

Identifizierung des Rezeptors und Charakterisierung der
Aufnahme des vakuolisierenden Cytotoxins VacA von
Helicobacter pylori in T-Zellen

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilian-Universität München
– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von
Xaver Sewald

Mai 2008

Dissertation eingereicht am: 29.05.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 08.09.2008

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Jung

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Boshart

Teile dieser Arbeit sind oder werden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Sewald X., Gebert-Vogl B., Prassl S., Barwig I., Weiss E., Fabbri M., Osicka R., Schiemann M., Busch D., Semmrich M., Holzmann B., Sebo P., R. Haas. 2008. Integrin Subunit CD18 is the T-Lymphocyte Receptor for the *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin. *Cell Host & Microbe* 3: 20-29.

Sewald X., Fischer W., R. Haas. 2008. Sticky Socks: *Helicobacter pylori* VacA takes shape. *Trends in Microbiology* 3: 89-92

Sewald X., Jiménez-Soto L.F., R. Haas. Mechanism of Endocytosis of the *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin VacA in primary T-Lymphocytes. (In Vorbereitung).

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

Tuo B., Wen G., Sewald X., Gebert-Vogl B., Haas R., Manns M., U. Seidler. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits duodenal bicarbonate secretion by a histamine-dependent mechanism. *Journal of Infectious Diseases*. (in Revision).

Jiménez-Soto L.F., Sewald X., Kutter S., Ertl C., Weiss E., Pattis I., Rohde M., Fischer W., R. Haas. *Helicobacter pylori* CagA binds Integrin for Interleukin-8 Induction and CagA Translocation. (Eingereicht).

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. <i>Helicobacter pylori</i> Epidemiologie und Infektion.....	1
1.2. Die Immunantwort bei der Infektion mit <i>H. pylori</i>	3
1.3. Virulenzfaktoren von <i>H. pylori</i>	4
1.4. VacA als multifunktionales Toxin	10
1.5. Immunsuppression durch VacA.....	12
1.6. Interaktion von VacA mit eukaryontischen Zellen.....	13
1.7. Ziel der Arbeit.....	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Material.....	16
2.1.1. Zelllinien.....	16
2.1.2. Bakterienstämme.....	16
2.1.3. Plasmide	16
2.1.4. Antikörper.....	17
2.1.4.1. Primäre Antikörper.....	17
2.1.4.2. Sekundäre Antikörper.....	17
2.1.5. Zellkulturmedien und -puffer	17
2.1.6. Chemikalien und Reagenzien	18
2.1.7. Proteine und Enzyme	18
2.1.8. Inhibitoren	18
2.1.8.1. Peptid-Inhibitoren	18

2.1.8.2. Chemische Inhibitoren.....	19
2.1.9. Molekulargewichtsmarker	20
2.1.10. Hilfsmittel.....	20
2.1.11. Apparaturen und Geräte	20
2.2. Methoden	21
2.2.1. Arbeiten mit Bakterien.....	21
2.2.1.1. Kultur von Bakterien.....	21
2.2.1.2. Herstellung chemisch-kompetenter Zellen (85).....	21
2.2.1.3. Transformation chemisch-kompetenter Zellen.....	22
2.2.1.4. Transformation von <i>E. coli</i> Top10-Zellen.....	22
2.2.2. Arbeiten mit DNA.....	22
2.2.2.1. DNA-Gelelektrophorese.....	22
2.2.2.2. Restriktion.....	23
2.2.2.3. Isolierung von Plasmid-DNA mit Qiagen-Säulen.....	23
2.2.3. Arbeiten mit Protein.....	23
2.2.3.1. Proteinbestimmung nach Bradford.....	23
2.2.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	23
2.2.3.3. Reversible Färbung von Proteinen mit Silbernitrat.....	24
2.2.3.4. Transfer von Proteinen auf Membran	24
2.2.3.5. Detektion von Proteinen mittels Antikörper.....	25
2.2.3.6. Aufkonzentrierung von Bakterien-Kulturüberständen.....	25
2.2.3.7. Anreicherung von <i>VacA</i> aus <i>H. pylori</i> Kulturüberstand	25
2.2.3.8. Markierung von <i>VacA</i> und Antikörpern	26
2.2.3.9. Membranpräparation	27
2.2.3.10. Präzipitation von <i>VacA</i> -Biotin	27
2.2.3.11. Kopplung von Antikörper an Latexkugeln.....	27

2.2.4. Arbeiten mit Zellen	28
2.2.4.1. Kultur von HeLa Zellen.....	28
2.2.4.2. Kultur von Jurkat, Raji und EL4 Zellen	28
2.2.4.3. Aufreinigung peripherer Blutlymphozyten (PBLC) und humaner CD4 ⁺ T-Lymphozyten	28
2.2.4.4. Isolation von CD4 ⁺ T-Zellen aus der Milz von Mäusen	29
2.2.4.5. <i>In vitro</i> -Generierung dendritischen Zellen	29
2.2.4.6. Co-Kultivierung von T-Zellen und Antigen-präsentierender Zellen (APC)	30
2.2.4.7. Generierung humaner LFA-1- und Mac-1-exprimierender EL4 T-Zellen.....	30
2.2.4.8. Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer.....	30
2.2.4.9. Transfektion von Jurkat T-Zellen.....	31
2.2.4.10. Transfektion primärer CD4 ⁺ T-Lymphozyten	31
2.2.4.11. Transfektion von HeLa Zellen	31
2.2.4.12. Mikroskopie	31
2.2.4.13. Messung der Luciferase Aktivität	32
2.2.4.14. Adhäsion von CD4 ⁺ T-Lymphozyten.....	32
2.2.4.15. Messung der IL-2-Produktion von T-Zellen mittels „sandwich“-ELISA	33
2.2.4.16. Quantifizierung der VacA-induzierten Vakuolisierung	33
2.2.4.17. Quantifizierung der VacA-Aufnahme	33
2.2.4.18. Quantifizierung der VacA-Bindung an Zellen.....	34
2.2.4.19. Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeit von CD4 ⁺ T-Zellen	34
2.2.4.20. Statistische Auswertung	35
3. Ergebnisse.....	36
3.1. Anreicherung von VacA aus Kulturüberstand und Modifizierung.....	36
3.1.1. Chromatographische Auftrennung von VacA mit Gelfiltration	36

3.1.2.	Kovalente Markierung von VacA	38
3.2.	Identifizierung des VacA-Rezeptors von Lymphozyten.....	39
3.2.1.	Sensitivität aktivierter T-Lymphozyten gegen VacA	39
3.2.2.	VacA-Aufnahme in aktivierte T-Lymphozyten.....	40
3.2.3.	Lokalisation von VacA am Uropodium polarisierter T-Zellen	42
3.2.4.	Co-Lokalisation von VacA mit LFA-1	44
3.2.5.	Aufnahme von VacA und LFA-1	46
3.2.6.	Direkte Interaktion von VacA und CD18.....	47
3.2.7.	Einfluß von VacA auf die LFA-1-Funktionalität.....	48
3.2.8.	LFA-1 ist essentiell für VacA-induzierte Vakuolisierung und IL-2-Hemmung	51
3.2.9.	LFA-1 als VacA-Rezeptor auf Immunzellen.....	53
3.3.	Interaktion von VacA und murinen T-Zellen	55
3.3.1.	Resistenz muriner CD4 ⁺ T-Lymphozyten gegen VacA	55
3.3.1.1.	Bindung und Aufnahme von VacA bei murinen T-Zellen.....	55
3.3.1.2.	Wirkung von VacA auf die IL-2-Expression und Vakuolisierung muriner T-Zellen	57
3.3.2.	Sensitivität <i>humanisierter</i> , muriner T-Zellen gegenüber VacA	58
3.3.2.1.	Expression humaner β_2 -Integrine in murinen T-Zellen.....	58
3.3.2.2.	VacA-induzierte Vakuolisierung in <i>humanisierten</i> , murinen EL4 T-Zellen.....	59
3.3.2.3.	Interaktion von VacA mit <i>humanisierten</i> , murinen T-Zellen.....	60
3.4.	Aufnahmemechanismus von VacA in T-Lymphozyten.....	62
3.4.1.	Bindung von VacA an primäre CD4 ⁺ T-Zellen	62
3.4.1.1.	Rolle der Oligomerisierung und Cholesterin-reicher Membrandomänen	63
3.4.1.2.	Bindung von VacA an Oligosaccharide	64
3.4.2.	VacA-Aufnahme in primäre CD4 ⁺ T-Lymphozyten.....	67
3.4.2.1.	Art der T-Zell-Aktivierung und Aufnahme von VacA	67

3.4.2.2.	Rolle des Aktin Zytoskeletts bei der VacA-Aufnahme	69
3.4.2.3.	Clathrin-unabhängige Aufnahme von VacA	70
3.4.2.4.	Zelluläre Enzyme und die VacA-Aufnahme in T-Zellen	72
3.4.2.5.	Rolle der PKC-Isoformen bei der Aufnahme von VacA.....	73
3.4.2.6.	Funktion kleiner GTPasen der Rho-Familie	75
3.5.	Zelluläre Lokalisation und Transport von VacA	77
3.5.1.	Vergleich der VacA-Verteilung in HeLa Zellen und T-Lymphozyten.....	77
3.5.2.	Lokalisation von VacA bei Kontakt von T-Lymphozyten mit APC	81
4. Diskussion.....		85
4.1.	CD18 ist der VacA-Rezeptor von Leukozyten	85
4.2.	Die Rolle von Oligosacchariden und des Co-Rezeptors für VacA.....	87
4.3.	VacA-Resistenz muriner T-Zellen durch Spezies-spezifische Interaktion	91
4.4.	Sensitivität stimulierter T-Lymphozyten gegenüber VacA.....	92
4.5.	Lokalisation von VacA am Uropodium und die Rolle von „lipid rafts“	93
4.6.	Aufnahmemechanismus von VacA in primären T-Lymphozyten.....	95
4.7.	Die Rolle der Protein Kinase C-Familie bei der VacA-Aufnahme	97
4.8.	Die Beteiligung der Rho-Familie GTPasen an der Aufnahme von VacA	100
4.9.	Lokalisation und Transport von VacA in CD4 ⁺ T-Zellen.....	102
4.10.	VacA und die Interaktion von T-Zellen mit APC.....	104
5. Zusammenfassung.....		106
6. Literaturverzeichnis.....		108
7. Abkürzungsverzeichnis.....		126

1. Einleitung

1.1. Helicobacter pylori Epidemiologie und Infektion

Im Jahr 2005 wurden Robin Warren und Barry Marshall für die Entdeckung und Isolierung von *Helicobacter pylori* aus der Magenmukosa von Patienten mit aktiver chronischer Gastritis (117) mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet. Die Entdeckung eines Bakteriums als Ursache für Magengeschwüre, chronischer atrophischer Gastritis, bis hin zu Magenkarzinomen hatte ein grundlegendes Umdenken bei der Diagnose und medizinischen Behandlung von Magenerkrankungen zur Folge. Ein weiterer Bruch mit einem klassischen Modell war die Erkenntnis, dass der Magen kein steriles Organ darstellt, sondern der Lebensraum eines spezifisch daran angepassten Bakteriums ist. Dabei ist der menschliche Magen die einzige ökologische Nische von *H. pylori*, was *H. pylori* von anderen Bakterien wie *Mycobacterium tuberculosis* und *Salmonella typhimurium*, die ebenso über einen langen Zeitraum im Menschen überdauern können, unterscheidet (131). *H. pylori*, ein Gram-negatives, spiral gewundenes und polar begeißeltes Bakterium, besiedelt schon seit mindestens 60 000 Jahren den Menschen und seine Vorfahren (66, 111). Obwohl man *H. pylori* aufgrund dieser langen Co-Evolution zwischen Mensch und Bakterium als Kommensalen betrachten kann, führt die Infektion mit *H. pylori* häufig zu chronischen Entzündungen, die jedoch meist unbemerkt bleiben. Eine Infektion mit *H. pylori* kann dabei auch positive Effekte haben und stellt(e) in der langen gemeinsamen Vergangenheit von *H. pylori* und Mensch möglicherweise einen Selektionsvorteil für den Mensch dar. Dazu zählt ein geringeres Risiko für Gastroösophageale Refluxerkrankung (GERD) sowie für die Konsequenz Speiseröhrenkrebs. Dies wird auf eine verminderte Säureproduktion zurückgeführt (207).

Weltweit sind ~50% der Menschen mit *H. pylori* kolonisiert, wobei die Prävalenz in verschiedenen Ländern und Populationsgruppen variiert und stark von sozioökonomischen Faktoren bestimmt wird. Die Infektionsrate liegt in den Entwicklungsländern bei 70-90%, wohingegen nur 20-50% der Menschen der Industrienationen von *H. pylori* besiedelt sind (52). Die Übertragung erfolgt vermutlich innerhalb der Familie. Ein oral-oral und fäkal-oraler Übertragungsweg von *H. pylori* konnte gezeigt werden, wobei die Infektion meist im Kindesalter von der Mutter auf das Kind erfolgt (52). Die Infektion mit *H. pylori* führt zu einer chronischen Entzündung der Magenschleimhaut die in 90% der Fälle symptomlos verläuft. Nur 15-20% der infizierten Personen entwickeln aufgrund dieser chronischen Entzündung Folgeerkrankungen wie chronische atrophische Gastritis, Magen- und

Zwölffingerdarmgeschwüre, Magenkarzinom, oder ein „mucosa associated lymphoid tissue“ (MALT)-Lymphom (14). Der Übergang einer chronischen *H. pylori*-induzierten Entzündung zu schwereren Krankheitsbildern wie Gastritis oder gar Krebs zeigt sich dabei erst nach Jahrzehnten. Schätzungen gehen davon aus, dass *H. pylori* für 5,5% aller menschlichen Krebsfälle verantwortlich ist. Dies entspricht 592 000 Fällen von Magenkrebs im Jahr 2002 (151), so dass *H. pylori* von der WHO als Karzinogen der Klasse I eingestuft wurde (113).

Bei der Entstehung von *H. pylori*-induzierten Adenokarzinomen spielen Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori*, sowie genetische Faktoren des Wirtes eine Rolle. Entsprechend morphologischer Veränderungen der Magenmukosa lassen sich charakteristische Ereignisse bei der Ausbildung von Karzinomen unterscheiden (30). Zu Beginn einer Infektion mit *H. pylori* kommt es zu einer oberflächlichen, chronischen Entzündung. Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori* wie die *cag*-Pathogenitätsinsel (-PAI) mit dem translozierten Protein Cytotoxin assoziiertes Gen A (CagA), das Vakuolisierende Cytotoxin VacA, sowie das Adhäsion BabA sind dabei signifikant mit der Ausbildung einer atrophischen Gastritis verknüpft. Neben den erwähnten bakteriellen Faktoren spielen genetische Determinanten des Wirtes bei Entstehung und Fortschreiten der Krankheit eine Rolle. Besitzt der Wirt Interleukin (IL)-1 β -Allele, die eine übermäßige IL-1 β Zytokin-Produktion fördern, ist die Entzündungsreaktion stärker und dadurch die Wahrscheinlichkeit einer atrophischen Gastritis erhöht (60). Im weiteren Verlauf der chronischen Entzündung kommt es zu intestinalen Metaplasien und Dysplasie. Die beiden morphologischen Veränderungen der Magenmukosa zeichnen sich durch ein Auflösen der Epithelgrenzen, Verlust von Drüsen und säureproduzierender Parietalzellen sowie Infiltration von Immunzellen der Submukosa aus. Dies geht der Bildung von Adenokarzinomen voraus (30). Allein die Veränderungen der Magenmukosa aufgrund atrophischer Gastritis erhöhen die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von Adenokarzinomen um den Faktor 90 (186). Auch hier findet sich eine signifikante Assoziation der Pathogenitätsfaktoren *cag*-PAI, VacA und BabA mit Adenokarzinomen.

Obwohl es über den gesamten Magen zu Entzündungsreaktionen kommt, zeigen epidemiologische Studien, dass die Kolonisierung mit *H. pylori* vor allem zur Ausbildung von distal gelegenen Adenokarzinomen führt (8). Dabei bestimmt die Lokalisierung der *H. pylori*-induzierten Gastritis im Magen den klinischen Verlauf. Im Fall der Antrum-dominierten Gastritis, wie sie 15% der infizierten Personen vor allem in westlichen Ländern entwickeln, kommt es kaum zur Entstehung von Adenokarzinomen. Ist die Gastritis eher Korpus-lokalisiert, entwickeln 1% der infizierten Personen Adenokarzinome. Dieser Typ der Gastritis

zeichnet sich durch geringe Säureproduktion mit multifokaler Atrophie, d.h. dem Verlust von Schleimhautdrüsen, aus und ist vor allem in Asien verbreitet.

1.2. Die Immunantwort bei der Infektion mit *H. pylori*

Die Infektion von *H. pylori* hat eine umfassende Immunantwort, sowohl des angeborenen als auch erworbenen Immunsystems, zur Folge. Als erste Konsequenz der Kolonisierung mit *H. pylori* kommt es im Maus-Tiermodell als Reaktion des angeborenen Immunsystems zu einer starken Infiltration von Granulozyten und Monozyten in die Magenmukosa (46). Die diffuse Infiltration durch weiße Blutkörperchen bezeichnet man als nicht-atrophische, aktive Gastritis. Zellen des Immunsystems werden dabei von Zytokinen, produziert von Epithelzellen, oder bakteriellen Faktoren (z.B. HP-NAP) angelockt (154, 172). Die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-8, IL-1 β , Tumornekrosefaktor (TNF)- α durch Epithelzellen wird von *H. pylori* PAI-abhängig induziert (38, 142). Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen wandern daraufhin in die Magenmukosa ein. Im Fall einer normalen Infektion führen die Zellen durch Phagozytose und Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen (\bullet OH) und NO zur Beseitigung des Erregers. *H. pylori* hat jedoch verschiedene Mechanismen entwickelt, der Reaktion des angeborenen Immunsystems zu entkommen. Neben der Produktion von Katalase und Superoxid-Dismutase zur enzymatischen Beseitigung reaktiver Sauerstoffverbindungen und Arginase zur Reduzierung von NO (81, 211), wird VacA zur Hemmung der Phagosomen-Reifung produziert. Das Abtöten phagozytierter *H. pylori*-Zellen durch Makrophagen wird dadurch verhindert (6, 225).

Im späteren Verlauf einer Infektion werden Zellen des adaptiven Immunsystems zur Infektion rekrutiert. Dabei handelt es sich vor allem um T-Lymphozyten, die eine zentrale Rolle bei der Beseitigung oder Kontrolle von pathogenen Microorganismen spielen. So genannte T-Helferzellen (T_H), eine Gruppe der T-Zellen, sind dabei für die Modulation der Immunreaktion wichtig. Aufgrund des Expressionsprofils der gebildeten Zytokine werden sie in die Subtypen T_{H0} , T_{H1} und T_{H2} eingeteilt (48, 136). T-Zellen, die keine Polarisierung in der Zytokinproduktion aufweisen, werden als T_{H0} bezeichnet und stellen die Mehrzahl dar. T_{H1} -Lymphozyten produzieren vor allem Interferon (IFN) - γ , TNF- β und IL-2 und fördern die zelluläre Immunantwort. T-Zellen vom Typ T_{H2} bilden IL-4, IL-5 und IL-13 und dienen als Wachstums- bzw. Differenzierungs-Faktor für B-Zellen und somit einer humoralen Immunreaktion. *H. pylori* beeinflusst die Polarisierung der Immunantwort, der genaue

Mechanismus ist jedoch noch unklar. Histologische Untersuchungen humaner Magenbiopsien haben gezeigt, dass bei einer Infektion mit *H. pylori* vor allem CD4⁺ T-Lymphozyten dominieren (17, 41). *H. pylori*-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten aus Biopsien entsprachen aufgrund der gebildeten Zytokine (IL-12, IFN- γ , TNF- α) dem Subtyp T_H1. Dabei verteilt sich die Population im Falle einer oberflächlichen Gastritis auf ~30% T_H1-Zellen und >50% T-Lymphozyten vom Typ T_H0. T-Lymphozyten vom Typ T_H2 sind kaum vorhanden. Biopsien von Patienten mit Magengeschwür zeigen, dass sogar >80% der T-Zellen dem Subtyp T_H1 entsprachen (40). Eine dominante T_H1-Polarisierung der Immunantwort ist vermutlich mit einem dramatischeren Krankheitsverlauf assoziiert. Eine T_H2- und somit humorale Immunantwort wird durch die gebildeten Zytokine unterdrückt. Der Beitrag einer solchen humoralen Immunantwort bei der Infektion mit *H. pylori* ist noch unklar. Es finden sich bei fast allen infizierten Patienten Antikörper gegen *H. pylori*, wobei erhöhte Titer von Immunglobulin (Ig)A+IgG gegen Membranproteine, Flagellin, Urease, *H. pylori* Adhäsin A (HpaA) und CagA gefunden werden (119, 120). Antikörper-Titer unterscheiden sich jedoch nicht zwischen Patienten ohne Symptome und Patienten mit Magenschwüren. Die Produktion *H. pylori*-spezifischer Antikörper führt nicht zur Beseitigung der Infektion.

1.3. Virulenzfaktoren von *H. pylori*

Für die Kolonisierung des Magens sind mehrere Faktoren essentiell. Verschiedene Virulenzfaktoren ermöglichen es *H. pylori*, sowohl den extremen Umweltbedingungen (pH, Nährstoffknappheit) zu begegnen als auch dem Immunsystem des Wirtes zu entgehen. Der pH-Wert des Magens liegt im 24 h-Durchschnitt bei pH 1,4 (197). Zusammen mit der dort herrschenden Peristaltik erschwert dies das Überleben von *H. pylori*. Dass sich mit *H. pylori* nur eine Art von Bakterium an dieses Habitat angepasst hat, verdeutlicht die dort herrschenden extremen Bedingungen. Jedoch kann auch *H. pylori* nur für kurze Zeit niedrige pH-Werte (pH<4) tolerieren (165). Als akute Reaktion auf niedrige pH-Werte produziert *H. pylori* konstitutiv große Mengen des Ni²⁺-enthaltenden Enzyms Urease (19). Wird die Umgebung zu sauer, führt die Aktivität der Urease im Zytosol von *H. pylori* zur Spaltung von Harnstoff aus dem Magensaft (1-3 mM) in CO₂ und NH₃ (158). Ammonium wird protoniert und puffert somit das Periplasma und die unmittelbare Umgebung von *H. pylori*. Dies ermöglicht wiederum einen optimalen pH-Gradienten über die Plasmamembran zur Ausbildung der Protonen-motorischen Kraft und somit zur Energiegewinnung aufrecht. Zentrales Element bei der Regulation des pH-Wertes ist der pH-regulierte Harnstoff-

spezifische Kanal UreI (157, 214). UreI ist in der inneren Membran lokalisiert und besitzt 6 Transmembran-Domänen. Der Kanal zum Transport von Harnstoff ist bei pH-Werten $\text{pH} < 5,5$ geöffnet. Es kommt zum Einstrom von Harnstoff in das Zytosol und dessen Spaltung. Zusätzlich zu diesem System, welches auf akute Veränderungen des pH-Wertes reagiert, besitzen Membranproteine von *H. pylori* vermehrt positive Ladungen und dadurch einen höheren isoelektrischen Punkt. Dies macht die Membran weniger durchlässig für Protonen (198) und führt zu mehr Stabilität bei niedrigen pH-Werten. Die beiden Mechanismen ermöglichen es jedoch nur für kurze Zeit niedrige pH-Werte zu tolerieren.

Um kolonisieren zu können, muß *H. pylori* tief in die Mukosa des Magens eindringen. Die helikale Gestalt sowie die polar lokalisierten 5-6 Flagellen, bestehend aus den Untereinheiten FlaA und FlaB, ermöglichen eine schnelle Fortbewegung. Die Orientierung erfolgt über einen pH-Gradienten, der entlang der Mukusschicht besteht (178). Der pH-Wert variiert dabei von $\text{pH} < 3$ im Lumen des Magens bis $\text{pH} \sim 6,5$ über der Magenepithelschicht. Dies konnte im Tiermodell der Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*) gezeigt werden. Andere Gradienten wie Harnstoff / Ammonium und Bicarbonat / CO_2 hatten keinen Einfluß auf die Orientierung von *H. pylori* im Mukus (178). Untersucht man die Verteilung der Bakterien im Tiermodell innerhalb der Mukusschicht, so zeigt sich, dass *H. pylori* im Bereich von 0 - 25 μm über der Epithelschicht zu finden ist. Jedoch befinden sich nur 30% der Bakterien in einem Bereich 0-5 μm oberhalb der Mukosa. Auch in humanen Magenbiopsien wurden nur ca. 20 % der *H. pylori*-Population an Epithelzellen gebunden vorgefunden (88). Dabei ist die Bindung an Epithelzellen für das Überleben von *H. pylori* essentiell. Verluste durch die Peristaltik des Magens sowie durch die Erneuerung der Magenmukosa werden damit vermieden. Die Bindung ist außerdem eine Voraussetzung zur Translokation verschiedener Pathogenitätsfaktoren und somit Induktion der Entzündung. Auch um essentielle Membranbestandteile wie z.B. Cholesterin zu gewinnen (219), spielt die Adhäsion eine zentrale Rolle. Die Bindung an Epithelzellen erfolgt dabei über eine Gruppe von äußeren Membran-Proteinen. Die Adhäsine BabA und SabA binden an Blutgruppen-Antigene, so genannte Lewis-Antigene, auf der Oberfläche von Magenepithelzellen und tragen somit zur Pathogenität von *H. pylori* bei (12, 13, 21, 147, 155). BabA erkennt fukosylierte Lewis^b-Antigene von Epithelzellen und stellt das dominierende Adhäsine von *H. pylori* dar. Expression von aktivem BabA ist mit verstärkter Proliferation der Epithelzellen sowie Entzündung der Mukosa assoziiert und stellt somit ein erhöhtes Risiko für atrophische

Gastritis, Metaplasien und Adenokarzinomen dar. SabA bindet sialylierte Glykoproteine (Sialyl-Lewis^x) und trägt ebenso zur Adhäsion bei.

H. pylori induziert eine Entzündung der Magenschleimhaut über zweierlei Mechanismen. Zum einen wird durch den TypIV-Sekretionsapparat die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-8 und RANTES stimuliert (180, 203). IL-8 wird von Epithelzellen sekretiert und lockt neutrophile Granulozyten und andere Effektorzellen des angeborenen Immunsystems an. Zusätzlich wird von *H. pylori* HP-NAP („*H. pylori*-neutrophil activating protein“) gebildet, das ebenfalls neutrophile Granulozyten anlockt und deren Adhäsion an Endothelzellen fördert (154). HP-NAP oligomerisiert im gereinigten Zustand zu Dodecameren der Masse 150 kDa und besitzt eine ballartige Struktur. Interessanterweise ist HP-NAP fähig ~500 Atome Eisen pro Dodecamer zu binden, so dass es ursprünglich als bakterielles Ferritin beschrieben wurde (199). Eine Rolle bei der Aufnahme von Eisen wäre denkbar, konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden. Neuere Studien zeigen, dass HP-NAP die Immunantwort beeinflusst indem es das Muster der Zytokin-Produktion von Leukozyten moduliert (7). Dabei werden vor allem IFN- γ und TNF- α durch T-Lymphozyten gebildet und Monozyten bzw. dendritische Zellen (DC) durch HP-NAP zur Produktion von IL-12 und IL-23 angeregt. Dieses veränderte Zytokin-Profil trägt zur Polarisierung der Immunantwort zum T_H1-Typ bei, was der dominierenden Immunantwort einer *H. pylori*-Infektion entspricht.

