätsgründen meist als Fusionsprotein an *Carrier*-Proteine gekoppelten Peptiden zur Verfügung (Routsias *et al.*, 2004; Seah *et al.*, 2000; Sambrook *et al.*, 2001). Ein zusätzlicher Vorteil dieser Methoden ist, dass so zumindest theoretisch auch der Nachweis von strukturellen B-Zell Epitopen möglich ist. Nachteile sind, dass durch die größere Länge der zu untersuchenden Einheiten keine präzise Epitop-Zuordnung möglich ist, nicht alle Proteine einem für das *Epitopemapping* sinnvollen proteolytischen Abbau zugänglich sind, oder ein Einfluss des verwendeten *Carrier*-Proteins auf die Antigenität des Fusionspartners nicht ausgeschlossen werden kann (Routsias *et al.*, 2004; Ogunniyi *et al.*, 2002). Zur Kontrolle der PEPSCAN Ergebnisse wurden diese hier mit den bereits in 6.3.6 erwähnten HcpA/DHFR Fusionspeptiden überprüft.

Der Nachweis der Interaktion zwischen Antikörpern und den Peptiden kann direkt oder indirekt erfolgen. Das indirekte Epitopemapping erfolgt mittels Kompetitionsassays, d.h. das zu untersuchende Peptid wird zusammen mit den Antikörpern vorinkubiert, um eine Absättigung der gegen das Peptid gerichteten Antikörper zu erreichen. Im Anschluss daran wird die Verminderung der Bindungsfähigkeit dieser abgesättigten Antikörper gegen das gesamte Protein-Antigen bestimmt. Dieser Ansatz ist jedoch nur bei Untersuchung von monoklonalen Antikörpern oder bei Vorliegen eines einzelnen immundominanten B-Zell Epitops sinnvoll, da polyklonale Seren meist mehrere Epitope erkennen und die Bindekapazität des Gesamtserums durch Neutralisation nur gegen ein Epitop gerichteter Antikörper nur geringfügig beeinflusst wird (Pereira *et al.*, 2004). Da in dieser Arbeit ausschließlich polyklonale Seren verschiedener Herkunft verwendet wurden und kein Hinweis auf ein einzelnes, eventuell immundominantes Epitop vorlag, wurde die Interaktion von Antikörpern und den Peptiden direkt bestimmt. Dieser direkte Nachweis von Epitopen erfolgt durch *antibody-capture* ELISA. Dabei werden die Peptide an einer Matrix-Oberfläche, meist Mikrotiterplatten oder Nitrozellulosemembranen, fixiert und nach der Inkubation mit dem zu untersuchenden Serum die Menge der an die immobilisierten Peptide gebundenen Antikörper nachgewiesen. Die Bindung der Peptide an die Matrix-Oberfläche erfolgt in der Regel über hydrophobe Wechselwirkungen (Pereira *et al.*, 2004). Dadurch erfolgt jedoch eine ungerichtete Anlagerung der Peptide an die Oberfläche, was möglicherweise vorhandene Epitope für Antikörper unzugänglich machen könnte, darüber hinaus können unterschiedliche hydrophatische Eigenschaften der Peptide

unterschiedliche Bindungsstärken zur Folge haben (Gregorius *et al.*, 1999). Daher werden kovalente Bindungen von Peptiden an die Matrix, beispielsweise über Poly-L-Lysin oder aktivierte Dextranmoleküle, im allgemeinen als zuverlässiger angesehen. Diese Methoden machen jedoch oft mehrstufige Reaktionen oder die chemische Modifikation von reaktiven Seitenketten (z.B. Cysteinen) der Peptide erforderlich, die wiederum mit Änderungen der Antigenität einhergehen können. Da beide Methoden zur Immobilisierung Vor- und Nachteile haben und in der Literatur erfolgreich verwendet wurden, wurde hier die für HcpA etablierte Methode des *Coating* an Mikrotiterplatten auch für die von HcpA abgeleiteten Peptide angewendet (Pereira *et al.*, 2004). Um durch ungerichtete Bindung auftretende Probleme zumindest zum Teil ausschließen zu können, wurden die Peptide noch zusätzlich per (Dot-) Westernblotting überprüft. Dabei ergaben sich dem ELISA vergleichbare Aussagen über das Bindungsverhalten der Serumantikörper gegenüber den Peptiden, was die ELISA Ergebnisse untermauert. Es zeigte sich, dass der ELISA in diesem Falle das sensitivere Verfahren darstellt und für die Untersuchung sowohl der linearen synthetischen Peptide als auch der Fusionsproteine gut geeignet ist.

Das experimentelle *Epitopmapping* wird zunehmend durch *in silico* Methoden zur Voraussage von potentiellen Epitopen unterstützt. Es existieren Algorithmen zur Vorhersage von T- und B-Zell Epitopen auf Grundlage von MHC-Bindung, räumlicher Struktur oder Aminosäuresequenz (Veeraraghavan *et al.*, 2004; Tiwari *et al.*, 2004; Forsthuber *et al.*, 2001; De Groot *et al.*, 2003; Bhasin *et al.*, 2004). Damit lassen sich die zu untersuchenden Bereiche von Antigenen bereits im Vorfeld praktischer Versuche eingrenzen. Jedoch müssen natürlich alle *in silico* gewonnenen Erkenntnisse experimentell überprüft werden, da Algorithmen nur Wahrscheinlichkeiten angeben können, reale Epitope jedoch aus vielen Gründen nicht in die zur Berechnung verwendeten Schemata fallen und so unentdeckt bleiben könnten (Konya *et al.*, 1997; Forsthuber *et al.*, 2001; Khanna, 2004). Beispielsweise können auch rein auf Sequenzhomologien beruhende Aussagen über bekannte Epitope in anderen Proteinen zu falschen Ergebnissen führen, wenn durch die Protein-Faltung die Epitopsequenz räumlich nicht für Antikörper zugänglich ist, d.h. ein Kryptotop bildet (Bogdanos *et al.*, 2004; Mahler *et al.*, 2003; Mesleh *et al.*, 2002). Die beste Methode ist daher die praktische Untersuchung des gesamten, *in vivo* vorkommenden Antigens. Auch für HcpA wurde eine *in silico* Vorhersage von putativen B- und T-Zell Epitopen durchgeführt. Die dabei identifizierten Bereiche deckten sich zum Teil gut mit den durch experimentelle Daten ermittelten Proteinabschnitten. Die vorhergesagte Antigenität war jedoch für das gesamte Protein sehr hoch, sodass in etwa 50% der Aminosäure-Sequenz als putative B-Zell Epitope in Frage kamen. Dieser hohe Prozentsatz führt zwangsläufig zu Übereinstimmungen zwischen den vorhergesagten und realen B-Zell Epitopen,

macht durch die geringe Einschränkung der möglichen Epitope die *in silico* Analyse in diesem Fall aber nahezu unbrauchbar.

Auffällig ist, dass die mit den meisten bzw. allen Seren definierbaren strukturellen B-Zell Epitope von HcpA an den jeweiligen Protein-Enden auftraten. Solche Phänomene sind bekannt (Gampfer *et al.*, 2002; Decker *et al.*, 2000). Eine gleichmäßige Verteilung von Epitopen in antigenen Proteinen ist zwar beschrieben, bildet aber anscheinend die Ausnahme (Helm *et al.*, 2000). Oft finden sich kurze Bereiche in Proteinen, die viele Epitope beinhalten, während andere Abschnitte keine nachweisbaren Epitope zeigten (Jacquemin *et al.*, 2003; Estienne *et al.*, 2002; Schulze *et al.*, 2003). Als Erklärung hierfür wird die Struktur der Antigene herangezogen, da die Bindung von Antikörpern an räumlich exponierten und dadurch zugänglichen Bereichen stattfindet. Das kann die Beobachtung erklären, dass Epitope häufig an den amino- bzw. carboxyterminalen Enden von Proteinen nachgewiesen werden, da diese auch in korrekt gefalteten Proteinen oft freiliegen (Decker *et al.*, 2000; Viudes *et al.*, 2001; Vinion-Dubiel *et al.*, 2001). T-Zell Epitope liegen auch häufig in unmittelbarer Nachbarschaft von B-Zell Epitopen (Castelletti *et al.*, 2004; Cribbs *et al.*, 2003). Subramanian *et al.* (2003) zeigten, dass einzelne Peptide, die gleichzeitig B- als auch T-Zell Epitope aufweisen, immunogener wirken als nur entweder B- oder T-Zell Epitope tragende Peptide. Das in HcpA nachgewiesene putative T-Zell Epitop LTE3 liegt nicht in unmittelbarer Nähe zu den B-Zell Epitopen. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass die Bestimmung der B-Zell Epitope mit Kaninchenserum und das Mapping der putativen T-Zell Epitope im Maussystem stattfand und die Herkunft des Probenmaterials aus unterschiedlichen Organismen diesen Befund erklären könnte. Da die Erkennung von Epitopen bereits in Individuen derselben Spezies unterschiedlich ist und sich die in verschiedenen Spezies reaktiven Epitope zusätzlich unterscheiden, überrascht es, dass *major* B-Zell Epitope, d.h. Epitope, die von allen getesteten Seren, unabhängig von deren Herkunft erkannt werden, doch relativ häufig auftreten (Schulze *et al.*, 2003). Beispielsweise wies ein Protein G Derivat aus *Streptococcus sp.* im Maussystem 7 B-Zell und 2 T-Zell-Epitope auf, während im humanen System 4 B-Zell Epitope und 3 T-Zell-Epitope gezeigt werden konnten. Davon waren jeweils 3 B-Zell Epitope und 1 T-Zell-Epitop Mensch und Maus gemeinsam (Goetsch *et al.*, 2003). Antikörper-Reaktivitäten gegen 5 B-Zell Epitope des *respiratory syncytial virus subgroup A* (RSV-A) G Proteins konnten identisch in Mäuse- und Humanseren nachgewiesen werden (Plotnicky-Gilquin *et al.*, 1999).

Wie bereits bei Immunisierung und Restimulation mit Vollängen HcpA beobachtet, hatte die Immunisierung unabhängig von der Adjuvierung nie die Ausbildung einer TH2 Immunantwort zur Folge. Die nach Restimulation von Splenozyten aus immunisierten Mäusen oder Stimulation von naiven Splenozyten gemessene

Immunantwort gegen die Fusionspeptide unterschied sich nur geringfügig. Daher scheint der Effekt der Stimulation der adaptiven Immunantwort additiv zum immunstimulatorischen Effekt auf das angeborene Immunsystem zu sein. Trotzdem war eine gegen HcpA gerichtete, adaptive Immunantwort nachzuweisen, die die Bestimmung des putativen Maus T-Zell Epitops LTE3 erlaubte. Die Identifizierung der beiden anderen putativen T-Zell Epitope LTE1 und LTE2 muss vorläufig als fraglich gelten, da sich die Immunantwort gegen diese Peptidsequenzen nicht reproduzieren liess.

Das *Epitopemapping* von Hp Proteinen beschränkte sich bisher ausschließlich auf die bekannten Virulenzfaktoren VacA, die beiden Untereinheiten der Urease UreA und UreB und das *heat-shock* Protein Hsp60 (Vinion-Dubiel *et al.*, 2001; Burnie *et al.*, 1996; Hirota *et al.*, 2001; Kamiya *et al.*, 2002). Dabei konnten VacA B-Zell Epitope und definierte Bereiche von VacA identifiziert werden, die für die zytotoxische Funktion entscheidend sind (Liu *et al.*, 2004; McClain *et al.*, 2001). Die Kenntnis von Urease-Epitopen konnten zur Etablierung von serologischen Tests mit synthetischen Peptiden als *capture* Antigen genutzt werden. Das Wissen um die Bindungsstellen neutralisierender α Urease Antikörper ermöglichten Rückschlüsse auf die Struktur des Enzyms (Burnie *et al.*, 1996; Fujii *et al.*, 2004; Hirota *et al.*, 2001). Ein spezifisches Epitop des für primäre humane Magenepithelzellen immunstimulatorisch wirkenden Hsp60 konnte als Peptid-Vakzine zusammen mit *Freund's complete* Adjuvans eine Reduktion der Hp Keimzahl im Mausmagen erreichen (Yamaguchi *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2000). Ein 15mer Peptid, das ausschließlich im Flagellenprotein FlgE von *H. hepaticus* zu finden ist, konnte im Mausmodell als T-Zell Epitop von klonalen TH1 CD4⁺ Zellen identifiziert werden (Kullberg *et al.*, 2003). HcpA stellt damit bisher eines der wenigen Hp Proteine dar, die in dieser Ausführlichkeit immunologisch untersucht wurden. Unter Verwendung des Kaninchenserums konnten 5 distinkte lineare *minor* B-Zell Epitope identifiziert werden, die jedoch nicht mit Immun-Seren aus anderen Organismen bestätigt werden konnten. Drei dieser Epitope zeigten starke, zwei nur schwache Antikörperbindung. Eine eindeutige Immunodominanz eines einzelnen Epitops war nicht festzustellen.

Es ist bekannt, dass unterschiedliche Hp Stämme eine hohe genetische Diversität mit durchschnittlich alle 25 Basen auftretenden Nukleotid-Polymorphismen aufweisen, die hauptsächlich auf die natürliche Kompetenz von Hp bei der DNA-Aufnahme, horizontalen Gentransfer und die Integration von Plasmiden zurückgeführt wird (Alm *et al.*, 1999b). Bei Untersuchung von 97 Hp Stämmen konnte eine höhere allelische Variabilität von Hp als bei praktisch allen anderen bekannten human- oder tierpathogenen Erregern festgestellt werden (Go *et al.*, 1996; Hazell *et al.*, 1997). Mittels *pulsed-field* Gelelektrophorese (PFGE) untersuchte genomische

Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) konnten nur zwischen zwei unzusammenhängenden Hp Isolaten ein identisches Bandenmuster nachweisen, alle anderen untersuchten Hp Stämme hatten jeweils einzigartige Bandenmuster (Taylor *et al.*, 1992). Ebenso ist auch keines der hier untersuchten *hcpA* Gene aus 13 verschiedenen Hp Isolaten mit einem anderen identisch. Dennoch zeigte der Vergleich der HcpA Proteinsequenzen, dass in allen untersuchten, natürlich vorkommenden, Hp Stämmen ein vollständiger *hcpA* ORF vorlag. Der Konservierungsgrad der von den Nukleotidsequenzen abgeleiteten Proteinsequenzen liegt mit 95-99,6% identischen Aminosäuren für Hp sehr hoch, ist aber für mit der Umgebung von Hp interagierenden Proteinen eher die Regel. CagA hatte in verschiedenen Hp Isolaten Aminosäuresequenz-Ähnlichkeiten von 93-97% (Tao *et al.*, 2004). Die Familie der Hop OMPs zeigen ca. 95% Sequenzidentität in verschiedenen Hp Stämmen (Peck *et al.*, 2001). HopZ stellt in dieser Familie mit nur ca. 80% identischen Aminosäuren die Ausnahme dar (Peck *et al.*, 1999). In HcpA sind insbesondere die der ganzen Hcp Proteinfamilie namensgebenden Disulfid-Motive höchst konserviert. Disulfidbrücken stellen strukturell sehr stabile und prominente Proteinbereiche dar, weshalb auch in Nähe von Cystein-Cystein Bindungen B-Zell Epitope verstärkt auftreten (Plotnicky-Gilquin *et al.*, 1999). Auch die linearen HcpA B-Zell Epitope LBE1, LBE2, LBE3 und LBE4 liegen in unmittelbarer Nähe oder direkt im Bereich der konservierten Disulfidbrücken von HcpA. Ebenso sind der carboxyterminale Bereich von HcpA und die darin liegenden B-Zell Epitope LBE5 und SLBE3 extrem konserviert.

Der Vergleich der ermittelten Epitopsequenzen mit den Sequenzen anderer Hcps zeigte, dass HcpC bezüglich dieser Teilsequenzen stark homologe Bereiche aufweist. Ein lineares, vom Kaninchenserum erkanntes Epitop ist in HcpA und HcpC zu 100% identisch. Dadurch lässt sich auch die beobachtete Kreuzreaktivität des Kaninchen- α HcpA Immuserums mit HcpC erklären (vgl. 5.1.3). Die außerhalb von HcpC gefundenen Homologien für die Epitopsequenzen erstreckten sich ausschließlich auf die Familie der Hcps, waren jedoch alle nur von niedrigen Identitätswerten. Diese Homologien lassen sich wahrscheinlich durch den allen Hcps gemeinsamen modularen Aufbau erklären (Lüthy *et al.*, 2002). Alle mit HcpA immunisierten Tiere wiesen Antikörper gegen die strukturellen B-Zell Epitope an den respektiven Enden von HcpA auf. Bei Untersuchung von Seren von Hp Infizierten konnte auch mit dieser kleinen Auswahl an Patientenseren keine eindeutige Korrelation zwischen α HcpA Titer und α Hp Titern beobachtet werden, und bestätigt damit die von Decker (2000) erhaltenen Daten aus 492 Patientenseren. Dort wurde dieser Sachverhalt auf das zum Teil stark unterschiedliche Sekretionsverhalten verschiedener Hp Stämme zurückgeführt. Das carboxyterminal gelegene Epitop SLBE3 zeigte jedoch zusätzlich auch mit den Seren aus Hp infizierten Patienten eine Antikörperbindung und stellt damit ein *major* B-Zell Epitop dar. Das Fusionspeptid

Fp8, das das Epitop SLBE3 enthält, wies auch gute immunstimulatorische Eigenschaften auf. Damit ist diese Aminosäuresequenz ein aussichtsreicher Kandidat für die Entwicklung einer Vakzine oder diagnostischer Tests.

6.3.8 Zytokininduktion aus humanen PBMCs

Die Verwendung von Mäusen als Tiermodell für die Aufklärung immunologischer Fragestellungen ist weit verbreitet, trotz der zum Teil erheblichen immunologischen Unterschiede zwischen Maus und Mensch (Eaton *et al.*, 2004; Akhiani *et al.*, 2004; Mohammadi *et al.*, 1996; Smythies *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002; Tracey *et al.*, 1999). Unterschiede finden sich beispielsweise bei der Entwicklung und der Funktion verschiedener Zell-Subpopulationen. So entsprechen murine B-1a Zellen humanen IgM Gedächtnis-B-Zellen, die für IgM-Gedächtnis-B-Zellen typische Expression von CD5 reicht aber für das murine System nicht als Identifikationsmerkmal aus (Carsetti *et al.*, 2004). Auch die Entwicklung von T-Zellen und die Expression von Rezeptoren auf T-Zellen ist in Maus und Mensch verschieden (Blom *et al.*, 1998). So exprimieren die aktivierten T-Zellen vieler Spezies, einschließlich des Menschen, funktionelles MHCII auf ihrer Oberfläche, T-Zellen aus Mäusen jedoch nicht (Holling *et al.*, 2004). Der Ablauf immunologischer Signalkaskaden weicht ebenfalls in beiden Organismen voneinander ab. Zum Beispiel erfolgt bei humanen Zellen die Erkennung von Imidazochinolonen durch TLR7 und TLR8, Maus TLR8 hingegen reagiert nicht dieser Substanzklasse (Jurk *et al.*, 2002). Im mukosalen Immunsystem kann die im Menschen über Typ I Interferone stattfindende Aktivierung von STAT4, einem für die Ausbildung einer TH1 polarisierten Immunantwort entscheidenden Transkriptionsfaktors, sich in der Maus wegen Insertion einer Mikrosatelliten-DNA in STAT2, einer STAT4 vorgeschalteter Kinase, so nicht ereignen (MacDonald, 2003). Das im Menschen nach Infektion mit Hp hauptsächlich von Epithelzellen sezernierte Zytokin IL-8 existiert so in der Maus nicht, hier übernimmt das Zytokin MIP-2 viele immunologische Aufgaben von IL-8 (Saukkonen *et al.*, 1990; Seebach *et al.*, 1995). Aufgrund der vielen immunologischen Unterschiede zwischen Maus und Mensch müssen letzten Endes bei der Untersuchung humanpathogener Erreger immer Experimente im humanen System herangezogen werden, um aussagekräftige Daten zu erhalten (Graham *et al.*, 2004b; Falush *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2004a; Malaty *et al.*, 1994). Häufig finden hierfür humane *peripheral-blood-mononuclear-cells* (PBMCs) Verwendung (Verthelyi *et al.*, 2003; Maino *et al.*, 1998). Ebenso wie bei murinen Splenozyten handelt es sich dabei um von der mukosalen Immunantwort entkoppelte Immunzellen, die jedoch leicht zugänglich und in ausreichender Anzahl zu erhalten sind und daher als Modell zur Untersuchung von lokalen Immunreaktionen, auch der Hp Infektion, genutzt werden können. So ist der Einsatz von PBMCs bei der Aufklärung der von Hp LPS induzierten Immunreaktion, sowie

der Zytokinfreisetzung und Expression von Oberflächenmarkern nach Hp Stimulation beschrieben (Luo *et al.*, 2004; Stassi *et al.*, 2003; Stassi *et al.*, 2002; Lembo *et al.*, 2002).

Hier sollte die Stimulation von PBMCs die Übertragbarkeit der mit murinen Splenozyten erhaltenen Ergebnisse in das humane System zeigen. Die von humanen PBMCs nach Stimulation mit Hp und HcpA induzierte Immunantwort entsprach dem mit Maussplenozyten beobachteten TH1 polarisierendem Zytokinprofil. Jedoch zeigte sich, dass humane PBMCs mit einer erhöhten Basalsekretion von Zytokinen, vor allem IL-8, auf die Präparation der Einzel-Zellsuspension als die Mausmilzzellen reagierten. Im Überstand von nicht stimulierten PBMCs konnten bereits signifikante Zytokinkonzentrationen an IL-6 und IL-8 nachgewiesen werden. Auch die im Maussystem immunologisch inerte Kontrollfraktion der HcpA Expression im DS-2 System enthielt offensichtlich noch für eine Immunstimulation von PBMCs ausreichende Menge an Fremdsubstanzen, die hauptsächlich die Ausschüttung von IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α induzierten. Diese betrug jedoch nur ca. 10% der durch HcpA induzierten Sekretion dieser Zytokine. Zusätzlich führte außer der Stimulation mit Kontrollsubstanzen nur die Inkubation mit Hp oder HcpA zu signifikanten Konzentrationen von IL-12 und IFN γ im Zellkulturmedium. So zeigten die, um die entsprechenden Negativkontrollen bereinigten, von Hp und HcpA induzierten Zytokinprofile eine, wie bereits im Maussystem festgestellt, nahezu identische Ausprägung. Damit ist die Übertragbarkeit auch anderer in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse auf das humane System wahrscheinlich und bestätigt so die Relevanz der hier erhaltenen Daten für die Hp Immunpathogenese im Menschen.

7 Anhang

7.1 Eigene Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

7.1.1 Veröffentlichungen

1. **Deml, L., M. Aigner, A. Eckhardt, J. Decker, N. Lehn, and W. Schneider-Brachert.** 2004. Application of single-cell cultures of mouse splenocytes as an assay system to analyze the immunomodulatory properties of bacterial components. *Methods Mol. Med.* **94:159-75.**:159-175.
2. **Kranzer, K., A. Eckhardt, M. Aigner, G. Knoll, L. Deml, C. Speth, N. Lehn, M. Rehli, and W. Schneider-Brachert.** 2004. Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* **72:**4416-4423.

7.1.2 Kongressbeiträge

2001:

11th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms, Freiburg

Identification and Characterisation of a 24 kDa *Helicobacter pylori* Extracellular Protein that Induces High Levels of IFN- γ in Mouse Splenocytes

J. Decker, L. Deml, M. Aigner, G. Knoll, N. Lehn, W. Schneider-Brachert.

Posterpräsentation

2002:

5th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in Helicobacter Infections, Helsingør, Dänemark

The Biological Function of Helicobacter-Cysteine-rich Protein A (HcpA) is IL-12 Dependent and Located at the Carboxyterminus.

M. Aigner, J. Decker, L. Deml, G. Knoll, N. Lehn, W. Schneider-Brachert.

Posterpräsentation, "Best Poster in Immunology Award"

**EUROPEAN HELICOBACTER STUDY GROUP: XV International Workshop,
Athen, Griechenland**

The Biological Function of Helicobacter-Cysteine-rich Protein A (HcpA) is IL-12
Dependent and Located at the Carboxyterminus.

M. Aigner, J. Decker, L. Deml, G. Knoll, N. Lehn, W. Schneider-Brachert.

Vortrag

2003:

**12th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related
Organisms, Aarhus, Dänemark**

Drosophila-Schneider-2 Cells as a New Expression System for Recombinant
Helicobacter pylori Proteins

M. Aigner, L. Deml, N. Lehn, W. Schneider-Brachert.

Posterpräsentation

2004:

**6th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in
Helicobacter Infections, Helsingør, Dänemark**

Mapping Of B-cell Epitopes On HcpA, A Secreted *H. pylori* Protein

M. Aigner, N. Lehn, and W. Schneider-Brachert

Vortrag

Impact of TLR4 for *H. pylori*-induced Activation of Macrophages

A. Eckhardt, M. Aigner, N. Lehn, and W. Schneider-Brachert

Posterpräsentation

7.2 Verzeichnisse

7.2.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Epidemiologie und Hp assoziierte Krankheiten	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung des HcpA Proteins	25
Abbildung 3: Angenommener Mechanismus der IFNγ Induktion durch HcpA	26
Abbildung 4: Abhängigkeit des Hp 2802 Wachstums von der FKS Konzentration im Medium	48
Abbildung 5: Wachstum von Hp 2802 unter Stressbedingungen	49
Abbildung 6: Einfluss von Stress auf Expression, Transport und Sekretion von HcpA in Hp 2802	50
Abbildung 7: Überprüfung der Induktionsdauer auf die Expression von HcpA in DS-2 Zellen	52
Abbildung 8: Quantitativer Westernblot mit αHcpA Kaninchen-Serum	53
Abbildung 9: HcpA-Expression in DS-2 Zellen	54
Abbildung 10: Aufreinigungsschema für beide Expressionssysteme	54
Abbildung 11: Immunologische Eigenschaften von in <i>E. coli</i> und in DS-2 Zellen exprimiertem HcpA	55
Abbildung 12: Zytokinexpressions-Kinetiken von Splenozyten nach Stimulation mit HcpA bzw. LPS	57
Abbildung 13: Einfluss von neutralisierenden Antikörpern auf die IFNγ Sekretion	58
Abbildung 14: Wirkung neutralisierender Antikörper auf das Zytokinprofil	59
Abbildung 15: Bedeutung des TLR4 für die immunologische Erkennung von HcpA	60
Abbildung 16: Restimulation von Splenozyten unterschiedlich immunisierter Mäuse	62
Abbildung 17: Entwicklung der αHcpA und αHp Antikörpertiter im Gerbil nach Hp Infektion	63
Abbildung 18: Westernblots der Antikörperentwicklung im Gerbil nach Infektion	63
Abbildung 19: Westernblot mit Gerbilserum gegen Gesamtlisate verschiedener Hp Stämme	65
Abbildung 20: Schema der intranasalen Immunisierung und Infektion von Gerbil	66
Abbildung 21: Gerbil Antikörpertiter nach Immunisierung und anschließender Infektion	66
Abbildung 22: Beispiele für Standard Kurve für ELISA und qRT PCR	69
Abbildung 23: Einfluss von DNaseI auf die nachgewiesene Kopienzahl im TaqMan® Assay	69
Abbildung 24: Transkription von Zytokin-Genen im Gerbil Magen nach Immunisierung und Infektion	70
Abbildung 25: Übersicht über die hergestellten HcpA Mutanten	71
Abbildung 26: Durch HcpA Mutanten erzeugte IFNγ Ausschüttung aus naiven murinen Splenozyten	72
Abbildung 27: Hergestellte HcpA/DHFR Fusionspeptide	72
Abbildung 28: Klonierung und Expression von HcpA/DHFR Fusionspeptiden	73
Abbildung 29: Induktion der IFNγ Sekretion durch HcpA-Fusionspeptide	74
Abbildung 30: Westernblots der HcpA/DHFR Fusionspeptide mit unterschiedlichen Seren	75
Abbildung 31: Dot-Westernblot der synthetischen Peptide mit αHcpA Kaninchenserum	76
Abbildung 32: HcpA B-Zell Epitope in Seren immunisierter Tiere	77
Abbildung 33: αHp ELISA und αHcpA ELISA und Westernblot von Human-Seren	80
Abbildung 34: HcpA B-Zell <i>Epitopemapping</i> mit Seren infizierter Patienten	81
Abbildung 35: Restimulation der Splenozyten mit HcpA immunisierter Mäuse	83
Abbildung 36: <i>Multiple Sequence Alignment</i> von HcpA aus verschiedenen Hp Stämmen	85
Abbildung 37: Von Hp 2802 bzw. HcpA induzierte Zytokine aus humanen PBMCs	87
Abbildung 38: Netto-Zytokinproduktion aus humanen PBMCs durch Hp 2802 und HcpA	88
Abbildung 39: Modifizierte, putative Mechanismen der IFNγ Induktion durch HcpA	100

7.2.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Helicobacter spp.</i> und Wirtsorganismen	10
Tabelle 2: Konservierung von <i>hcp</i>-Genen in Hp Stämmen	23
Tabelle 3: Genotypen der verwendeten <i>E. coli</i> Stämme	29
Tabelle 4: Verwendete Sequenzierprimer	32
Tabelle 5: Verwendete PCR-Programme	32
Tabelle 6: Durchgeführte Polymerase-Kettenreaktionen und Primersequenzen	33
Tabelle 7: Westernblotting Antikörper-Konzentrationen	37
Tabelle 8: Verwendete HRP gekoppelte Sekundär-Antikörper	37
Tabelle 9: Sequenzen der bei TaqMan® <i>real-time</i> PCR verwendeten Oligo-DNAs	40
Tabelle 10: Übersicht über verwendete ULRs	44
Tabelle 11: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen	46
Tabelle 12: Quantitative Auswertung der Westernblots aus Abbildung 6	50
Tabelle 13: Bekannte Hp Antigene mit theoretischem und beobachtetem Molekulargewicht	64
Tabelle 14: Genetische Eigenschaften der verwendeten Hp Stämme	65
Tabelle 15: Klonierte Gerbil cDNAs	67
Tabelle 16: Ermittelte optimale Konzentrationen für neu etablierte Gerbil-Zytokin TaqMan® Assays ..	68
Tabelle 17: Eigenschaften der generierten HcpA Mutanten	71
Tabelle 18: Beispiel der Bestimmung von B-Zell Epitopen	78
Tabelle 19: Mit Kaninchenserum ermittelte B-Zell Epitope in HcpA	78
Tabelle 20: Durch Datenbankvergleich erhaltene Treffer für die jeweiligen Epitop-Sequenzen	79
Tabelle 21: Aus Maussplenozyten bestimmte T-Zell Epitope	84

7.2.3 Literaturverzeichnis

1. **Anonym**, 1994. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval.Carcinog.Risks Hum.*, 61:1-241.: 1-241
2. **Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pober, J. S.**, 2000. Cellular and Molecular Immunology, 4th Edition:
3. **Abe, Y.; Ohara, S.; Koike, T.; Sekine, H.; Iijima, K.; Kawamura, M.; Imatani, A.; Kato, K.; Shimosegawa, T.**, 2004. The prevalence of Helicobacter pylori infection and the status of gastric acid secretion in patients with Barrett's esophagus in Japan. *Am.J Gastroenterol.*, 99:7, 1213-1221
4. **Agarraberes, F. A. und Dice, J. F.**, 2001. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci.*, 114:Pt 13, 2491-2499
5. **Aggarwal, S.; Ghilardi, N.; Xie, M. H.; de Sauvage, F. J.; Gurney, A. L.**, 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol.Chem.*, 278:3, 1910-1914
6. **Ahmad-Nejad, P.; Hacker, H.; Rutz, M.; Bauer, S.; Vabulas, R. M.; Wagner, H.**, 2002. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur.J Immunol*, 32:7, 1958-1968
7. **Aigner, M.**, 2001. Funktionsanalyse des IFN γ induzierenden Proteins HcpA (Helicobacter cysteine-rich protein A), Diplomarbeit, Universität Regensburg
8. **Akhiani, A. A.; Pappo, J.; Kabok, Z.; Schon, K.; Gao, W.; Franzen, L. E.; Lycke, N.**, 2002. Protection against Helicobacter pylori infection following immunization is IL-12-dependent and mediated by Th1 cells. *J Immunol*, 169:12, 6977-6984
9. **Akhiani, A. A.; Schon, K.; Lycke, N.**, 2004. Vaccine-induced immunity against Helicobacter pylori infection is impaired in IL-18-deficient mice. *J Immunol*, 173:5, 3348-3356