Ein wichtiger Pathogenitätsfaktor von *H. pylori* ist CagA, das über einen TypIV-Sekretionsapparat in eukaryontische Zellen transloziert wird (146). Die Komponenten des TypIV-Sekretionssystems sowie CagA sind auf einer 40 kBp-großen Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) kodiert (26), wobei CagA das bisher einzige beschriebene Substrat des TypIV-Apparates darstellt. Epidemiologische Studien ergaben, dass in westlichen Ländern ~60% der isolierten *H. pylori*-Stämme eine *cag*-PAI besitzen, im Vergleich zu ~90% in der asiatischen Population (86). CagA (130-170 kDa) besitzt mehrere C-terminal gelegene Sequenzmotive (A-D), die alle die konservierten Aminosäuren EPIYA besitzen (89, 137). *H. pylori*-Stämme westlicher und asiatischer Isolate unterscheiden sich dabei in der Anzahl und Zusammensetzung dieses Motivs. CagA wird über einen kontaktabhängigen Mechanismus in die Zielzelle übertragen. Transloziertes CagA lagert sich an die Zytoplasmamembran an (90) und wird von Protein Tyrosin-Kinasen der Src-Familie (Src, Fyn, Lyn, Yes) an den Tyrosin-Resten des EPIYA-Motifs modifiziert (11, 201). Phosphoryliertes CagA bindet die SHP2 Tyrosin-Phosphatase und führt zu einer anormalen Aktivität dieses *bona fide* Onkoproteins (89). Die CagA-induzierte Aktivität von SHP2 stimuliert verschiedene Signalkaskaden, die unter anderem zur

Aktivierung von Erk und Dephosphorylierung der „focal adhesion kinase“ (FAK) führen. Die Ausbildung des charakteristischen Hummingbird-Phänotyps und verstärkte Zellmigration sind die Folge (202). Weiter werden durch CagA das Gerüstprotein ZO-1 und das Transmembran-Protein JAM zur Bindungsstelle zwischen *H. pylori* und Epithelzelle rekrutiert (9). Diese Interaktion hat Einfluß auf die Integrität der Kontaktstellen benachbarter Epithelzellen, den sogenannten „tight junctions“, und kann *in vivo* zum Aufbrechen der Barrierefunktion des Magenepithels führen. Die Ausbildung eines Komplexes von CagA mit PAR1/MARK beeinträchtigt zusätzlich die Integrität der „tight junctions“ und führt zum Verlust der apikal-basolateralen Zellpolarität (164).

Weitere Interaktionen von CagA, die jedoch unabhängig von einer Phosphorylierung sind, wurden mit Grb2, c-Met und PLC- γ gezeigt (27, 127). Die Bindung von CagA an Grb2 führt zur Aktivierung des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweges, was zur verstärkten Proliferation und morphologischen Veränderungen in Epithelzellen führt. Kürzlich wurde außerdem gezeigt, dass CagA den Transkriptionsfaktor NFAT („nuclear factor of activated T-cells“) in Epithelzellen aktiviert und damit die Expression NFAT-abhängiger Gene induziert. Dieser Effekt war ebenso unabhängig von einer Phosphorylierung des EPIYA-Motivs (223).

Die zahlreichen Veränderungen in Zell-Signalwegen sowie epidemiologische Studien, die eine Korrelation zwischen der Expression von CagA und der Ausbildung von Magenkarzinomen zeigen, führen dazu, CagA als bakterielles Onkoprotein zu bezeichnen. Unterstützt wird diese Ansicht durch eine Arbeit von Hatakeyama (148), in der die Ausbildung von Magenkarzinomen in CagA-transgenen Mäusen beschrieben wird. Die Mäuse, die CagA ubiquitär exprimierten, wiesen anormale Proliferation des Magenepithels und hämatopoetischer Zellen auf. Transgene Mäuse, die CagA ohne EPIYA-Motiv exprimierten, wiesen keinerlei Veränderungen auf. Dies unterstreicht wiederum die Bedeutung der Interaktion von CagA mit SHP2 bei der Ausbildung von Adenokarzinomen.

Die Beobachtung, dass Kulturüberstand von *H. pylori* die Ausbildung großer, zytoplasmatischer Vakuolen in Epithelzellen induziert, führte 1988 zur Entdeckung des vakuolisierenden Cytotoxins VacA (109). Es wurde 1992 von Cover und Blaser (32) biochemisch gereinigt und charakterisiert. Weitere Studien zeigten, dass es als ~140 kDa Prä-Protoxin produziert (Abb. 1), Sec-abhängig über die innere Membran von *H. pylori* exportiert und mit einer C-terminal gelegenen Autotransporter-Domäne über die äußere Membran sekretiert wird. Dieser Sekretionsmechanismus wird als TypVa bezeichnet. Die Autotransporter-Domäne wird abgespalten und das reife Toxin mit einer molekularen Masse

von ~90 kDa in den Überstand abgegeben (35, 140, 176). Dort oligomerisiert das Toxin in hexamere Ringe und zwei solcher Ringe bilden einen hochmolekularen, dodecameren Komplex der molekularen Masse von ~ 1 MDa aus, der einer Blume ähnelt (Abb. 1) (34, 114).

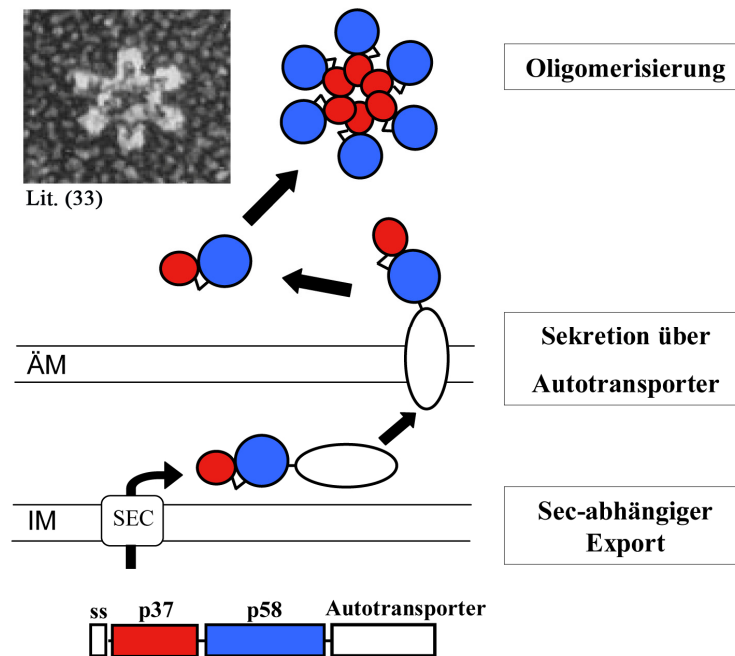


Abb. 1: Schematische Darstellung der Sekretion von VacA.

VacA wird als Prä-Protoxin (140 kDa) produziert und besitzt neben einer N-terminal gelegenen Signalsequenz (ss) eine Autotransporter-Domäne am C-Terminus. VacA, bestehend aus der p37- und p58-Domäne, wird Sec-abhängig über die innere Membran (IM) exportiert. Die Autotransporter-Domäne sorgt für den Transport über die äußere Membran (ÄM). Nach Abspaltung von der Membran oligomerisiert das reife VacA-Toxin im Kulturüberstand. In der Abbildung ist ein VacA-Hexamer dargestellt, wie es mit Cryo-EM von gereinigten VacA gefunden wird (34).

Ein saurer (pH <4) oder alkalischer pH-Wert (pH >9) führt zum Zerfall des Komplexes (34, 128). Diese sogenannte Säureaktivierung erhöht die Toxizität um ein Vielfaches. Sekretiertes VacA kann weiter in ein 37 kDa (p37) und 55 kDa (p55) Fragment prozessiert werden. Bedeutung und Mechanismus dieser Spaltung sind jedoch unbekannt (24, 196). Die beiden Fragmente weisen unterschiedliche Funktionen auf. So wurde für das p37-Fragment gezeigt, dass es für die Ausbildung einer Membranpore nötig ist (208). Essentiell ist ein N-terminal gelegener stark hydrophober Bereich. Er besteht aus ~30 Aminosäuren, die 3 Wiederholungen eines GXXXG-Motivs aufweisen (123). Dieses Sequenzmotiv ist für die Insertion von Proteinen in Membranen verantwortlich, wie es für MscL von *E. coli* beschrieben ist (99). Das p55-Fragment ist für die Bindung an die Zelloberfläche und Oligomerisierung verantwortlich (94, 149). Die ersten ~100 Aminosäuren von p55 sind für die Ausbildung der

Pore durch das p37-Fragment essentiell, indem es die Interaktion der Untereinheiten vermittelt. Eine klassische Struktur wie bei AB-Toxinen ist dadurch jedoch nicht gegeben. Alle bisher isolierten *H. pylori*-Stämme aus menschlichen Biopsien produzieren VacA, obwohl deutliche Variationen in der Sequenz erkennbar sind. Aufgrund dieser Sequenzpolymorphismen lassen sich verschiedene VacA-Allele unterscheiden, die sich in ihrem Bindungsverhalten an eukaryotische Zellen und Vakuolisierungs-Aktivität unterscheiden (15, 69). In Abb. 2 sind die bisher beschriebenen Sequenzvariationen schematisch dargestellt. VacA-Allele können dabei anhand von Polymorphismen in Bereichen des 5'-Ende (s-Region) und mittleren Bereich (m-Region) unterschieden werden (16, 122). VacA-Formen s1/m1 zeigen die stärkste Aktivität bei der Vakuolisierung von Epithelzellen, wohingegen VacA vom Typ s2/m1 nicht aktiv ist (108). *H. pylori* mit s2/m2 VacA wurde bisher nicht isoliert. Das s1/m2-Allel von VacA hingegen führt nur bei bestimmten Zelltypen zur Vakuolisierung. VacA mit der m1-Region kann in allen Zellen Vakuolen induzieren, s1m2 VacA hingegen führt bei Kaninchen-Nierenkrebszellen (RK13 Zellen) und primären Mageneithelzellen zur Ausbildung saurer Vakuolen. Hingegen sind HeLa- und AGS-Zellen nicht sensitiv gegenüber s1/m2 VacA (149). Der Grund hierfür wird in zwei unterschiedlichen Rezeptoren der beiden VacA-Allele gesehen. Aufgrund dieser Eigenschaften wurden *H. pylori*-Stämme als TypI (s1/m1) bzw. Typ2 (s1/m2) Stämme eingeteilt. *H. pylori*-Stämme vom Typ1 weisen im Vergleich zu Typ2-Stämmen ein deutlich höheres Risiko zur Ausbildung von Magengeschwüren und Adenokarzinomen auf. TypI *H. pylori*-Stämme besitzen außerdem im Gegensatz zu TypII-Stämmen die Pathogenitätsinsel mit CagA als Effektorprotein.

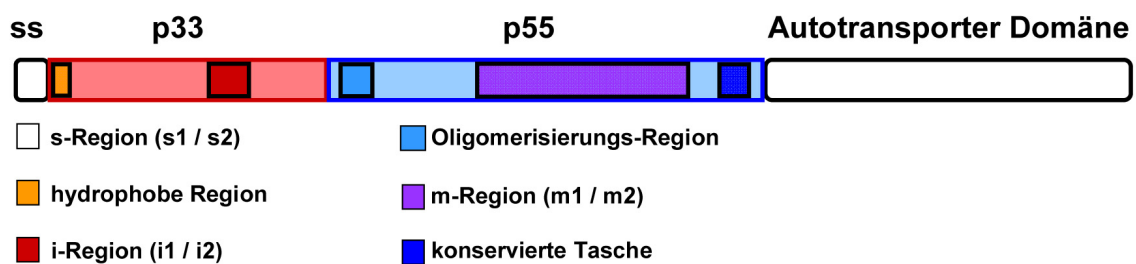


Abb. 2: Schematischer Überblick der polymorphen Region von VacA.

Das VacA Prä-Protoxin setzt sich aus einer Signalsequenz (ss), den beiden Fragmenten p33 und p55, sowie einer Autotransporter-Domäne am C-Terminus zusammen. Die Signalsequenz (s1/s2) und Autotransporter-Domäne werden bei der Sekretion abgespalten. Das reife VacA-Toxin besitzt verschiedene Sequenzpolymorphismen. Die p33-Fragmente der verschiedenen VacA-Allele unterscheiden sich in der N-terminal gelegenen hydrophoben Region und der i-Region. Im p55-Fragment befinden sich die Oligomerisierungs-Region, die m-Region und eine konservierte Tasche am C-Terminus.

Kürzlich wurde in der Gruppe von Atherton eine weitere polymorphe Region im p37-Fragment, bezeichnet als i-Region („intermediate“), identifiziert (159). Epidemiologische Studien ergaben, dass *H. pylori* mit i1-Allel signifikant mit der Ausbildung von Magenkrebs assoziiert ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Zelltyp-spezifische Vakuolisierung von s1/m2 VacA ebenso von der i-Region beeinflusst wird. VacA-Allele mit der Domänen-Kombination s1/i1/m2 waren fähig RK13 Zellen zu vakuolisieren, s1/i2/m2-Formen von VacA hingegen nicht. Weitere Aspekte zur Charakterisierung funktioneller VacA-Regionen ergaben sich aus der vor kurzem beschriebenen Kristallstruktur des p55 VacA-Fragments (75). Die Struktur von p55 besteht aus mehreren rechts-gedrehten β -Helices und einer C-terminalen, globulären Domäne, bestehend aus α - und β -helikalen Elementen. Die lang gestreckte β -helikale Struktur ist dabei durch einen Knick von der globulären Domäne abgesetzt. Die p55-Kristallstruktur passt sich der VacA-Struktur aus Cryo-Elektronenmikroskopie (-EM) Studien an (59). Lacy und Kollegen (75) verglichen außerdem 92 VacA-Sequenzen bezüglich der oberflächenexponierten Aminosäurereste. Hiermit konnten zwei konservierte Bereiche in dem p55-Fragment bestimmt werden. Vermutet wird in diesen Bereichen eine C-terminal lokalisierte Rezeptor-Bindetasche und ein am N-terminus gelegenen Bereich zur Interaktion mit dem p37-Fragment. Ein experimenteller Beweis steht jedoch noch aus.

1.4. VacA als multifunktionales Toxin

Der erste beschriebene VacA-Effekt war die Ausbildung saurer Vakuolen in Epithelzellen (33). Weitere *in vitro*-Studien zeigten, dass VacA auf viele verschiedene Zelltypen, von Magenepithelzellen bis hin zu Zellen des Immunsystems, einwirken kann. Aufgrund der vielen unterschiedlichen Effekte wurde VacA als multifunktionales Toxin bezeichnet (31). Im folgenden Abschnitt werden einige Effekte beschrieben, wobei hier darauf hingewiesen wird, dass dafür zum Teil sehr hohe VacA-Konzentrationen nötig sind.

Die Induktion saurer Vakuolen ist in den meisten Zellen zu beobachten. Die Ausbildung der Vakuolen hängt dabei von der Anwesenheit schwacher Basen wie Ammoniumchlorid ab. Das Modell der Vakuolenbildung geht von der Bindung an die Zytoplasmamembran und anschließender Aufnahme aus (31, 132). VacA bildet Anionen-spezifische Kanäle aus, wobei noch unklar ist, ob die Kanäle in der Zytoplasmamembran oder erst später im endosomalen System gebildet werden. Eine Ansäuerung des Lumens später Endosomen führt zum Einstrom von Cl⁻ über die VacA-Pore und somit zu einer Erhöhung der Chlorid-Konzentration in den

Vesikeln. Dies hat eine verstärkte Aktivität der vakuolären ATPase (v-ATPase) zur Folge, die vermehrt Protonen in das Lumen pumpt, um die negative Ladung von Cl^- auszugleichen. Dadurch sinkt der pH-Wert weiter ab. Schwache Basen wie NH_3 können über Membranen diffundieren und werden im sauren Lumen der Vesikel protoniert. NH_4^+ -Ionen sind nicht mehr membrangängig, so dass ein osmotisches Anschwellen der Vesikel die Folge ist. Die sauren Vakuolen besitzen dabei Marker von späten Endosomen (Rab7) und frühen Lysosomen (LAMP1) (129, 150). Proteine früher Endosomen (Rab5, EEA1) fehlen. Die Bildung saurer Vakuolen ist jedoch vermutlich nur ein Nebeneffekt der Aufnahme von VacA. Werden keine Vakuolen gebildet, treten trotzdem Änderungen im endosomalen System auf (110). Dabei sind die Inhibition des intrazellulären Abbaus von EGF („epidermal growth factor“) und Reifung von Procathepsin D zu nennen (173). Außerdem führt VacA zum „Clustern“ des späten endosomalen Kompartiments (110), sowie zur Inhibition der Antigenpräsentation in der B-Lymphozyten Zelllinie Raji (130). VacA stört die proteolytische Prozessierung von Antigenen und somit den Ii-abhängigen Weg der Antigenpräsentation zur Aktivierung von T- und B-Lymphozyten. All diese Effekte werden auf Veränderungen des endosomalen Transportes zurückgeführt.

Neben dem Einfluß auf das endosomale Kompartiment, kann VacA durch Freisetzung von CytochromC Apoptose in Epithelzellen induzieren (74, 216, 217). Generell ist der Vorteil der Induktion von Apoptose für *H. pylori* jedoch fraglich. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass *H. pylori* im Mongolian Gerbil-Modell die Induktion der Apoptose inhibiert (126). Dabei kommt es zu einer CagA-abhängigen Induktion des Überlebensfaktors Erk und des anti-apoptotischen Faktors MCL-1 im Magenepithel. Außerdem wurde gezeigt, dass *in vivo* kein Unterschied in der Apoptose-Rate von Epithelzellen bei Infektion mit *H. pylori* Wildtyp und *vacA*-Deletionsmutante erkennbar ist.

VacA führt in Epithelzellen nach Bindung an Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatase (RPTP) β zur Tyrosin-Phosphorylierung von G-Protein-gekoppelter Rezeptorkinase-Interaktor 1 (Git-1) (72). Dieser Effekt ist unabhängig von einer Aufnahme von VacA in die Zelle. Experimente mit primären Magenepithelzellen von RPTP^{-/-}-Mäusen zeigten, dass VacA in Abwesenheit des Rezeptors zwar aufgenommen wird und Vakuolen induziert, das Ablösen der Zellen von der extrazellulären Matrix jedoch abhängig von einer Interaktion mit RPTP β war. Dies zeigt sich auch bei *in vivo*-Experimenten. Die orale Gabe von VacA führte in Wildtyp-Mäusen zum Ablösen der Epithelzellen von der Basalmembran und ähnelt den morphologischen Veränderungen bei Magengeschwüren im Menschen. RPTP^{-/-}-Mäuse waren dagegen resistent. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Bindung von VacA an RPTP β die Signalwege an das

RPTP β -Substrat Git-1 stört. Dessen VacA-induzierte Phosphorylierung beeinflusst möglicherweise Signalwege, die Einfluß auf Zelladhäsion und Organisation des Zytoskeletts haben.

Außerdem wurde die Induktion der Ca²⁺-Oszillation in eukaryotischen Zellen und weitere Effekte auf zelluläre Signaltransduktions-Wege wie Aktivierung der MAPK p38 und ERK1/2 beschrieben. Diese VacA-Effekte sind dabei, ebenso wie die Git-1-Phosphorylierung, auf eine Interaktion von VacA mit spezifischen Rezeptor(en) zurückzuführen und stellen im Gegensatz zur Vakuolisierung und Apoptose schnelle VacA-Effekte dar.

1.5. Immunsuppression durch VacA

Die Besonderheit einer Infektion mit *H. pylori* liegt in der chronischen, meist lebenslangen Entzündung, ohne vom Immunsystem beseitigt zu werden. Bei der Kontrolle einer *H. pylori*-Infektion spielen CD4⁺ T-Lymphozyten eine zentrale Rolle (4). Dabei kann VacA eine Antigen-spezifische Aktivierung von T-Lymphozyten durch APC verhindern, indem es die Ii-abhängige Antigen-Prozessierung stört (130). Ein weitaus direkterer Effekt von VacA auf T-Lymphozyten wurde ebenso beschrieben. Wie von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt wurde, inhibiert VacA *in vitro* die Proliferation primärer T-Lymphozyten (78, 194). Dieser Effekt erfolgt durch Hemmung der Expression von IL-2 und Präsentation der hochaffinen IL-2R α Untereinheit. IL-2 wird unter normalen Bedingungen nach Aktivierung des T-Zell Rezeptors (TCR)/Co-Rezeptors exprimiert und sekretiertes IL-2 führt über eine autokrine Schleife zur Proliferation der T-Lymphozyten. Experimentell können T-Lymphozyten auch mit dem Phorbolster PMA zusammen mit dem Ca²⁺-Ionophor Ionomycin aktiviert werden. Die Expression von IL-2 hängt von der Aktivierung der Ca²⁺-abhängigen Phosphatase Calcineurin ab, die nach Bindung von Ca²⁺, Calcineurin A (CnA) und Calcineurin B (CnB), zur Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFAT führt (36, 37). VacA verhindert die Dephosphorylierung und somit die Translokation von NFAT in den Nukleus (20, 78). Die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B sind nicht betroffen. Der VacA-Effekt führt zum Arrest des Zellzyklus indem die Produktion von Cyclin D3 und Cyclin E reduziert wird, was eine reduzierte Phosphorylierung und Aktivierung des Retinoblastom-Proteins zur Folge hat. Genexpressions-Studien ergaben, dass VacA die Aktivierung von Calcineurin, ähnlich der Wirkung des immunsuppressiven Moleküls FK506 inhibiert. Da konstitutiv aktives Calcineurin nicht von VacA beeinträchtigt wird, findet der immunsuppressive Effekt auf der Stufe von Calcineurin oder aufwärts der Signalkaskade statt. Neben der Expression von IL-2

ist auch die Produktion weiterer Zytokine wie MIP-1 α und MIP-1 β betroffen (78). Für den VacA-Effekt auf Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten scheint die Ausbildung des VacA-Kanals von Bedeutung zu sein. Eine Hemmung des Cl⁻-spezifischen Kanals durch den Inhibitor NPPB sowie die VacA-Mutante VacA Δ 6-27, die keine funktionelle Pore ausbilden kann, zeigten keinen inhibitorischen Effekt auf die IL-2 Expression (194).

Boncrisiano und Kollegen (20) postulierten einen weiteren Weg der Inhibition von T-Lymphozyten durch VacA, unabhängig von der Aufnahme des Toxins. Allein die Bindung des p55-Fragments, das nicht oligomerisieren kann und somit nicht aufgenommen wird, führt zur Aktivierung der Stress-Kinase p38 und Aktivierung der GTPase Rac1. Die daraus resultierende Umlagerung von Aktin könnte die Aktivierung der T-Lymphozyten stören. Auch in Magenepithelzellen führte VacA zur Aktivierung des p38/ATF-2 Signalweges (139). Die Bedeutung dieses VacA-Effektes ist jedoch noch unklar.

1.6. Interaktion von VacA mit eukaryotischen Zellen

Für VacA ist, wie für die meisten anderen Toxine auch, die Bindung an einen oder mehrere spezifische(n) Rezeptor(en) ein essentieller Schritt bei der Intoxikation der Zellen. Verschiedene Rezeptoren sind für VacA auf unterschiedlichen Zelltypen beschrieben. *In vitro* Experimente zeigten, dass VacA an Glykosphingolipide auf Dünnschichtchromatographie-Platten bindet (161). Die Existenz und Bedeutung dieser Interaktion auf Zellen ist jedoch unbekannt. Die am besten charakterisierte Interaktion mit einem Rezeptor stellt die Bindung von VacA an die Glykoproteine RPTP α und RPTP β dar (72, 220, 221). Die Transmembran-Proteine besitzen neben einem kurzen zytoplasmatischen Bereich mehrere stark glykosylierte, extrazelluläre Domänen. Die Binderegion von VacA an RPTP α und RPTP β wurde weiter eingengt und auf einen membranahen Bereich von 5 Aminosäuren reduziert (222). Die Glykosylierung dieses Aminosäure-Motivs ist für die Bindung von VacA essentiell. Eine Abspaltung von Oligosacchariden mit Neuraminidase führte zu einem Verlust der Interaktion von VacA mit RPTP α und RPTP β . Dies zeigt sich auch bei Austausch der glycosylierten Aminosäure. VacA bindet an die Transmembran-Proteine über Oligosaccharide, vergleichbar mit der Interaktion mit Glykosphingolipiden. Dass RPTP α und RPTP β nicht die einzigen Interaktionspartner von VacA mit Zielzellen sind, zeigt sich zum einen daran, dass die Abspaltung von Oligosacchariden mit Neuraminidase zum Verlust der Interaktion mit RPTP α und - β führt, die Bindung an die Zellen jedoch nicht beeinträchtigt ist. Außerdem zeigten

Telford und Kollegen, dass in HeLa Zellen mindestens ein weiterer VacA-Rezeptor vorkommt (187).

Nach Bindung an die Zielzelle über einen Rezeptor werden Toxine meist aufgenommen. Verschiedene zelluläre Aufnahmemechanismen werden ausgenutzt, die sich anhand der beteiligten Komponenten unterscheiden und darüber charakterisiert werden. Für VacA wurde gezeigt, dass die Aufnahme in Epithelzellen über spezifische Membrandomänen, so genannte „lipid raft“-Strukturen, erfolgt (77, 177). Bindet VacA an RPTP β kommt es zum „Clustern“ des VacA/Rezeptor-Komplexes in Cholesterin-reichen Domänen der Membran (138). Die Ursache der Re-Organisation von RPTP β ist noch unklar, kann aber ein Effekt der Oligomerisierung von VacA sein. Das Entfernen von Cholesterin, einer charakteristischen Komponente dieser Bereiche, verhindert dabei die Aufnahme, jedoch nicht die Bindung von VacA. Als weitere Komponenten des Endozytoseweges von VacA konnte das Aktin-Zytoskelett bestimmt werden. Die weitere Charakterisierung der VacA-Aufnahme in Epithelzellen ergab, dass der Mechanismus von den kleinen GTPasen Cdc42 und Rac-1 reguliert wird (77). Rac-1 wird dabei für die Umlagerung von VacA auf der Zelloberfläche verantwortlich gemacht. Aufgrund der beteiligten Komponenten und Struktur wird das Kompartiment nach VacA-Aufnahme als „GPI-anchored proteins-enriched early endosomal compartment“ (GEEC) bezeichnet und ähnelt der Aufnahme Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerter Proteine.