10. **Akopyants, N. S.; Eaton, K. A.; Berg, D. E.**, 1995. Adaptive mutation and cocolonization during *Helicobacter pylori* infection of gnotobiotic piglets. *Infect Immun.*, 63:1, 116-121
11. **Allen, L. A.; Schlesinger, L. S.; Kang, B.**, 2000. Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *J Exp.Med.*, 191:1, 115-128
12. **Alleva, D. G.; Johnson, E. B.; Wilson, J.; Beller, D. I.; Conlon, P. J.**, 2001. SJL and NOD macrophages are uniquely characterized by genetically programmed, elevated expression of the IL-12(p40) gene, suggesting a conserved pathway for the induction of organ-specific autoimmunity. *J Leukoc.Biol.*, 69:3, 440-448
13. **Alm, R. A.; Ling, L. S.; Moir, D. T.; King, B. L.; Brown, E. D.; Doig, P. C.; Smith, D. R.; Noonan, B.; Guild, B. C.; deJonge, B. L.; Carmel, G.; Tummino, P. J.; Caruso, A.; Uria-Nickelsen, M.; Mills, D. M.; Ives, C.; Gibson, R.; Merberg, D.; Mills, S. D. et al.**, 1999a. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 397:6715, 176-180
14. **Alm, R. A. und Trust, T. J.**, 1999b. Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *J Mol.Med.*, 77:12, 834-846
15. **Amedei, A.; Bergman, M. P.; Appelmelk, B. J.; Azzurri, A.; Benagiano, M.; Tamburini, C.; van der, Z. R.; Telford, J. L.; Vandenbroucke-Grauls, C. M.; D'Elis, M. M.; Del Prete, G.**, 2003. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* antigens and H⁺, K⁺ --adenosine triphosphatase in human gastric autoimmunity. *J Exp.Med.*, %20;198:8, 1147-1156
16. **Amieva, M. R.; Vogelmann, R.; Covacci, A.; Tompkins, L. S.; Nelson, W. J.; Falkow, S.**, 2003. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science*, 300:5624, 1430-1434
17. **Atherton, J. C.; Peek, R. M., Jr.; Tham, K. T.; Cover, T. L.; Blaser, M. J.**, 1997. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 112:1, 92-99
18. **Awasthi, A.; Mathur, R. K.; Saha, B.**, 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med.Res.*, 119:6, 238-258

19. **Backert, S.; Moese, S.; Selbach, M.; Brinkmann, V.; Meyer, T. F.**, 2001. Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol.Microbiol.*, 42:3, 631-644
20. **Bagchi, D.; Bhattacharya, G.; Stohs, S. J.**, 1996. Production of reactive oxygen species by gastric cells in association with *Helicobacter pylori*. *Free Radic.Res.*, 24:6, 439-450
21. **Bagchi, D.; McGinn, T. R.; Ye, X.; Bagchi, M.; Krohn, R. L.; Chatterjee, A.; Stohs, S. J.**, 2002. *Helicobacter pylori*-induced oxidative stress and DNA damage in a primary culture of human gastric mucosal cells. *Dig.Dis Sci.*, 47:6, 1405-1412
22. **Bayerdörffer, E.; Lehn, N.; Stolte, M.**, 2004. [Helicobacter treatment. Proven and new antibiotic combinations for the treatment of recurrences]. *Dtsch.Med.Wochenschr.* , 129:9, 443-446
23. **Bayle, D.; Wangler, S.; Weitzenegger, T.; Steinhilber, W.; Volz, J.; Przybylski, M.; Schafer, K. P.; Sachs, G.; Melchers, K.**, 1998. Properties of the P-type ATPases encoded by the copAP operons of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter felis*. *J Bacteriol.*, 180:2, 317-329
24. **Bazzoli, F.**, 2001. Key points from the revised Maastricht Consensus Report: the impact on general practice. *Eur.J Gastroenterol.Hepatol.*, 13 Suppl 2:S3-7.: S3-S7
25. **Beevers, D. G.; Lip, G. Y.; Blann, A. D.**, 2004. Salt intake and *Helicobacter pylori* infection. *J Hypertens.*, 22:8, 1475-1477
26. **Beezhold, D. H.; Hickey, V. L.; Sutherland, M. F.; O'Hehir, R. E.**, 2004. The latex allergen hev B 5 is an antigen with repetitive murine B-cell epitopes. *Int.Arch.Allergy Immunol*, 134:4, 334-340
27. **Beier, D.; Spohn, G.; Rappuoli, R.; Scarlato, V.**, 1997. Identification and characterization of an operon of *Helicobacter pylori* that is involved in motility and stress adaptation. *J Bacteriol.*, 179:15, 4676-4683
28. **Belladonna, M. L.; Renaud, J. C.; Bianchi, R.; Vacca, C.; Fallarino, F.; Orabona, C.; Fioretti, M. C.; Grohmann, U.; Puccetti, P.**, 2002. IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells. *J Immunol*, 168:11, 5448-5454

29. **Benting, J.; Lecat, S.; Zacchetti, D.; Simons, K.**, 2000. Protein expression in *Drosophila* Schneider cells. *Anal.Biochem.*, 278:1, 59-68
30. **Bernard, A. R.; Kost, T. A.; Overton, L.; Cavegn, C.; Young, J.; Bertrand, M.; Yahia-Cherif, Z.; Chabert, C.; Mills, A.**, 1994. Recombinant protein expression in a *Drosophila* cell line: comparison with the baculovirus system. *Cytotechnology*, 15:1-3, 139-144
31. **Berry, L. J.; Hickey, D. K.; Skelding, K. A.; Bao, S.; Rendina, A. M.; Hansbro, P. M.; Gockel, C. M.; Beagley, K. W.**, 2004. Transcutaneous immunization with combined cholera toxin and CpG adjuvant protects against *Chlamydia muridarum* genital tract infection. *Infect Immun.*, 72:2, 1019-1028
32. **Bhasin, M. und Raghava, G. P.**, 2004. Prediction of CTL epitopes using QM, SVM and ANN techniques. *Vaccine*, 22:23-24, 3195-3204
33. **Birkness, K. A.; Gold, B. D.; White, E. H.; Bartlett, J. H.; Quinn, F. D.**, 1996. In vitro models to study attachment and invasion of *Helicobacter pylori*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 797:293-5.: 293-295
34. **Bizzozero, G.**, 1893. Über die schlauchförmigen Drüsen des Magen-Darmkanals und und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. *Arch.mikro.Anat.*, 42: 82
35. **Blaser, M. J.**, 1998. *Helicobacters* are indigenous to the human stomach: duodenal ulceration is due to changes in gastric microecology in the modern era. *Gut*, 43:5, 721-727
36. **Blaser, M. J. und Atherton, J. C.**, 2004. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest*, 113:3, 321-333
37. **Blaser, M. J.; Perez-Perez, G. I.; Kleanthous, H.; Cover, T. L.; Peek, R. M.; Chyou, P. H.; Stemmermann, G. N.; Nomura, A.**, 1995. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.*, 55:10, 2111-2115
38. **Blom, B.; Res, P. C.; Spits, H.**, 1998. T cell precursors in man and mice. *Crit Rev.Immunol*, 18:4, 371-388
39. **Bogdanos, D. P.; Baum, H.; Gunsar, F.; Arioli, D.; Polymeros, D.; Ma, Y.; Burroughs, A. K.; Vergani, D.**, 2004. Extensive homology between the major immunodominant mitochondrial antigen in primary biliary cirrhosis and

- Helicobacter pylori* does not lead to immunological cross-reactivity. *Scand.J Gastroenterol.*, 39:10, 981-987
40. **Brown, L. M.; Thomas, T. L.; Ma, J. L.; Chang, Y. S.; You, W. C.; Liu, W. D.; Zhang, L.; Pee, D.; Gail, M. H.**, 2002. *Helicobacter pylori* infection in rural China: demographic, lifestyle and environmental factors. *Int.J Epidemiol.*, 31:3, 638-645
 41. **Burnie, J. P. und al Dughaym, A.**, 1996. The application of epitope mapping in the development of a new serological test for *Helicobacter pylori* infection. *J Immunol Methods*, 194:1, 85-94
 42. **Bury-Mone, S.; Skouloubris, S.; Labigne, A.; De Reuse, H.**, 2001. The *Helicobacter pylori* Urel protein: role in adaptation to acidity and identification of residues essential for its activity and for acid activation. *Mol.Microbiol.*, 42:4, 1021-1034
 43. **Bury-Mone, S.; Thiberge, J. M.; Contreras, M.; Maitournam, A.; Labigne, A.; De Reuse, H.**, 2004. Responsiveness to acidity via metal ion regulators mediates virulence in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Mol.Microbiol.*, 53:2, 623-638
 44. **Calvet, X.; Garcia, N.; Lopez, T.; Gisbert, J. P.; Gene, E.; Roque, M.**, 2000. A meta-analysis of short versus long therapy with a proton pump inhibitor, clarithromycin and either metronidazole or amoxicillin for treating *Helicobacter pylori* infection. *Aliment.Pharmacol.Ther.*, 14:5, 603-609
 45. **Camoglio, L.; Juffermans, N. P.; Peppelenbosch, M.; te Velde, A. A.; ten Kate, F. J.; van Deventer, S. J.; Kopf, M.**, 2002. Contrasting roles of IL-12p40 and IL-12p35 in the development of hapten-induced colitis. *Eur.J Immunol*, 32:1, 261-269
 46. **Canizares, P.; Gracia, I.; Gomez, L. A.; Martin, d. A.; Boixeda, D.; Garcia, A.; de Rafael, L.**, 2004. Allyl-thiosulfinates, the bacteriostatic compounds of garlic against *Helicobacter pylori*. *Biotechnol.Prog.*, 20:1, 397-401
 47. **Cao, P.; McClain, M. S.; Forsyth, M. H.; Cover, T. L.**, 1998. Extracellular release of antigenic proteins by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.*, 66:6, 2984-2986
 48. **Carsetti, R.; Rosado, M. M.; Wardmann, H.**, 2004. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev.*, 197:179-91.: 179-191

49. **Carvalho Costa, C. L.; Rocha, G. A.; Rocha, A. M.; de Moura, S. B.; de Figueiredo, S. T.; Esteves, A. M.; Nogueira, A. M.; Cabral, M. M.; de Carvalho, A. S.; Bitencourt, P.; Ferreira, A.; Queiroz, D. M., 2003.** Evaluation of [¹³C]urea breath test and *Helicobacter pylori* stool antigen test for diagnosis of *H. pylori* infection in children from a developing country. *J Clin Microbiol.*, 41:7, 3334-3335
50. **Castelletti, D.; Fracasso, G.; Righetti, S.; Tridente, G.; Schnell, R.; Engert, A.; Colombatti, M., 2004.** A dominant linear B-cell epitope of ricin A-chain is the target of a neutralizing antibody response in Hodgkin's lymphoma patients treated with an anti-CD25 immunotoxin. *Clin Exp.Immunol*, 136:2, 365-372
51. **Cheng, J.; Tu, Y.; Li, J.; Huang, C.; Liu, Z.; Liu, D., 2001.** A study on the expression of interleukin (IL)-10 and IL-12 P35, P40 mRNA in the psoriatic lesions. *J Tongji Med.Univ*, 21:1, 86-88
52. **Chiba, S.; Sugiyama, T.; Yonekura, K.; Tanaka, S.; Matsumoto, H.; Fujii, N.; Ebisu, S.; Sekiguchi, K., 2002.** An antibody to VacA of *Helicobacter pylori* in cerebrospinal fluid from patients with Guillain-Barre syndrome. *J Neurol.Neurosurg.Psychiatry*, 73:1, 76-78
53. **Chisholm, S. A. und Owen, R. J., 2003.** Development and application of a novel screening PCR assay for direct detection of '*Helicobacter heilmannii*'-like organisms in human gastric biopsies in Southeast England. *Diagn.Microbiol.Infect Dis*, 46:1, 1-7
54. **Choi, I. S.; Collisson, E. W.; Maheswaran, S. K.; Yoo, H. S., 2002.** Evaluation of cytokine gene expression in porcine spleen cells, peripheral blood mononuclear cells, and alveolar macrophages by competitive RT-PCR. *FEMS Immunol Med.Microbiol.*, 34:2, 119-126
55. **Choi, K. S.; Nah, J. J.; Ko, Y. J.; Kang, S. Y.; Yoon, K. J.; Joo, Y. S., 2004.** Characterization of immunodominant linear B-cell epitopes on the carboxy terminus of the rinderpest virus nucleocapsid protein. *Clin Diagn.Lab Immunol*, 11:4, 658-664
56. **Ciacchi, C.; Sabbatini, F.; Cavallaro, R.; Castiglione, F.; Di Bella, S.; Iovino, P.; Palumbo, A.; Tortora, R.; Amoroso, D.; Mazzacca, G., 2004.** *Helicobacter pylori* impairs iron absorption in infected individuals. *Dig.Liver Dis*, 36:7, 455-460

57. **Cooksley, C.; Jenks, P. J.; Green, A.; Cockayne, A.; Logan, R. P.; Hardie, K. R.**, 2003. NapA protects *Helicobacter pylori* from oxidative stress damage, and its production is influenced by the ferric uptake regulator. *J Med.Microbiol.*, 52:Pt 6, 461-469
58. **Cooper, J. A.; Hayman, W.; Reed, C.; Kagawa, H.; Good, M. F.; Saul, A.**, 1997. Mapping of conformational B cell epitopes within alpha-helical coiled coil proteins. *Mol.Immunol.*, 34:6, 433-440
59. **Cordoba-Rodriguez, R. und Frucht, D. M.**, 2003. IL-23 and IL-27: new members of the growing family of IL-12-related cytokines with important implications for therapeutics. *Expert.Opin.Biol.Ther.*, 3:5, 715-723
60. **Cornelie, S.; Hoebeke, J.; Schacht, A. M.; Bertin, B.; Vicogne, J.; Capron, M.; Riveau, G.**, 2004. Direct evidence that toll-like receptor 9 (TLR9) functionally binds plasmid DNA by specific cytosine-phosphate-guanine motif recognition. *J Biol.Chem.*, 279:15, 15124-15129
61. **Cover, T. L.; Berg, D. E.; Blaser, M. J.; Mobley, H. L.**, 2001. *H. pylori* Pathogenesis, 1:
62. **Crabtree, J. E.**, 1996. Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. *Scand.J Gastroenterol.Suppl*, 215:3-10.: 3-10
63. **Crabtree, J. E.; Court, M.; Aboshkiwa, M. A.; Jeremy, A. H.; Dixon, M. F.; Robinson, P. A.**, 2004. Gastric mucosal cytokine and epithelial cell responses to *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J Pathol.*, 202:2, 197-207
64. **Cribbs, D. H.; Ghochikyan, A.; Vasilevko, V.; Tran, M.; Petrushina, I.; Sadzikava, N.; Babikyan, D.; Kesslak, P.; Kieber-Emmons, T.; Cotman, C. W.; Agadjanyan, M. G.**, 2003. Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. *Int.Immunol*, 15:4, 505-514
65. **D'Elcios, M. M.; Appelmelk, B. J.; Amedei, A.; Bergman, M. P.; Del Prete, G.**, 2004. Gastric autoimmunity: the role of *Helicobacter pylori* and molecular mimicry. *Trends Mol.Med.*, 10:7, 316-323
66. **D'Elcios, M. M.; Manghetti, M.; De Carli, M.; Costa, F.; Baldari, C. T.; Burrioni, D.; Telford, J. L.; Romagnani, S.; Del Prete, G.**, 1997. T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J Immunol*, 158:2, 962-967
67. **Davis, S. S.**, 2001. Nasal vaccines. *Adv.Drug Deliv.Rev.*, 51:1-3, 21-42

68. **de Boer, W.; Driessen, W.; Jansz, A.; Tytgat, G.**, 1995. Effect of acid suppression on efficacy of treatment for *Helicobacter pylori* infection. *Lancet*, 345:8953, 817-820
69. **De Crescenzo, G.; Pham, P. L.; Durocher, Y.; Chao, H.; O'Connor-McCourt, M. D.**, 2004. Enhancement of the antagonistic potency of transforming growth factor-beta receptor extracellular domains by coiled coil-induced homo- and heterodimerization. *J Biol.Chem.*, 279:25, 26013-26018
70. **De Groot, A. S.; Rayner, J.; Martin, W.**, 2003. Modelling the immunogenicity of therapeutic proteins using T cell epitope mapping. *Dev.Biol.(Basel)*, 112:71-80.: 71-80
71. **de Jonge, R.; Pot, R. G.; Loffeld, R. J.; van Vliet, A. H.; Kuipers, E. J.; Kusters, J. G.**, 2004. The functional status of the *Helicobacter pylori* sabB adhesin gene as a putative marker for disease outcome. *Helicobacter*, 9:2, 158-164
72. **de Lees, T. H. T.; Steen, K. S.; van Wijngaarden, S.; Lems, W. F.; van der Laar, M. A.; Dijkmans, B. A.**, 2002. The prevalence of *H. pylori* is still substantial in rheumatic patients. *Scand.J Rheumatol.*, 31:2, 94-96
73. **de Vries, N.; Kuipers, E. J.; Kramer, N. E.; van Vliet, A. H.; Bijlsma, J. J.; Kist, M.; Bereswill, S.; Vandenbroucke-Grauls, C. M.; Kusters, J. G.**, 2001. Identification of environmental stress-regulated genes in *Helicobacter pylori* by a lacZ reporter gene fusion system. *Helicobacter*, 6:4, 300-309
74. **de Vries, N.; van Ark, E. M.; Stoof, J.; Kuipers, E. J.; van Vliet, A. H.; Kusters, J. G.**, 2003. The stress-induced hsp12 gene shows genetic variation among *Helicobacter pylori* strains. *FEMS Immunol Med.Microbiol.*, 38:1, 45-51
75. **Decker, J.**, 2000. Funktionelle Charakterisierung eines neuartigen immunmodulatorischen Proteins aus *Helicobacter pylori*, Dissertation, Universität Regensburg
76. **Decker, P.; Le Moal, A.; Briand, J. P.; Muller, S.**, 2000. Identification of a minimal T cell epitope recognized by antinucleosome Th cells in the C-terminal region of histone H4. *J Immunol*, 165:2, 654-662
77. **Delany, I.; Pacheco, A. B.; Spohn, G.; Rappuoli, R.; Scarlato, V.**, 2001. Iron-dependent transcription of the frpB gene of *Helicobacter pylori* is controlled by the Fur repressor protein. *J Bacteriol.*, 183:16, 4932-4937