1.7. Ziel der Arbeit

Die Infektion mit *H. pylori* führt zu einer starken Immunantwort, die zu Gastritis, Magengeschwüren und Magenkarzinomen führen kann. Trotz der starken Entzündung ist das Immunsystem nicht in der Lage, die Kolonisierung des Magens mit *H. pylori* zu beseitigen. *H. pylori* besitzt dafür verschiedene Mechanismen das Immunsystem zu unterdrücken oder zu umgehen. Das Vakuolisierendes Cytotoxin VacA spielt hierbei mit der Inhibition der IL-2-Expression von CD4⁺ T-Lymphozyten eine zentrale Rolle. VacA hemmt vermutlich auf der Stufe der Ca²⁺-abhängigen Phosphatase Calcineurin die Aktivierung von T-Lymphozyten. Wie VacA jedoch mit T-Lymphozyten interagiert, um die Aktivierung von T-Zellen zu inhibieren, ist nicht bekannt. Wichtigstes Ziel dieser Arbeit war deshalb die Identifizierung des VacA-Rezeptors auf humanen T-Lymphozyten. Die Kenntnis des spezifischen Rezeptors könnte helfen, die hemmende Wirkung von VacA auf T-Zellen besser zu verstehen. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, warum murine T-Zellen nicht auf VacA reagieren. Weiterhin sollte mit der Identifizierung des VacA-Rezeptors der Aufnahmemechanismus von VacA in humane T-Zellen im Detail charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien

Jurkat E6.1	Humane T-Zelllinie (ATCC TIB-152)
J- β 2.7	Jurkat; exprimieren kein CD11a (C. Weber; Uniklinik Aachen)
J- β 2.7 / CD11a	J- β 2.7 komplementiert mit CD11a (B. Holzmann; TU München)
SKW3	humane T-Zelllinie (C. Weber; Uniklinik Aachen)
SK- β 2.7	SKW3; exprimieren kein CD18
HeLa	Humane Zervixkarzinom-Zelllinie (ATCC 57)
Raji	humane B-Zelllinie (ATCC CCL-86)
EL4	murine T-Zelllinie (ATCC TIB-39)

2.1.2. Bakterienstämme

Escherichia coli-Stämme

DH5 α	F ⁻ , ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA 1, endA 1, hsdR 17(r _K ⁻ , m _K ⁺), supE 44, thi -1, λ ⁻ gyrA 96, relA 1 (Gibco, BRL)
TOP10	F ⁻ , ϕ lacZ Δ M15 Δ (lacZYH-argF)U169, deoR, recA1, araD139, Δ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL (Str ^R), endA1, nupG (Invitrogen)

Helicobacter pylori-Stämme

60190	Wildtypstamm zur Produktion von VacA
60190 VacA Δ 6-27	Stamm 60190 mit Deletion von Aminosäuren 6-27 in VacA
P12	klinisches Isolat der Abteilung Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Hamburg
P12 Δ VacA	P12 mit Deletion von <i>vacA</i>

2.1.3. Plasmide

pIL-2 <i>luc</i>	Transfektionsplasmid mit IL-2-Promotorsequenz vor dem Luciferase-Gen (L. Thomson, The Burnham Institute, San Diego)
pLAMP1-YFP	Fusionprotein LAMP1-EYFP; Vektor pEYFP-N1 (W. Mothes; Yale)
pRab5-GFP	Marino Zerial (MPI für molekulare Zellbiologie und Genetik)

pRab7-YFP	Fusionprotein Rab7-EYFP; Vektor pEYFP-C1 (W. Mothes; Yale)
pRab11-GFP	Marino Zerial (MPI für molekulare Zellbiologie und Genetik)
pCEP4-CD11a	Expression von CD11a (M. Fabbri, Mailand)
pcDNA1-CD18	Expression von CD18 (M. Fabbri, Mailand)
pcDNA3.1-CD11b	Expression von CD11b (P. Sebo, Prag)

2.1.4. Antikörper

2.1.4.1. Primäre Antikörper

α -CD3 (UCHT1)	monoklonaler Antikörper gegen CD3 (Maus), BD
α -CD28 (CD28.2)	monoklonaler Antikörper gegen CD28 (Maus), BD
α -VacA (AK197)	polyklonales Antiserum gegen VacA von <i>H. pylori</i> (Kaninchen)
α -CD18 (IB4)	monoklonaler Antikörper gegen CD18 (Maus), Axxora
α -CD18 (MEM-48)	monoklonaler Antikörper gegen CD18 (Maus), Ancell
α -CD11a (YTH81.5)	monoklonaler Antikörper gegen CD11a (Maus), serotec
α -CD83-FITC	monoklonaler Antikörper gegen CD83 für FACS, BD
α -CD86-FITC	monoklonaler Antikörper gegen CD86 für FACS, BD
α -CD80-FITC	monoklonaler Antikörper gegen CD80 für FACS, BD
α -Alexa488	monoklonaler Antikörper gegen Alexa Fluor-488, invitrogen
α -CD18-PE	monoklonaler Antikörper gegen CD18 für FACS; Klon 6.7, BD
α -CD11a-PE	monoklonaler Antikörper gegen CD11a für FACS; Klon G43-25B, BD
α -CD11b-PE	monoklonaler Antikörper gegen CD11b für FACS; Klon ICRF44, BD

2.1.4.2. Sekundäre Antikörper

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

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

2.1.5. Zellkulturmedien und -puffer

PBS	PBS Dulbeccos's ohne Calcium, Magnesium und Natriumbicarbonat
RPMI	RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium mit Natriumpyruvat und Pyridoxin

Alle Zellkulturlösungen und Medien wurden von Gibco bezogen

2.1.6. Chemikalien und Reagenzien

Brucella Medium (BD); Heptakis [(2,6-di-O-methyl)- β -Cyclodextrin] (Sigma); Cholesterollösung (Gibco); Coomassie Brilliant Blue R250 (Biomol); GC-Agar (Oxoid); Acrylamid/Methylenbisacrylamid 29:1 (30%), Lennox-L-LB-Agar, Lennox-L-LB-Medium, N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) (Sigma); Chloramphenicol, Nystatin, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Merck); FK506; Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Ionomycin, Gentamicin, Ampicillin, Ethidiumbromid, Kanamycin, Leupeptin, Natrium-Orthovanadat, Pepstatin, Trimethoprim, TritonX-100, Tween-20, Vancomycin; Luciferin (Roche); Neutravidin-Sepharose (Pierce); Succinimidyl-Alexa Fluor-488, -555; Cholera Toxin Untereinheit B (CtxB)-Alexa Fluor-647, CtxB-Biotin (Molecular Probes); Transferrin-Biotin (Pierce); rekombinantes ICAM-1/Fc (human, murin), rekombinantes VCAM-1/Fc (RnD); Transferrin-Alexa488; Cell line Nucleofector-Kit L, - Kit V, Human T Cell Nucleofector-Kit (Amaxa Biosystems); Fugene 6 Transfektions Reagenz (Roche); OptEIA IL-2 ELISA Set (human, murin) (BD); Dynasore, SecraminA (T. Kirchhausen, Harvard Medical School, Boston)

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

2.1.7. Proteine und Enzyme

Rinderserumalbumin (BSA) (Biomol); fötales Kälberserum (FCS), Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco BRL); Pferdeserum (PAA); ProteinG Agarose; Streptavidin-HRP (Pierce); Exodus-2 (CCL21), SDF-1 (CXCL-12), GM-CSF, IL-4, TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE₂ (Immunotools), Neuraminidase (Calbiochem)

2.1.8. Inhibitoren

2.1.8.1. Peptid-Inhibitoren

Tabelle 1: Liste der verwendeten Peptid-Inhibitoren.

In der Tabelle sind die Peptid-Inhibitoren zur Hemmung der PKC-Isoformen aufgeführt. Die Konzentrationen beziehen sich auf die verwendete Menge im Experiment.

Peptid	AS-Sequenz	Konzentration	Ziel
Pseudosubstrat PKCα, -β1	Myr-FARKGALRQ	20 μ M	PKC α , - β 1
Pseudosubstrat PKCζ	Myr-SIYRRGARRWRKL	10 μ M	PKC ζ

2.1.8.2. Chemische Inhibitoren**Tabelle 2: Liste der verwendeten chemischen Inhibitoren.**

In der Tabelle sind die Inhibitoren zur Hemmung der angegebenen zellulären Komponenten aufgeführt. Die Konzentrationen beziehen sich auf die verwendete Menge im Experiment.

Inhibitor	Konzentration	Zielstruktur
Cytochalasin D	2 nM	Aktin
Latrunculin B	1 μ M	Aktin
Jasplakinolid	5 μ M	Aktin
Nocodazol	20 μ M	Mikrotubuli
Calpeptin	250 μ M	Calpain
Genistein	250 μ M	Tyr-P
BAPTA	50 μ M	Ca ²⁺ -Chelator
Heptakis	1 μ g/ml	Cholesterol
mono-Dansylcadaverin	10 μ M	Clathrin
Chlorpromazin	10 μ M	Clathrin
1-Butanol/2-Butanol	1%	Clathrin
Dynasore	20 μ M	Dynamin
Gö6983	1 μ M	PKC- α , - β , - δ , - γ , - ζ
Bisindolylmaleimide II	1 μ M	allg. PKC
Gö6976	4 μ M	Ca ²⁺ -abh. PKC- α , - β , - γ
Rottlerin	10 μ M	PKC- δ ; auch PKC- α , - β , - γ
Wortmannin	100 nM	PI-3-K
NSC23766	25 μ M	Rac1
C3 Exotoxin	20 μ g/ml	RhoA
Y27632	25 μ M	ROCK
ML-7	25 μ M	MLCK
SecraminA	1,5 μ M	Cdc42

2.1.9. Molekulargewichtsmarker

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

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

Prestained High Range (Bio-Rad)

2.1.10. Hilfsmittel

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

2.1.11. Apparaturen und Geräte

Agarose-Gelkammern, Gene Pulser™, Spannungsquellen, PAGE-Mini-Gelkammern (Bio-Rad); Blot-Apparaturen (Biotech Fisher); Brutschränke (Binder); Anaerobenbrutschrank Microincubator MI22C (Scholzen); UV-Transilluminator, Video-Geldokumentationssystem (BioRad); ELISA-Reader (Tecan); Fluoreszenz-Plattenlesegerät (CytoFluor 4000, Perseptive Biosystems); Sterilbank (BDK); Wasserbäder, Schüttelinkubator (GFL); Photometer (Hach); Magnetrührer (Heidolph); DNA Speed Vac (Savant); Thermocycler (Perkin Elmer, Eppendorf); Heizblock (Techne); Rolltisch (Assistent); Zentrifuge RC5C Plus (Rotoren SS34, SLA3000, SLA1500) (Sorvall); Tischzentrifugen Megafuge1.0R, Biofuge15R, Biofuge15 (Heraeus); konfokales Laserscanning-Mikroskop Leica TCS SP-5; Luminometer MicroLumat Plus LB 96V (Berthold); Durchflußzytometer EPICS® XL-MCL (Coulter) und FACSCanto (BD); PerkinElmer „spinning disc“-Mikroskopsystem mit Nikon Eclipse TE300 Mikroskop, EMBL-Umweltkammer.

2.2. Methoden

2.2.1. **Arbeiten mit Bakterien**

2.2.1.1. Kultur von Bakterien

Escherichia coli wurde auf Luria-Bertani (LB)-Platten oder LB-Flüssigmedium bei 37°C kultiviert. Dem Medium wurde optional das jeweilige Antibiotikum zugegeben.

LB-Flüssigmedium 20 g/l Lennox-L-Medium

LB-Platte 32 g/l Lennox-L-Agar

Helicobacter pylori wurde auf Serumplatten kultiviert, die gegebenenfalls mit Antibiotika versetzt worden waren. Flüssigkulturen wurden in Brucella-Medium angesetzt, die je nach Bedarf mit 10% FCS, 2 g/l Heptakis oder Cholesterol (1:250, Gibco) supplementiert wurden. Alle *H. pylori*-Kulturen wurden bei 37°C in einer Atmosphäre aus 85% N₂, 10% CO₂ und 5% O₂ inkubiert. Dafür wurden entweder Anaeroben-Brutschränke oder Anaerobentöpfe verwendet.

Serumplatten 36 g/l GC-Agar-Base, nach dem Autoklavieren Zugabe von 10 ml/l Vitamin-Mix, 80 ml/l Pferdeserum, 10 mg/l Vancomycin, 5 mg/l Trimethoprim, 1 mg/l Nystatin

Vitamin-Mix 100 g/l α-D-Glucose, 10 g/l L-Glutamin, 26 g/l L-Cystein, 0,1 g/l Cocarboxylase, 20 mg/l Fe(III)-Nitrat, 3 mg/l Thiamin, 13 mg/l p-Aminobenzoesäure, 0,25 g/l Nicotinamidadenindinucleotid (NAD), 10 mg/l Vitamin B12, 1,1 g/l L-Cystin, 1 g/l Adenin, 30 mg/l Guanin, 0,15 g/l L-Arginin, 0,5 g/l Uracil

Brucella-Medium 28 g/l Brucella Broth

2.2.1.2. Herstellung chemisch-kompetenter Zellen (85)

Zur Herstellung von Zellen für die chemische Transformation wurden 100 ml LB-Medium mit 5 ml Übernacht-Kultur von *E. coli* angeimpft und bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5-0,6 inkubiert. Die Zellen wurden 5 min auf Eis gekühlt, nach Zentrifugation (2300 x g, 15 min, 4°C) das Sediment in 20 ml TfbI resuspendiert und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (2300 x g, 15 min, 4°C), in 4 ml TfbII

resuspendiert und nach 15 min Inkubation auf Eis in Aliquots von 50-100 µl abgefüllt, auf Trockeneis schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Tfbl 30 mM Ka-Acetat, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% Glycerin, pH 5,8

TfbII 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% Glycerin, pH 6,5

2.2.1.3. Transformation chemisch-kompetenter Zellen

Chemisch kompetente Zellen wurden von -70°C auf Eis aufgetaut, 1-2 µl Plasmid-DNA zugefügt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 s bei 42°C und anschließender Inkubation auf Eis wurden 500 µl LB-Medium zu den Transformationen zugegeben. Diese wurden für 1 h bei 37°C geschüttelt und im Anschluß die geeignete Menge des Ansatzes auf Selektionsplatten ausplattiert. Die Ansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.4. Transformation von *E. coli* Top10-Zellen

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

2.2.2. **Arbeiten mit DNA**

2.2.2.1. DNA-Gelelektrophorese

Die analytische Auftrennung von DNA erfolgte mit Agarosegele mit einer Agarosekonzentration von 0,8-1,5% (in 1 x TAE-Puffer) eingesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit ¼ Volumen GEBS-Puffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in Horizontalgelkammern mit 1 x TAE-Puffer bei 100 V. Nach der Auftrennung der Proben wurde die DNA mit Ethidiumbromid (1 mg/l) angefärbt und durch UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurde ein Videosystem benutzt.

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

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

2.2.2.2. Restriktion

DNA-Restriktionen wurden üblicherweise mit Restriktionsenzymen von Roche und dem dazugehörigen Puffersystem durchgeführt. Analytische Restriktionen wurden mit 1 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt. Die Puffer- und Inkubationsbedingungen für die verschiedenen Restriktionsenzyme wurden nach den Hersteller-Angaben gewählt. Bei Zweifach-Restriktionen mit Enzymen, die unterschiedliche Puffer benötigen, wurde zwischen den beiden Restriktionen eine Zentrifugationsentsalzung durchgeführt.

2.2.2.3. Isolierung von Plasmid-DNA mit Qiagen-Säulen

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

2.2.3. **Arbeiten mit Protein**

2.2.3.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe wurden 100 µl der Probe (gegebenenfalls verdünnt in PBS) mit 1 ml Bradfordreagenz versetzt und nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur die Extinktion der Probe bei 595 nm gegen einen entsprechenden Nullwert gemessen. Für jede Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit bekannten BSA-Konzentrationen aufgenommen.

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

2.2.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde das vertikale Gelelektrophoresesystem von Biorad benutzt. Trenn- und Sammelgele wurden nach Sambrook *et al.* (168) angesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben erfolgte bei einer Spannung von 100-120 V. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe Western Blot) oder mit Coomassie Brilliant Blue für 30 min gefärbt. Das Gel wurde so lange in der Entfärbelösung inkubiert, bis die Proteine deutlich sichtbar waren.

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

Coomassie-Lösung	0,275% Coomassie Brilliant Blue R250, 50% Methanol, 10% Essigsäure
Entfärbelösung	10% Methanol, 10% Ethanol, 7,5% Essigsäure

2.2.3.3. Reversible Färbung von Proteinen mit Silbernitrat

Proteine wurden mittels Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und über Nacht mit 40% Ethanol/10% Acetat fixiert. Die Gele wurden im Anschluss 2 x 10 min in 10 % Ethanol geschüttelt. Nach Waschen mit H₂O_{dest.} für 2 x 5 min und 3 x 10 min, wurden die Gele 2,5 min mit Puffer I inkubiert. Im Anschluss folgten weitere Waschschritte mit H₂O_{dest.} für 1 x 8 min, 2 x 5 min und 2 x 10 min. Die Gele wurden nun 30 min in Puffer II geschüttelt. Nach zweimaligem kurzem Waschen in H₂O_{dest.} wurden die Gele für 5 min in Puffer III inkubiert und im Anschluss so lange mit Puffer IV entwickelt, bis die gewünschte Färbung der Proteine erreicht war. Die Reaktion wurde mit Puffer V gestoppt. Die Gele wurden digitalisiert und die entsprechenden Protein-Banden ausgeschnitten. Die Entfärbung der Proteine erfolgte durch einlegen der Gelfragmente in Entfärbelösung (Lösung 1 + Lösung 2; 1:1) bis sie farblos wurden. Im Anschluss wurden sie 3 x 30 min mit H₂O_{dest.} gewaschen.

Puffer I:	0,15% Ka-Hexacyanoferrat (III), 0,3% Na-Thiosulfat, 0,05% Na-Carbonat
Puffer II:	0,1 % AgNO ₃
Puffer III	2,5% Na-Carbonat
Puffer IV	2,5% Na-Carbonat, 0,02% Formaldehyd
Puffer V	1% Glycerin
Lösung 1:	1,5 M Natriumthiosulfat
Lösung 2:	0,15 M Kupfersulfat, 0,6 M NaCl, 0,9 M Ammoniak

2.2.3.4. Transfer von Proteinen auf Membran

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Halbtrockenblotverfahren mit Hilfe einer Elektrobloßapparatur auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Kontakt zwischen Kathode und PAA-Gel bzw. Anode und Nitrocellulose- oder PVDF-Membran erfolgte durch je zwei dicke und dünne Filterpapiere, die in Western Transfer Puffer getränkt wurden. Der Proteintransfer wurde bei 1,25 mA/cm² für 75 min durchgeführt.

Western Transfer Puffer 192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% Methanol, 0,1% SDS, pH 8,3

2.2.3.5. Detektion von Proteinen mittels Antikörper

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF- oder Nitrocellulosemembran wurden die nicht besetzten Bindungsstellen auf der Membran für mindestens eine Stunde in AP abgesättigt. Anschließend wurde das jeweilige Antiserum je nach Titer um Faktor 1000-5000 in VP verdünnt und mit der Membran über Nacht bei 4°C rollend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 Minuten mit TTBS wurde die Membran mit einem Peroxidase-gekoppeltem Antikörper in VP (1:10000) für 30 min inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TTBS erfolgte die Entwicklung mit ECL™ Western Blot Detektionsreagenzien (Amersham). Die Sichtbarmachung der Antikörper-markierten Proteine erfolgte mit Hilfe von Röntgenfilmen.

TBS 150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5

TTBS TBS, 0,05% Tween20

AP 50 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 0,1% Tween20, 5% Magermilchpulver, pH 7,4

VP 10 mM Tris/HCl, 170 mM NaCl, 0,2% Tween20, 1% Magermilchpulver, pH 7,4

2.2.3.6. Aufkonzentrierung von Bakterien-Kulturüberständen

H. pylori-Flüssigkulturen wurden mit $OD_{550} = 0,1$ angeimpft und zwei Tage bei leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (2500 x g, 20 min, 4°C) und die Überstände durch einen Sterilfilter (0,2 µm Porengröße) filtriert. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden durch Versetzen mit dem gleichen Volumen gesättigter $(NH_4)_2SO_4$ -Lösung ausgefällt. Die Proteine wurden durch Zentrifugation im SS34-Rotor (20 min, 20000 x g, 4°C) sedimentiert und das erhaltene Präzipitat in 1 ml PBS aufgenommen. Zur Entfernung des Ammoniumsulfats wurden die Proben über Nacht gegen PBS dialysiert.

2.2.3.7. Anreicherung von VacA aus *H. pylori* Kulturüberstand

H. pylori Stamm 60190 bzw. 60190 Δ6-27 wurde in Brucella-Medium mit 2 g/l Heptakis oder Cholesterin (1:250; Gibco) unter mikroaerophilen Bedingungen (10% CO₂ / 85% N₂ / 5% O₂) bei 37°C kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde zentrifugiert (6000 rpm, 20 min, 4°C) und der Kulturüberstand sterilfiltriert (Steritop, Amicon). Proteine wurden mittels Ammoniumsulfat (44% Endkonzentration) über Nacht bei 4°C unter leichtem Rühren präzipitiert. Im Anschluß wurden die gefällten Proteine bei 10000 rpm für 30 min (4°C) sedimentiert, in 15-30 ml PBS resuspendiert und, um eine ausreichende Löslichkeit zu gewährleisten, die Ansätze über Nacht bei 4°C inkubiert. Für die anschließende Gelfiltration

wurde das Volumen mit einer Filtrationseinheit (100 kDa Ausschlußgröße) auf 4 ml eingengt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte entsprechend ihrer Größe über Gelfiltration. Dazu wurde eine Sephacryl S300 16/60-Säule verwendet, deren Auftrennungsvermögen zwischen 100-1000 kDa liegt. Für die Chromatographie wurde entweder die HPLC Äkta oder eine FPLC (Amersham) mit 100 mM NaCl, 50 mM NaPO₄ (pH 7,4) als Laufpuffer verwendet. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Färbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue und Western Blot-Analyse auf den Grad der Anreicherung getestet. VacA in den Fraktionen wurde mit einer Filtrationseinheit (100 kDa Ausschlußgröße) auf eine Proteinkonzentration von 0,5-1 mg/ml eingengt. Die Qualität der VacA-Anreicherung wurde durch Vakuolisierung von Jurkat bzw. HeLa Zellen, sowie IL-2-Inhibition kontrolliert.

Gereinigtes VacA wurde durch Zugabe von 0,2 Volumen 0,3 M HCl angesäuert, für 20 min bei 37°C inkubiert und vor Verwendung mit 0,2 Volumen 0,3 M NaOH neutralisiert. Diese so genannte „Säureaktivierung“ wurde standardmäßig vor jedem Experiment durchgeführt.

2.2.3.8. Markierung von VacA und Antikörpern

Angereichertes VacA (Kapitel 2.2.3.7.) wurde durch kovalente Bindung des Fluoreszenz-Farbstoffes Alexa Fluor 488 oder Alexa Fluor 555 (Molecular Probes) an primäre Aminogruppen markiert. Die Reaktion erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. VacA wurde dafür mit PBS auf ~200 µg/ml verdünnt und der pH-Wert durch Zugabe von 1/10 Volumen 1 M Na-Carbonat (Endkonzentration 0,1 M) auf pH ~8 eingestellt. Je Reaktion wurden 0,25 mg Alexa Fluor-Succinimidyl Esther, gelöst in 25 µl DMSO, zugegeben und für 1,5 h bei Raumtemperatur rollend inkubiert. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln. Ungebundener Farbstoff wurde durch Dialyse gegen 1 x PBS über Nacht (4°C) entfernt. Die Proteinkonzentration von Fluoreszenz-markiertem VacA (VacA-Alexa) erfolgte mittels Bradford-Proteinbestimmung. Der Markierungsgrad wurde nach Angaben des Herstellers photometrisch bestimmt und lag durchschnittlich bei 15-20 mol Alexa Fluor pro mol VacA. Die Funktionalität von markierten VacA wurde durch Vakuolisierung von Jurkat T-Zellen bestimmt. Die Kopplung von Biotin an VacA erfolgte entsprechend den Herstellerangaben (Pierce). Der Erfolg der Markierung wurde mittels Western Blot-Analyse durch Nachweis von Biotin mit Streptavidin-HRP kontrolliert.

Der CD11a-spezifische monoklonale Antikörper YTH81.5 (serotec) und CD18 spezifische monoklonale Antikörper IB4 (Axxora) wurden, wie für VacA beschrieben (siehe oben), mit

Alexa Fluor 488 markiert. Der Markierungsgrad betrug 10-15 mol Alexa Fluor 488 pro mol VacA.

2.2.3.9. Membranpräparation

Zellen ($2,5 - 5 \times 10^7$) zur Präparation der Zellmembran wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Zentrifugation für 5 min bei 200 x g wurden die Zellen in 1,5 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA, 200 mM Saccharose und Protease-Inhibitoren PMSF (1 mM), Pepstatin (1 μ M) und Leupeptin (1 μ M) resuspendiert. Die Zell-Lyse erfolgte mit Ultraschall. Zell-Fragmente wurden durch Zentrifugation bei 900 x g für 10 min (4°C) entfernt. Der Überstand wurde für 75 min bei 45000 rpm (4°C) zentrifugiert (TLA100.3 Rotor, Optima TL Ultrazentrifuge, Beckman) und das Sediment (Membran) in 50 mM Na-Phosphat Puffer (pH 7.5), 150 mM NaCl, PMSF (1 mM), Pepstatin (1 μ M) und Leupeptin (1 μ M), 0,5% NP-40 resuspendiert. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurde die Präparation für 10 min bei 13000 rpm (4°C) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt.

2.2.3.10. Präzipitation von VacA-Biotin

Präparierte Membranen (Kapitel 2.2.3.9) verschiedener Zelllinien wurden zur Präzipitation von CD18 mit VacA-Biotin verwendet. Dazu wurde die Membran mit 50 mM Na-Phosphat (pH 7,5), 150 mM NaCl (PMSF, Pepstatin, Leupeptin) auf eine Konzentration von 800 μ g/ml und Endvolumen 500 μ l verdünnt. Die NP40-Konzentration wurde auf 0,1% eingestellt. Im Anschluß wurden je 1 μ g VacA, VacA-Biotin, CtxB-Biotin oder Transferrin-Biotin zugegeben und über Nacht bei 4° rotierend inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm um ausgefallene Komplexe zu entfernen, wurden 20 μ l Neutravidin-Sepharose (Pierce) zugegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Ansätze wurden 3 x mit je 0,5 ml 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, PMSF, pepstatin, leupeptin, 0,1% NP-40 gewaschen. Die Sepharose wurde mit 20 μ l 2 x Auftragspuffer (nicht reduzierend) versetzt, für 5 min gekocht und die Proteine mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.3.2.) aufgetrennt.

2.2.3.11. Kopplung von Antikörper an Latexkugeln

Um CD4⁺ T-Lymphozyten zu aktivieren, wurden Latexkugeln (Polysciences) mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3 und CD28 gekoppelt. Dafür wurden 5×10^7 Kugeln in

15 ml eiskaltem PBS resuspendiert und für 1,5 h bei 37°C mit 5 µg anti-CD3 Antikörper und 20 µg anti-CD28 Antikörper schüttelnd inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 8750 x g (4°C) wurden nicht besetzte Bindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur mit 10 ml RPMI / 10% FCS abgesättigt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Kugeln in RPMI / 10% FCS auf eine Dichte von 1×10^5 Kugeln pro µl resuspendiert. Zur Aktivierung von primären CD4⁺ T-Lymphozyten wurden 1,5 Kugeln pro Zelle verwendet.

2.2.4. Arbeiten mit Zellen

2.2.4.1. Kultur von HeLa Zellen

HeLa Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS kultiviert. Bevor die Zellen einen konfluenten Rasen gebildet hatten, wurden sie verdünnt und in eine neue Zellkulturflasche umgesetzt. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend einige Minuten mit 3 ml Trypsinlösung bei 37°C und 5% CO₂ behandelt. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Sobald alle Zellen vom Flaschenboden abgelöst waren, wurde das Trypsin durch Zugabe von 5 ml DMEM-Medium mit 10% FCS inaktiviert. Ein Teil der Zellen wurde dann in eine frische Flasche mit DMEM / 10% FCS umgesetzt. Die frische Kultur wurde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.4.2. Kultur von Jurkat, Raji und EL4 Zellen

Die Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden alle zwei Tage 1:4 (Jurkat, Raji) bzw. 1:6 (EL4) verdünnt. Da die Zellen nicht adhärent wachsen, wurden sie zur Entfernung des alten Mediums und bei Waschschritten fünf Minuten bei 200 x g abzentrifugiert.

2.2.4.3. Aufreinigung peripherer Blutlymphozyten (PBLC) und humaner CD4⁺ T-Lymphozyten

PBLC wurden über Dichtegradienten-Zentrifugation aus humanem Blut isoliert. Hierzu wurde frisch entnommenes, heparinisiertes Blut mit 3 Volumen PBS verdünnt. Zur Auftrennung wurde 15 ml einer Ficoll-Lösung (Dichte 1,077) mit je 35 ml verdünntem Blut überschichtet. Nach der Zentrifugation (400 x g, 40 min, ohne Bremse, Heraeus Megafuge 1.0R) wurde die an der Phasengrenze entstandene Bande aus Lymphozyten, Monozyten und Blutplättchen abgenommen und die Zellen einmal mit 50 ml PBS / 2 mM EDTA (4°C) gewaschen. Zur

Abtrennung der Blutplättchen wurden die Zellen zweimal mit PBS / 2 mM EDTA gewaschen und bei 300 x g zentrifugiert, wobei die Blutplättchen im Überstand bleiben. Die Präparation von CD4⁺ T-Zellen erfolgte durch positive Selektion mit dem MACS-System. Dazu wurden die erhaltenen PBLC gezählt und mit einer Zelldichte von 1 x 10⁷ Zellen / 80 µl in MACS-Puffer aufgenommen. Pro 1 x 10⁷ Zellen wurden 20 µl MACS-CD4-MicroBeads (Miltenyi Biotec) zugegeben und die Zellen 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem 20fachen Volumen an MACS-Puffer gewaschen und zum Auftragen auf die mit MACS Puffer äquilibrierte Säule (Typ LS) in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen. Nachdem die Zellsuspension durch die Säule getropft war, wurde die Säule zweimal mit 4 ml MACS-Puffer gewaschen. Zur Elution wurde die Säule aus der Magnethalterung genommen und die Zellen mit 3 ml MACS-Puffer eluiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 200 x g wurden die Zellen in 5 ml RPMI / 10% FCS resuspendiert, gezählt und auf eine Zelldichte von 1 x 10⁶ Zellen pro ml eingestellt.

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

2.2.4.4. Isolation von CD4⁺ T-Zellen aus der Milz von Mäusen

Die Milzen wurden von BALB/c oder C57BL/6 Mäusen präpariert und mittels sterilen Mörser in 3 ml PBS / 2 mM EDTA homogenisiert. Die Suspension wurde durch ein Zellsieb der Porengröße 40 µM (BD Falcon) von Geweberückständen befreit und 2 zweimal mit PBS / 2 mM EDTA gewaschen. Nach Zentrifugation für 10 min bei 300 x g wurden die Zellen in 1 ml PBS / 2 mM EDTA, 0,5% BSA resuspendiert. Im Anschluß wurde wie in 2.2.4.3. verfahren. Zur Isolierung muriner T-Lymphozyten wurden MACS-CD4-Microbeads gegen murines CD4⁺ verwendet. Die Zellen wurden bei einer Dichte von 1 x 10⁶ Zellen/ml in RPMI / 10% FCS kultiviert.

2.2.4.5. In vitro-Generierung dendritischen Zellen

Dendritische Zellen wurden mittels Zytokinen von humanem Blut generiert. Dazu wurden periphere Blut-Monozyten (PBMC) bei der Aufreinigung von CD4⁺ T-Lymphozyten gewonnen (Durchlauf nach Waschschritten) und Monozyten über Plastikadhäsion angereichert. Dazu wurden PBMCs für genau 1 h bei 37°C in Zellkulturschalen inkubiert und im Anschluß 3 x mit 10 ml warmen PBS gewaschen. Die noch adherenten Zellen wurden über Nacht mit RPMI / 2% FCS inkubiert. Abgelöste Zellen wurden nun auf eine Zelldichte von 1 x 10⁶ Zellen / ml eingestellt. Die Differenzierung in dendritische Zellen erfolgt nach Angaben

der Literatur (145). Hierfür wurden die Zellen für 24 h mit GM-CSF (1000 U/ml) und IL-4 (500 U/ml) inkubiert. Um reife DCs zu erhalten wurden die Zellen für weitere 24 h mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α (1000 U/ml), IL-1 β (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml) und PGE₂ (10 μ M) inkubiert. Der Erfolg der Differenzierung wurde durch Detektion der DC-spezifischen Oberflächenmarker CD83, CD86 und MHCII mittels FACS-Analyse überprüft.

2.2.4.6. Co-Kultivierung von T-Zellen und Antigen-präsentierender Zellen (APC)

Um die Lokalisation von VacA während der Interaktion von APC und T-Zellen zu untersuchen wurden T-Zellen (Jurkat, CD4⁺ T-Lymphozyten) zusammen mit Raji Zellen (B-Lymphoma Zelllinie) oder DCs inkubiert. Eine Antigen-spezifische Aktivierung wurde durch Verwendung des Superantigens *Staphylococcus* Enterotoxin B (SSB) umgangen. Raji B-Zellen und DC wurden vor Co-Kultivierung mit T-Zellen für 0,5 h mit 2 μ g/ml SSB behandelt. VacA-Alexa wurde 4 h vor Co-Kultivierung zu Raji- oder T-Zellen gegeben. Nach 1 h wurden die Ansätze 2 x mit PBS gewaschen um überschüssiges VacA zu entfernen und für weitere 3 h inkubiert. Zur Detektion von LFA-1 wurde den Ansätzen der Fluoreszenz-markierte anti-CD11a Antikörper YTH81.5 zugegeben.

2.2.4.7. Generierung humaner LFA-1- und Mac-1-exprimierender EL4 T-Zellen

EL4 T-Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA1/Neo-CD18 und pCEP4/Hyg-CD11a bzw. pcDNA3.1_Zeo(+)-CD11b mittels Cell line Nucleofector-Kit L (Amaxa Biosystems) entsprechend den Angaben des Herstellers transfiziert. Dabei wurde das Programm C-09 verwendet. Zur Selektion der positiv transfizierten Zellen wurden die entsprechenden Antibiotika verwendet. Die überlebenden Zellen wurden subkloniert, vermehrt und auf stabile Expression der Integrin-Heterodimere und IL-2-Produktion getestet.

2.2.4.8. Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer

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

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.4.9. Transfektion von Jurkat T-Zellen

Plasmid pIL-2 *luc* wurde in Jurkat T-Zellen über Elektroporation eingebracht. Exponentiell wachsende Jurkat T-Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Zelldichte von 2×10^7 Zellen / ml in 400 μ l RPMI-Medium mit 10% FCS resuspendiert. Je nach Plasmid und Anwendung wurden 10 - 15 μ g/ml Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben. Die Transfektion erfolgte bei 250 V und 960 μ F (Gene Pulser, Biorad). Die transfizierten Zellen wurden in RPMI / 10% FCS überführt und zur Expression des transfizierten Gens für 16 - 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurden.

Plasmide mit Fluoreszenz-Fusionsproteinen wurden mittels „Cell line Nucleofector“- Kit V (Amaxa Biosystems) mit dem Programm X-01 transfiziert.

2.2.4.10. Transfektion primärer CD4⁺ T-Lymphozyten

Die Transfektion von CD4⁺ T-Zellen mit Plasmiden erfolgte mittels „Human T Cell Nucleofector“-Kit (Amaxa) nach Anleitung des Herstellers. Es wurden jeweils 1,5 μ g Plasmid verwendet. Die Transfektion erfolgte mit Amaxa Nucleofector I durch Program V-024.

2.2.4.11. Transfektion von HeLa Zellen

HeLa Zellen wurden in 6-Napf-Zellkulturschalen bis zu einer Dichte von 50-60% kultiviert und im Anschluß mit Plasmiden für Fluoreszenz-Fusionsproteine mit Fugene 6-Transfektionsreagenz (Roche) transfiziert. Dies erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.4.12. Mikroskopie

Mikroskopische Experimente wurden an dem PerkinElmer Ultraview-System mit Nikon Eclipse TE300 Mikroskop durchgeführt. Das System besitzt eine Nipkow-Scheibe („spinning disc“) zur Aufnahme konfokaler Bilder. Die Bildaufnahme erfolgt mittels Orca ER Kamera. Das Mikroskop ist von einer Umweltkammer umgeben um Parameter (Temperatur, CO₂-Konzentration und Luftfeuchtigkeit) für die „live cell“-Mikroskopie variieren zu können. Laser der Wellenlänge von 488 nm, 568 nm und 647 nm zur Anregung von Fluorophoren wurden verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels Ultraview- (PerkinElmer), Metamorph- (visitron) und ImageJ-Software (freeware).

Für die Lebendzellmikroskopie wurden Zellkulturschalen mit Glasboden der Firma Mattek verwendet. Für Migrationsexperimente wurde die Oberflächen über Nacht mit 8-10 μ g/ml

rekombinantem ICAM-1/Fc (human oder murin) und VCAM-1/Fc (RnD systems) bei Raumtemperatur gekoppelt. Ungebundene Proteine wurden durch Waschen mit PBS entfernt.

2.2.4.13. Messung der Luciferase Aktivität

Jurkat T-Zellen wurden durch Elektroporation mit 15 µg pIL-2 *luc* Reporter-Plasmid transfiziert (250 V, 960 µF). 16-18 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen aliquotiert und mit VacA oder gefällten Überständen für 1 h behandelt. Die Zellen wurden mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (1 µM) für 4-5 h Stunden aktiviert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 100 µl Lyse-Puffer aufgenommen. Zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurden 50 µl des Lysats mit 50 µl Luciferase-Puffer gemischt und die emittierten Photonen im Luminometer gemessen (MicroLumat Plus LB 96V, Berthold).

Lyse-Puffer	14 g/l K ₂ HPO ₄ , 2,67 g/l KH ₂ PO ₄ , 0,74 g/l EDTA, 5 g/l BSA, 1 g/l Triton X-100, pH 7,8
Luciferase-Puffer	20 mM Tricin, 1,07 mM (MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ , 0,1 mM EDTA, 33,3 mM DTT, 270 µM Li ₃ -CoenzymA, 470 µM Luciferin, 530 µM Mg-ATP, pH 7,8

2.2.4.14. Adhäsion von CD4⁺ T-Lymphozyten

CD4⁺ T-Lymphozyten wurden wie in Abschnitt x beschrieben isoliert und über Nacht mit 10 nM PMA stimuliert. Die Markierung der Zellen mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Calcein-AM (Molecular Probes) erfolgte durch Inkubation mit 10 µM Calcein-AM für 30 min bei 37°C. Nach 2 x waschen mit PBS wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an VacA oder monoklonalem Antikörper gegen CD18 (IB4) für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Ansätze wurden zentrifugiert und mit PBS / 4 mM MgCl₂ auf eine Konzentration von 4 x 10⁶ Zellen / ml resuspendiert. Je 100 µl (4 x 10⁵ Zellen) wurden in die Vertiefungen einer 96-Napf Platte (Maxisorb, Nunc) gegeben. Die Platten wurden zuvor mit 8 µg/ml rekombinanten humanen ICAM-1/Fc (RnD) für 2 h bei 37°C gekoppelt. Überschüssiges ICAM-1/Fc wurde durch Waschen mit PBS entfernt und unspezifische Bindungsstellen mit PBS / BSA (20 mg/ml) für 30 min bei 37°C abgesättigt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen zugegeben. Die Platten wurden für 3 min bei 600 rpm zentrifugiert um eine schnellere Bindung der Zellen zu ermöglichen. Die Gesamtfluoreszenz wurde im Anschluß bei einer Wellenlänge von 488 nm mittels Fluoreszenz-Plattenlesegerät (CytoFluor 4000, Perseptive Biosystems) bestimmt. Nach Adhäsion für 20 min bei 37°C wurde das Medium abgesaugt

und die Zellen einmal mit vorgewärmten PBS / MgCl₂ (4 mM) gewaschen. Die Fluoreszenz wurde bestimmt und als Teil der Gesamtfluoreszenz von Zeitpunkt 0 bestimmt.

2.2.4.15. Messung der IL-2-Produktion von T-Zellen mittels „sandwich“-ELISA

Zellen wurden 1 h mit PMA vorstimuliert und im Anschluß mit 250 µg/ml gefällttem Bakterien-Kulturüberstand oder 500 ng/ml VacA inkubiert. Alternativ wurden die Zellen mit 250 ng/ml Zytokin SDF-1 (CCL12) oder Exodus-2 (CXCL21) gleichzeitig mit VacA-Zugabe aktiviert. Nach 1 h wurden die Zellen mit 50 ng/ml PMA und 1 µM Ionomycin oder CD3/CD28-Latexkugeln aktiviert. 12-16 Stunden nach Aktivierung wurden die Zellen abzentrifugiert und die Überstände zur Messung der IL-2-Konzentration im ELISA eingesetzt oder zunächst bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der IL-2-Konzentration in den Zellkulturüberständen erfolgte mit dem OptEIA® Human oder Maus IL-2 Set (BD Pharmingen) nach Anleitung des Herstellers.

2.2.4.16. Quantifizierung der VacA-induzierten Vakuolisierung

Zellen ($2,5 \times 10^5$) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von säureaktivierten VacA für 4 h inkubiert. Im Anschluß wurde NH₄Cl mit einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben und die Ansätze für 0,5-1 h inkubiert. Vakuolisierung wurde mittels Neutralrot-Färbung quantifiziert. Dazu wurden die Zellen zentrifugiert und mit 0,008% Neutralrot in RPMI / 10% FCS für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 2 x waschen mit je 1 ml PBS 0,5% BSA wurde Neutralrot mit 70% Ethanol und 0,37% HCl extrahiert und die Ansätze in 96-Napf-Platten übertragen. Neutralrot wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 534 nm (Referenz: 405 nm) quantifiziert (Tecan Sunrise).

2.2.4.17. Quantifizierung der VacA-Aufnahme

Zur Quantifizierung der Aufnahme von VacA in Zellen wurde VacA-Alexa488 verwendet. Die Zellen wurden mit RPMI / 10% FCS auf eine Dichte von 5×10^5 Zellen pro ml eingestellt. Entsprechend den Versuchen wurden die Zellen für 30 min bei 37°C mit 10 nM PMA stimuliert. Im Anschluß wurden, wenn erforderlich, für 20-30 min die entsprechenden Inhibitoren zugegeben. Je Bedingung wurden 500 µl Zellen ohne und mit 1 µg/ml VacA-Alexa488 für 30-40 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluß in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und alle folgenden Schritte auf Eis durchgeführt, um eine weitere

Aufnahme von VacA zu unterbinden. Die Ansätze wurden für 6 min bei 2800 rpm in einer Tischzentrifuge (4°C) zentrifugiert und zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Danach wurde das Sediment in je 400 µl PBS mit 4 µg anti-Alexa488 Antikörper resuspendiert und für 30 min im Kühlschrank unter mehrmaligem schütteln inkubiert. Dadurch wurde die Fluoreszenz der noch an der Oberfläche gebundenen VacA-Moleküle unterdrückt. Die Proben wurden mittels FACS-Analyse untersucht. Für die Quantifizierung wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität verwendet.

2.2.4.18. Quantifizierung der VacA-Bindung an Zellen

Zur Quantifizierung der Bindung von VacA wurde Fluoreszenz-markiertes VacA verwendet. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen mit den entsprechenden Inhibitoren für 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurden 500 µl Zellen (5×10^5 Zellen/ml) ohne und mit 1,5 µg/ml VacA-Alexa488 für 30 min im Kühlschrank inkubiert. Die Ansätze wurden zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen und die Zellen mittels FACS analysiert. Die Quantifizierung erfolgte anhand der mittleren Fluoreszenzintensität.

2.2.4.19. Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeit von CD4⁺ T-Zellen

CD4⁺ T-Lymphozyten wurden für 1 h mit 10 nM PMA stimuliert. Im Anschluß wurde das Medium gewechselt und die Zellen über Nacht bei 37°C in Zellkulturschalen inkubiert. 250 µl der aktivierten T-Zellen (1×10^6 /ml) wurden für 30 min auf ICAM-1- bzw. VCAM-1-gekoppelte Glasboden-Schalen (Mattek) gegeben. Nicht gebundene Zellen wurden im Anschluß mit RPMI / 10% FCS abgewaschen. Je Ansatz wurde kein, 1 µg/ml, oder 5 µg/ml VacA-Alexa488 zugegeben und unterschiedlich lang (3 h, 24 h, 48 h) inkubiert. Die Zellen wurden mittels „live cell“-Mikroskopie (40x Vergrößerung) über einen Zeitraum von 5 min mikroskopiert, wobei alle 4 Sekunden Phasenkontrast-Aufnahmen gemacht wurden. Am Ende der Aufnahme wurde im Fluoreszenz-Kanal (488 nm) die Lokalisation von VacA-Alexa488 überprüft. Je Ansatz und Zeitpunkt wurden 3 verschiedenen Bereiche mikroskopiert und alle T-Zellen je Bereich (15-30 Zellen) verfolgt. Nur T-Zellen mit eindeutiger Aufnahme von VacA wurden quantifiziert. Die Bestimmung der Migrations-Geschwindigkeit (µm/min) erfolgte mittels Metamorph-Software (Visitron).

2.2.4.20. Statistische Auswertung

Alle Werte sind Mittelwerte +/- Standardabweichung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student t-Test oder Mann-Whitney U-Test bestimmt und ist für das entsprechende Experiment angegeben. Die Werte sind in beiden Fällen normalverteilt und zweiteilig.

3. Ergebnisse

3.1. Anreicherung von VacA aus Kulturüberstand und Modifizierung

Das vakuolisierende Cytotoxin VacA wird von *H. pylori* als Prä-Protoxin produziert und nach Export über die innere Membran durch einen Autotransporter über die äußere Membran sekretiert (Abb. 1). Das reife Toxin (95 kDa) oligomerisiert nach Abspaltung von der Autotransporter-Domäne zu dodecameren Komplexen, die in ihrer Form einer Blüte ähneln (32). Die Bildung dieser hochmolekularen Strukturen der Masse von ~1 MDa macht man sich zur Reinigung von VacA aus dem Kulturüberstand zunutze. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde VacA aus *H. pylori*-Kulturüberstand angereichert und mit Fluoreszenzfarbstoffen und Biotin funktionell modifiziert. Dies ermöglicht die Verwendung von VacA für die „live cell“-Mikroskopie und biochemische Ansätze.

3.1.1. **Chromatographische Auftrennung von VacA mit Gelfiltration**

Zur Anreicherung von VacA wurde der *H. pylori* Stamm 60190 verwendet, da dieser Stamm große Mengen VacA des Typs s1/m1 produziert. Für die Präparation wurde *H. pylori* 60190 in Brucella-Medium kultiviert, wobei die für das Wachstum von *H. pylori* essentiellen Zusätze Heptakis (2 g/l) oder synthetisches Cholesterin (1:250) zugegeben wurden. Proteine im Kulturüberstand wurden mittels Ammoniumsulfat gefällt und der hochmolekulare VacA-Komplex über Gelfiltration (Sephacryl S300-Säule) aufgereinigt. Ein typisches Chromatogramm ist in Abb. 3 zu sehen. Die blaue Kurve entspricht der Absorption bei 280 nm und somit der Proteinmenge. Deutlich ist dabei eine Zunahme der Absorption der Fraktionen A2-A6 zu erkennen. Die Proteine dieser Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt (Abb. 3). VacA ist als Signal bei ~100 kDa zu erkennen und verteilt sich, der Kurve im Chromatogramm entsprechend, auf alle Fraktionen.

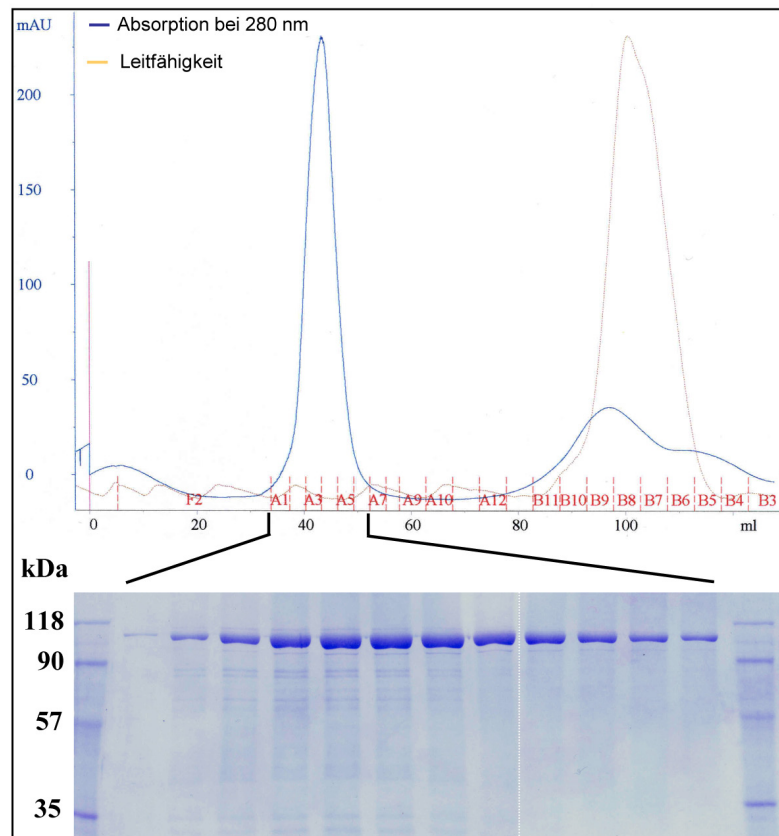


Abb. 3: Chromatogramm einer Gelfiltration zur Aufreinigung von VacA aus dem Kulturüberstand von *H. pylori* 60190.

Zur Reinigung von VacA wurden die Proteine im Überstand einer *H. pylori*-Kultur mit Ammoniumsulfat (44%) gefällt und im Anschluss mittels Gelfiltration (Sephacryl S300-Säule) aufgetrennt. Die Protein-Menge wird durch die Absorption bei 280 nm wiedergegeben (blaue Kurve). Proteine der Fraktionen A1-6 wurden mittels SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. VacA ist als Signal bei ~100 kDa erkennbar. Die Fraktionen mit der besten VacA-Anreicherung wurden vereint.

Die Fraktionen mit dem besten VacA/Fremdprotein-Verhältnis wurden vereint und mit Filtrationseinheiten konzentriert. In Abb. 4 ist eine typische VacA-Präparation, angefärbt mit Coomassie Brilliant Blue (Abb. 4 A) und Silbernitrat (Abb. 4 B), dargestellt. Es befinden sich neben VacA noch VacA-Spaltprodukte und andere Proteinkontaminationen in der Präparation. Für die weitere Verwendung von VacA ist der Grad der Toxin-Anreicherung jedoch ausreichend. Die Toxin-Aktivität jeder VacA-Präparation wurde durch Vakuolisierung und Inhibition der IL-2-Expression von Jurkat T-Zellen überprüft.

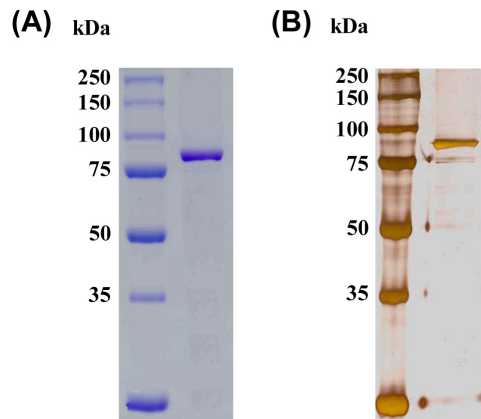


Abb. 4: SDS-PAGE einer VacA-Präparation angefärbt mit Coomassie Brilliant Blue und Silbernitrat.

Fractionen einer Gelfiltration von gefällten VacA-Kulturüberstand wurden vereint und mit Filtrationseinheiten konzentriert. Um die Effizienz der Reinigung zu kontrollieren wurde ein Aliquot der Probe mit SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue (A) und Silbernitrat (B) angefärbt. Es wurden 500 ng (A) bzw. 25 ng (B) Protein pro Spur aufgetragen.

3.1.2. Kovalente Markierung von VacA

Eine Möglichkeit Proteine zu modifizieren besteht darin, chemische Gruppen kovalent an Aminosäure-Seitengruppen zu binden. Dazu eignen sich Succinimidyl-Ester, die unspezifisch mit primären Aminogruppen reagieren. Kommerziell erhältliche Fluoreszenz-Moleküle mit unterschiedlichen Spektren (Alexa Fluor), sowie Biotin wurden über Succinimidyl-Ester kovalent an VacA gebunden. Die Reaktion erfolgte unter leicht basischen Bedingungen (pH 8) und wurde für jede Art von Modifikation optimiert. Ungebundene Moleküle wurden durch Dialyse entfernt. Der Markierungsgrad lag für Fluoreszenz-Moleküle bei ~ 15 -20 mol pro mol VacA bzw. ~ 5 mol pro mol VacA für Biotin. Die Aktivität von modifiziertem VacA, exemplarisch mit biotinylierten VacA (VacA-Bio) gezeigt, wurde mittels Vakuolisierung von Jurkat T-Zellen bestimmt (Abb. 5). Die Funktionalität wurde durch die Modifikationen nicht beeinträchtigt, wie beim Vergleich der Vakuolisierung mit unmodifizierten VacA ersichtlich ist.

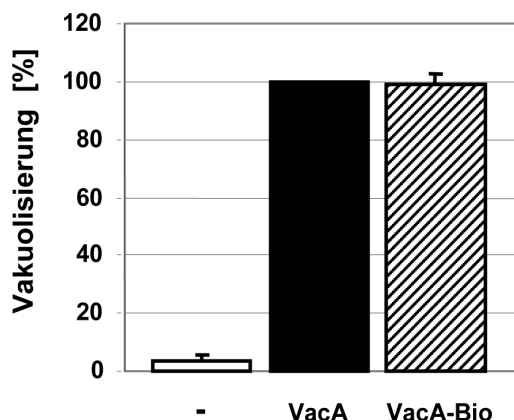


Abb. 5: Vakuolisierung von Jurkat T-Zellen mit VacA und biotinyliertem VacA (VacA-Bio).

Gereinigtes VacA wurde durch kovalente Bindung von Biotin an primäre Aminogruppen modifiziert. Um die Funktionalität von VacA-Biotin zu kontrollieren, wurden T-Zellen für 4 h mit je $1 \mu\text{g/ml}$ VacA bzw. VacA-Bio inkubiert. Nach Zugabe von 2 mM Ammoniumchlorid für 30 min wurde die Bildung saurer Vakuolen mittels Neutralrotfärbung quantifiziert.

3.2. Identifizierung des VacA-Rezeptors von Lymphozyten

Toxine interagieren mit Proteinen und/oder anderen Membranbestandteilen auf der Oberfläche von Zielzellen. Die Bindung an spezifische Strukturen ermöglicht dabei den Zugang in das entsprechende zelluläre Kompartiment, so dass die Kenntnis des/der Rezeptor/en essentielle Einblicke in den Mechanismus von Toxinen erlaubt. Für VacA sind mit Rezeptor Protein Tyrosinphosphatase (RPTP) α und RPTP β zwei Rezeptoren für Epithelzellen beschrieben (220, 221). Da in Vorarbeiten von Bettina Gebert-Vogl RPTP α und - β als mögliche Rezeptoren von VacA auf T-Lymphozyten ausgeschlossen wurden, stand die Identifizierung des VacA-Rezeptors auf T-Zellen im Zentrum dieser Arbeit.

3.2.1. **Sensitivität aktivierter T-Lymphozyten gegen VacA**

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass VacA die Proliferation und IL-2-Expression von Jurkat T-Zellen inhibiert (20, 78, 194). VacA verhindert dabei, vermutlich auf Stufe der Ca^{2+} -abhängigen Phosphatase Calcineurin, die Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT in den Zellkern und somit die Expression von IL-2 und anderer NFAT-abhängiger Gene. Sundrud und Kollegen zeigten jedoch, dass VacA bei primären Zellen nur die Proliferation, nicht jedoch die IL-2-Expression blockiert. Der letztere VacA-Effekt konnte nur für die humane T-Zelllinie Jurkat gezeigt werden. Ein möglicher Unterschied zwischen primären CD4^+ T-Zellen und der Jurkat Zelllinie liegt in dem Status der Aktivierung. Jurkat T-Zellen teilen sich unabhängig von äußeren Signalen, ein aktiver Metabolismus ist dabei anzunehmen. Aus humanem Blut isolierte primäre T-Zellen befinden sich hingegen in einem ruhenden Zustand. Zellteilung findet nicht statt und typische Eigenschaften wie Adhäsion und Migration sind nicht zu erkennen. *In vitro* können primäre T-Lymphozyten durch Zugabe von Zytokinen, von spezifischen Antikörpern gegen den T-Zell Rezeptor (TCR; CD3) und den Co-Rezeptor (CD28) sowie mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) stimuliert werden (53). Ob eine Stimulierung primäre CD4^+ T-Zellen sensitiv gegen VacA macht, sollte im Folgenden untersucht werden. T-Lymphozyten wurden dafür über Nacht mit PMA stimuliert und im Anschluss mit konzentriertem Kulturüberstand (ccs) von *H. pylori* P12 oder P12 $\Delta vacA$ inkubiert. Die IL-2-Expression wurde durch Latexkugeln, gekoppelt mit Antikörper gegen CD3 und CD28 (im Folgenden als CD3/CD28-Latexkugeln bezeichnet), induziert. Eine Aktivierung von T-Zellen mit PMA/Ionomycin führt ebenso zur Expression von IL-2. Nach 12 h wurde die gebildete IL-2-Menge mit ELISA quantifiziert.

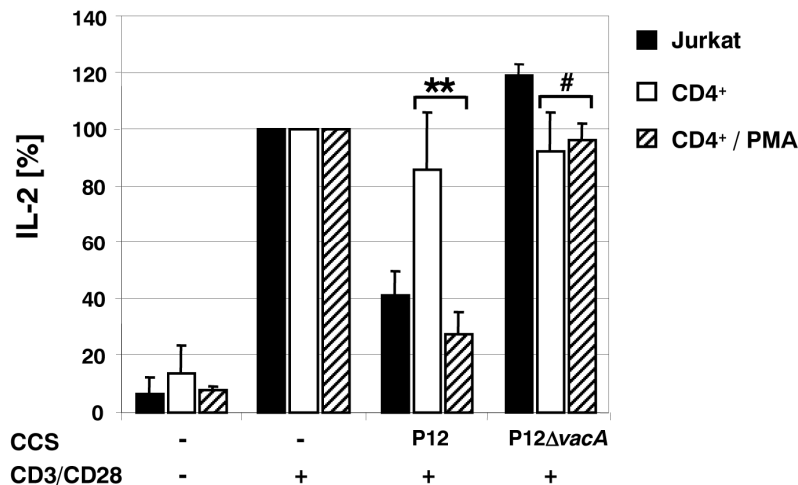


Abb. 6: Hemmung der IL-2-Expression primärer T-Lymphozyten durch VacA.