78. **Delany, I.; Spohn, G.; Rappuoli, R.; Scarlato, V.**, 2003. An anti-repression Fur operator upstream of the promoter is required for iron-mediated transcriptional autoregulation in *Helicobacter pylori*. *Mol.Microbiol.*, 50:4, 1329-1338
79. **Demir, S.; Yilmaz, M.; Koseoglu, M.; Akalin, N.; Aslan, D.; Aydin, A.**, 2003. Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis. *Turk.J Gastroenterol.*, 14:1, 39-43
80. **Deml, L.; Aigner, M.; Eckhardt, A.; Decker, J.; Lehn, N.; Schneider-Brachert, W.**, 2004. Application of single-cell cultures of mouse splenocytes as an assay system to analyze the immunomodulatory properties of bacterial components. *Methods Mol.Med.*, 94:159-75.: 159-175
81. **Deml, L. und Wagner, R.**, 1997. Stable Transfected Drosophila Schneider-2 Cells as a Novel Tool to Produce Recombinant Antigens for Diagnostic, Therapeutic, and Preventive Purposes. *Methods Mol.Med.* 11, 185-200
82. **Denk, S.**, 2003. Analyse der *Helicobacter pylori*-induzierten zellulären und humoralen Immunantworten im Immunisierungs- und Infektionsmodell der Maus, Diplomarbeit, Universität Regensburg
83. **Dewhirst, F. E.; Seymour, C.; Fraser, G. J.; Paster, B. J.; Fox, J. G.**, 1994. Phylogeny of *Helicobacter* isolates from bird and swine feces and description of *Helicobacter pametensis* sp. nov. *Int.J Syst.Bacteriol.*, 44:3, 553-560
84. **Dooley, C. P.; Cohen, H.; Fitzgibbons, P. L.; Bauer, M.; Appleman, M. D.; Perez-Perez, G. I.; Blaser, M. J.**, 1989. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N.Engl.J Med.*, 321:23, 1562-1566
85. **Dore, M. P.; Leandro, G.; Realdi, G.; Sepulveda, A. R.; Graham, D. Y.**, 2000. Effect of pretreatment antibiotic resistance to metronidazole and clarithromycin on outcome of *Helicobacter pylori* therapy: a meta-analytical approach. *Dig.Dis Sci.*, 45:1, 68-76
86. **Draenert, R.; Altfeld, M.; Brander, C.; Basgoz, N.; Corcoran, C.; Wurcel, A. G.; Stone, D. R.; Kalams, S. A.; Trocha, A.; Addo, M. M.; Goulder, P. J.; Walker, B. D.**, 2003. Comparison of overlapping peptide sets for detection of antiviral CD8 and CD4 T cell responses. *J Immunol Methods*, 275:1-2, 19-29

87. **Duret, L. und Mouchiroud, D.**, 1999. Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila*, and *Arabidopsis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96:8, 4482-4487
88. **Eaton, K. A.; Logan, S. M.; Baker, P. E.; Peterson, R. A.; Monteiro, M. A.; Altman, E.**, 2004. *Helicobacter pylori* with a truncated lipopolysaccharide O chain fails to induce gastritis in SCID mice injected with splenocytes from wild-type C57BL/6J mice. *Infect Immun.*, 72:7, 3925-3931
89. **Eslick, G. D.**, 2000. *Helicobacter pylori* infection transmitted sexually via oral-genital contact: a hypothetical model. *Sex Transm.Infect*, 76:6, 489-492
90. **Eslick, G. D.**, 2002. Sexual transmission of *Helicobacter pylori* via oral-anal intercourse. *Int.J STD AIDS*, 13:1, 7-11
91. **Eslick, G. D.**, 2004. Non-gonococcal urethritis, *Helicobacter pylori* infection and fellatio: a new menage a trois? *Microbiology*, 150:Pt 3, 520-522
92. **Estienne, V.; Duthoit, C.; Blanchin, S.; Montserret, R.; Durand-Gorde, J. M.; Chartier, M.; Baty, D.; Carayon, P.; Ruf, J.**, 2002. Analysis of a conformational B cell epitope of human thyroid peroxidase: identification of a tyrosine residue at a strategic location for immunodominance. *Int.Immunol*, 14:4, 359-366
93. **Eustace, B. K. und Jay, D. G.**, 2004. Extracellular Roles for the Molecular Chaperone, hsp90. *Cell Cycle*, 3:9).
94. **Evans, D. G.; Evans, D. J., Jr.; Graham, D. Y.**, 1992. Adherence and internalization of *Helicobacter pylori* by HEP-2 cells. *Gastroenterology*, 102:5, 1557-1567
95. **Evans, D. J., Jr.; Evans, D. G.; Takemura, T.; Nakano, H.; Lampert, H. C.; Graham, D. Y.; Granger, D. N.; Kvietys, P. R.**, 1995. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect Immun.*, 63:6, 2213-2220
96. **Falush, D.; Kraft, C.; Taylor, N. S.; Correa, P.; Fox, J. G.; Achtman, M.; Suerbaum, S.**, 2001. Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98:26, 15056-15061
97. **Falush, D.; Wirth, T.; Linz, B.; Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Kidd, M.; Blaser, M. J.; Graham, D. Y.; Vacher, S.; Perez-Perez, G. I.; Yamaoka, Y.;**

- Megraud, F.; Otto, K.; Reichard, U.; Katzowitsch, E.; Wang, X.; Achtman, M.; Suerbaum, S.**, 2003. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*, 299:5612, 1582-1585
98. **Fan, X.; Gunasena, H.; Cheng, Z.; Espejo, R.; Crowe, S. E.; Ernst, P. B.; Reyes, V. E.**, 2000. *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J Immunol*, 165:4, 1918-1924
99. **Felley, C. P.; Pignatelli, B.; Van Melle, G. D.; Crabtree, J. E.; Stolte, M.; Diezi, J.; Cortesy-Theulaz, I.; Michetti, P.; Bancel, B.; Patricot, L. M.; Ohshima, H.; Felley-Bosco, E.**, 2002. Oxidative stress in gastric mucosa of asymptomatic humans infected with *Helicobacter pylori*: effect of bacterial eradication. *Helicobacter*, 7:6, 342-348
100. **Fera, M. T.; Carbone, M.; Buda, C.; Aragona, M.; Panetta, S.; Giannone, M.; La Torre, F.; Giudice, A.; Losi, E.**, 2002. Correlation between *Helicobacter pylori* infection and IL-18 mRNA expression in human gastric biopsy specimens. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 963:326-8.: 326-328
101. **Fiocca, R.; Necchi, V.; Sommi, P.; Ricci, V.; Telford, J.; Cover, T. L.; Solcia, E.**, 1999. Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J Pathol.*, 188:2, 220-226
102. **Fischer, W.; Puls, J.; Buhrdorf, R.; Gebert, B.; Odenbreit, S.; Haas, R.**, 2001. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol.Microbiol.*, 42:5, 1337-1348
103. **Forsthuber, T. G.; Shive, C. L.; Wienhold, W.; de Graaf, K.; Spack, E. G.; Sublett, R.; Melms, A.; Kort, J.; Racke, M. K.; Weissert, R.**, 2001. T cell epitopes of human myelin oligodendrocyte glycoprotein identified in HLA-DR4 (DRB1*0401) transgenic mice are encephalitogenic and are presented by human B cells. *J Immunol*, 167:12, 7119-7125
104. **Fox, J. G.; Dangler, C. A.; Taylor, N. S.; King, A.; Koh, T. J.; Wang, T. C.**, 1999. High-salt diet induces gastric epithelial hyperplasia and parietal cell loss, and enhances *Helicobacter pylori* colonization in C57BL/6 mice. *Cancer Res.*, 59:19, 4823-4828

105. **Freeland, S. J. und Hurst, L. D.**, 1998. The genetic code is one in a million. *J Mol.Evol.*, 47:3, 238-248
106. **Freigang, J.; Diederichs, K.; Schafer, K. P.; Welte, W.; Paul, R.**, 2002. Crystal structure of oxidized flavodoxin, an essential protein in *Helicobacter pylori*. *Protein Sci.*, 11:2, 253-261
107. **Freudenberg, M. A.; Kumazawa, Y.; Meding, S.; Langhorne, J.; Galanos, C.**, 1991. Gamma interferon production in endotoxin-responder and -nonresponder mice during infection. *Infect Immun.*, 59:10, 3484-3491
108. **Frydman, J. und Hohfeld, J.**, 1997. Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. *Trends Biochem.Sci.*, 22:3, 87-92
109. **Fujii, R.; Morihara, F.; Oku, T.; Hifumi, E.; Uda, T.**, 2004. Epitope mapping and features of the epitope for monoclonal antibodies inhibiting enzymatic activity of *Helicobacter pylori* urease. *Biotechnol.Bioeng.*, 2004;86:4, 434-444
110. **Galmiche, A.; Rassow, J.; Doye, A.; Cagnol, S.; Chambard, J. C.; Contamin, S.; de, T., V; Just, I.; Ricci, V.; Solcia, E.; Van Obberghen, E.; Boquet, P.**, 2000. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J*, 19:23, 6361-6370
111. **Gampfer, J. M.; Samstag, A.; Waclavicek, M.; Wolf, H. M.; Eibl, M. M.; Gulle, H.**, 2002. Epitope mapping of neutralizing TSST-1 specific antibodies induced by immunization with toxin or toxoids. *Vaccine*, 20:31-32, 3675-3684
112. **Garcia-Garcia, J. C.; de la, F. J.; Kocan, K. M.; Blouin, E. F.; Halbur, T.; Onet, V. C.; Saliki, J. T.**, 2004. Mapping of B-cell epitopes in the N-terminal repeated peptides of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and characterization of the humoral immune response of cattle immunized with recombinant and whole organism antigens. *Vet.Immunol Immunopathol.*, 98:3-4, 137-151
113. **Gardsvoll, H.; Werner, F.; Sondergaard, L.; Dano, K.; Ploug, M.**, 2004. Characterization of low-glycosylated forms of soluble human urokinase receptor expressed in *Drosophila* Schneider 2 cells after deletion of glycosylation-sites. *Protein Expr.Purif.*, 34:2, 284-295
114. **Garhart, C. A.; Heinzl, F. P.; Czinn, S. J.; Nedrud, J. G.**, 2003a. Vaccine-induced reduction of *Helicobacter pylori* colonization in mice is interleukin-12

- dependent but gamma interferon and inducible nitric oxide synthase independent. *Infect Immun.*, 71:2, 910-921
115. **Garhart, C. A.; Nedrud, J. G.; Heinzl, F. P.; Sigmund, N. E.; Czinn, S. J.**, 2003b. Vaccine-induced protection against *Helicobacter pylori* in mice lacking both antibodies and interleukin-4. *Infect Immun.*, 71:6, 3628-3633
116. **Gasbarrini, A.; Franceschi, F.; Armuzzi, A.; Ojetti, V.; Candelli, M.; Torre, E. S.; De Lorenzo, A.; Anti, M.; Pretolani, S.; Gasbarrini, G.**, 1999. Extradigestive manifestations of *Helicobacter pylori* gastric infection. *Gut*, 45 Suppl 1:I9-I12.: I9-I12
117. **Ge, Z.; Jiang, Q.; Taylor, D. E.**, 1996. Conservation and diversity of the *Helicobacter pylori* copper-transporting ATPase gene (*copA*) sequence among *Helicobacter* species and *Campylobacter* species detected by PCR and RFLP. *Helicobacter*, 1:2, 112-117
118. **Ge, Z. und Taylor, D. E.**, 1999. Contributions of genome sequencing to understanding the biology of *Helicobacter pylori*. *Annu.Rev.Microbiol.*, 53:353-87.: 353-387
119. **Gebert, B.; Fischer, W.; Haas, R.**, 2004. The *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: from cellular vacuolation to immunosuppressive activities. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.*, ..
120. **Gebert, B.; Fischer, W.; Weiss, E.; Hoffmann, R.; Haas, R.**, 2003. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*, 301:5636, 1099-1102
121. **Gewirtz, A. T.; Yu, Y.; Krishna, U. S.; Israel, D. A.; Lyons, S. L.; Peek, R. M., Jr.**, 2004. *Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *J Infect Dis*, 189:10, 1914-1920
122. **Geysen, H. M.; Rodda, S. J.; Mason, T. J.; Tribbick, G.; Schoofs, P. G.**, 1987. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J Immunol Methods*, 102:2, 259-274
123. **Gilmour, M. W.; Gunton, J. E.; Lawley, T. D.; Taylor, D. E.**, 2003. Interaction between the IncHI1 plasmid R27 coupling protein and type IV secretion system: TraG associates with the coiled-coil mating pair formation protein TrhB. *Mol.Microbiol.*, 49:1, 105-116

124. **Go, M. F.; Kapur, V.; Graham, D. Y.; Musser, J. M.**, 1996. Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J Bacteriol.*, 178:13, 3934-3938
125. **Gobert, A. P.; Cheng, Y.; Wang, J. Y.; Boucher, J. L.; Iyer, R. K.; Cederbaum, S. D.; Casero, R. A., Jr.; Newton, J. C.; Wilson, K. T.**, 2002a. *Helicobacter pylori* induces macrophage apoptosis by activation of arginase II. *J Immunol*, 168:9, 4692-4700
126. **Gobert, A. P.; Mersey, B. D.; Cheng, Y.; Blumberg, D. R.; Newton, J. C.; Wilson, K. T.**, 2002b. Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase. *J Immunol*, 168:12, 6002-6006
127. **Goetsch, L.; Haeuw, J. F.; Champion, T.; Lacheny, C.; N'Guyen, T.; Beck, A.; Corvaia, N.**, 2003. Identification of B- and T-cell epitopes of BB, a carrier protein derived from the G protein of *Streptococcus* strain G148. *Clin Diagn.Lab Immunol*, 10:1, 125-132
128. **Goodman, K. J.; Correa, P.; Tengana Aux, H. J.; Ramirez, H.; DeLany, J. P.; Guerrero, P. O.; Lopez, Q. M.; Collazos, P. T.**, 1996. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: a population-based study of transmission pathways. *Am.J Epidemiol.*, 144:3, 290-299
129. **Goodridge, H. S.; Harnett, W.; Liew, F. Y.; Harnett, M. M.**, 2003. Differential regulation of interleukin-12 p40 and p35 induction via Erk mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent mechanisms and the implications for bioactive IL-12 and IL-23 responses. *Immunology*, 109:3, 415-425
130. **Goodwin, C. S.; Armstrong, J. A.; Marshall, B. J.**, 1986. *Campylobacter pyloridis*, gastritis, and peptic ulceration. *J Clin Pathol.*, 39:4, 353-365
131. **Graham, D. Y.; Opekun, A. R.; Jogi, M.; Yamaoka, Y.; Lu, H.; Reddy, R.; El Zimaity, H. M.**, 2004a. False negative urea breath tests with H₂-receptor antagonists: interactions between *Helicobacter pylori* density and pH. *Helicobacter*, 9:1, 17-27
132. **Graham, D. Y.; Opekun, A. R.; Osato, M. S.; El Zimaity, H. M.; Lee, C. K.; Yamaoka, Y.; Qureshi, W. A.; Cadoz, M.; Monath, T. P.**, 2004b. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut*, 53:9, 1235-1243

133. **Graham, J. E.; Peek, R. M., Jr.; Krishna, U.; Cover, T. L.,** 2002. Global analysis of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. *Gastroenterology*, 123:5, 1637-1648
134. **Gregorius, K.; Dalum, I.; Freisleben, M.; Mouritsen, S.; Elsner, H. I.,** 1999. A novel microtiter plate based method for identification of B-cell epitopes. *J Pept.Sci.*, 5:2, 75-82
135. **Guruge, J. L.; Schalen, C.; Nilsson, I.; Ljungh, A.; Tyszkiewicz, T.; Wikander, M.; Wadstrom, T.,** 1990. Detection of antibodies to *Helicobacter pylori* cell surface antigens. *Scand.J Infect Dis*, 22:4, 457-465
136. **Haas, G.; Karaali, G.; Ebermayer, K.; Metzger, W. G.; Lamer, S.; Zimny-Arndt, U.; Diescher, S.; Goebel, U. B.; Vogt, K.; Roznowski, A. B.; Wiedenmann, B. J.; Meyer, T. F.; Aebischer, T.; Jungblut, P. R.,** 2002. Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease. *Proteomics.*, 2:3, 313-324
137. **Hall, T. A.,** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl.Acids.Symp.Ser.*, 41: 95-98
138. **Handt, L. K.; Fox, J. G.; Dewhirst, F. E.; Fraser, G. J.; Paster, B. J.; Yan, L. L.; Rozmiarek, H.; Rufo, R.; Stalis, I. H.,** 1994. *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. *Infect Immun.*, 62:6, 2367-2374
139. **Harrison, L. M.; van Haaften, W. C.; Tesh, V. L.,** 2004. Regulation of proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides in the human monocytic cell line THP-1. *Infect Immun.*, 72:5, 2618-2627
140. **Hazell, S. L.; Andrews, R. H.; Mitchell, H. M.; Daskalopoulos, G.,** 1997. Genetic relationship among isolates of *Helicobacter pylori*: evidence for the existence of a *Helicobacter pylori* species-complex. *FEMS Microbiol.Lett.*, 150:1, 27-32
141. **Hazell, S. L.; Lee, A.; Brady, L.; Hennessy, W.,** 1986. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis*, 153:4, 658-663

142. **Helm, R. M.; Cockrell, G.; Connaughton, C.; Sampson, H. A.; Bannon, G. A.; Beilinson, V.; Nielsen, N. C.; Burks, A. W.**, 2000. A soybean G2 glycinin allergen. 2. Epitope mapping and three-dimensional modeling. *Int.Arch.Allergy Immunol*, 123:3, 213-219
143. **Henics, T.; Winkler, B.; Pfeifer, U.; Gill, S. R.; Buschle, M.; von Gabain, A.; Meinke, A. L.**, 2003. Small-fragment genomic libraries for the display of putative epitopes from clinically significant pathogens. *Biotechniques*, 35:1, 196-202
144. **Heumann, D.; Lauener, R.; Ryffel, B.**, 2003. The dual role of LBP and CD14 in response to Gram-negative bacteria or Gram-negative compounds. *J Endotoxin.Res.*, 9:6, 381-384
145. **Heumann, D. und Roger, T.**, 2002. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim.Acta*, 323:1-2, 59-72
146. **Higashi, H.; Tsutsumi, R.; Fujita, A.; Yamazaki, S.; Asaka, M.; Azuma, T.; Hatakeyama, M.**, 2002a. Biological activity of the Helicobacter pylori virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99:22, 14428-14433
147. **Higashi, H.; Tsutsumi, R.; Muto, S.; Sugiyama, T.; Azuma, T.; Asaka, M.; Hatakeyama, M.**, 2002b. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein. *Science*, 295:5555, 683-686
148. **Higuchi, K.; Tanigawa, T.; Hamaguchi, M.; Takashima, T.; Sasaki, E.; Shiba, M.; Tominaga, K.; Fujiwara, Y.; Oshitani, N.; Matsumoto, T.; Watanabe, T.; Arakawa, T.**, 2003. Comparison of the effects of rebamipide with those of cimetidine on chronic gastritis associated with Helicobacter pylori in Mongolian gerbils. *Aliment.Pharmacol.Ther.*, 18 Suppl 1:1-7.: 1-7
149. **Hirota, K.; Nagata, K.; Norose, Y.; Futagami, S.; Nakagawa, Y.; Senpuku, H.; Kobayashi, M.; Takahashi, H.**, 2001. Identification of an antigenic epitope in Helicobacter pylori urease that induces neutralizing antibody production. *Infect Immun.*, 69:11, 6597-6603
150. **Hocking, D.; Webb, E.; Radcliff, F.; Rothel, L.; Taylor, S.; Pinczower, G.; Kapouleas, C.; Braley, H.; Lee, A.; Doidge, C.**, 1999. Isolation of recombinant protective Helicobacter pylori antigens. *Infect Immun.*, 67:9, 4713-4719

151. **Hoffman, P. S.; Vats, N.; Hutchison, D.; Butler, J.; Chisholm, K.; Sisson, G.; Raudonikiene, A.; Marshall, J. S.; Veldhuyzen van Zanten, S. J.**, 2003. Development of an interleukin-12-deficient mouse model that is permissive for colonization by a motile KE26695 strain of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.*, 71:5, 2534-2541
152. **Hoffmeister, B.; Kiecker, F.; Tesfa, L.; Volk, H. D.; Picker, L. J.; Kern, F.**, 2003. Mapping T cell epitopes by flow cytometry. *Methods*, 29:3, 270-281
153. **Hofreuter, D.; Odenbreit, S.; Haas, R.**, 2001. Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol.Microbiol.*, 41:2, 379-391
154. **Hoit, B. D.**, 2001. Two faces of nitric oxide: lessons learned from the NOS2 knockout. *Circ.Res.*, 89:4, 289-291
155. **Holling, T. M.; Schooten, E.; van Den Elsen, P. J.**, 2004. Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. *Hum.Immunol*, 65:4, 282-290
156. **Holscher, C.**, 2004. The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases. *Med.Microbiol.Immunol (Berl)*, 193:1, 1-17
157. **Ilver, D.; Arnqvist, A.; Ogren, J.; Frick, I. M.; Kersulyte, D.; Incecik, E. T.; Berg, D. E.; Covacci, A.; Engstrand, L.; Boren, T.**, 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*, 279:5349, 373-377
158. **Inohara, N.; Ogura, Y.; Chen, F. F.; Muto, A.; Nunez, G.**, 2001. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol.Chem.*, 276:4, 2551-2554
159. **Israeli, E.; Ilan, Y.; Meir, S. B.; Buena vida, C.; Goldin, E.**, 2003. A novel ¹³C-urea breath test device for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: continuous online measurements allow for faster test results with high accuracy. *J Clin Gastroenterol.*, 37:2, 139-141
160. **Jacquemin, M.; Vantomme, V.; Buhot, C.; Lavend'homme, R.; Burny, W.; Demotte, N.; Chaux, P.; Peerlinck, K.; Vermynen, J.; Maillere, B.; van der, B. P.; Saint-Remy, J. M.**, 2003. CD4+ T-cell clones specific for wild-type

- factor VIII: a molecular mechanism responsible for a higher incidence of inhibitor formation in mild/moderate hemophilia A. *Blood*, 101:4, 1351-1358
161. **Janssens, S. und Beyaert, R.**, 2003. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol.Rev.*, 16:4, 637-646
162. **Jarvinen, N.; Maki, M.; Rabina, J.; Roos, C.; Mattila, P.; Renkonen, R.**, 2001. Cloning and expression of *Helicobacter pylori* GDP-I-fucose synthesizing enzymes (GMD and GMER) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur.J Biochem.*, 268:24, 6458-6464
163. **Jenne, S.; Brepoels, K.; Collen, D.; Jespers, L.**, 1998. High resolution mapping of the B cell epitopes of staphylokinase in humans using negative selection of a phage-displayed antigen library. *J Immunol*, 161:6, 3161-3168
164. **Jeon, B. H.; Oh, Y. J.; Lee, N. G.; Choe, Y. H.**, 2004. Polymorphism of the *Helicobacter pylori* feoB gene in Korea: a possible relation with iron-deficiency anemia? *Helicobacter*, 9:4, 330-334
165. **Jiang, W.; Baker, H. J.; Smith, B. F.**, 2003. Mucosal immunization with *Helicobacter*, CpG DNA, and cholera toxin is protective. *Infect Immun.*, 71:1, 40-46
166. **Jones, A. D.; Bacon, K. D.; Jobe, B. A.; Sheppard, B. C.; Deveney, C. W.; Rutten, M. J.**, 2003. *Helicobacter pylori* induces apoptosis in Barrett's-derived esophageal adenocarcinoma cells. *J Gastrointest.Surg.*, 7:1, 68-76
167. **Jones, N. L.; Day, A. S.; Jennings, H. A.; Sherman, P. M.**, 1999a. *Helicobacter pylori* induces gastric epithelial cell apoptosis in association with increased Fas receptor expression. *Infect Immun.*, 67:8, 4237-4242
168. **Jones, N. L. und Sherman, P. M.**, 1999b. On/off antigenic variation in *Helicobacter pylori*: a clue to understanding immune evasion in the host. *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.*, 28:2, 233-234
169. **Jurk, M.; Heil, F.; Vollmer, J.; Schetter, C.; Krieg, A. M.; Wagner, H.; Lipford, G.; Bauer, S.**, 2002. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat.Immunol*, 3:6, 499
170. **Kalinski, P.; Vieira, P. L.; Schuitemaker, J. H.; de Jong, E. C.; Kapsenberg, M. L.**, 2001. Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood*, 97:11, 3466-3469

171. **Kamiya, S.; Osaki, T.; Taguchi, H.; Yamaguchi, H.**, 2002. Immune response to heat shock protein of *Helicobacter pylori*--a candidate as a vaccine component. *Keio J Med.*, 51 Suppl 2:24-5.: 24-25
172. **Kammerer, R.; Kettner, A.; Chvatchko, Y.; Dufour, N.; Tiercy, J. M.; Corradin, G.; Spertini, F.**, 1997. Delineation of PLA2 epitopes using short or long overlapping synthetic peptides: interest for specific immunotherapy. *Clin Exp.Allergy*, 27:9, 1016-1026
173. **Karczewska, E.; Konturek, J. E.; Konturek, P. C.; Czesnikiewicz, M.; Sito, E.; Bielanski, W.; Kwiecien, N.; Obtulowicz, W.; Ziemniak, W.; Majka, J.; Hahn, E. G.; Konturek, S. J.**, 2002. Oral cavity as a potential source of gastric reinfection by *Helicobacter pylori*. *Dig.Dis Sci.*, 47:5, 978-986
174. **Kato, A.; Ogasawara, T.; Homma, T.; Saito, H.; Matsumoto, K.**, 2004. Lipopolysaccharide-binding protein critically regulates lipopolysaccharide-induced IFN-beta signaling pathway in human monocytes. *J Immunol*, 172:10, 6185-6194
175. **Kavermann, H.; Burns, B. P.; Angermuller, K.; Odenbreit, S.; Fischer, W.; Melchers, K.; Haas, R.**, 2003. Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J Exp.Med.*, 197:7, 813-822
176. **Kayser, F. H.; Bienz, K. A.; Eckert, J.; Zinkernagel, R. M.**, 1998. *Medizinische Mikrobiologie*, 9:
177. **Keenan, J.; Day, T.; Neal, S.; Cook, B.; Perez-Perez, G.; Allardyce, R.; Bagshaw, P.**, 2000a. A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *FEMS Microbiol.Lett.*, 182:2, 259-264
178. **Keenan, J.; Oliaro, J.; Domigan, N.; Potter, H.; Aitken, G.; Allardyce, R.; Roake, J.**, 2000b. Immune response to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies lipoprotein 20 as a *Helicobacter pylori* vaccine candidate. *Infect Immun.*, 68:6, 3337-3343
179. **Keenan, J. I.; Allardyce, R. A.; Bagshaw, P. F.**, 1998. Lack of protection following immunisation with *H. pylori* outer membrane vesicles highlights antigenic differences between *H. felis* and *H. pylori*. *FEMS Microbiol.Lett.*, 161:1, 21-27

180. **Kennedy, M. N.; Mullen, G. E.; Leifer, C. A.; Lee, C.; Mazzoni, A.; Dileepan, K. N.; Segal, D. M.**, 2004. A complex of soluble MD-2 and lipopolysaccharide serves as an activating ligand for Toll-like receptor 4. *J Biol.Chem.*, 279:33, 34698-34704
181. **Khanna, R.**, 2004. Predictive algorithms and T cell epitope mapping. *J Immunol*, 173:5, 2895-2896
182. **Kim, N.; Marcus, E. A.; Wen, Y.; Weeks, D. L.; Scott, D. R.; Jung, H. C.; Song, I. S.; Sachs, G.**, 2004. Genes of *Helicobacter pylori* regulated by attachment to AGS cells. *Infect Immun.*, 72:4, 2358-2368
183. **Kitagawa, M.; Natori, M.; Katoh, M.; Sugimoto, K.; Omi, H.; Akiyama, Y.; Sago, H.**, 2001. Maternal transmission of *Helicobacter pylori* in the perinatal period. *J Obstet.Gynaecol.Res.*, 27:4, 225-230
184. **Kjerrulf, M.; Lowenadler, B.; Svanholm, C.; Lycke, N.**, 1997. Tandem repeats of T helper epitopes enhance immunogenicity of fusion proteins by promoting processing and presentation. *Mol.Immunol*, 34:8-9, 599-608
185. **Kobayashi, S.; Nishihira, J.; Watanabe, S.; Todo, S.**, 1999. Prevention of lethal acute hepatic failure by antimacrophage migration inhibitory factor antibody in mice treated with bacille Calmette-Guerin and lipopolysaccharide. *Hepatology*, 29:6, 1752-1759
186. **Konya, J.; Eklund, C.; af, G., V; Yuan, F.; Stuber, G.; Dillner, J.**, 1997. Identification of a cytotoxic T-lymphocyte epitope in the human papillomavirus type 16 E2 protein. *J Gen.Virol.*, 78:Pt 10, 2615-2620
187. **Kotloff, K. L.; Sztein, M. B.; Wasserman, S. S.; Losonsky, G. A.; DiLorenzo, S. C.; Walker, R. I.**, 2001. Safety and immunogenicity of oral inactivated whole-cell *Helicobacter pylori* vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection. *Infect Immun.*, 69:6, 3581-3590
188. **Krakovka, S.; Eaton, K. A.; Rings, D. M.; Morgan, D. R.**, 1991. Gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Rev.Infect Dis*, 13 Suppl 8:S681-5.: S681-S685
189. **Kranzer, K.; Eckhardt, A.; Aigner, M.; Knoll, G.; Deml, L.; Speth, C.; Lehn, N.; Rehli, M.; Schneider-Brachert, W.**, 2004. Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.*, 72:8, 4416-4423

190. **Krishnamurthy, P.; Parlow, M. H.; Schneider, J.; Burroughs, S.; Wickland, C.; Vakil, N. B.; Dunn, B. E.; Phadnis, S. H.**, 1999. Identification of a novel penicillin-binding protein from *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.*, 181:16, 5107-5110
191. **Kullberg, M. C.; Andersen, J. F.; Gorelick, P. L.; Caspar, P.; Suerbaum, S.; Fox, J. G.; Cheever, A. W.; Jankovic, D.; Sher, A.**, 2003. Induction of colitis by a CD4+ T cell clone specific for a bacterial epitope. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100:26, 15830-15835
192. **Kumagai, T.; Yan, J.; Graham, D. Y.; Tozuka, M.; Okimura, Y.; Ikeno, T.; Sugiyama, A.; Katsuyama, T.; Ota, H.**, 2001. Serum immunoglobulin G immune response to *Helicobacter pylori* antigens in Mongolian gerbils. *J Clin Microbiol.*, 39:4, 1283-1288
193. **Kurt-Jones, E. A.; Popova, L.; Kwinn, L.; Haynes, L. M.; Jones, L. P.; Tripp, R. A.; Walsh, E. E.; Freeman, M. W.; Golenbock, D. T.; Anderson, L. J.; Finberg, R. W.**, 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat.Immunol.*, 1:5, 398-401
194. **Lankford, C. S. und Frucht, D. M.**, 2003. A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity. *J Leukoc.Biol.*, 73:1, 49-56
195. **Lascols, C.; Lamarque, D.; Costa, J. M.; Copie-Bergman, C.; Le Glaunec, J. M.; Deforges, L.; Soussy, C. J.; Petit, J. C.; Delchier, J. C.; Tankovic, J.**, 2003. Fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mutations in *H. pylori* isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol.*, 41:10, 4573-4577
196. **Latz, E.; Visintin, A.; Lien, E.; Fitzgerald, K. A.; Monks, B. G.; Kurt-Jones, E. A.; Golenbock, D. T.; Espevik, T.**, 2002. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J Biol.Chem.*, 277:49, 47834-47843
197. **Leakey, A.; La Brooy, J.; Hirst, R.**, 2000. The ability of *Helicobacter pylori* to activate neutrophils is determined by factors other than *H. pylori* neutrophil-activating protein. *J Infect Dis.*, 182:6, 1749-1755
198. **Lee, C. K.; Soike, K.; Hill, J.; Georgakopoulos, K.; Tibbitts, T.; Ingrassia, J.; Gray, H.; Boden, J.; Kleanthous, H.; Giannasca, P.; Ermak, T.; Weltzin,**