CD4⁺ T-Zellen wurden aus humanem Blut isoliert und ein Teil der Zellen über Nacht mit PMA stimuliert. Stimulierte und ruhende CD4⁺ T-Lymphozyten, sowie Jurkat T-Zellen als Kontrolle, wurden für 1 h mit konzentriertem Kulturüberstand (CCS) von *H. pylori* P12 WT sowie VacA-Mutante ($\Delta vacA$) inkubiert und im Anschluss mit CD3/CD28-gekoppelten Latexkugeln aktiviert. Gebildetes IL-2 wurde mittels ELISA quantifiziert. Die Werte stimulierter T-Zellen wurde als 100% gesetzt. Die Abbildung zeigte das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. ** ($p < 0,01$); # ($p > 0,1$; nicht signifikant).

VacA hatte im Fall der naiven, primären CD4⁺ T-Zellen keinen Effekt auf die IL-2-Expression (Abb. 6; weiße Balken). Wurden die primären Zellen jedoch vor Zugabe von P12 ccs über Nacht mit PMA stimuliert, zeigten sich die Zellen empfindlich gegenüber VacA (gestreifte Balken). Die IL-2-Expression wurde dabei auf ca. 30% reduziert und war mit der IL-2-Reduktion von VacA-behandelten Jurkat T-Zellen vergleichbar (schwarze Balken), die jedoch keine Stimulierung benötigten.

3.2.2. VacA-Aufnahme in aktivierte T-Lymphozyten

Dass eine Stimulierung mit PMA T-Lymphozyten empfindlich gegenüber einer Hemmung der IL-2-Expression durch VacA macht, kann unterschiedliche Gründe haben. So könnte die Stimulierung der T-Zellen zur Präsentation des VacA-Rezeptors auf der Oberfläche führen. Dies hätte eine verstärkte Bindung von VacA zur Folge. Da aktivierte T-Zellen generell eine erhöhte Endozytose-Rate aufweisen (67), könnte außerdem die Behandlung der Zellen mit PMA die Aufnahme des VacA/Rezeptor-Komplexes induzieren.

Ob die verstärkte Aufnahme von VacA nach Stimulierung primärer T-Zellen an der Zunahme des Rezeptors an der Zelloberfläche liegt, wurde durch Vergleich der Bindung von VacA an nicht-stimulierte und PMA-stimulierte Zellen untersucht. CD4⁺ T-Zellen, isoliert aus humanem Blut, wurden mit/ohne PMA behandelt und im Anschluss VacA-Alexa488 bei 8°C

zugegeben. Die niedrige Temperatur verhindert eine Aufnahme von VacA. Die Bindung von VacA-Alexa488 wurde mittels FACS quantifiziert. Wie in Abb. 7 zu erkennen ist, hat die Aktivierung der Zellen mit PMA keinen Einfluß auf die Bindung von VacA an die Zelloberfläche.

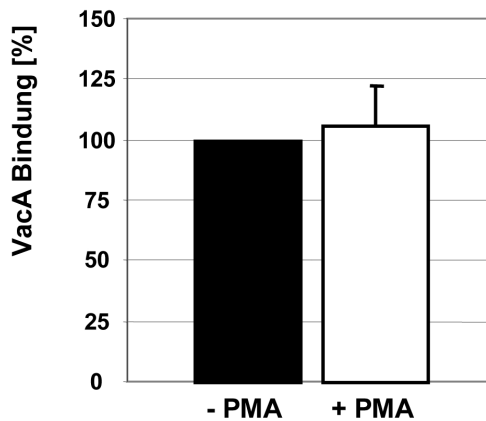


Abb. 7: Quantifizierung der VacA-Bindung PMA-stimulierter T-Zellen.

Primäre CD4⁺ T-Lymphozyten wurden aus Blut präpariert und ein Teil für 30 min mit PMA stimuliert. Je $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden mit 1 µg/ml VacA-Alexa bei 8°C inkubiert. Die Ansätze wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und die Fluoreszenz mittels FACS-Analyse quantifiziert. Der Wert unstimulierter T-Zellen wurde als 100% gesetzt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten.

Um die Folgen der T-Zell-Stimulierung mit PMA auf die zelluläre Lokalisation von VacA zu untersuchen, wurden T-Zellen mit PMA stimuliert und für 30 min mit VacA-Alexa488 inkubiert. Die Ansätze wurden im Anschluß mit „live cell“-Mikroskopie beobachtet (PerkinElmer, Ultraview).

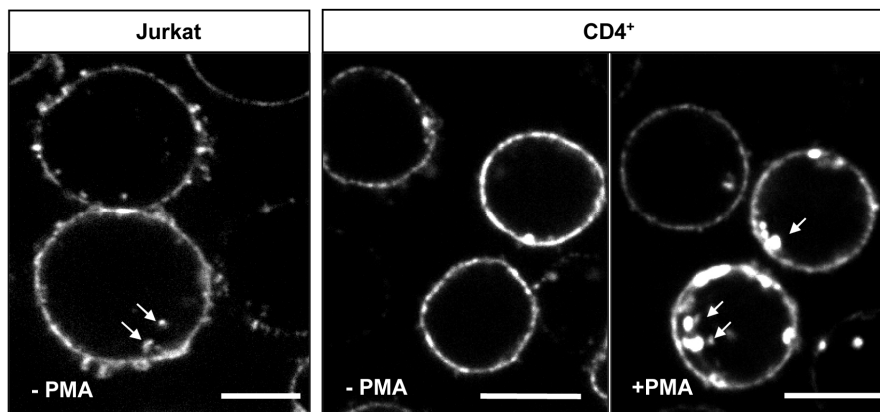


Abb. 8: Aufnahme von VacA-Alexa488 in primäre CD4⁺ T-Zellen nach PMA-Stimulierung.

CD4⁺ T-Zellen wurden mit magnetischen Kugeln, gekoppelt mit spezifischen Antikörpern gegen CD4 (MACS-System), aus humanem Blut präpariert und ein Teil für 30 min mit PMA stimuliert. VacA-Alexa (1 µg/ml) wurde zugegeben und 30 min später die Zellen mittels „live cell“-Mikroskopie beobachtet. Als Kontrolle wurden unstimulierte Jurkat T-Zellen verwendet. Aufgenommenes VacA in Vesikeln ist mit Pfeilen kenntlich gemacht. Der Balken entspricht 5 µm.

Der Vergleich unstimulierter und PMA-stimulierter Zellen ergab, dass nur PMA-behandelte Zellen VacA aufgenommen hatten (Abb. 8). VacA-Alexa488 ist dabei schon nach ca. 10 min

als sich bewegende Punkte (Daten nicht gezeigt) und nach 30 min deutlich als Ansammlung (siehe Pfeile Abb. 8) innerhalb der Zellen zu erkennen. Auch Jurkat T-Zellen konnten im selben Zeitraum VacA aufnehmen. Die Endozytose von VacA-Alexa488 war dabei jedoch, wie die Hemmung der IL-2-Expression durch VacA (Abb. 6), unabhängig von einer Vorstimulierung.

Zur Quantifizierung der Aufnahme von VacA in T-Zellen wurde eine Methode entwickelt, die VacA-Aufnahme mittels FACS-Analyse zu bestimmen. Dabei wurden T-Lymphozyten mit und ohne PMA-Stimulierung mit VacA-Alexa488 inkubiert und im Anschluß nicht-gebundenes VacA entfernt. Die Fluoreszenz von oberflächlich-gebundenem VacA-Alexa488 wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen Alexa488 unterdrückt, so dass nur aufgenommenes VacA-Alexa488 quantifiziert wurde. Die „quenching“-Effizienz mittels Antikörper lag bei ~80% (Daten nicht gezeigt). Die Fluoreszenz nicht-stimulierter T-Zellen wurde als 100% gesetzt (Abb. 9; schwarzer Balken). Es zeigt sich in Abb. 9 eine deutliche Fluoreszenz-Zunahme der PMA-stimulierten T-Lymphozyten (weisser Balken) im Vergleich mit nicht-stimulierten Zellen. Diese Methode wurde im späteren Verlauf zur weiteren Charakterisierung der VacA-Aufnahme verwendet (Kapitel 3.4.2.).

Die Stimulierung primärer T-Zellen führt somit nicht zu einer Zunahme der Bindung von VacA an die Zelloberfläche, sondern hat eine verstärkte Aufnahme zur Folge.

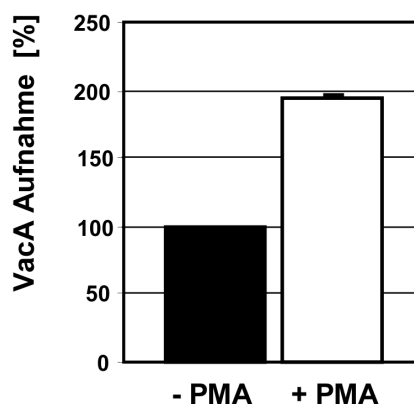


Abb. 9: Quantifizierung der VacA-Aufnahme PMA-stimulierter T-Zellen.

Humane T-Zellen wurden zum Teil mit PMA für 30 min stimuliert. Je 1,5 µg/ml VacA-Alexa488 wurde zu 500 µl Zellen ($2,5 \times 10^5$) gegeben und die Aufnahme von VacA nach 40 min mit FACS-Analyse quantifiziert. Die Fluoreszenz von extrazellulär gebundenem VacA-Alexa488 wurde mit α -Alexa488 Antikörper unterdrückt. Die Fluoreszenz nicht-stimulierter Zellen wurde als 100% gesetzt. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente dar.

3.2.3. Lokalisation von VacA am Uropodium polarisierter T-Zellen

Die Aktivierung von T-Zellen durch Chemokine oder experimentell mit PMA führt zur Adhäsion und Migration auf 2-dimensionalen Oberflächen sowie in 3-dimensionaler Collagen-Matrix (70, 98). Voraussetzung dafür ist eine Polarisierung der Zellen, mit

Ausbildung von Lamellipodien an der Zellfront und dem so genannten Uropodium im hinteren Bereich. Ein komplexes System aus Signaltransduktions-Molekülen wie Tyrosin- und Lipid-Kinasen, sekundäre Signalmoleküle und kleine GTPasen der Rho-Familie tragen zur Polarisierung bei (101). Da die Aktivierung von T-Zellen zur Aufnahme von VacA und Hemmung der IL-2-Expression führt, sollte die Verteilung von VacA auf polarisierten Zellen untersucht werden, die sich auf einer 2-dimensionalen Oberfläche fortbewegen. Primäre CD4⁺ T-Zellen wurden mit CD3/CD28-Latexkugeln aktiviert, mit VacA-Alexa488 inkubiert und im Anschluß die Migration auf einer ICAM-1-gekoppelten Oberfläche durch „live cell“-Mikroskopie beobachtet.

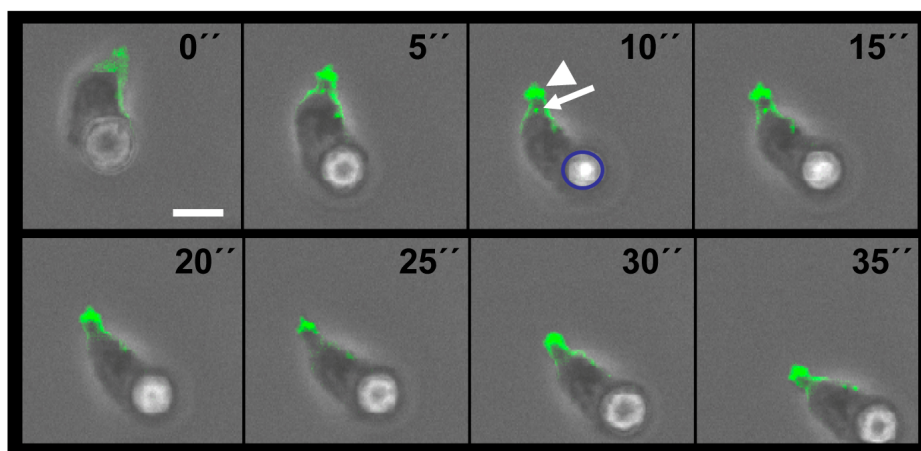


Abb. 10: Lokalisation von VacA bei migrierenden T-Lymphozyten.

Primäre CD4⁺ T-Zellen wurden mit CD3/CD28-gekoppelten Latexkugeln und im Anschluß mit VacA-Alexa inkubiert. Die Zellen wurden auf Glasbodenschälchen, beschichtet mit ICAM-1, überführt und mikroskopiert. Über einen Zeitraum von 120 s wurden alle 5 s Phasenkontrast- und Fluoreszenzbilder aufgezeichnet. In der Abbildung ist die Migration einer aktiven T-Zelle über einen Zeitraum von 35 s im Phasenkontrast/Fluoreszenz-Bild dargestellt. VacA am Uropodium ist mittels Pfeilkopf und aufgenommenes VacA mit Pfeil exemplarisch hervorgehoben. Die Latexkugel ist blau umrandet. Der Balken entspricht 5 µm.

In Abb. 10 ist die Bildsequenz einer typischen migrierenden T-Zelle über einen Zeitraum von 40 s zu sehen, wobei der Phasenkontrast- und Fluoreszenz-Kanal überlagert wurden. Deutlich ist dabei zu erkennen, dass VacA (grün) hauptsächlich am Uropodium, einer Struktur am Ende der migrierenden Zelle, konzentriert ist (Abb. 10, Pfeilkopf). Außerdem ist VacA in Vesikeln im Cytosol vorzufinden (Pfeil). Die Bilder wurden in Abständen von 5 s aufgenommen.

Weitere Experimente zeigten, dass nicht-migrierende Zellen eine fast gleichmäßige Verteilung von VacA auf der Oberfläche aufweisen. Erst eine durch PMA induzierte Aktivierung führt zur Polarisierung der Zelle und Migration auf ICAM-1. Dabei kommt es

auch zur schnellen Umlagerung von VacA zum Uropodium, was in Abb. 11 zu sehen ist. T-Zellen wurden dafür mit VacA-Alexa inkubiert und deren Migration auf ICAM-1 beobachtet.

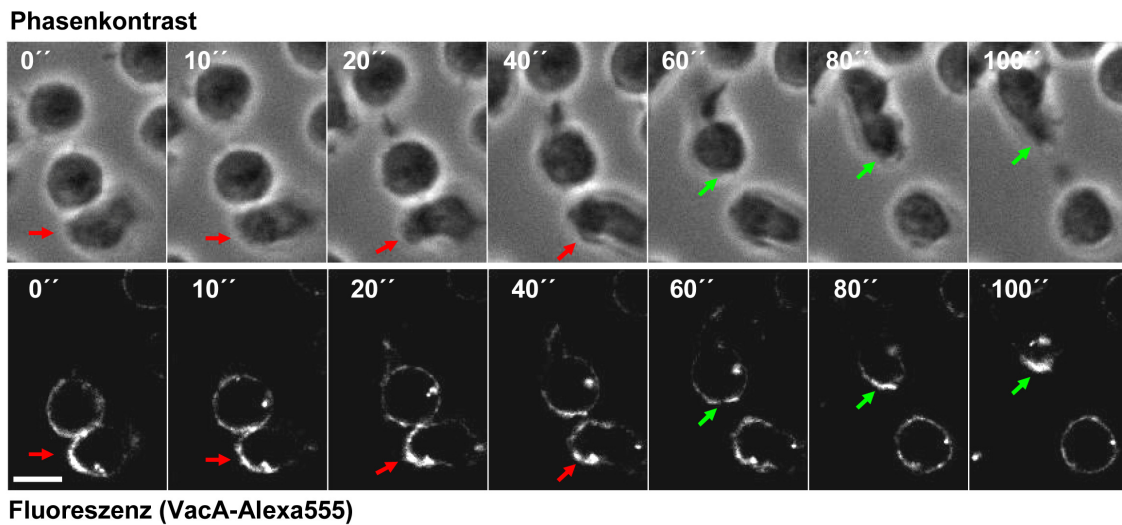


Abb. 11: Dynamik der VacA-Verteilung bei primären CD4⁺ T-Zellen.

Primäre CD4⁺ T-Zellen wurden bei 8°C mit VacA-Alexa555 inkubiert und im Anschluss nicht gebundenes VacA mit PBS entfernt. Die Zellen wurden auf Glasbodenschälchen, beschichtet mit ICAM-1, transferiert und bei 37°C mit „live cell“-Mikroskopie verfolgt. In der Abbildung ist die Bildsequenz zweier spontan aktiver T-Zellen im Phasenkontrast- (oben) und Fluoreszenzkanal (unten) zu beobachten. Die Bilder wurden in Abständen von 10 s aufgenommen. Sich am Uropodium konzentrierendes VacA-Alexa ist mit einem grünen Pfeil markiert. VacA das wieder beginnt sich gleichmäßig auf der Oberfläche der T-Zelle zu verteilen, ist mit einem roten Pfeil kenntlich gemacht. Der Balken entspricht 5 µm.

Im Fall der dargestellten Zellen in Abb. 11 handelt es sich um spontan-aktive T-Zellen, wie sie zu einem bestimmten Anteil bei jeder Präparation vorkommen. In der Bildsequenz sieht man den Übergang einer nicht-adhären, abgerundeten Zelle zur Polarisierung und Migration auf der ICAM-1-gekoppelten Oberfläche. Die obere Reihe entspricht der Phasenkontrast-Aufnahme und die untere Bildsequenz dem Fluoreszenz-Kanal für VacA-Alexa555. Die obere Zelle beginnt dabei mit der Polarisierung und Migration, die untere löst sich wieder von der Oberfläche ab. Dabei wird VacA entweder am Uropodium konzentriert (grüner Pfeil) oder verteilt sich wieder gleichmäßig über die Zelloberfläche (roter Pfeil).

3.2.4. Co-Lokalisation von VacA mit LFA-1

Eine essentielle Rolle bei der Migration von T-Lymphozyten spielen Integrine sowie deren Liganden. Das dominierende Integrin auf Lymphozyten ist das β_2 -Integrin LFA-1, bestehend aus den Untereinheiten CD18 (β_2) und CD11a (α_L). Es bindet an „intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) und vermittelt darüber den Kontakt mit der Oberfläche (190). Da die VacA-Sensitivität von T-Lymphozyten von der Aktivierung abhängt und die Lokalisation von

VacA bei migrierenden Zellen Ähnlichkeiten mit der Verteilung von LFA-1 aufweist, wurde vermutet, dass LFA-1 an der Aufnahme von VacA beteiligt sein könnte. LFA-1 verteilt sich bei migrierenden Zellen auf die Zellfront, der Kontaktzone in der Mitte der Zelle und am Zellende (Uropodium). Die höchste Konzentration von LFA-1 findet man am Uropodium der migrierenden Zellen, die dabei 5-mal höher als an der Kontaktzone zur Oberfläche ist (189). Um eine mögliche Beteiligung von LFA-1 zu überprüfen, sollte die Lokalisation von LFA-1 und VacA auf polarisierten T-Lymphozyten mikroskopisch untersucht werden. Dafür wurden die Zellen mit CD3/CD28-Latexkugeln inkubiert. Dies führt zum „Clustern“ des T-Zell- und Co-Rezeptors und simuliert die Interaktion mit einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC). Die Polarisierung der T-Lymphozyten wird damit induziert. Nach Bindung an die CD3/CD28-Latexkugeln wurde VacA-Alexa555 zugegeben. Die β_2 -Integrin Untereinheiten CD18 bzw. CD11a wurden mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper gefärbt und die Ansätze mit „live cell“-Mikroskopie untersucht.

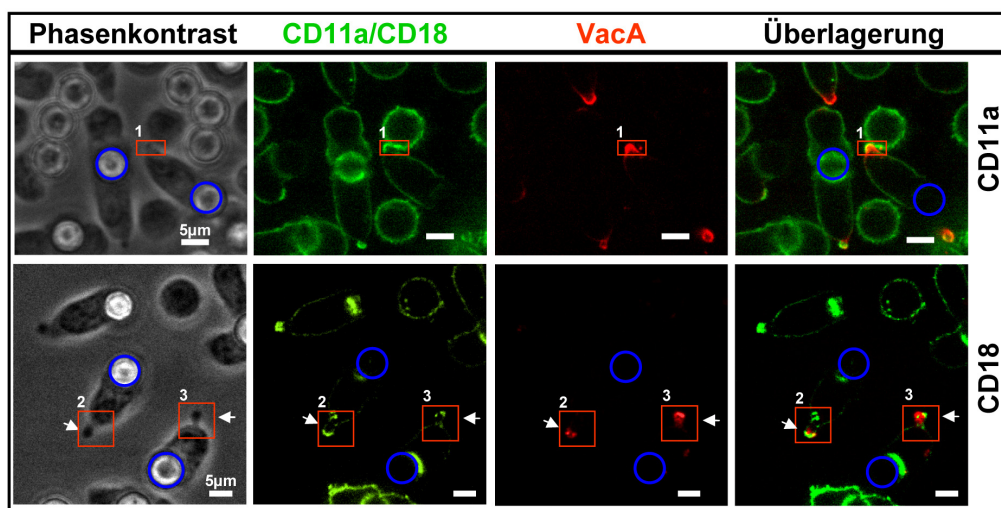


Abb. 12: Co-Lokalisation von VacA und LFA-1 (CD18/CD11a) am Uropodium polarisierter T-Zellen.

CD4⁺ T-Lymphozyten wurden zusammen mit CD3/CD28-gekoppelten Latexkugeln inkubiert. VacA-Alexa555 wurde zugegeben und zusammen mit Alexa488-markierten monoklonalen Antikörpern gegen CD18 bzw. CD11a für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach Wechsel des Mediums wurden die Zellen mikroskopiert. In der Abbildung sind die Phasenkontrast-Bilder, CD18/CD11a (grün), VacA (rot) und die überlagerten Bilder dargestellt. Bereiche starker Co-lokalisierung von VacA und LFA-1 am Uropodium sind mit roten Kästchen (1, 2, 3) hervorgehoben. Blaue Kreise zeigen die Position der CD3/CD28-Latexkugeln (Phasenkontrast) an.

Es zeigte sich eine deutliche Überlagerung von VacA (rot) und LFA-1 (CD18/CD11a) (grün) am Uropodium der polarisierten Zellen (Abb. 12). An der Kontaktzone zwischen T-Zelle und Latexkugel konnte ebenso CD18 bzw. CD11a detektiert werden, VacA war hingegen nicht vorhanden. Dies lässt darauf schließen, dass VacA möglicherweise nur mit LFA-1 eines

bestimmten Aktivierungsstatus interagiert. Die Bindung an einen anderen Uropodium-spezifischen Rezeptor kann jedoch mit dieser Methode nicht ausgeschlossen werden.

3.2.5. Aufnahme von VacA und LFA-1

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigten, dass eine Stimulierung primärer T-Zellen nötig ist, um sie empfindlich gegenüber VacA zu machen. Außerdem konnte die räumliche Nähe von VacA und dem auf T-Zellen dominierenden Integrin LFA-1 nachgewiesen werden. Der charakteristische Phänotyp aktivierter Zellen ist die Migration. LFA-1 vermittelt die Migration auf einer 2-dimensionalen Oberfläche durch Bindung an ICAM-1, wobei die Zelle im vorderen Bereich („leading edge“) Kontakt mit der Oberfläche aufnimmt und Interaktionen im hinteren Bereich („trailing edge“) wieder löst (190). Beteiligte Proteine werden wieder nach vorne transportiert, um neue Kontakte herzustellen. VacA könnte dieses Recycling von LFA-1 dazu verwenden, um in die Zelle aufgenommen zu werden. Dies wurde mikroskopisch mit PMA-stimulierten T-Lymphozyten, die auf einer ICAM-1-gekoppelten Oberfläche migrieren, untersucht. Zu stimulierten T-Zellen wurde VacA-Alexa555 zugegeben und LFA-1 mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen CD11a (YTH81.5-Alexa488) gefärbt.

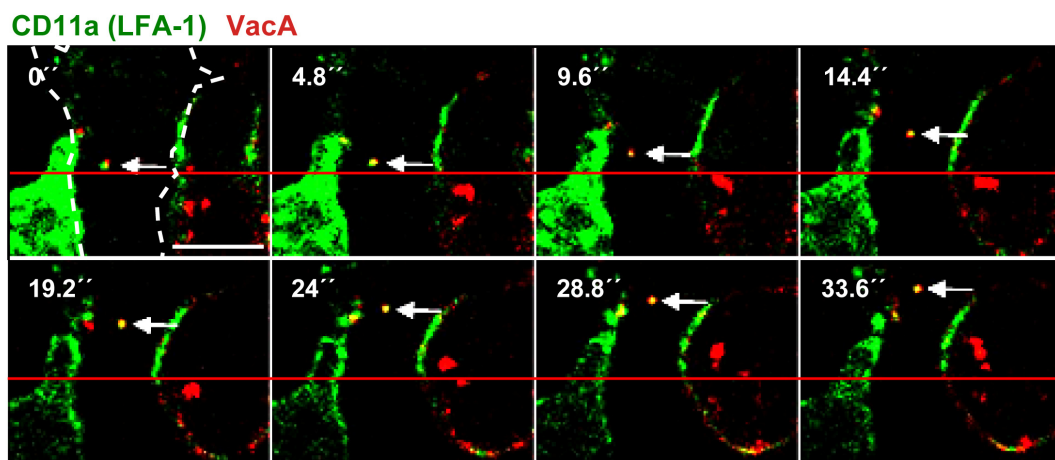


Abb. 13: Gemeinsame Aufnahme und Transport von VacA und LFA-1.

Primäre CD4⁺ T-Zellen wurden mit PMA stimuliert und nach Zugabe von VacA-Alexa555 (rot) und Alexa488-markierten monoklonalen Antikörper gegen CD11a (grün) auf ICAM-1-beschichteten Glasbodenschälchen überführt. Die Aufnahme von VacA und LFA-1 wurde bei 30°C mit „live cell“-Mikroskopie untersucht. Bilder der beiden Fluoreszenz-Kanäle wurden alle ~5 s über einen Zeitraum von 2 min aufgenommen. Zur besseren Darstellung der Bewegung ist der Startpunkt mit einer roten Linie markiert und der Umriss der migrierenden Zelle im ersten Bild weiß dargestellt. Der Balken entspricht 5 µm.

Wie in Abb. 13 zu erkennen ist, konnten VacA und LFA-1 zusammen in Membranvesikeln beobachtet werden. Zur besseren Darstellung des Transportes ist eine Bildsequenz über einen

Zeitraum von 34 Sekunden dargestellt. Die Zelle ist im ersten Bild weiß umrandet und der Startpunkt des Vesikels mit einer roten Linie dargestellt. Deutlich ist dabei zu erkennen, daß VacA (rot) und LFA-1 (grün) zusammen in einem Vesikel transportiert werden.

3.2.6. Direkte Interaktion von VacA und CD18

Bisher konnte gezeigt werden, dass VacA auf polarisierten T-Zellen in räumlicher Nähe zu LFA-1 lokalisiert ist und zusammen mit LFA-1 in Vesikel aufgenommen wurde. Ob LFA-1 jedoch den Rezeptor für VacA auf T-Lymphozyten darstellt, muss durch den Nachweis einer direkten Interaktion zwischen VacA und LFA-1 erbracht werden. Dabei kann die Bindung von VacA an die LFA-1-Untereinheiten CD18 und CD11a allein oder in Form des Integrin-Heterodimers stattfinden. In welcher Kombination die Interaktion erfolgt, sollte durch Präzipitation von VacA und dem Nachweis der Untereinheiten mittels Western Blot-Analyse geklärt werden.

Dazu wurden Membranen der T-Lymphozyten Zelllinien SKW3 und Jurkat T-Zellen, sowie von primären CD4⁺ T-Lymphozyten mit NP-40 solubilisiert und mittels Ultrazentrifugation präpariert. Mit Biotin modifiziertes VacA (VacA-Bio) wurde den Membranen zugegeben und mittels Neutravidin-Sepharose präzipitiert. Unspezifische Effekte durch Oligomerisierung von VacA und des Biotin-Tags wurde durch Kontrollen mit biotinylierter B-Untereinheit von Cholera Toxin (CtxB-Bio) und Transferrin-Biotin (Tf-Bio) ausgeschlossen.

Wie in Abb. 14 A + B zu sehen ist, konnte mit VacA-Biotin spezifisch CD18 co-präzipitiert werden. In den Kontroll-Ansätzen mit VacA ohne Biotin und CtxB-Biotin bzw. Tf-Biotin konnte CD18 nicht detektiert werden. In der ersten Spur von Abb. 14 A ist ein Aliquot der Membran-Präparation aufgetragen. Dabei sind 3 Konformationen von CD 18 erkennbar, die unterschiedlichen Modifikationen durch Glykosylierung entsprechen (10, 42, 43). VacA interagiert vor allem mit den vermutlich vollständig modifizierten, reifen Formen von LFA-1, die den oberen beiden Signalen von CD18 entsprechen. Wie in Abb. 14 B zu erkennen ist, konnte CD18 auch von Membranen der Jurkat Zelllinie und primären CD4⁺ T-Lymphozyten co-präzipitiert werden. Dabei dominierte die obere Bande, die der reifen CD18-Form entspricht. Die CD11a-Untereinheit von LFA-1 konnte in den Experimenten nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), so dass VacA unter diesen Bedingungen nur mit der CD18 Untereinheit von LFA-1 interagiert. Eine mögliche Interaktion mit CD11a auf der Zelloberfläche intakter Zellen oder gar *in vivo* kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Mit der Präzipitation konnte eine direkte Bindung von VacA an CD18 gezeigt werden.

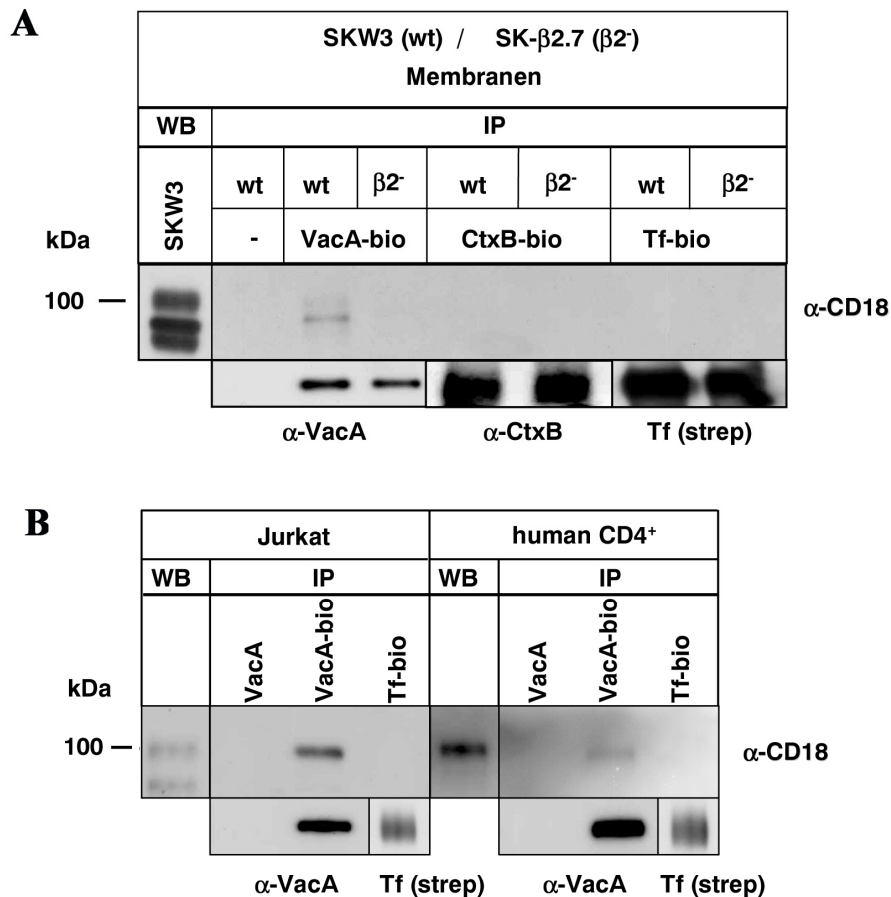


Abb. 14: Direkte Interaktion von VacA mit der LFA-1 Untereinheit CD18.

Membranen der T-Lymphozyten Zelllinien SKW3 (WT) und SK-β2.7 (CD18-negativ) (A) sowie von primären CD4⁺ T-Zellen und der Jurkat Zelllinie (B) wurden mit NP-40 solubilisiert und mittels Ultrazentrifugation präpariert. Zu den Ansätzen wurden jeweils 1 µg VacA, VacA-Biotin, Transferrin-Biotin (Tf-Bio) und Cholera-Toxin Untereinheit B-Biotin (CtxB-Bio) über Nacht zugegeben. Biotinylierte Proteine wurden mit Neutravidin-Sepharose präzipitiert und die Proteine mit SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden VacA, CtxB, Transferrin und CD18 mittels Western Blot-Analyse detektiert. Als Kontrolle wurden Aliquots der Membranpräparationen verwendet, um CD18 zu detektieren.

3.2.7. Einfluss von VacA auf die LFA-1-Funktionalität

LFA-1 ist ein Adhäsionsmolekül, das die Bindung und Migration von T-Lymphozyten auf ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3 vermittelt. Die Bindung an ICAM-1 erfolgt dabei in Anwesenheit zweiwertiger Kationen (Mg²⁺) über die I-Domäne der CD11a-Untereinheit. Die Affinität dieser Domäne wird zusätzlich durch die „I-like“-Domäne von CD18 reguliert (182, 183). Ob die direkte Bindung von VacA an CD18 die Funktion von LFA-1 bei der Adhäsion von T-Zellen beeinträchtigt, sollte im Anschluss geklärt werden. Es wurde die Adhäsion von CD4⁺ T-Zellen auf einer ICAM-1-beschichteten Oberfläche untersucht. Dazu wurden die Zellen mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Calcein AM markiert, um eine Quantifizierung durch Messung der Fluoreszenz zu ermöglichen. Aktivierte Zellen wurden mit unterschiedlichen

Mengen an VacA inkubiert und im Anschluß die Fluoreszenz der gebundenen Zellen gemessen. Als Kontrolle wurden T-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen des blockierenden Antikörpers gegen die CD18-Untereinheit inkubiert.

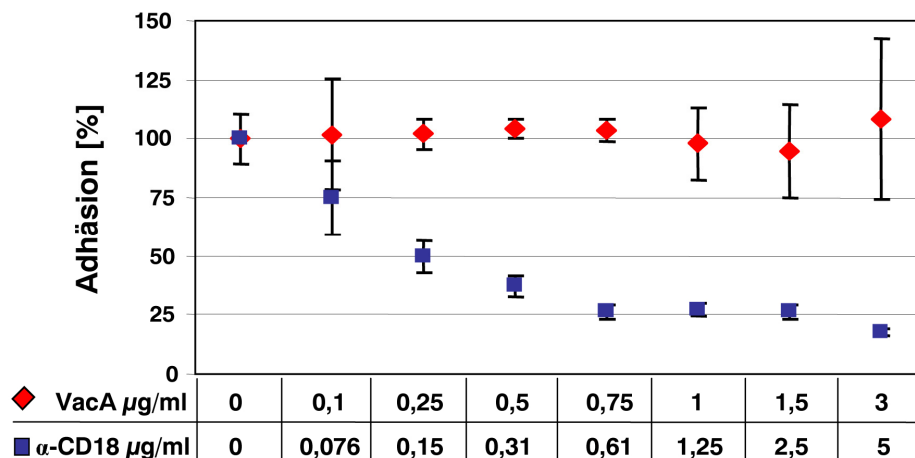


Abb. 15: Quantifizierung der Bindung primärer T-Lymphozyten an ICAM-1.

CD4^+ T-Lymphozyten wurden aus humanem Blut isoliert und mit PMA stimuliert. Die Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM gefärbt, um die Bindung der Zellen an eine ICAM-1-beschichtete Oberfläche zu quantifizieren. CD4^+ T-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an VacA (0 – 3 $\mu\text{g/ml}$) oder LFA-1-blockierenden Antikörper IB4 (0 – 5 $\mu\text{g/ml}$) bei 8°C inkubiert. Danach wurde die Bindung an die ICAM-1-gekoppelte Oberfläche für 20 min bei 37°C ermöglicht und die Gesamtfluoreszenz bestimmt. Die Zellen wurden einmal mit PBS / 4 mM MgCl_2 gewaschen und die Fluoreszenz erneut quantifiziert. Die Prozentzahlen entsprechen der Abnahme der Fluoreszenz im Verhältnis zur Gesamtfluoreszenz.

Wie in Abb.15 zu erkennen ist, haben selbst hohe VacA-Konzentrationen bis 3 $\mu\text{g/ml}$ keinen Einfluß auf die LFA-1-vermittelte Adhäsion an ICAM-1. Der blockierende Antikörper IB4 zeigte hingegen schon ab einer Konzentration von 0,15 $\mu\text{g/ml}$ eine Hemmung der Adhäsion um 50%. Die Bindung von VacA an die Zelloberfläche wurde in einem parallelen Ansatz mit VacA-Alexa555 verifiziert (Daten nicht gezeigt).

Wie oben beschrieben, beeinflusst die Bindung von VacA an CD18 nicht die durch die Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1 vermittelte Adhäsion von T-Lymphozyten. Effekte auf die zelluläre Verteilung von LFA-1 könnten jedoch stattfinden, was wiederum die Migration der T-Zellen beeinflussen würde. Um dies zu untersuchen wurden CD4^+ T-Lymphozyten über Nacht mit PMA stimuliert und im Anschluss verschieden lang (3 h, 24 h, 48 h) mit VacA-Alexa488 behandelt. Die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen auf ICAM-1 wurde mittels „live cell“-Mikroskopie und „single cell-tracking“ (Abb. 16 A) bestimmt. Nach 3 h und 24 h war weder mit 1 $\mu\text{g/ml}$ noch 5 $\mu\text{g/ml}$ VacA ein Effekt auf die Geschwindigkeit zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Erst ab 48 h zeigte sich eine Reduktion der Geschwindigkeit auf 60-

70% im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen (Abb. 16 B). Dieser Effekt war dabei spezifisch für die Migration auf ICAM-1 durch LFA-1 (Abb. 16 C). Wurde die Migrationsgeschwindigkeit auf VCAM-1, einem Liganden des Integrins VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$), bestimmt, zeigte sich kein Einfluss von VacA auf die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen. Die Geschwindigkeit auf VCAM-1 blieb nach 48 h unverändert.

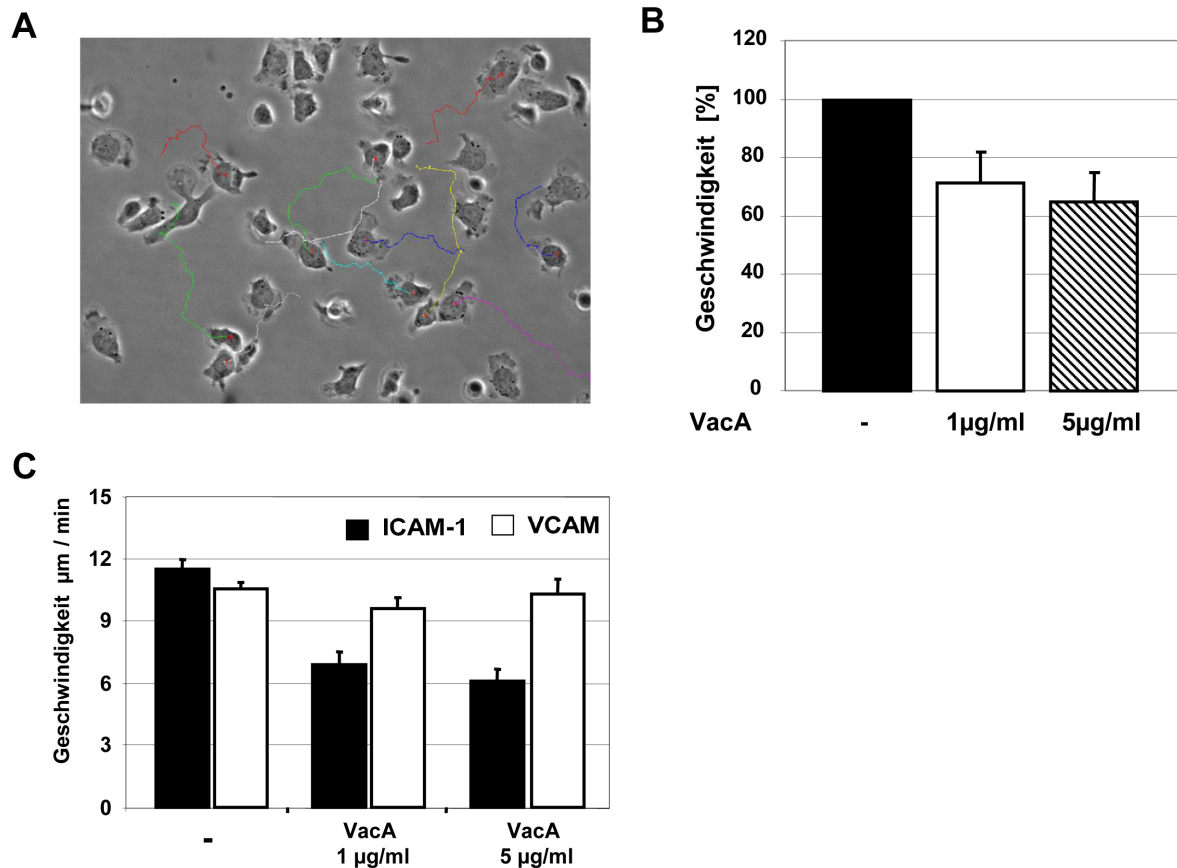


Abb. 16: Quantifizierung der Migrationsgeschwindigkeit primärer T-Zellen auf ICAM-1 mit VacA.

Primäre T-Zellen wurden für 1 h mit PMA stimuliert und weiter über Nacht ohne PMA kultiviert. Die Zellen wurden 48 h mit unterschiedlichen VacA-Konzentrationen (1 bzw. 5 µg/ml) in Glasbodenschälchen mit ICAM-1- bzw. VCAM-1-gekoppelter Oberfläche inkubiert. Je Ansatz wurde von 3 Gesichtsfeldern die Migration aktivierter T-Zellen über einen Zeitraum von 5 min verfolgt. Mittels Metamorph-Software wurde die zurückgelegte Strecke einzelner Zellen verfolgt (A) und im Anschluß die Geschwindigkeit quantifiziert (B, C). Die Migrationsgeschwindigkeit von T-Zellen ohne VacA wurde als 100% gesetzt.

Weitere Studien müssen zeigen, worin der Effekt von VacA auf die Migration liegt. VacA könnte dabei das Recycling von LFA-1 stören oder über einen anderen Mechanismus auf die Dynamik des Zytoskeletts wirken. Interessant ist dabei die Beobachtung, dass die Zellen mit VacA nach 48 h Probleme hatten das Uropodium von der Oberfläche zu lösen (Daten nicht gezeigt). Dieser Phänotyp ist vergleichbar mit dem gestörten Ablösen des Uropodiums migrierender T-Zellen bei Hemmung der RhoA-Kinase (ROCK) mit dem chemischen Inhibitor Y27632. Möglicherweise stört VacA zu späten Zeitpunkten den RhoA-Signalweg.

3.2.8. LFA-1 ist essentiell für VacA-induzierte Vakuolisierung und IL-2-Hemmung

Die Bindung von VacA an CD18 führt zur Aufnahme in T-Lymphozyten. Für andere Toxine, wie z.B. Cholera Toxin, sind verschiedene Aufnahmewege beschrieben. Dabei spielen Clathrin- und Caveolin-abhängige Wege, sowie Endozytosewege über „lipid rafts“ eine Rolle (118). Ob LFA-1 die funktionelle Aufnahme in T-Lymphozyten und somit die Inhibition der IL-2-Expression sowie die Vakuolisierung ermöglicht, sollte mittels LFA-1-negativen Jurkat T-Zellen (J- β 2.7) gezeigt werden. Diese Zellen produzieren kein CD11a, so dass als Folge kein funktionelles LFA-1 an der Oberfläche lokalisiert ist. Integrine werden nur als Heterodimer, bestehend aus einer α - und β -Untereinheit, an die Oberfläche transportiert (92). Außerdem wurde die mit *cd11a*-komplementierte Zelllinie J- β 2.7 / CD11a für die Vakuolisierungs- und IL-2-Inhibitionsstudien verwendet.

Zuerst sollte die Bildung saurer Vakuolen mittels Neutralrotfärbung quantifiziert werden. Die drei Zelllinien (Jurkat, J- β 2.7 und J- β 2.7 / CD11a) wurden mit unterschiedlichen VacA-Konzentrationen inkubiert und die gebildeten Vakuolen mit Neutralrot quantifiziert.

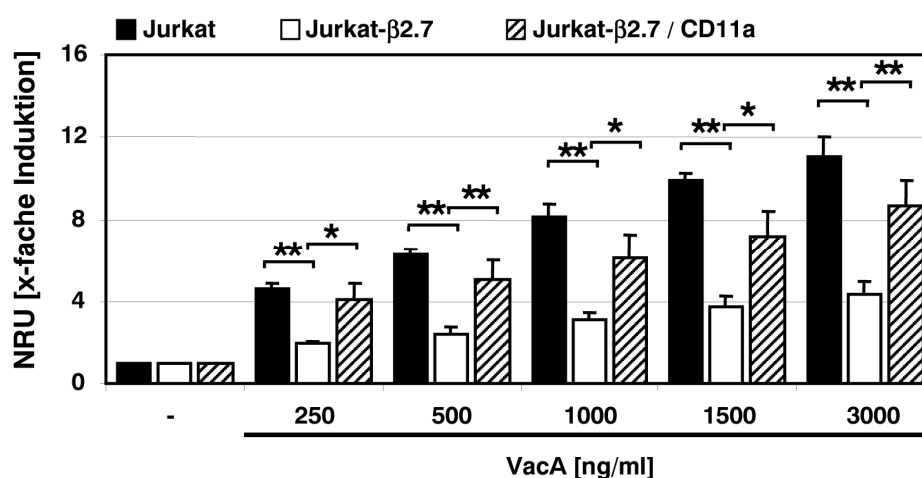


Abb. 17: LFA-1-abhängige Vakuolisierung von Jurkat T-Zellen.

Je 500 μ l der Zelllinien Jurkat (WT), J- β 2.7 (LFA-1 neg.) und J- β 2.7 / CD11a (LFA-1 pos.) der Zelldichte 5×10^5 /ml wurden mit unterschiedlichen Mengen VacA (0 – 3 μ g/ml) inkubiert. Nach Zugabe von Ammoniumchlorid wurden die gebildeten sauren Vakuolen mit Neutralrot gefärbt. Nach Lyse der Zellen wurde die Menge an Neutralrot, das sich in den sauren Vakuolen angesammelt hatte, freigesetzt und bei einer Wellenlänge von 495 nm quantifiziert (NRU: „neutral red units“). Die Werte der Ansätze ohne VacA wurden als 100% bzw. 1-fach gesetzt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels Student-t-Test bestimmt. ** ($p < 0,01$); * ($p < 0,05$)

Dabei zeigte sich, dass Wildtyp- sowie CD11a-komplementierte Zellen signifikant mehr Vakuolen ausbilden als die LFA-1-negative Zelllinie J- β 2.7 (Abb. 17). Dabei war schon bei

250 ng/ml VacA deutlich die Bildung von Vakuolen zu erkennen. Im Vergleich zu Zellen ohne VacA wurden um einen Faktor 4 mehr Vakuolen gebildet. Daß auch LFA-1 negative Zellen ein geringes, wenn auch signifikantes, Maß an Vakuolisierung aufwiesen, kann an weiteren, LFA-1-unabhängigen Aufnahmewegen für VacA liegen.

Um die Hemmung der IL-2-Expression durch VacA in Abhängigkeit von LFA-1 zu bestimmen, wurden die drei Zelllinien mit pIL-2 *luc*-Plasmid transfiziert. Die Expression des *luc*-Gens wird durch den *il-2* Promotor reguliert, so dass durch Bestimmung der Lumineszenz indirekt die Expression von IL-2 bestimmt werden kann. Der inhibitorische Effekt von VacA in Abhängigkeit von LFA-1 wurde für unterschiedliche Toxin-Konzentrationen (25 – 500 ng/ml) bestimmt. VacA wurde den Ansätzen zugegeben und die Zellen mit PMA/Ionomycin aktiviert. Die Luciferase-Aktivität wurde durch Lumineszenzmessung quantifiziert und die Aktivität der Ansätze ohne VacA als 100% definiert (Abb. 18). FK506 hemmt die Aktivität der Phosphatase Calcineurin und unterdrückt die IL-2-Expression.

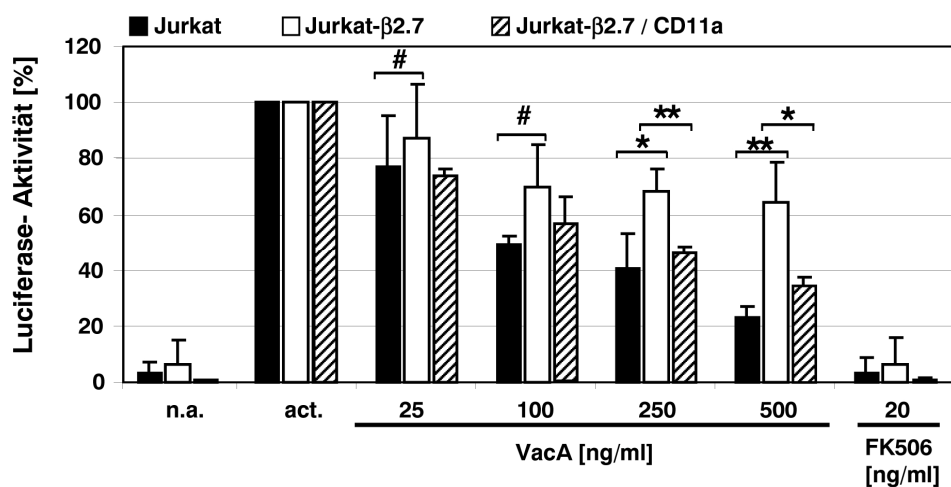


Abb. 18: Hemmung der IL-2 Transkription durch VacA in Abhängigkeit von LFA-1.

Jurkat (WT), J-β2.7 (LFA-1 neg.) und J-β2.7 / CD11a (LFA-1 pos.) wurden mit dem pIL-2 *luc*-Plasmid transfiziert. Nach 12 h wurden die Zellen mit unterschiedlichen Mengen an VacA (25 – 500 ng/ml) inkubiert. Nach Aktivierung mit PMA/Ionomycin wurde die Expression der Luciferase in Abhängigkeit von VacA quantifiziert. Die Expression aktivierter T-Zellen ohne VacA wurde als 100% gesetzt. Als Kontrolle wurden nicht-stimulierte Zellen und FK506, ein Calcineurin-Inhibitor der die IL-2-Expression hemmt, verwendet. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels Student-t-Test bestimmt. ** ($p < 0,01$); * ($p < 0,05$); # ($p > 0,05$; nicht signifikant)

Jurkat T-Zellen zeigten bei einer VacA-Konzentration von 100 ng/ml eine 50%ige Hemmung der IL-2-Expression. Die mit *cd11a*-komplementierten Zellen wiesen eine vergleichbare VacA-Sensitivität auf. Ab VacA-Konzentrationen von 250 ng/ml war ein signifikanter

Unterschied zu den LFA-1 negativen Zellen zu erkennen. Zwar zeigten diese bei Konzentrationen ab 100 ng/ml auch einen geringen inhibitorischen VacA-Effekt von ~20-30%, dieser war jedoch unabhängig von der Konzentration. Wie in Abb. 18 zu erkennen ist, bleibt die Hemmung mit ansteigender VacA-Konzentration bis 500 ng/ml konstant bei 20-30%. Dies spricht für einen unspezifischen Weg der Aufnahme. Wildtyp- und komplementierte Zellen hingegen zeigten mit ansteigender VacA-Konzentration eine kontinuierlich zunehmende Hemmung der IL-2-Expression.

Beide Experimente zeigen damit deutlich, dass LFA-1 für eine funktionelle Aufnahme (Vakuolisierung und Hemmung der IL-2-Expression) von VacA essentiell ist. Dabei ist zu betonen, dass die Hemmung der IL-2-Expression schon bei geringen Konzentrationen von ca. 50-100 ng/ml zu erkennen ist. Für die Vakuolisierung hingegen sind VacA-Mengen von ~200 ng/ml erforderlich, so dass dieser VacA-Effekt möglicherweise als Folge zu hoher VacA-Mengen anzusehen ist. Dies verdeutlicht aber auch, dass der inhibitorische VacA-Effekt auf die IL-2-Expression vermutlich auch *in vivo* möglich ist, da sehr geringe Toxin-Konzentrationen nötig sind.

3.2.9. LFA-1 als VacA-Rezeptor auf Immunzellen

LFA-1 wird auf allen Leukozyten exprimiert (100). Damit besteht die Möglichkeit, dass VacA CD18 generell als Rezeptor für Zellen des Immunsystems wie z.B. Neutrophile, Makrophagen, B-Lymphozyten, dendritische Zellen (DC) nutzt. Dies wäre eine wichtige Komponente für *H. pylori* zur Unterdrückung einer Immunreaktion gegen sich selbst. Ob die Bindung von VacA an andere Leukozyten vergleichbar mit der an T-Lymphozyten ist, sollte exemplarisch anhand der Lokalisation von LFA-1 und VacA an reifen dendritischen Zellen (DC) untersucht werden. DCs wurden dafür *in vitro* mit Zytokinen aus peripheren Blutmonozyten (PBMC) differenziert. Die Zellen wurden mit VacA-Alexa555 inkubiert und mittels „live cell“-Mikroskopie migrierend auf ICAM-1 beobachtet. LFA-1 wurde mit Fluoreszenz-markiertem Antikörper gegen CD11a angefärbt.

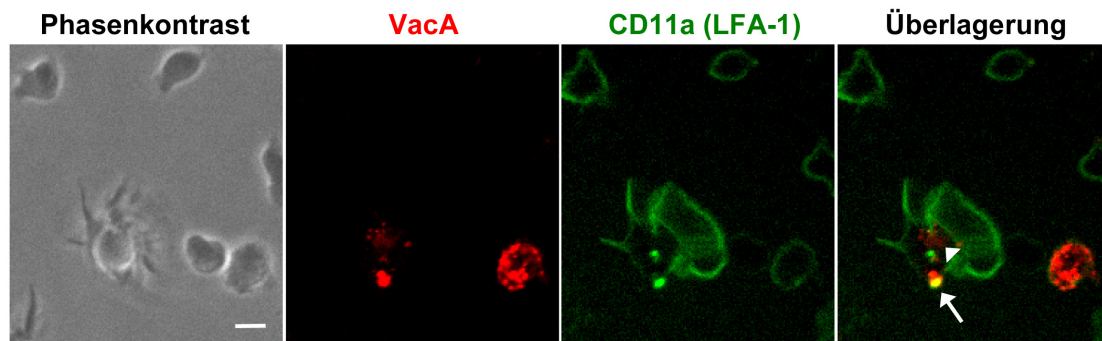


Abb. 19: Co-Lokalisation von VacA und LFA-1 am Uropodium migrierender DCs.

Periphere Blutmonozyten wurden mittels Dichtezentrifugation und Plastikadhäsion präpariert. Diese wurden *in vitro* durch Zugabe von Zytokinen (GM-CSF, IFN- γ , IL-6, TNF- α , PGE₂) zu reifen DC differenziert. Den aktivierten DC wurde der Alexa488-markierte monoklonale Antikörpern gegen CD11a und VacA-Alexa555 zugegeben und auf ICAM-1-gekoppelte Glasbodenschälchen überführt. Die Verteilung von VacA (rot) und LFA-1 (grün) wurde mikroskopisch beobachtet. Am Uropodium lokalisiertes VacA ist mit einem Pfeil gekennzeichnet, intrazelluläres VacA mit Pfeilkopf. Der Balken entspricht 5 μ m.