- R.; Blanchard, J.; Monath, T. P., 1999. Immunization with recombinant Helicobacter pylori urease decreases colonization levels following experimental infection of rhesus monkeys. *Vaccine*, 17:11-12, 1493-1505
199. Lee, H. W.; Choe, Y. H.; Kim, D. K.; Jung, S. Y.; Lee, N. G., 2004a. Proteomic analysis of a ferric uptake regulator mutant of Helicobacter pylori: regulation of Helicobacter pylori gene expression by ferric uptake regulator and iron. *Proteomics.*, 4:7, 2014-2027
200. Lee, J. H.; Park, E. K.; Uhm, C. S.; Chung, M. S.; Kim, K. H., 2004b. Inhibition of Helicobacter pylori adhesion to human gastric adenocarcinoma epithelial cells by acidic polysaccharides from Artemisia capillaris and Panax ginseng. *Planta Med.*, 70:7, 615-619
201. Lee, S. K.; Stack, A.; Katzowitsch, E.; Aizawa, S. I.; Suerbaum, S.; Josenhans, C., 2003. Helicobacter pylori flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes Infect*, 5:15, 1345-1356
202. Lembo, A.; Caradonna, L.; Magrone, T.; Mastronardi, M. L.; Caccavo, D.; Jirillo, E.; Amati, L., 2002. Helicobacter pylori organisms induce expression of activation and apoptotic surface markers on human lymphocytes and AGS cells: a cytofluorimetric evaluation. *Immunopharmacol.Immunotoxicol.*, 24:4, 567-582
203. Leong, R. W.; Lee, C. C.; Ling, T. K.; Leung, W. K.; Sung, J. J., 2003. Evaluation of the string test for the detection of Helicobacter pylori. *World J Gastroenterol.*, 9:2, 309-311
204. Liang, S. und Redlinger, T., 2003. A protocol for isolating putative Helicobacter pylori from fecal specimens and genotyping using vacA alleles. *Helicobacter*, 8:5, 561-567
205. Liu, C. J.; Zhang, Z. S.; Li, S. Q.; Huang, C. F., 2000. Cloning and Secretion Expression of Heat-shock Protein 70 Gene of Helicobacter pylori. *Sheng Wu Hua Xue.Yu Sheng Wu Wu Li Xue.Bao.(Shanghai)*, 32:5, 524-528
206. Liu, X.; Hu, J.; Zhang, X.; Fan, D., 2002. Oral immunization of mice with attenuated Salmonella typhimurium expressing Helicobacter pylori urease B subunit. *Chin Med.J (Engl.)*, 115:10, 1513-1516

207. **Liu, X. L.; Li, S. Q.; Liu, C. J.; Tao, H. X.; Zhang, Z. S.**, 2004. Antigen epitope of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin A. *World J Gastroenterol.*, 10:16, 2340-2343
208. **Loffeld, R. J. und van der Putten, A. B.**, 2004. Helicobacter pylori and gastro-oesophageal reflux disease: a cross-sectional epidemiological study. *Neth.J Med.*, 62:6, 188-191
209. **Logan, R. P.**, 1996. Adherence of Helicobacter pylori. *Aliment.Pharmacol.Ther.*, 10 Suppl 1:3-15.: 3-15
210. **Loh, J. T.; Forsyth, M. H.; Cover, T. L.**, 2004. Growth phase regulation of flaA expression in Helicobacter pylori is luxS dependent. *Infect Immun.*, 72:9, 5506-5510
211. **Lundin, A.; Nilsson, C.; Gerhard, M.; Andersson, D. I.; Krabbe, M.; Engstrand, L.**, 2003. The NudA protein in the gastric pathogen Helicobacter pylori is an ubiquitous and constitutively expressed dinucleoside polyphosphate hydrolase. *J Biol.Chem.*, 278:14, 12574-12578
212. **Luo, Y. H.; Yan, J.; Mao, Y. F.**, 2004. Helicobacter pylori lipopolysaccharide: biological activities in vitro and in vivo, pathological correlation to human chronic gastritis and peptic ulcer. *World J Gastroenterol.*, 10:14, 2055-2059
213. **Lupetti, P.; Heuser, J. E.; Manetti, R.; Massari, P.; Lanzavecchia, S.; Bellon, P. L.; Dallai, R.; Rappuoli, R.; Telford, J. L.**, 1996. Oligomeric and subunit structure of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin. *J Cell Biol.*, 133:4, 801-807
214. **Lüthy, L.; Grutter, M. G.; Mittl, P. R.**, 2002. The crystal structure of *Helicobacter pylori* cysteine-rich protein B reveals a novel fold for a penicillin-binding protein. *J Biol.Chem.*, 277:12, 10187-10193
215. **Lüthy, L.; Grutter, M. G.; Mittl, P. R.**, 2004. The crystal structure of Helicobacter cysteine-rich protein C at 2.0 Å resolution: similar peptide-binding sites in TPR and SEL1-like repeat proteins. *J Mol.Biol.*, 340:4, 829-841
216. **MacDonald, T. T.**, 2003. The mucosal immune system. *Parasite Immunol.*, 25:5, 235-246
217. **Mahdavi, J.; Sonden, B.; Hurtig, M.; Olfat, F. O.; Forsberg, L.; Roche, N.; Angstrom, J.; Larsson, T.; Teneberg, S.; Karlsson, K. A.; Altraja, S.; Wadstrom, T.; Kersulyte, D.; Berg, D. E.; Dubois, A.; Petersson, C.**

- Magnusson, K. E.; Norberg, T.; Lindh, F. et al.**, 2002. Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*, 297:5581, 573-578
218. **Mahler, M.; Bluthner, M.; Pollard, K. M.**, 2003. Advances in B-cell epitope analysis of autoantigens in connective tissue diseases. *Clin Immunol*, 107:2, 65-79
219. **Mai, Z.; Horohov, D. W.; Klei, T. R.**, 1998. Hypoxanthine phosphoribosyltransferase cDNA in gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Lab Anim Sci.*, 48:2, 179-183
220. **Maino, V. C. und Picker, L. J.**, 1998. Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression. *Cytometry*, 34:5, 207-215
221. **Makristathis, A.; Hirschl, A. M.; Lehours, P.; Megraud, F.**, 2004. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, 9:s1, 7-14
222. **Malaty, H. M.; El Kasabany, A.; Graham, D. Y.; Miller, C. C.; Reddy, S. G.; Srinivasan, S. R.; Yamaoka, Y.; Berenson, G. S.**, 2002. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet*, 359:9310, 931-935
223. **Malaty, H. M. und Graham, D. Y.**, 1994. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 35:6, 742-745
224. **Marshall, B. J.**, 2002. *Helicobacter pylori*: 20 years on. *Clin Med.*, 2:2, 147-152
225. **Marshall, B. J. und Warren, J. R.**, 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1:8390, 1311-1315
226. **Martin-Araguz, A. und Bustamante-Martinez, C.**, 2004. [The examination of men's wits by Juan Huarte de San Juan, and the dawn of the neurobiology of intelligence in the Spanish renaissance]. *Rev.Neurol.*, 38:12, 1176-1185
227. **Martineau, P.; Leclerc, C.; Hofnung, M.**, 1996. Modulating the immunological properties of a linear B-cell epitope by insertion into permissive sites of the MalE protein. *Mol.Immunol*, 33:17-18, 1345-1358

228. **McClain, M. S.; Cao, P.; Iwamoto, H.; Vinion-Dubiel, A. D.; Szabo, G.; Shao, Z.; Cover, T. L.**, 2001. A 12-amino-acid segment, present in type s2 but not type s1 *Helicobacter pylori* VacA proteins, abolishes cytotoxin activity and alters membrane channel formation. *J Bacteriol.*, 183:22, 6499-6508
229. **Mealey, R. H.; Zhang, B.; Leib, S. R.; Littke, M. H.; McGuire, T. C.**, 2003. Epitope specificity is critical for high and moderate avidity cytotoxic T lymphocytes associated with control of viral load and clinical disease in horses with equine infectious anemia virus. *Virology*, 313:2, 537-552
230. **Medzhitov, R.**, 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat.Rev.Immunol*, 1:2, 135-145
231. **Medzhitov, R.; Preston-Hurlburt, P.; Janeway, C. A., Jr.**, 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388:6640, 394-397
232. **Mehta, N.; Olson, J. W.; Maier, R. J.**, 2003. Characterization of *Helicobacter pylori* nickel metabolism accessory proteins needed for maturation of both urease and hydrogenase. *J Bacteriol.*, 185:3, 726-734
233. **Menaker, R. J.; Ceponis, P. J.; Jones, N. L.**, 2004. *Helicobacter pylori* induces apoptosis of macrophages in association with alterations in the mitochondrial pathway. *Infect Immun.*, 72:5, 2889-2898
234. **Merrell, D. S.; Goodrich, M. L.; Otto, G.; Tompkins, L. S.; Falkow, S.**, 2003a. pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.*, 71:6, 3529-3539
235. **Merrell, D. S.; Thompson, L. J.; Kim, C. C.; Mitchell, H.; Tompkins, L. S.; Lee, A.; Falkow, S.**, 2003b. Growth phase-dependent response of *Helicobacter pylori* to iron starvation. *Infect Immun.*, 71:11, 6510-6525
236. **Mesleh, M. F.; Belmar, N.; Lu, C. W.; Krishnan, V. V.; Maxwell, R. S.; Genain, C. P.; Cosman, M.**, 2002. Marmoset fine B cell and T cell epitope specificities mapped onto a homology model of the extracellular domain of human myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Neurobiol.Dis*, 9:2, 160-172
237. **Michelsen, K. S.; Wong, M. H.; Shah, P. K.; Zhang, W.; Yano, J.; Doherty, T. M.; Akira, S.; Rajavashisth, T. B.; Arditi, M.**, 2004. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and

- alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, %20;101:29, 10679-10684
238. **Miehlke, S.; Kirsch, C.; Schneider-Brachert, W.; Haferland, C.; Neumeyer, M.; Bastlein, E.; Papke, J.; Jacobs, E.; Vieth, M.; Stolte, M.; Lehn, N.; Bayerdorffer, E.**, 2003. A prospective, randomized study of quadruple therapy and high-dose dual therapy for treatment of *Helicobacter pylori* resistant to both metronidazole and clarithromycin. *Helicobacter*, 8:4, 310-319
239. **Miles, M. A.; Wallace, G. R.; Clarke, J. L.**, 1989. Multiple peptide synthesis (Pepscan method) for the systematic analysis of B- and T-cell epitopes: Application to parasite proteins. *Parasitol.Today*, 5:12, 397-400
240. **Mitchell, H. und Megraud, F.**, 2002. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 7 Suppl 1:8-16.: 8-16
241. **Mittl, P. R.; Luthy, L.; Hunziker, P.; Grutter, M. G.**, 2000. The cysteine-rich protein A from *Helicobacter pylori* is a beta-lactamase. *J Biol.Chem.*, 275:23, 17693-17699
242. **Mittl, P. R.; Lüthy, L.; Grütter, M.**, 2003a. Crystal structures of *Helicobacter* cysteine-rich proteins-B and -C are prototype structures for the lage family of SEL1-like proteins. *Int.J Med.Microbiol.*, 293:Suppl. No. 35, 122-122
243. **Mittl, P. R.; Lüthy, L.; Reinhardt, C.; Joller, H.**, 2003b. Detection of high titers of antibody against *Helicobacter* cysteine-rich proteins A, B, C, and E in *Helicobacter pylori*-infected individuals. *Clin Diagn.Lab Immunol*, 10:4, 542-545
244. **Mobley, H. L.; Island, M. D.; Hausinger, R. P.**, 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol.Rev.*, 59:3, 451-480
245. **Mohammadi, M.; Czinn, S.; Redline, R.; Nedrud, J.**, 1996. *Helicobacter*-specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. *J Immunol*, 156:12, 4729-4738
246. **Mohanty, M. C. und Ravindran, B.**, 2002. Deficiency of antibody responses to T-independent antigens in gerbils---*Meriones unguiculatus*. *Dev.Comp Immunol*, 26:4, 385-391

247. **Molinari, M.; Salio, M.; Galli, C.; Norais, N.; Rappuoli, R.; Lanzavecchia, A.; Montecucco, C.,** 1998. Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp.Med.*, 187:1, 135-140
248. **Moss, S. F. und Sood, S.,** 2003. *Helicobacter pylori*. *Curr.Opin.Infect Dis*, 16:5, 445-451
249. **Muotiala, A.; Helander, I. M.; Pyhala, L.; Kosunen, T. U.; Moran, A. P.,** 1992. Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun.*, 60:4, 1714-1716
250. **Noach, L. A.; Rolf, T. M.; Tytgat, G. N.,** 1994. Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. *J Clin Pathol.*, 47:8, 699-704
251. **Nuijens, J. H.; van Berkel, P. H.; Schanbacher, F. L.,** 1996. Structure and biological actions of lactoferrin. *J Mammary.Gland.Biol.Neoplasia*, 1:3, 285-295
252. **Nurgalieva, Z. Z. und Graham, D. Y.,** 2003. Pearls and pitfalls of assessing *Helicobacter pylori* status. *Dig.Liver Dis*, 35:6, 375-377
253. **Obonyo, M.; Guiney, D. G.; Harwood, J.; Fierer, J.; Cole, S. P.,** 2002. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori* induction of inflammatory mediators during murine infection. *Infect Immun.*, 70:6, 3295-3299
254. **Odenbreit, S.; Faller, G.; Haas, R.,** 2002. Role of the alpAB proteins and lipopolysaccharide in adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Int.J Med.Microbiol.*, 292:3-4, 247-256
255. **Oderda, G.; Rapa, A.; Ronchi, B.; Lerro, P.; Pastore, M.; Staiano, A.; de'Angelis, G. L.; Strisciuglio, P.,** 2000. Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by non-invasive antigen enzyme immunoassay in children: multicentre Italian study. *BMJ*, 320:7231, 347-348
256. **Ogunniyi, A. D.; Kotlarski, I.; Morona, R.; Manning, P. A.,** 2002. Epitope analysis of the FanC subunit protein of the K99 (F5) fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* using a recombinant fusion technique. *FEMS Immunol Med.Microbiol.*, 34:1, 23-31
257. **Okazaki, Y.; Furuno, M.; Kasukawa, T.; Adachi, J.; Bono, H.; Kondo, S.; Nikaido, I.; Osato, N.; Saito, R.; Suzuki, H.; Yamanaka, I.; Kiyosawa, H.; Yagi, K.; Tomaru, Y.; Hasegawa, Y.; Nogami, A.; Schonbach, C.;**

- Gojobori, T.; Baldarelli, R. et al.**, 2002. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature*, 420:6915, 563-573
258. **Oliaro, J.; Johnson, R. D.; Chen, W.; Chadwick, V. S.; Murray, A.**, 2000. Identification of an immunogenic 18-kDa protein of *Helicobacter pylori* by alkaline phosphatase gene fusions. *J Med. Microbiol.*, 49:7, 643-650
259. **Oppmann, B.; Lesley, R.; Blom, B.; Timans, J. C.; Xu, Y.; Hunte, B.; Vega, F.; Yu, N.; Wang, J.; Singh, K.; Zonin, F.; Vaisberg, E.; Churakova, T.; Liu, M.; Gorman, D.; Wagner, J.; Zurawski, S.; Liu, Y.; Abrams, J. S. et al.**, 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, 13:5, 715-725
260. **Otto, B. R.; Verweij-van Vught, A. M.; MacLaren, D. M.**, 1992. Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit Rev. Microbiol.*, 18:3, 217-233
261. **Palsson-McDermott, E. M. und O'Neill, L. A.**, 2004. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, 113:2, 153-162
262. **Pantheil, K.; Faller, G.; Haas, R.**, 2003. Colonization of C57BL/6J and BALB/c wild-type and knockout mice with *Helicobacter pylori*: effect of vaccination and implications for innate and acquired immunity. *Infect Immun.*, 71:2, 794-800
263. **Papadogiannakis, N.; Willen, R.; Carlen, B.; Sjostedt, S.; Wadstrom, T.; Gad, A.**, 2000. Modes of adherence of *Helicobacter pylori* to gastric surface epithelium in gastroduodenal disease: a possible sequence of events leading to internalisation. *APMIS*, 108:6, 439-447
264. **Papini, E.; Satin, B.; Norais, N.; de Bernard, M.; Telford, J. L.; Rappuoli, R.; Montecucco, C.**, 1998. Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J Clin Invest*, 102:4, 813-820
265. **Parsonnet, J.; Hansen, S.; Rodriguez, L.; Gelb, A. B.; Warnke, R. A.; Jellum, E.; Orentreich, N.; Vogelstein, J. H.; Friedman, G. D.**, 1994. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N.Engl.J Med.*, 330:18, 1267-1271