In Abb. 19 sind das Phasenkontrast-Bild und die Fluoreszenz-Bilder einer migrierenden DC zu sehen. Die Zelle ist deutlich über die gesamte Oberfläche mit LFA-1 gefärbt (grün). Interessanterweise konzentriert sich VacA (rot), ebenso wie bei CD4⁺ T-Lymphozyten, am Uropodium der migrierenden Zelle und überlagert deutlich mit LFA-1 (siehe Pfeil; Abb. 19). Dieses Beispiel zeigt, dass VacA auch bei anderen Leukozyten mit LFA-1 co-lokalisiert und ein charakteristisches Verteilungsmuster aufweist. Ob VacA CD18 als funktionellen Rezeptor zur Aufnahme in andere oder gar alle Leukozyten verwendet, muß in weiteren Studien geklärt werden.

3.3. Interaktion von VacA und murinen T-Zellen

H. pylori kolonisiert die Mukosa des Magens, wobei das Bakterium spezifisch an den Menschen angepasst ist. *In vivo*-Studien zur Kolonisierung von *H. pylori* wurden meist im Maus-, Mongolian Gerbil- oder Schweine-Modell mit daran adaptierten Stämmen durchgeführt. Dabei wurden verschiedene essentielle Kolonisierungsfaktoren wie Urease und Flagellin identifiziert (55, 56, 97). Auch die Rolle von VacA bei der Kolonisierung des Magens wurde untersucht. Verschiedene Studien führten dabei zu gegensätzlichen Ergebnissen (167, 218). Im folgenden Abschnitt sollte der Effekt von VacA auf murine CD4⁺ T-Zellen untersucht werden. Neben der Bindung und Aufnahme von VacA, wurde Experimente zur Vakuolisierung und Hemmung der IL-2-Expression durchgeführt.

3.3.1. **Resistenz muriner CD4⁺ T-Lymphozyten gegen VacA**

3.3.1.1. Bindung und Aufnahme von VacA bei murinen T-Zellen

Für VacA-Bindungsstudien wurden CD4⁺ T-Lymphozyten aus der Milz von Mäusen isoliert. Nach Aktivierung mit PMA wurden sie mit VacA-Alexa488 bzw. VacA-Alexa555 und CtxB-Alexa488 inkubiert, auf ICAM-1-gekoppelten Glasbodenschälchen überführt und mittels „live cell“-Mikroskopie untersucht. Dabei zeigte sich im Vergleich mit humanen CD4⁺ Lymphozyten (linke Spalte; Abb. 20 A), dass murine T-Zellen kaum VacA binden und aufnehmen (rechte Spalte; Abb. 20 A). Die Bindung von VacA an primäre humane und murine CD4⁺ T-Zellen wurde außerdem mittels FACS-Analyse untersucht und quantifiziert (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse entsprachen den mikroskopischen Beobachtungen. Um einen generellen Defekt der Aufnahme muriner T-Zellen auszuschließen, wurden stimulierte Zellen zusätzlich mit CtxB-Alexa555 inkubiert. Wie in Abb. 20 B erkennbar ist, wurde CtxB deutlich aufgenommen, wohingegen VacA kaum gebunden hatte und nur punktuell am Ende der Zellen lokalisiert war (siehe Pfeil; Abb. 20 B)

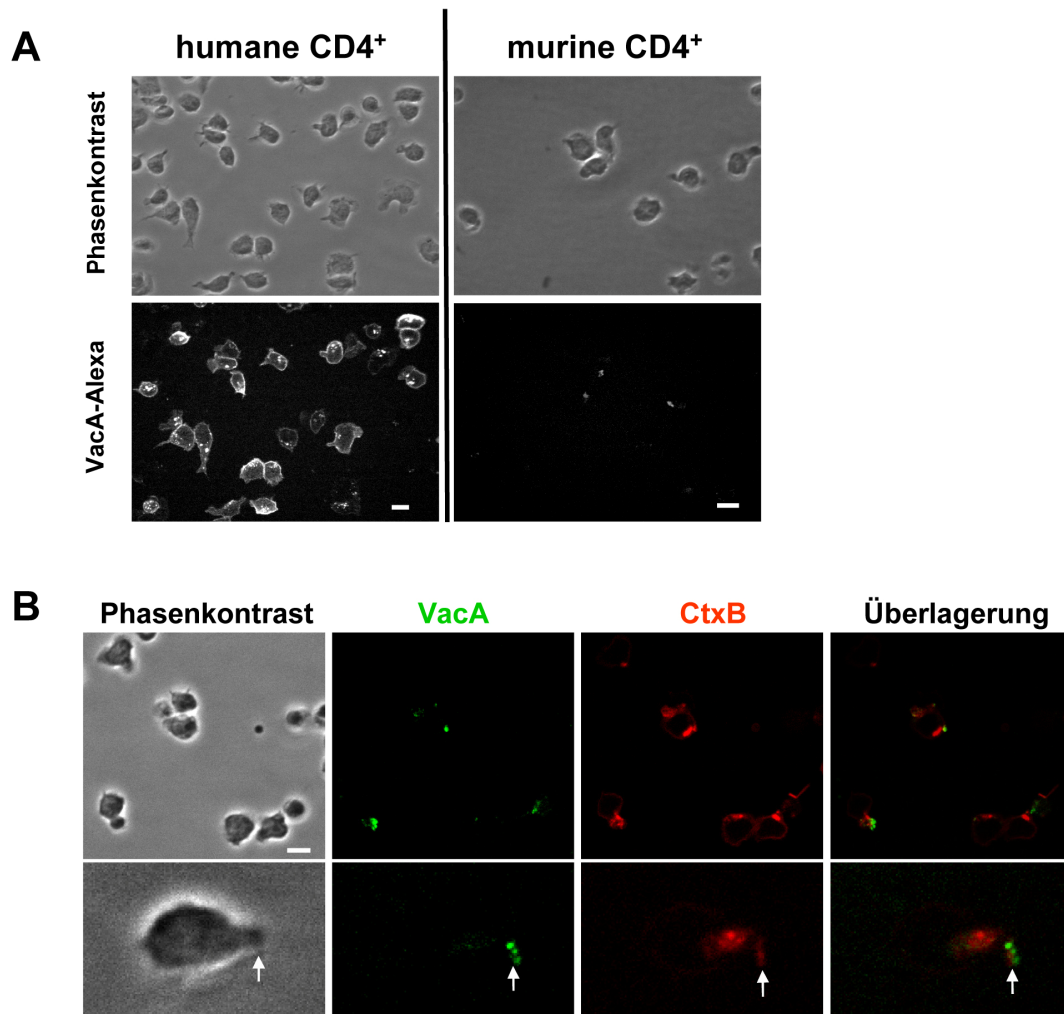


Abb. 20: VacA-Bindung und -Aufnahme primärer T-Zellen aus Mensch und Maus.

Primäre CD4⁺ T-Zellen wurden mittels MACS-Technik aus humanem Blut oder der Milz von BALB/c-Mäusen mit MACS-Technik präpariert. Die Zellen wurden für 30 min mit VacA-Alexa488 (A) oder VacA-Alexa555 (grün) und CtxB-Alexa488 (rot) inkubiert und auf humanen- oder murinen ICAM-1-gekoppelten Glasbodenschälchen mittels „live cell“-Mikroskopie verfolgt. Am Uropodium lokalisiertes VacA (grün) ist mit einem Pfeil markiert (B). Die Balken entsprechen 5 μ m.

Im Anschluß wurde die Bindung von VacA an die murine T-Zelllinie EL4 untersucht und mit der VacA-Bindung an humane T-Zellen verglichen. Jurkat und EL4 T-Zellen wurden bei 8°C mit VacA-Alexa inkubiert und die Bindung mit FACS-Analyse quantifiziert. Entsprechend der Beobachtung primärer muriner T-Zellen (Abb. 20 A und B), wies die Bindung von VacA an EL4 T-Zellen nur 1/7 der VacA-Bindung an Jurkat-Zellen (Abb. 21) auf.

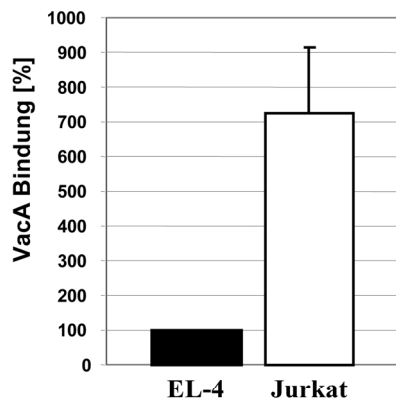


Abb. 21: Quantifizierung der VacA-Bindung an humane und murine T-Lymphozyten.

Je 500 μl Zellen ($2,5 \times 10^5$) wurden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ VacA-Alexa488 für 30 min bei 8°C inkubiert. Die Ansätze wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und die Bindung von VacA-Alexa mit FACS-Analyse quantifiziert. Als Wert wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität verwendet. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten aus 3 unabhängigen Experimenten.

Wie die Ergebnisse zeigen, interagiert VacA kaum mit murinen T-Zellen. Trotz Aktivierung der Zellen mit PMA ist keine Bindung und Aufnahme von VacA in murine T-Zellen (primäre CD4^+ T-Lymphozyten und EL4 T-Zelllinie) zu beobachten. Ob VacA in murinen T-Zellen trotzdem zur Ausbildung von Vakuolen und Hemmung der IL-2-Expression führt, sollte im folgenden Teil untersucht werden.

3.3.1.2. Wirkung von VacA auf die IL-2-Expression und Vakuolisierung muriner T-Zellen

Im Anschluß wurde die Expression von IL-2 untersucht. Dafür wurden neben humanen Jurkat T-Zellen sowohl die murine T-Zelllinie EL4 als auch primäre murine CD4^+ T-Lymphozyten verwendet. Humane T-Zellen (Jurkat) und murine T-Zellen (EL4, primäre CD4^+ T-Zellen) wurden mit ccs P12, P12 $\Delta vacA$ sowie mit VacA inkubiert. Primäre T-Lymphozyten wurden zuvor über Nacht mit PMA stimuliert. Mit PMA/Ionomycin wurde die IL-2-Expression induziert. Nach 12 h wurde die gebildete IL-2-Menge quantifiziert.

Die Experimente zeigten, dass die IL-2-Expression von EL4 T-Zellen (weiße Balken) sowie muriner CD4^+ Lymphozyten (gestreifte Balken) nicht von VacA gehemmt wurde (Abb. 22). Die beobachtete Abnahme der IL-2-Expression im Ansatz mit ccs P12 ist auch mit ccs P12 $\Delta vacA$ vorhanden und somit ein VacA-unabhängiger Effekt. Humane T-Zellen zeigten eine starke Hemmung in Abhängigkeit von VacA (schwarze Balken).

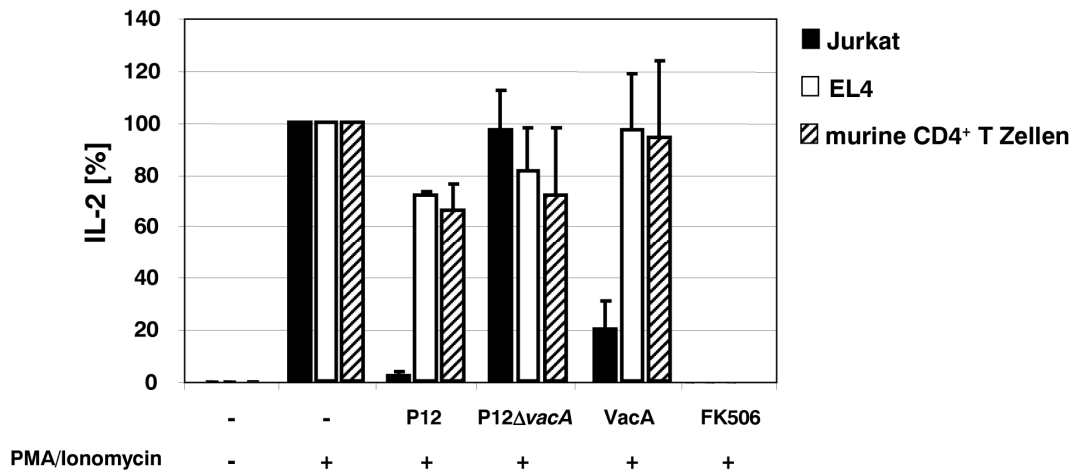


Abb. 22: IL-2-Expression humaner und muriner T-Zellen in Abhängigkeit von VacA.

Primäre CD4⁺ T-Zellen, die murine T-Zelllinie EL4, sowie humane Jurkat T-Zellen wurden mit konzentrierten Kulturüberstand (ccs) von *H. pylori* P12 und *vacA*-Deletionsmutante P12Δ*vacA*, sowie gereinigten VacA inkubiert. Die primären murinen T-Zellen wurden zuvor über Nacht mit PMA stimuliert. Die IL-2-Expression wurde mit PMA/Ionomycin induziert und gebildetes IL-2 nach 12 h mit ELISA quantifiziert. Die IL-2-Menge der Ansätze ohne VacA wurde als 100% gesetzt. Nicht aktivierte Zellen sowie FK506 dienten als Kontrolle. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

Vergleicht man die VacA-induzierte Vakuolisierung muriner EL4 T-Zellen mit der humaner T-Zellen (Jurkat), so wird auch hier die Resistenz muriner T-Zellen deutlich. Jurkat T-Zellen bilden bei einer VacA-Konzentration von 1,5 µg/ml 10mal mehr Vakuolen aus als ohne VacA (Abb. 17; schwarze Balken). Bei EL4 T-Zellen hingegen kommt es kaum zur Bildung saurer Vakuolen (Abb. 23). Murine T-Zellen (primäre T-Zellen und EL4 T-Zelllinie) zeigen somit weder eine VacA-abhängige Ausbildung von Vakuolen, noch einen inhibitorischen Effekt von VacA auf die IL-2-Expression. In einer Publikation von Cover und Kollegen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass murine CD4⁺ T-Lymphozyten resistent gegenüber einer VacA-induzierten Vakuolisierung und Hemmung der Proliferation sind (5). Eine Erklärung hierfür wurde dabei jedoch nicht erbracht. Möglicherweise führt das Fehlen eines VacA-Rezeptors zur Resistenz muriner T-Zellen gegenüber VacA. Dies sollte im folgenden Abschnitt untersucht werden.

3.3.2. Sensitivität humanisierter, muriner T-Zellen gegenüber VacA

3.3.2.1. Expression humaner β₂-Integrine in murinen T-Zellen

Eine Ursache für die Unempfindlichkeit muriner T-Zellen gegenüber VacA könnte der VacA-Rezeptor auf Lymphozyten darstellen, der bei murinen Zellen entweder nicht vorhanden ist oder aufgrund abweichender Eigenschaften (Aminosäuresequenz, Glykosylierung) nicht

erkannt wird. Um eine Spezies-spezifische Bindung von VacA an CD18 zu untersuchen, sollte der humane VacA-Rezeptor auf T-Zellen CD18 in Kombination mit CD11a (LFA-1) oder CD11b (Mac-1) in murinen T-Zellen exprimiert werden. Hierfür wurde die murine T-Lymphozyten Zelllinie EL4 verwendet. EL4 T-Zellen wurden mit Plasmiden für CD11a und CD18 bzw. CD11b und CD18 transfiziert, mittels eines FACS-Sorters Integrin-exprimierende Klone sortiert und unter Selektion weiter kultiviert. Die erhaltenen Zellen wurden subkloniert und mehrere Klone mit FACS-Analyse auf die Oberflächenexpression von LFA-1 und Mac-1 kontrolliert (Daten nicht gezeigt; Kollaboration Frau Sandra Praßl). Die Zellen werden im Folgenden als EL4 hLFA-1 bzw. EL4 hMac-1 bezeichnet.

3.3.2.2. VacA-induzierte Vakuolisierung in humanisierten, murinen EL4 T-Zellen

Im Anschluss wurden repräsentative Klone der murinen T-Zellen EL4 hLFA-1 und EL4 hMac-1 auf die Expression von IL-2 und Vakuolisierung untersucht. Die Zellen wurden mit VacA inkubiert und die Expression von IL-2 mit PMA/Ionomycin induziert. Trotz humaner Integrine konnte kein Effekt auf die Expression von IL-2 durch VacA in murinen T-Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Weiter wurde die Ausbildung saurer Vakuolen durch VacA in Abhängigkeit von CD18 untersucht. VacA wurde zu den murinen T-Zellen EL4 hLFA-1 und EL4 hMac-1 gegeben und die gebildeten Vakuolen mit Neutralrot angefärbt und quantifiziert.

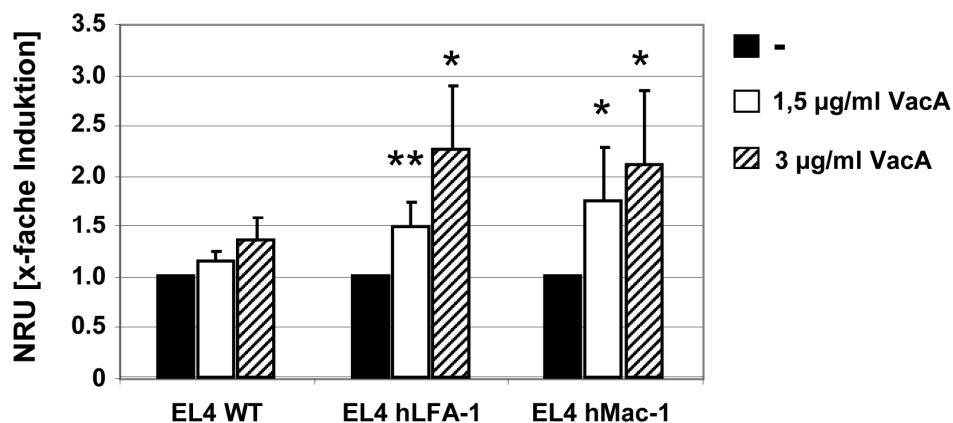


Abb. 23: Vakuolisierung hLFA-1- bzw. hMac-1-exprimierender EL4 Zellen.

Je 500 µl Zellen (5×10^5 /ml) der Zelllinie EL4 (WT), EL4 hLFA-1 und EL4 hMac-1 wurden mit VacA (1,5 bzw. 3 µg/ml) inkubiert. Nach Zugabe von 2 mM Ammoniumchlorid wurden die gebildeten Vakuolen mit Neutralrot gefärbt. Die Menge an Neutralrot in den Vakuolen wurde bei einer Wellenlänge von 495 nm quantifiziert (NRU: „neutral red units“). Die Werte der Ansätze ohne VacA wurden als 100% bzw. 1-fach bestimmt und die Induktion der Vakuolen als x-fach berechnet. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichung aus 4 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt. ** ($p < 0,01$); * ($p < 0,05$).

Der Test auf Vakuolisierung zeigte dabei, dass hLFA-1 bzw. hMac-1 exprimierende Zellen signifikant mehr Vakuolen ausbilden als Wildtyp EL4-Zellen (Abb. 23). Dieser Effekt war abhängig von der VacA-Konzentration, erforderte jedoch deutlich höhere Konzentrationen als humane T-Zellen (Abb. 17). Weitere Komponenten für die funktionelle Aufnahme von VacA in murine T-Zellen scheinen nötig zu sein.

3.3.2.3. Interaktion von VacA mit humanisierten, murinen T-Zellen

Unterstützt wird dies durch Untersuchung der VacA-Bindung an EL4 T-Zellen und Vergleich mit hLFA-1 bzw. hMac-1 exprimierenden Zellen. Die Quantifizierung mit FACS-Analyse zeigte dabei keine signifikante Zunahme der Bindung in Abhängigkeit von hLFA-1 bzw. Mac-1. Zwar bindet etwas mehr VacA an die Zelloberfläche (Abb. 24 A), die Bindung erreicht jedoch nicht die Werte humaner T-Zellen (Abb. 21). Ein weiterer Bindungspartner für VacA an humane T-Zellen ist deswegen anzunehmen. Zusätzlich wurde die Interaktion von VacA mit humanen CD18, exprimiert in murinen EL4 T-Zellen (EL4 hLFA-1), mittels Co-Präzipitation untersucht. Membranen wurde von EL4 hLFA-1 T-Zellen präpariert und CD18 mit VacA-Biotin präzipitiert. Als Kontrolle diente Tf-Biotin. Biotinylierte Proteine wurden mit Neutraavidin-Sepharose präzipitiert.

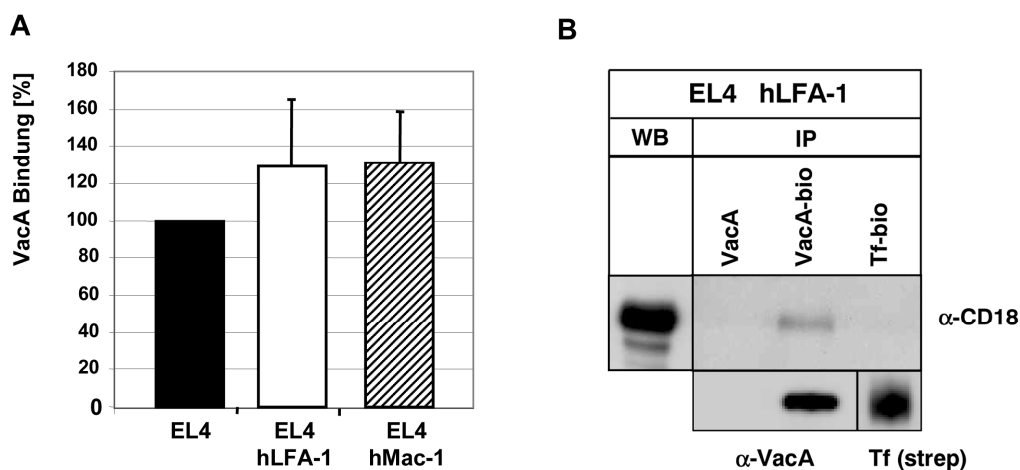


Abb. 24: VacA-Bindung an EL4 und EL4 hLFA-1 bzw. hMac-1 T-Zellen und CD18-Präzipitation von hLFA-1 exprimierenden EL4 T-Zellen.

(A) Je $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ VacA-Alexa488 bei 8°C inkubiert. Die Ansätze wurden zweimal mit PBS gewaschen und die Bindung von VacA-Alexa mit FACS-Analyse quantifiziert. Als Wert wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität verwendet. Die Bindung von VacA an EL4 wurde als 100% gesetzt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten 3 unabhängiger Experimenten.

(B) Von murinen EL4 T-Zellen, die humanes LFA-1 exprimieren, wurden Membranen mittels Ultrazentrifugation präpariert. VacA, VacA-Biotin bzw. Transferrin-Biotin (Tf-bio) wurden über Nacht zugegeben und biotinylierte Proteine mit Neutraavidin-Sepharose gebunden. Die Proteine wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot-Analyse detektiert.

Western Blot-Analyse der co-präzipitierten Proteine mit α -human CD18 Antikörper zeigte, dass VacA mit hCD18, exprimiert in murinen T-Zellen, interagiert (Abb. 24 B). Nachdem die Bindung auf murinen T-Zellen jedoch trotz Expression von hLFA-1 bzw. hMac-1 nicht stark zunimmt, ist ein weiterer Bindungspartner auf der Oberfläche von T-Lymphozyten anzunehmen. Dies wird weiter unterstützt, da auch die VacA-Bindung an die LFA-1-negativen humanen T-Zellen J- β 2.7 kaum reduziert ist (Daten nicht gezeigt). Der mögliche Co-Rezeptor spielt dabei bei der funktionellen Aufnahme eine Rolle, da für die Vakuolisierung von EL4 hLFA-1 und EL4 hMac-1 T-Zellen deutlich höhere VacA-Konzentrationen nötig sind.

3.4. Aufnahmemechanismus von VacA in T-Lymphozyten

In dem vorangegangenen Kapitel wurde CD18 als VacA-Rezeptor auf humanen T-Lymphozyten identifiziert. LFA-1, bestehend aus den Untereinheiten CD18 und CD11a, führt zur funktionellen Aufnahme von VacA und somit zur Ausbildung von Vakuolen und zur Hemmung der IL-2-Expression. Die Untereinheiten von LFA-1 sind stark glykosylierte Transmembran-Proteine mit kurzen, zytoplasmatischen Domänen zur Interaktion mit Proteinen. Vor allem CD18 besitzt Sequenzmotive zur Bindung an Struktur-Proteine wie Talin oder α -Actinin (169). Spezifische Aminosäuren (AS) können außerdem durch Phosphorylierung modifiziert werden, was die LFA-1-Verteilung und verschiedene Signalwege reguliert (64, 65, 205). Für CD18 wurde das membrannahe Sequenzmotiv YXX θ (wobei X eine beliebige AS und θ eine AS mit einer sperrigen hydrophoben Seitenkette darstellt) als essentiell für das Recycling von LFA-1 zwischen Zytoplasmamembran und Rab11-positiven Endosomen beschrieben (61, 62). Dieser Kreislauf aus Endo- und Exozytose von LFA-1-Vesikeln ist vermutlich über den gesamten Verlauf abhängig von Cholesterin. Auch für VacA wurde gezeigt, dass die Aufnahme in Epithelzellen über Cholesterin-reichen Membranstrukturen erfolgt (138, 177). Außerdem wurde sowohl für VacA als auch LFA-1 beschrieben, dass die Aufnahme in Zellen über einen Clathrin-unabhängigen Mechanismus erfolgt (61, 77). Die Untersuchungen mit VacA wurden jedoch in Epithelzellen, die für LFA-1 in Neutrophilen durchgeführt. Da für viele Toxine unterschiedliche Aufnahmewege beschrieben sind, die zwischen verschiedenen Zelltypen sowie Zelllinien und primären Zellen variieren können, sollte die Interaktion von VacA mit primären T-Lymphozyten untersucht werden. Der erste Teil behandelt die Bindung von VacA an die Oberfläche von CD4⁺ T-Zellen. Im zweiten Teil wird der Aufnahmeweg und -mechanismus genauer charakterisiert.

3.4.1. **Bindung von VacA an primäre CD4⁺ T-Zellen**

Im folgenden Teil wurde der genaue Mechanismus der Interaktion von VacA mit CD4⁺ T-Lymphozyten untersucht. VacA oligomerisiert im Kulturüberstand zu hexameren Ringen, die sich zu dodecameren Komplexen zusammenlagern. Studien mit künstlichen Membranen zeigten, dass VacA als Hexamer in die Membran integriert (39). Dies ist abhängig von dem pH-Wert (pH<5). Membran-Bereiche, angereichert mit Cholesterin und Sphingolipiden, sind für die Aufnahme essentiell. Die Bindung von VacA an Epithelzellen ist davon jedoch unabhängig (160). Es wurde nun die Bindung von VacA an primäre T-Lymphozyten mittels FACS-Analyse untersucht.

3.4.1.1. Rolle der Oligomerisierung und Cholesterin-reicher Membrandomänen

Zuerst wurde der Beitrag der VacA-Oligomerisierung von VacA bei der Bindung von VacA untersucht. CD4⁺ T-Zellen wurden mit PMA stimuliert und mit Säure-aktivierten oder nicht-aktivierten VacA bei 8°C inkubiert. Die Bindung wurde mittels FACS-Analyse quantifiziert. Zusätzlich wurde die direkte Interaktion von oligomeren VacA mit CD18 untersucht. Dafür wurden Experimente zur Co-Präzipitationen von CD18 mit nicht-säureaktiviertem VacA durchgeführt. Wie in Abb. 25 A zu sehen ist, bindet VacA in der Hexameren- und Dodecameren-Form nicht an die Zelloberfläche. Auch die Interaktion mit CD18 ist abhängig von der monomeren VacA-Form. CD18 konnte nicht mit nicht-aktiviertem VacA-Biotin (VacA-biotin na) präzipitiert wird (Abb. 25 B).

Im Anschluss wurde die Rolle von „lipid rafts“ bei der Bindung von VacA untersucht. Bindungsstudien von VacA an T-Zellen, deren Membran-Cholesterin mit Heptakis entfernt wurde oder denen zusätzlich Cholesterin (30 min vor oder gleichzeitig mit VacA) zugegeben wurde, wurden durchgeführt. Die essentielle Funktion von „lipid raft“-Strukturen zeigt sich nach Entfernung von Cholesterin aus der Membran durch Behandlung mit Heptakis (1 µg/ml) für 30 min. Die Bindung von VacA reduziert sich dabei auf ~20% der unbehandelten Zellen und ist mit der Bindung von nicht-säureaktivierten, oligomeren VacA vergleichbar (Abb. 25 A). Eine direkte VacA-Bindung an Cholesterin kann ausgeschlossen werden. Zwar reduziert die Zugabe von Cholesterin zeitgleich mit VacA die Bindung leicht, der Effekt tritt jedoch auch auf, wenn die Zellen 20 min mit Cholesterin inkubiert und vor VacA-Zugabe überschüssiges Cholesterin gewaschen wurde. Deshalb wird ein Effekt von Cholesterin auf die Membran-Fluidität oder die Auflösung der „lipid raft“-Integrität und somit der Verteilung der/des Rezeptoren/s als Erklärung hierfür angesehen (184, 213).