266. **Parsonnet, J.; Shmueli, H.; Haggerty, T.**, 1999. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA*, 282:23, 2240-2245
267. **Peck, B.; Ortkamp, M.; Diehl, K. D.; Hundt, E.; Knapp, B.**, 1999. Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res.*, 27:16, 3325-3333
268. **Peck, B.; Ortkamp, M.; Nau, U.; Niederweis, M.; Hundt, E.; Knapp, B.**, 2001. Characterization of four members of a multigene family encoding outer membrane proteins of *Helicobacter pylori* and their potential for vaccination. *Microbes Infect*, 3:3, 171-179
269. **Peek, R. M., Jr. und Blaser, M. J.**, 2002. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat.Rev.Cancer*, 2:1, 28-37
270. **Pereira, C. M.; Franco, d. S.; Duranti, M.; Cunha-Neto, E.; Zingales, B.; Castilho, B. A.**, 2004. Epitope mapping of a single repetitive unit of the B13 *Trypanosoma cruzi* antigen as fusions to *Escherichia coli* LamB protein. *FEMS Microbiol.Lett.*, 235:2, 237-242
271. **Perez-Perez, G. I.; Shepherd, V. L.; Morrow, J. D.; Blaser, M. J.**, 1995. Activation of human THP-1 cells and rat bone marrow-derived macrophages by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun.*, 63:4, 1183-1187
272. **Petersen, A. M. und Krogfelt, K. A.**, 2003. *Helicobacter pylori*: an invading microorganism? A review. *FEMS Immunol Med.Microbiol.*, 36:3, 117-126
273. **Petrovsky, N. und Aguilar, J. C.**, 2004. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol.*, 82:5, 488-496
274. **Plotnicky-Gilquin, H.; Goetsch, L.; Huss, T.; Champion, T.; Beck, A.; Haeuw, J. F.; Nguyen, T. N.; Bonnefoy, J. Y.; Corvaia, N.; Power, U. F.**, 1999. Identification of multiple protective epitopes (protectopes) in the central conserved domain of a prototype human respiratory syncytial virus G protein. *J Virol.*, 73:7, 5637-5645
275. **Poltorak, A.; He, X.; Smirnova, I.; Liu, M. Y.; Van Huffel, C.; Du, X.; Birdwell, D.; Alejos, E.; Silva, M.; Galanos, C.; Freudenberg, M.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Layton, B.; Beutler, B.**, 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282:5396, 2085-2088

276. **Prinz, C.; Hafsi, N.; Volland, P.**, 2003. *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. *Trends Microbiol.*, 11:3, 134-138
277. **Prinz, C.; Schoniger, M.; Rad, R.; Becker, I.; Keiditsch, E.; Wagenpfeil, S.; Classen, M.; Rosch, T.; Schepp, W.; Gerhard, M.**, 2001. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res.*, 61:5, 1903-1909
278. **Puccetti, P.; Belladonna, M. L.; Grohmann, U.**, 2002. Effects of IL-12 and IL-23 on antigen-presenting cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Crit Rev.Immunol*, 22:5-6, 373-390
279. **Pugsley, A. P.**, 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol.Rev.*, 57:1, 50-108
280. **Rad, R.; Gerhard, M.; Lang, R.; Schoniger, M.; Rosch, T.; Schepp, W.; Becker, I.; Wagner, H.; Prinz, C.**, 2002. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J Immunol*, 168:6, 3033-3041
281. **Rahaman, A.; Srinivasan, N.; Shamala, N.; Shaila, M. S.**, 2004. Phosphoprotein of the rinderpest virus forms a tetramer through a coiled coil region important for biological function. A structural insight. *J Biol.Chem.*, 279:22, 23606-23614
282. **Realdi, G.; Dore, M. P.; Fastame, L.**, 1999. Extradigestive manifestations of *Helicobacter pylori* infection: fact and fiction. *Dig.Dis Sci.*, 44:2, 229-236
283. **Reddy, B. S.; Rastogi, S.; Das, B.; Salhan, S.; Verma, S.; Mittal, A.**, 2004. Cytokine expression pattern in the genital tract of *Chlamydia trachomatis* positive infertile women - implication for T-cell responses. *Clin Exp.Immunol*, 137:3, 552-558
284. **Rieder, G.; Hofmann, J. A.; Hatz, R. A.; Stolte, M.; Enders, G. A.**, 2003. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in *Helicobacter pylori*-associated gastritis may represent an increased risk factor to develop gastric carcinoma of the intestinal type. *Int.J Med.Microbiol.*, 293:6, 403-412
285. **Warren, J. R. und Marshall, B.**, 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *The Lancet*, 321:8336, 1273-1275

286. **Rock, F. L.; Hardiman, G.; Timans, J. C.; Kastelein, R. A.; Bazan, J. F.,** 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95:2, 588-593
287. **Rokutan, K.,** 2000. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. *J Gastroenterol.Hepatol.*, 15 Suppl:D12-9.: D12-D19
288. **Rolle-Kampczyk, U. E.; Fritz, G. J.; Diez, U.; Lehmann, I.; Richter, M.; Herbarth, O.,** 2004. Well water--one source of *Helicobacter pylori* colonization. *Int.J Hyg.EnvIRON.Health*, 207:4, 363-368
289. **Romaniuk, P. J.; Zoltowska, B.; Trust, T. J.; Lane, D. J.; Olsen, G. J.; Pace, N. R.; Stahl, D. A.,** 1987. *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp. *J Bacteriol.*, 169:5, 2137-2141
290. **Rossi, G.; Ruggiero, P.; Peppoloni, S.; Pancotto, L.; Fortuna, D.; Lauretti, L.; Volpini, G.; Mancianti, S.; Corazza, M.; Taccini, E.; Di Pisa, F.; Rappuoli, R.; Del Giudice, G.,** 2004. Therapeutic vaccination against *Helicobacter pylori* in the beagle dog experimental model: safety, immunogenicity, and efficacy. *Infect Immun.*, 72:6, 3252-3259
291. **Rothe, H.; O'Hara, R. M., Jr.; Martin, S.; Kolb, H.,** 1997. Suppression of cyclophosphamide induced diabetes development and pancreatic Th1 reactivity in NOD mice treated with the interleukin (IL)-12 antagonist IL-12(p40)2. *Diabetologia*, 40:6, 641-646
292. **Rothfuchs, A. G.; Trumstedt, C.; Wigzell, H.; Rottenberg, M. E.,** 2004. Intracellular bacterial infection-induced IFN-gamma is critically but not solely dependent on Toll-like receptor 4-myeloid differentiation factor 88-IFN-alpha beta-STAT1 signaling. *J Immunol*, 172:10, 6345-6353
293. **Roussos, A.; Philippou, N.; Gourgouljanis, K. I.,** 2003. *Helicobacter pylori* infection and respiratory diseases: a review. *World J Gastroenterol.*, 9:1, 5-8
294. **Routsias, J. G.; Tzioufas, A. G.; Moutsopoulos, H. M.,** 2004. The clinical value of intracellular autoantigens B-cell epitopes in systemic rheumatic diseases. *Clin Chim.Acta*, 340:1-2, 1-25
295. **Rowland, M.; Kumar, D.; Daly, L.; O'Connor, P.; Vaughan, D.; Drumm, B.,** 1999. Low rates of *Helicobacter pylori* reinfection in children. *Gastroenterology*, 117:2, 336-341

296. **Rupnow, M. F.; Shachter, R. D.; Owens, D. K.; Parsonnet, J.**, 2000. A dynamic transmission model for predicting trends in *Helicobacter pylori* and associated diseases in the United States. *Emerg. Infect Dis*, 6:3, 228-237
297. **Rüssmann, H.; Feydt-Schmidt, A.; Adler, K.; Aust, D.; Fischer, A.; Koletzko, S.**, 2003. Detection of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded and in shock-frozen gastric biopsy samples by fluorescent in situ hybridization. *J Clin Microbiol.*, 41:2, 813-815
298. **Sagar, M.; Padol, I.; Khan, W. I.; Bonin, R. P.; Blennerhassett, P. A.; Hunt, R. H.**, 2004. Establishment of T-Helper-2 immune response based gerbil model of enteric infection. *Scand.J Gastroenterol.*, 39:7, 668-673
299. **Salama, N.; Guillemin, K.; McDaniel, T. K.; Sherlock, G.; Tompkins, L.; Falkow, S.**, 2000. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97:26, 14668-14673
300. **Sambrook, J. und Russel, D. W.**, 2001. Molecular Cloning, Third Edition:
301. **Saukkonen, K.; Sande, S.; Cioffe, C.; Wolpe, S.; Sherry, B.; Cerami, A.; Tuomanen, E.**, 1990. The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J Exp.Med.*, 171:2, 439-448
302. **Sawai, N.; Kita, M.; Kodama, T.; Tanahashi, T.; Yamaoka, Y.; Tagawa, Y.; Iwakura, Y.; Imanishi, J.**, 1999. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Infect Immun.*, 67:1, 279-285
303. **Schmausser, B.; Andrulis, M.; Endrich, S.; Lee, S. K.; Josenhans, C.; Muller-Hermelink, H. K.; Eck, M.**, 2004. Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Exp.Immunol*, 136:3, 521-526
304. **Schreiber, S.; Nguyen, T. H.; Konradt, M.; Scheid, P.**, 2003. Recovery from gastric mucus depletion in the intact guinea pig mucosa. *Scand.J Gastroenterol.*, 38:11, 1136-1143
305. **Schulze, K.; Medina, E.; Chhatwal, G. S.; Guzman, C. A.**, 2003. Identification of B- and T-cell epitopes within the fibronectin-binding domain of the SfbI protein of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun.*, 71:12, 7197-7201

306. **Seah, J. N.; Yu, L.; Kwang, J.,** 2000. Localization of linear B-cell epitopes on infectious bronchitis virus nucleocapsid protein. *Vet.Microbiol.*, 75:1, 11-16
307. **Sebbane, F.; Bury-Mone, S.; Cailliau, K.; Browaeys-Poly, E.; De Reuse, H.; Simonet, M.,** 2002. The *Yersinia pseudotuberculosis* Yut protein, a new type of urea transporter homologous to eukaryotic channels and functionally interchangeable in vitro with the *Helicobacter pylori* Urel protein. *Mol.Microbiol.*, 45:4, 1165-1174
308. **Seebach, J.; Bartholdi, D.; Frei, K.; Spanaus, K. S.; Ferrero, E.; Widmer, U.; Isenmann, S.; Strieter, R. M.; Schwab, M.; Pfister, H.,** 1995. Experimental *Listeria meningoenzephalitis*. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and -2 are produced intrathecally and mediate chemotactic activity in cerebrospinal fluid of infected mice. *J Immunol*, 155:9, 4367-4375
309. **Selbach, M.; Moese, S.; Hauck, C. R.; Meyer, T. F.; Backert, S.,** 2002. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol.Chem.*, 277:9, 6775-6778
310. **Sherev, T.; Wiesmuller, K. H.; Walden, P.,** 2003. Mimotopes of tumor-associated T-cell epitopes for cancer vaccines determined with combinatorial peptide libraries. *Mol.Biotechnol.*, 25:1, 53-61
311. **Shimoyama, T.; Fukuda, S.; Liu, Q.; Nakaji, S.; Fukuda, Y.; Sugawara, K.,** 2003. *Helicobacter pylori* water soluble surface proteins prime human neutrophils for enhanced production of reactive oxygen species and stimulate chemokine production. *J Clin Pathol.*, 56:5, 348-351
312. **Shiratsuchi, A.; Watanabe, I.; Takeuchi, O.; Akira, S.; Nakanishi, Y.,** 2004. Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages. *J Immunol*, 172:4, 2039-2047
313. **Sjunnesson, H.; Sturegard, E.; Hynes, S.; Willen, R.; Feinstein, R.; Wadstrom, T.,** 2003. Five month persistence of *Helicobacter pylori* infection in guinea pigs. *APMIS*, 111:6, 634-642
314. **Slater, E.; Owen, R. J.; Williams, M.; Pounder, R. E.,** 1999. Conservation of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*: associations with vacuolating cytotoxin allele and IS605 diversity. *Gastroenterology*, 117:6, 1308-1315

315. **Smith, M. F., Jr.; Mitchell, A.; Li, G.; Ding, S.; Fitzmaurice, A. M.; Ryan, K.; Crowe, S.; Goldberg, J. B.,** 2003. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol.Chem.*, 278:35, 32552-32560
316. **Smithwick, L. A.; Smith, A.; Quensen, J. F., III; Stack, A.; London, L.; Morris, P. J.,** 2003. Inhibition of LPS-induced splenocyte proliferation by ortho-substituted polychlorinated biphenyl congeners. *Toxicology*, 188:2-3, 319-333
317. **Smoot, D. T.,** 1997. How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? Direct mechanisms. *Gastroenterology*, 113:6 Suppl, S31-S34
318. **Smythies, L. E.; Waites, K. B.; Lindsey, J. R.; Harris, P. R.; Ghiara, P.; Smith, P. D.,** 2000. *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN-gamma, gene-deficient mice. *J Immunol*, 165:2, 1022-1029
319. **Solnick, J. V.; Chang, K.; Canfield, D. R.; Parsonnet, J.,** 2003. Natural acquisition of *Helicobacter pylori* infection in newborn rhesus macaques. *J Clin Microbiol.*, 41:12, 5511-5516
320. **Sommer, F.; Faller, G.; Konturek, P.; Kirchner, T.; Hahn, E. G.; Zeus, J.; Rollinghoff, M.; Lohoff, M.,** 1998. Antrum- and corpus mucosa-infiltrating CD4(+) lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis display a Th1 phenotype. *Infect Immun.*, 66:11, 5543-5546
321. **Sospedra, M.; Pinilla, C.; Martin, R.,** 2003. Use of combinatorial peptide libraries for T-cell epitope mapping. *Methods*, 29:3, 236-247
322. **Spohn, G.; Danielli, A.; Roncarati, D.; Delany, I.; Rappuoli, R.; Scarlato, V.,** 2004. Dual control of *Helicobacter pylori* heat shock gene transcription by HspR and HrcA. *J Bacteriol.*, 186:10, 2956-2965
323. **Spohn, G.; Delany, I.; Rappuoli, R.; Scarlato, V.,** 2002. Characterization of the HspR-mediated stress response in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.*, 184:11, 2925-2930
324. **Spohn, G. und Scarlato, V.,** 1999. The autoregulatory HspR repressor protein governs chaperone gene transcription in *Helicobacter pylori*. *Mol.Microbiol.*, 34:4, 663-674

325. **Stanley, J.; Linton, D.; Burnens, A. P.; Dewhirst, F. E.; On, S. L.; Porter, A.; Owen, R. J.; Costas, M.**, 1994. Helicobacter pullorum sp. nov.-genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. *Microbiology*, 140:Pt 12, 3441-3449
326. **Stassi, G.; Arena, A.; Speranza, A.; Iannello, D.; Mastroeni, P.**, 2002. Different modulation by live or killed Helicobacter pylori on cytokine production from peripheral blood mononuclear cells. *New Microbiol.*, 25:2, 247-252
327. **Stassi, G.; Arena, A.; Speranza, A.; Iannello, D.; Miceli, M.; Mastroeni, P.**, 2003. Treatment of PBMC with killed Helicobacter pylori subverts the environment of inflammatory cytokines. *New Microbiol.*, 26:2, 227-231
328. **Stenstrom, C. M.; Jin, H.; Major, L. L.; Tate, W. P.; Isaksson, L. A.**, 2001. Codon bias at the 3'-side of the initiation codon is correlated with translation initiation efficiency in Escherichia coli. *Gene*, 263:1-2, 273-284
329. **Su, B.; Ceponis, P. J.; Sherman, P. M.**, 2003. Cytoskeletal rearrangements in gastric epithelial cells in response to Helicobacter pylori infection. *J Med.Microbiol.*, 52:Pt 10, 861-867
330. **Subramanian, S.; Andal, S.; Karande, A. A.; Radhakantha, A. P.**, 2003. Epitope mapping and evaluation of specificity of T-helper sites in four major antigenic peptides of chicken riboflavin carrier protein in outbred rats. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 311:1, 11-16
331. **Suerbaum, S. und Michetti, P.**, 2002. Helicobacter pylori infection. *N.Engl.J Med.*, 347:15, 1175-1186
332. **Suerbaum, S.; Smith, J. M.; Bapumia, K.; Morelli, G.; Smith, N. H.; Kunstmann, E.; Dyrek, I.; Achtman, M.**, 1998. Free recombination within Helicobacter pylori. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95:21, 12619-12624
333. **Sun, Y. Q.; Soderholm, J. D.; Petersson, F.; Borch, K.**, 2004. Long-standing gastric mucosal barrier dysfunction in Helicobacter pylori-induced gastritis in mongolian gerbils. *Helicobacter*, 9:3, 217-227
334. **Sutton, P.; O'Rourke, J.; Wilson, J.; Dixon, M. F.; Lee, A.**, 2004. Immunisation against Helicobacter felis infection protects against the development of gastric MALT Lymphoma. *Vaccine*, 22:20, 2541-2546
335. **Suzuki, M.; Hisamatsu, T.; Podolsky, D. K.**, 2003. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in

- human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infect Immun.*, 71:6, 3503-3511
336. **Szabo, I.; Brutsche, S.; Tombola, F.; Moschioni, M.; Satin, B.; Telford, J. L.; Rappuoli, R.; Montecucco, C.; Papini, E.; Zoratti, M.**, 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*, 18:20, 5517-5527
337. **Takabayashi, F.; Harada, N.; Yamada, M.; Murohisa, B.; Oguni, I.**, 2004. Inhibitory effect of green tea catechins in combination with sucralfate on *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J Gastroenterol.*, 39:1, 61-63
338. **Takashima, M.; Furuta, T.; Hanai, H.; Sugimura, H.; Kaneko, E.**, 2001. Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils. *Gut*, 48:6, 765-773
339. **Takata, T.; Aras, R.; Tavakoli, D.; Ando, T.; Olivares, A. Z.; Blaser, M. J.**, 2002. Phenotypic and genotypic variation in methylases involved in type II restriction-modification systems in *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res.*, 30:11, 2444-2452
340. **Tao, R.; Fang, P. C.; Liu, H. Y.; Jiang, Y. S.; Chen, J.**, 2004. A new subtype of 3' region of *cagA* gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from Zhejiang Province in China. *World J Gastroenterol.*, 10:22, 3284-3288
341. **Tatematsu, M.; Nozaki, K.; Tsukamoto, T.**, 2003. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinogenesis in animal models. *Gastric.Cancer*, 6:1, 1-7
342. **Taylor, D. E.; Eaton, M.; Chang, N.; Salama, S. M.**, 1992. Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. *J Bacteriol.*, 174:21, 6800-6806
343. **Tindberg, Y.; Bengtsson, C.; Granath, F.; Blennow, M.; Nyren, O.; Granstrom, M.**, 2001. *Helicobacter pylori* infection in Swedish school children: lack of evidence of child-to-child transmission outside the family. *Gastroenterology*, 121:2, 310-316
344. **Tiwari, R.; Geliebter, J.; Lucchese, A.; Mittelman, A.; Kanduc, D.**, 2004. Computational peptide dissection of Melan-a/MART-1 oncoprotein antigenicity. *Peptides*, 25:11, 1865-1871

345. **Tolfvenstam, T.; Lundqvist, A.; Levi, M.; Wahren, B.; Broliden, K.**, 2000. Mapping of B-cell epitopes on human parvovirus B19 non-structural and structural proteins. *Vaccine*, 19:7-8, 758-763
346. **Tomb, J. F.; White, O.; Kerlavage, A. R.; Clayton, R. A.; Sutton, G. G.; Fleischmann, R. D.; Ketchum, K. A.; Klenk, H. P.; Gill, S.; Dougherty, B. A.; Nelson, K.; Quackenbush, J.; Zhou, L.; Kirkness, E. F.; Peterson, S.; Loftus, B.; Richardson, D.; Dodson, R.; Khalak, H. G. et al.**, 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388:6642, 539-547
347. **Tomita, T.; Jackson, A. M.; Hida, N.; Hayat, M.; Dixon, M. F.; Shimoyama, T.; Axon, A. T.; Robinson, P. A.; Crabtree, J. E.**, 2001. Expression of Interleukin-18, a Th1 cytokine, in human gastric mucosa is increased in *Helicobacter pylori* infection. *J Infect Dis*, 183:4, 620-627
348. **Tonello, F.; Dundon, W. G.; Satin, B.; Molinari, M.; Tognon, G.; Grandi, G.; Del Giudice, G.; Rappuoli, R.; Montecucco, C.**, 1999. The *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein is an iron-binding protein with dodecameric structure. *Mol.Microbiol.*, 34:2, 238-246
349. **Tracey, K. J. und Abraham, E.**, 1999. From mouse to man: or what have we learned about cytokine-based anti-inflammatory therapies? *Shock*, 11:3, 224-225
350. **Tsan, M. F. und Gao, B.**, 2004a. Cytokine function of heat shock proteins. *Am.J Physiol Cell Physiol*, 286:4, C739-C744
351. **Tsan, M. F. und Gao, B.**, 2004b. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc.Biol.*, 76:3, 514-519
352. **Uronen-Hansson, H.; Allen, J.; Osman, M.; Squires, G.; Klein, N.; Callard, R. E.**, 2004. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 are present inside human dendritic cells, associated with microtubules and the Golgi apparatus but are not detectable on the cell surface: integrity of microtubules is required for interleukin-12 production in response to internalized bacteria. *Immunology*, 111:2, 173-178
353. **Vaidyanathan, H.; Zhou, Y.; Petro, T. M.; Schwartzbach, S. D.**, 2003. Intracellular localization of the p35 subunit of murine IL-12. *Cytokine*, 21:3, 120-128

354. **van der Geld, Y. M.; Stegeman, C. A.; Kallenberg, C. G.**, 2004. B cell epitope specificity in ANCA-associated vasculitis: does it matter? *Clin Exp.Immunol*, 137:3, 451-459
355. **van Vliet, A. H.; Kuipers, E. J.; Stoof, J.; Poppelaars, S. W.; Kusters, J. G.**, 2004. Acid-responsive gene induction of ammonia-producing enzymes in *Helicobacter pylori* is mediated via a metal-responsive repressor cascade. *Infect Immun.*, 72:2, 766-773
356. **van Vliet, A. H.; Stoof, J.; Vlasblom, R.; Wainwright, S. A.; Hughes, N. J.; Kelly, D. J.; Bereswill, S.; Bijlsma, J. J.; Hoogenboezem, T.; Vandembroucke-Grauls, C. M.; Kist, M.; Kuipers, E. J.; Kusters, J. G.**, 2002. The role of the Ferric Uptake Regulator (Fur) in regulation of *Helicobacter pylori* iron uptake. *Helicobacter*, 7:4, 237-244
357. **Vandenbroeck, K.; Alloza, I.; Gadina, M.; Matthys, P.**, 2004. Inhibiting cytokines of the interleukin-12 family: recent advances and novel challenges. *J Pharm.Pharmacol.* , 56:2, 145-160
358. **Veeraraghavan, S.; Renzoni, E. A.; Jeal, H.; Jones, M.; Hammer, J.; Wells, A. U.; Black, C. M.; Welsh, K. I.; du Bois, R. M.**, 2004. Mapping of the immunodominant T cell epitopes of the protein topoisomerase I. *Ann.Rheum.Dis*, 63:8, 982-987
359. **Verthelyi, D. und Klinman, D. M.**, 2003. Immunoregulatory activity of CpG oligonucleotides in humans and nonhuman primates. *Clin Immunol*, 109:1, 64-71
360. **Viala, J.; Chaput, C.; Boneca, I. G.; Cardona, A.; Girardin, S. E.; Moran, A. P.; Athman, R.; Memet, S.; Huerre, M. R.; Coyle, A. J.; Distefano, P. S.; Sansonetti, P. J.; Labigne, A.; Bertin, J.; Philpott, D. J.; Ferrero, R. L.**, 2004. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat.Immunol*, 5:11, 1166-1174
361. **Vinion-Dubiel, A. D.; McClain, M. S.; Cao, P.; Mernaugh, R. L.; Cover, T. L.**, 2001. Antigenic diversity among *Helicobacter pylori* vacuolating toxins. *Infect Immun.*, 69:7, 4329-4336
362. **Viudes, A.; Perea, S.; Lopez-Ribot, J. L.**, 2001. Identification of continuous B-cell epitopes on the protein moiety of the 58-kiloDalton cell wall mannoprotein of *Candida albicans* belonging to a family of immunodominant fungal antigens. *Infect Immun.*, 69:5, 2909-2919

363. **Von Stebut, E. und Udey, M. C.**, 2004. Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect*, 6:12, 1102-1109
364. **Wang, Y. Q.; Ugai, S.; Shimozato, O.; Yu, L.; Kawamura, K.; Yamamoto, H.; Yamaguchi, T.; Saisho, H.; Tagawa, M.**, 2003. Induction of systemic immunity by expression of interleukin-23 in murine colon carcinoma cells. *Int.J Cancer*, %20;105:6, 820-824
365. **Weeks, D. L.; Eskandari, S.; Scott, D. R.; Sachs, G.**, 2000. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*, 287:5452, 482-485
366. **Weeratna, R. D.; McCluskie, M. J.; Xu, Y.; Davis, H. L.**, 2000. CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine*, 18:17, 1755-1762
367. **Wirth, H. P.; Beins, M. H.; Yang, M.; Tham, K. T.; Blaser, M. J.**, 1998. Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant *Helicobacter pylori* strains. *Infect Immun.*, 66:10, 4856-4866
368. **Wirth, H. P.; Yang, M.; Peek, R. M., Jr.; Hook-Nikanne, J.; Fried, M.; Blaser, M. J.**, 1999. Phenotypic diversity in Lewis expression of *Helicobacter pylori* isolates from the same host. *J Lab Clin Med.*, 133:5, 488-500
369. **Wotherspoon, A. C.**, 1998. Gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue and *Helicobacter pylori*. *Annu.Rev.Med.*, 49:289-99.: 289-299
370. **Wu, B.; Zhang, Y.; Zheng, R.; Guo, C.; Wang, P. G.**, 2002. Bifunctional phosphomannose isomerase/GDP-D-mannose pyrophosphorylase is the point of control for GDP-D-mannose biosynthesis in *Helicobacter pylori*. *FEBS Lett.*, 519:1-3, 87-92
371. **Wu, J.; Sun, C. C.; Fanchiang, J. H.**, 1999. T-cell epitope mapping performed after patch testing in a patient with contact allergy to several azo dyes. *Br.J Dermatol.* , 141:2, 359-360
372. **Wyle, F. A.; Tarnawski, A.; Schulman, D.; Dabros, W.**, 1990. Evidence for gastric mucosal cell invasion by *C. pylori*: an ultrastructural study. *J Clin Gastroenterol.*, 12 Suppl 1:S92-8.: S92-S98
373. **Xia, H. H.; Lam, S. K.; Huang, X. R.; Wong, W. M.; Leung, S. Y.; Yuen, S. T.; Lan, H. Y.; Wong, B. C.**, 2004. *Helicobacter pylori* infection is associated

- with increased expression of macrophage migratory inhibitory factor--by epithelial cells, T cells, and macrophages--in gastric mucosa. *J Infect Dis*, 190:2, 293-302
374. **Xiang, Z.; Censini, S.; Bayeli, P. F.; Telford, J. L.; Figura, N.; Rappuoli, R.; Covacci, A.**, 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.*, 63:1, 94-98
375. **Yamaguchi, H.; Osaki, T.; Kai, M.; Taguchi, H.; Kamiya, S.**, 2000. Immune response against a cross-reactive epitope on the heat shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.*, 68:6, 3448-3454
376. **Yamaguchi, H.; Osaki, T.; Kurihara, N.; Taguchi, H.; Kamiya, S.**, 1999. Reactivity of monoclonal antibody to HSP60 homologue of *Helicobacter pylori* with human gastric epithelial cells and induction of IL-8 from these cells by purified *H. pylori* HSP60. *J Gastroenterol.*, 34 Suppl 11:1-5.: 1-5
377. **Yamaoka, Y.; Kikuchi, S.; El Zimaity, H. M.; Gutierrez, O.; Osato, M. S.; Graham, D. Y.**, 2002a. Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology*, 123:2, 414-424
378. **Yamaoka, Y.; Kita, M.; Kodama, T.; Imamura, S.; Ohno, T.; Sawai, N.; Ishimaru, A.; Imanishi, J.; Graham, D. Y.**, 2002b. *Helicobacter pylori* infection in mice: Role of outer membrane proteins in colonization and inflammation. *Gastroenterology*, 123:6, 1992-2004
379. **Yamaoka, Y.; Kwon, D. H.; Graham, D. Y.**, 2000. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 97:13, 7533-7538
380. **Yan, J.; Kumagai, T.; Ohnishi, M.; Ueno, I.; Ota, H.**, 2001. Immune response to a 26-kDa protein, alkyl hydroperoxide reductase, in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbil model. *Helicobacter*, 6:4, 274-282
381. **Yan, J.; Luo, Y. H.; Mao, Y. F.**, 2004. Establishment of *Helicobacter pylori* infection model in Mongolian gerbils. *World J Gastroenterol.*, 10:6, 852-855

382. **Yeo, H. J.; Savvides, S. N.; Herr, A. B.; Lanka, E.; Waksman, G.,** 2000. Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the Helicobacter pylori type IV secretion system. *Mol.Cell*, 6:6, 1461-1472
383. **Yeo, M.; Park, H. K.; Kim, D. K.; Cho, S. W.; Kim, Y. S.; Cho, S. Y.; Paik, Y. K.; Hahm, K. B.,** 2004. Restoration of heat shock protein70 suppresses gastric mucosal inducible nitric oxide synthase expression induced by Helicobacter pylori. *Proteomics.*, %20;.:
384. **Yoshida, M.; Wakatsuki, Y.; Kobayashi, Y.; Itoh, T.; Murakami, K.; Mizoguchi, A.; Usui, T.; Chiba, T.; Kita, T.,** 1999. Cloning and characterization of a novel membrane-associated antigenic protein of Helicobacter pylori. *Infect Immun.*, 67:1, 286-293
385. **Zabaleta, J.; McGee, D. J.; Zea, A. H.; Hernandez, C. P.; Rodriguez, P. C.; Sierra, R. A.; Correa, P.; Ochoa, A. C.,** 2004. Helicobacter pylori arginase inhibits T cell proliferation and reduces the expression of the TCR zeta-chain (CD3zeta). *J Immunol*, 173:1, 586-593
386. **Zambon, C. F.; Navaglia, F.; Basso, D.; Rugge, M.; Plebani, M.,** 2003. Helicobacter pylori babA2, cagA, and s1 vacA genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *J Clin Pathol.*, 56:4, 287-291
387. **Zanotti, G.; Papinutto, E.; Dundon, W.; Battistutta, R.; Seveso, M.; Giudice, G.; Rappuoli, R.; Montecucco, C.,** 2002. Structure of the neutrophil-activating protein from Helicobacter pylori. *J Mol.Biol.*, 323:1, 125-130
388. **Zediak, V. P. und Hunter, C. A.,** 2003. IL-10 fails to inhibit the production of IL-18 in response to inflammatory stimuli. *Cytokine*, 21:2, 84-90
389. **Zheng, Q.; Chen, X. Y.; Shi, Y.; Xiao, S. D.,** 2004. Development of gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils after long-term infection with Helicobacter pylori. *J Gastroenterol.Hepatol.*, 19:10, 1192-1198
390. **Zhou, H. R.; Islam, Z.; Pestka, J. J.,** 2003. Kinetics of lipopolysaccharide-induced transcription factor activation/inactivation and relation to proinflammatory gene expression in the murine spleen. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 187:3, 147-161

8 Danksagung

Diese Arbeit wurde von Juni 2001 bis Dezember 2004 am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg angefertigt.

Danken möchte ich Prof. Dr. Norbert Lehn für die fortwährende Betreuung und die Möglichkeit, die Arbeit eigenständig planen und unter hervorragenden Bedingungen durchführen zu können.

Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer danke ich für die bereitwillige Vertretung der Arbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.

Dr. Wulf Schneider danke ich für die intensive und fachlich hervorragende Betreuung meiner Arbeit im Rahmen des Teilprojekts B3 des SFB 585 „Regulation der Immunfunktionen in Verdauungstrakt“.

Dr. Jochen Decker und Dr. Ludwig Deml danke ich für die „Entdeckung“ von HcpA und die intensive Einarbeitung in dieses Thema, sowie fachlich kompetente Beratung und Hilfestellungen.

Danken möchte ich ebenfalls Dr. Gertrud Knoll, Dr. Katharina Kranzer, Dr. Ulrike Thalmaier, Stefanie Denk, Regine Birngruber, Christine Irtenkauf, Maria Kurz, Ines Tschertner, Alexander Eckhardt, Martin Ehrenschwender, Thomas Holzmann, Alexander Lehn, Oliver Merkel und Andreas Neumayr für die sehr angenehme Labor-Atmosphäre und die geleisteten praktischen Hilfestellungen.

Christian Schütz danke ich für praktische Hilfe bei der Durchführung der Stressexperimente.

Christian Gerdes danke ich für seine Unterstützung bei der Aufreinigung von HcpA.

Peter Neumann und Tom Grundler danke ich für die Herstellung der Medien.

Außer den Genannten danke ich allen in irgendeiner Form an dieser Arbeit beteiligten Personen, insbesondere allen Mitgliedern des Instituts, die für ein entspanntes und angenehmes Arbeitsklima sorgten.

Besonders danken möchte ich den Teilnehmern des „Instituts-Billard“: Jochen Decker, Alexander Lehn, Michael Liss, Oliver Merkel, Andreas Neumayr, Frank Notka, Uwe Starflinger und Andreas Weiß.

Last, but not least bedanke ich mich bei Stefanie Kandler für die Geduld, die sie mit mir hatte und hat.