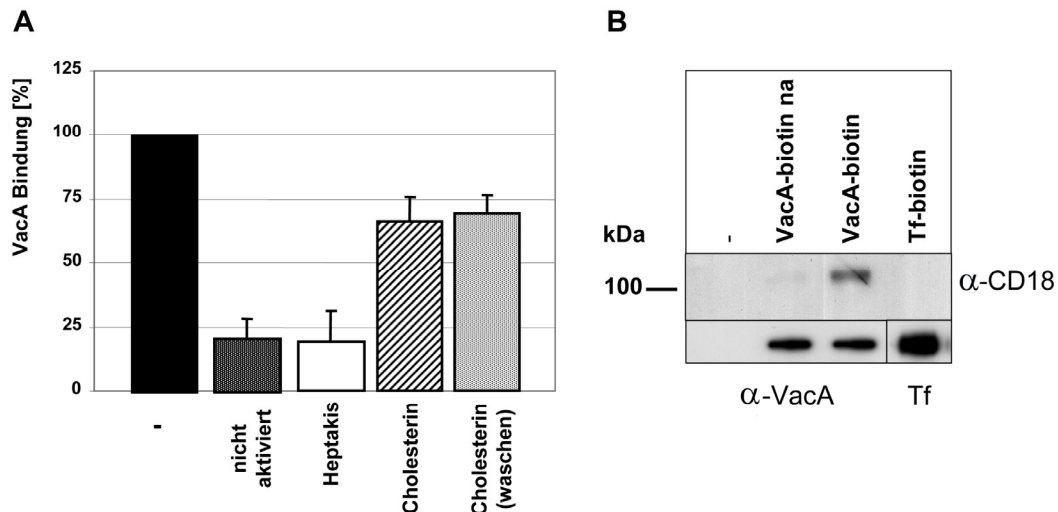


Abb. 25: VacA-Bindung an T-Zellen und Interaktion von VacA mit CD18 in Abhängigkeit von Säure-Aktivierung und Cholesterin.

(A) Primäre T-Lymphozyten wurden 30 min mit PMA stimuliert. Die Zellen wurden in den entsprechenden Ansätzen mit Heptakis inkubiert, um Membran-Cholesterin zu entfernen. Außerdem wurden T-Zellen gleichzeitig mit oder 30 min vor VacA-Zugabe mit synthetischem Cholesterin kultiviert. Die Ansätze wurden mit VacA-Alexa bei 8°C inkubiert. Ein Teil der stimulierten T-Zellen wurde mit 1 µg/ml nicht-aktiviertem VacA versetzt. Die VacA-Bindung wurde mittels FACS-Analyse quantifiziert. Es wurde die mittlere Fluoreszenzintensität aus drei unabhängigen Experimenten zur Quantifizierung verwendet.

(B) Membran von Jurkat T-Zellen wurde mit Ultrazentrifugation präpariert und zu je 75 µg Membran je 1 µg/ml VacA-biotin, VacA-biotin na (nicht aktiviert), Transferrin-biotin (Tf-biotin) über Nacht zugegeben. Einem Kontrollansatz wurde nichts hinzugegeben. Biotinylierte Proteine wurden mit Neutravidin-Sepharose präzipitiert und die Proteine mit SDS-PAGE aufgetrennt. CD18 wurde nach Transfer auf PVDF-Membran mit Western Blot-Analyse detektiert.

3.4.1.2. Bindung von VacA an Oligosaccharide

Für die Bindung von VacA an die Rezeptoren RPTP α und RPTP β von Epithelzelllinien wurde gezeigt, dass sie auf einer Interaktion von VacA und Oligosacchariden beruht (222). Dabei spielen Sialyl-Reste eine entscheidende Rolle, da die Behandlung mit dem Enzym Neuraminidase zum Verlust der direkten Bindung von VacA an RPTP α und RPTP β führt. Die Deletion der glykosylierten Aminosäure-Reste hatte denselben Effekt. Behandlung der Epithelzellen mit Neuraminidase verhinderte jedoch nicht die Bindung an die Zelloberfläche, so dass auch hier eine weitere Komponente für die Bindung von VacA in Betracht zu ziehen ist. Im folgenden Teil sollte der Effekt der Neuraminidase-Behandlung von CD4⁺ T-Zellen auf die Bindung von VacA untersucht werden.

Zellen wurden hierfür auf Eis mit Neuraminidase behandelt und im Anschluß bei 8°C mit VacA-Alexa inkubiert. Die Deglykosylierung wurde durch Western Blot-Analyse von CD18

(Abb. 26) kontrolliert, da die Abspaltung von Sialyl-Resten zu einem veränderten Laufverhalten von CD18 führt.

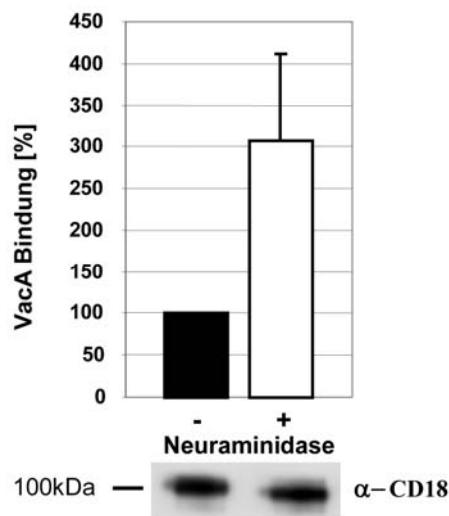


Abb. 26: VacA-Bindung an CD4⁺ T-Zellen nach Deglykosylierung mit Neuraminidase.

T-Zellen (5×10^5) wurden auf Eis mit oder ohne 4 mU Neuraminidase inkubiert. Den Ansätzen wurde jeweils 1 $\mu\text{g/ml}$ VacA-Alexa für 30 min bei 8°C zugegeben. Nach Waschen der Zellen mit PBS wurde die Fluoreszenz mittels FACS-Analyse quantifiziert. Die Ansätze ohne Neuraminidase-Behandlung wurden als 100% definiert. Die Kontrolle der Neuraminidase-Aktivität erfolgte nach Auftrennung von Zelllysaten durch SDS-PAGE mit der Western Blot-Analyse von CD18. Die Abspaltung von Oligosacchariden führt zu einem veränderten Laufverhalten.

Dabei zeigte sich, dass VacA nach Neuraminidase-Behandlung dreifach stärker an CD4⁺ T-Lymphozyten bindet (Abb. 26). Dieses Ergebnis unterscheidet sich von der beschriebenen Bindung an Epithelzellen. Die stärkere Bindung ist auch bei Jurkat T-Zellen nach Neuraminidase-Behandlung zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Ob die stärkere Bindung von VacA an die Zelloberfläche nach Deglykosylierung mit Neuraminidase auf einer verstärkten Bindung von VacA an CD18 beruht, wurde mittels Co-Präzipitation von CD18 mit VacA-Biotin untersucht. Dabei wurde die Membranpräparation vor Zugabe von VacA-Biotin mit Neuraminidase behandelt. Auch hier wurde die Effektivität der Reaktion durch das veränderte Laufverhalten von CD18 in der SDS-PAGE mit Western Blot-Analyse kontrolliert. Als Kontrolle wurde VacA ohne Biotin und Transferrin-Biotin (Tf-Bio) verwendet. Wie sich dabei zeigte, kann CD18 nach Behandlung mit Neuraminidase nicht mehr mit VacA-Biotin präzipitiert werden (Abb. 27). Dies lässt darauf schließen, dass die Bindung von VacA an CD18 über Oligosaccharide erfolgt, und somit der VacA-Bindung an RPTP α und RPTP β gleicht.

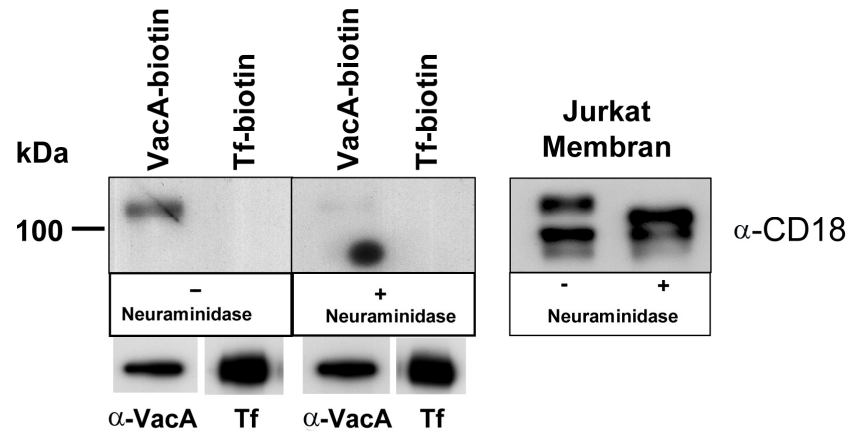


Abb. 27: Präzipitation von CD18 mit VacA-biotin in Abhängigkeit von Glykosylierung.

Membran von Jurkat T-Zellen wurde mit Ultrazentrifugation präpariert und für 4 h mit und ohne Neuraminidase behandelt. Zu je 75 μ g Membran wurden je 1 μ g/ml VacA-biotin und Transferrin-biotin (Tf-biotin) über Nacht zugegeben. Einem Kontrollansatz wurde nichts hinzugegeben. Biotinylierte Proteine wurden mit Neutravidin-Sephrose präzipitiert und die Proteine mit SDS-PAGE aufgetrennt. CD18 wurde nach Transfer auf PVDF-Membran mit Western Blot-Analyse detektiert. Als Kontrolle der Neuraminidase-Behandlung wurde das veränderte Laufverhalten von CD18 in der Jurkat-Membran überprüft.

Die Neuraminidase-Behandlung der Zellen führt zwar zu einer stärkeren Bindung von VacA an die Zelloberfläche, jedoch zum Verlust der direkten Interaktion mit CD18. Dies kann bedeuten, daß die Abspaltung von Oligosacchariden zu einer verstärkten Bindung von VacA an einen möglichen Co-Rezeptor führt. Um nun weitere Interaktionspartner von VacA zu identifizieren, wurden Präzipitationen mit VacA-Biotin von unbehandelten bzw. Neuraminidase-behandelten Membranpräparationen durchgeführt. Die co-präzipitierten Proteine wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und durch reversible Färbung mit Silbernitrat kenntlich gemacht.

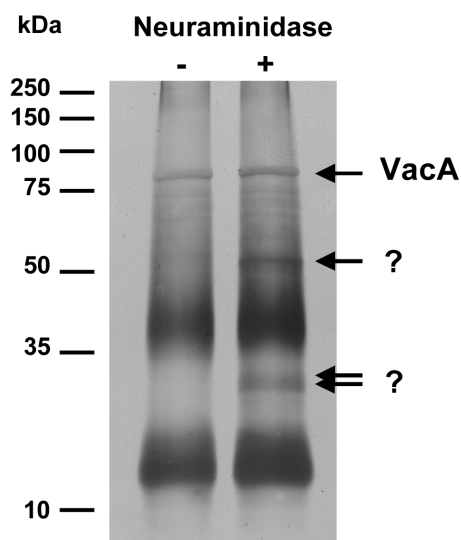


Abb. 28: SDS-PAGE von Co-Präzipitation mit VacA-Biotin und Protein-Silberfärbung.

Präparierte Membranen von Jurkat T-Zellen wurden für 4 h mit oder ohne Neuraminidase behandelt. Je Ansatz wurde 4 μ g VacA-Biotin pro 300 μ g Membran pro ml über Nacht zugegeben. Biotinylierte Proteine wurden mit Neutravidin-Sephrose präzipitiert und die Proteine mit SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden mit reversibler Silbernitrat-Färbung sichtbar gemacht.

Vergleicht man die aufgetrennten Proteine der Ansätze unbehandelter und Neuraminidase-behandelter Membranen, so binden mindestens 3 Proteine der Größen von ~50, 30 und 33 kDa an VacA (Abb. 28). Dieses Experiment soll in Zukunft im präparativen Maßstab durchgeführt werden und die drei Proteinbanden sollen aus dem Gel ausgeschnitten und durch Massenspektrometrie identifiziert werden.

3.4.2. VacA-Aufnahme in primäre CD4⁺ T-Lymphozyten

Nach spezifischer Bindung an den/die Rezeptor/en werden Toxine meistens in die Zelle aufgenommen. Häufig induziert die Bindung eine Aktivierung von Signalwegen und dadurch eine Stimulierung zellulärer Endozytosewege. Eine Oligomerisierung des Toxin/Rezeptor-Komplexes oder die Reorientierung in spezifische Membranstrukturen sind häufig daran beteiligt. Dabei existieren in Zellen mehrere Aufnahmewege, die abhängig von verschiedenen Faktoren sind, wie z.B. der Art des Rezeptors oder dem Zelltyp. Außerdem können sich Endozytosewege funktionell komplementieren oder Rezeptoren über mehrere Wege aufgenommen werden (174). Die Endozytose von VacA in Zellen wurde bisher an der HeLa Epithelzelllinie untersucht (76, 77, 160). Dabei zeigte sich, dass VacA über einen Clathrin-unabhängigen Weg endozytiert wird. Die Aufnahme erfolgt über „lipid raft“-Strukturen und erfordert neben dem Aktin-Zytoskelett die kleinen GTPasen Cdc42 und Rac-1. Der Aufnahmeweg wurde aufgrund der beteiligten Komponenten als GEEC-Weg eingeteilt. Im folgenden Teil wurde untersucht, ob die Aufnahme von VacA in primäre T-Zellen vergleichbar mit der in Epithelzellen ist. Zu Beginn sollte gezeigt werden welche Art der Aktivierung der Zellen nötig ist, um die Aufnahme von VacA zu induzieren. Weiter wurden mit chemischen Inhibitoren und inhibitorischen Peptiden essentielle Komponenten für die Aufnahme von VacA bestimmt.

3.4.2.1. Art der T-Zell-Aktivierung und Aufnahme von VacA

Wie unsere Daten zeigen, werden primäre CD4⁺ T-Lymphozyten nach Aktivierung mit PMA und CD3/CD28-gekoppelten Latexkugeln sensitiv für die Inhibition der IL-2-Expression durch VacA (Abb. 6). Außerdem stimuliert PMA die Aufnahme von VacA (Abb. 8 und Abb. 9). Ob auch die Aktivierung mit Zytokinen primäre T-Zellen sensitiv für VacA macht und zur Aufnahme von VacA führt, sollte mittels FACS-Analyse und IL-2-ELISA bestimmt werden. Für die Quantifizierung der Aufnahme wurden die Zellen 30 min mit PMA oder für 8 bzw. 20 h mit CD3/CD28-Latexkugeln aktiviert. Außerdem wurde der Effekt zweier Zytokine, SDF-1

(CXCL12) und Exodus-2 (CCL21), untersucht. Beide Zytokine regulieren die Adhäsion von Leukozyten und führen zur Aktivierung von LFA-1 (29, 80). Die Zellen wurden 15 und 30 min vor, sowie gleichzeitig mit VacA mit Zytokinen aktiviert. Die Aktivierung wurde mikroskopisch durch Migration bzw. Adhäsion auf ICAM-1 kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Nach Aktivierung wurde VacA-Alexa488 zugegeben und die Aufnahme mittels FACS-Analyse quantifiziert.

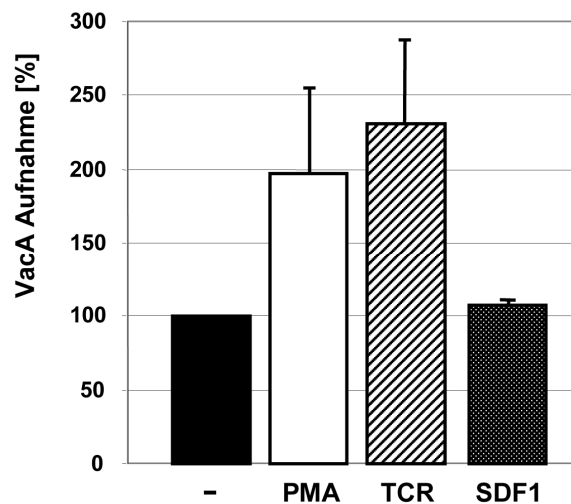


Abb. 29: Quantifizierung der VacA-Aufnahme nach Aktivierung primärer T-Zellen mit PMA, SDF-1 und CD3/CD28-Latexkugeln (TCR).

Primäre CD4⁺ T-Lymphozyten wurden entweder für ~20 h mit CD3/CD28-Latexkugeln (TCR), oder Zugabe von PMA (5 nM) für 30 min bzw. SDF-1 für 15 min aktiviert. Den Zellen ($2,5 \times 10^5$) wurde jeweils 1 µg/ml VacA-Alexa488 zugegeben und 30-40 min bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden auf Eis überführt und zweimal mit PBS gewaschen. VacA Aufnahme wurden mittels FACS-Analyse quantifiziert und die Fluoreszenz unstimulierter T-Zellen wurde als 100% gesetzt. Die Abbildung entspricht den Ergebnissen aus 3 unabhängigen Experimenten.

Wie in Abb. 29 zu erkennen ist, führt die Stimulierung mittels PMA zur deutlichen Aufnahme von VacA. Die Aktivierung über den TCR hat einen vergleichbaren Effekt, muß dabei jedoch über ca. 20 h durchgeführt werden, da der Aktivierungsprozess über den TCR deutlich länger dauert. T-Zellen, gebunden an CD3/CD28-Kugeln, weisen zu Beginn ein anerges Verhalten auf und nehmen kein VacA auf. Nach 8 h nehmen nur 30% der T-Zell-Population VacA auf. Nach 20 h verschiebt sich der Anteil dieser ungebundenen, aktivierten T-Zellen auf ~80%. Die aktivierte Population kann nun deutlich VacA aufnehmen. Diese Aktivierungsstadien sind auch bei Aktivierung von T-Zellen durch APC *in vivo* zu beobachten (87). Zytokine führen, unabhängig vom Zeitpunkt der Aktivierung, zu keiner Aufnahme von VacA. Zwar kommt es zur Polarisierung der Zellen, die Aktivierung mit Zytokinen führt jedoch nicht zur Migration sondern nur zur Adhäsion von T-Zellen (29, 80). Eine Korrelation zwischen Migration von T-Zellen und VacA-Aufnahme wird dadurch unterstützt.

In ersten vorläufigen Experimenten konnte außerdem gezeigt werden, dass die Stimulierung mit den Zytokinen SDF-1 und Exodus-2 primäre T-Lymphozyten nicht sensitiv gegenüber einer Hemmung der IL-2-Expression durch VacA macht (Daten nicht gezeigt). Dies muß jedoch in weiteren Experimenten bestätigt werden.

3.4.2.2. Rolle des Aktin Zytoskeletts bei der VacA-Aufnahme

Um die Rolle verschiedener zellulärer Faktoren bei der Aufnahme von VacA in CD4⁺ T-Zellen zu testen, wurde eine systematische Untersuchung durchgeführt, wobei folgende Gruppen unterschieden wurden: Zytoskelett (Aktin, Tubulin), Endozytosewege (Clathrin, „lipid raft“), Enzyme (Kinasen, Phosphatasen, Lipasen), kleine GTPasen der Rho-Familie mit Effektor-Kinasen (RhoA, Rac-1, Cdc42, ROCK, MLCK), Adaptor-Proteine (Talin). CD4⁺ T-Zellen wurden entweder mit PMA oder über den TCR aktiviert und die Aufnahme von VacA mittels FACS-Analyse quantifiziert. Die Inhibitoren und Peptide wurden wie in Tabelle 2 beschrieben eingesetzt.

Zuerst wurde die Rolle des Zytoskeletts untersucht. Dabei wurden die Aktin-depolymerisierenden Agenzien CytochalasinD und LatrunculinB und das F-Aktin-stabilisierende zyklische Peptid Jasplakinolide benutzt. Nocodazol wurde zur Depolymerisierung der Mikrotubuli verwendet. Die Inhibitoren wurden den Zellen 30 min vor VacA-Alexa488 zugegeben. Wie in Abb. 30 zu sehen ist, führt die Störung des Aktin-Zytoskeletts, unabhängig ob Depolymerisierung oder Stabilisierung, zur Reduktion der VacA-Aufnahme um ca. 60%, bezogen auf den Wert nicht-stimulierter Zellen (weißer Balken). Die Depolymerisierung der Mikrotubuli-Fasern mit Nocodazol hat keinen Einfluß auf die Aufnahme. Eine 100%ige Blockade der Aufnahme mit Aktin-Inhibitoren ist nicht erfolgt. Die Funktion von Aktin bei der Endozytose in Säugetierzellen wird dabei als variabel aber nicht obligatorisch beschrieben (73). Die häufig beschriebene Inkonsistenz der Ergebnisse zur Hemmung der Endozytose mag auch auf eine unvollständige Inhibition des Aktin-Zytoskeletts zurückgeführt werden.

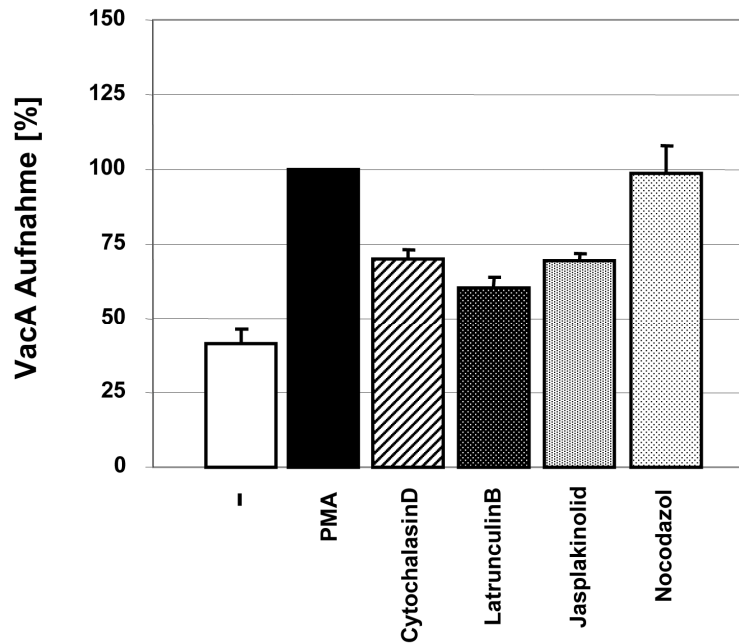


Abb. 30: Effekte von Inhibitoren des Aktin-Zytoskeletts und Mikrotubuli auf die VacA-Aufnahme von T-Lymphozyten.

T-Lymphozyten wurden für 30 min mit PMA stimuliert und für weitere 30 min mit den Inhibitoren LatrunculinB, Jasplakinolid, CytochalasinD bzw. Nocodazol versehen. Den Ansätzen wurde VacA-Alexa488 zugegeben und für 40 min bei 37°C inkubiert. Die Aufnahme wurde mittels FACS-Analyse quantifiziert. Das Ergebnis entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten

3.4.2.3. Clathrin-unabhängige Aufnahme von VacA

Ob VacA über Clathrin-abhängige oder -unabhängige Wege aufgenommen wird, sollte im weiteren Verlauf untersucht werden. Da die Transfektion primärer Zellen mit dominant-negativen Konstrukten von Komponenten des Clathrin-Systems (Dynamin2, Eps15) schwierig ist, wurden chemische Inhibitoren verwendet. Neben mono-Dansylcadaverin und Chlorpromazin, wurde 1-Butanol und 2-Butanol (Kontrolle für 1-Butanol) verwendet. Außerdem wurde die VacA-Aufnahme in Anwesenheit des spezifischen Dynamin-Inhibitors Dynasore getestet. Wie in Abb. 31 zu sehen ist, zeigen die Inhibitoren mono-Dansylcadaverin, Chlorpromazin und 1-Butanol keinen negativen Effekt auf die VacA-Aufnahme. Es ist eher eine verstärkte Endozytose zu erkennen. Nur im Fall von Dynasore ist ein leichter Rückgang der VacA-Aufnahme erkennbar. Im Gegensatz zu den anderen Ansätzen wurden die Zellen während des Experiments mit Dynasore in RPMI-Medium mit reduzierten FCS (2% Serum) kultiviert. T-Zellen zeigen dadurch ein leicht aktiviertes Verhalten auch ohne PMA. Dies kann möglicherweise das veränderte Verhalten erklären. Die Ergebnisse zeigen insgesamt, dass VacA auch in T-Lymphozyten Clathrin-unabhängig aufgenommen wird.

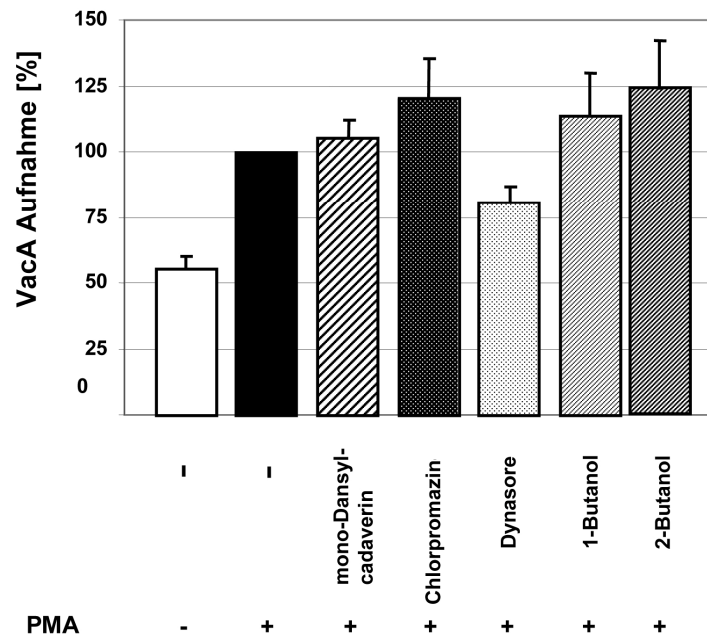


Abb. 31: VacA-Aufnahme in CD4⁺ T-Zellen bei Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose.

CD4⁺ T-Zellen wurden mit PMA stimuliert und im Anschluß mit den Inhibitoren Chlorpromazin, mono-Dansylcadaverin und Dynasore für 20 min inkubiert. Die Alkohole 1- bzw. 2-Butanol wurden 1 min vor Zugabe von VacA verwendet. Die Ansätze wurden mit je 1 µg/ml VacA-Alexa für 30-40 min inkubiert und nach zweimal waschen mit PBS die mittlere Fluoreszenz von aufgenommenen VacA bestimmt. Die VacA-Aufnahme PMA-stimulierter Zellen wurde als 100% gesetzt.

Neben Clathrin-abhängigen Wegen spielt die Aufnahme über „lipid raft“-Membranstrukturen eine wichtige Rolle in eukaryontischen Zellen. Zentrale Bestandteile dieser Membrandomänen sind Cholesterin und Sphingolipide mit gesättigten Kohlenwasserstoffketten. Unterschiedliche Proteine wie Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine, doppelt acylierte Proteine, α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine oder palmitoylierte Proteine zeigen eine Affinität zu „lipid raft“-Membrandomänen (184). Eine Behandlung der Zellen mit Heptakis führt zur Depletion von Cholesterin und beeinträchtigt die Endozytose über „lipid rafts“. PMA-aktivierte CD4⁺ T-Zellen wurden mit Heptakis behandelt und im Anschluß die Aufnahme von VacA mittels FACS-Analyse quantifiziert. Wie in Abb. 32 zu sehen ist, können Heptakis-behandelte Zellen kein VacA mehr aufnehmen. Dass der Wert dabei noch unter den von nicht-stimulierten Zellen fällt, kann daran liegen, dass die Behandlung mit Heptakis auch die Bindung von VacA deutlich stört (Abb. 25). Dies zeigt jedoch deutlich, dass die VacA-Aufnahme in CD4⁺ T-Zellen deutlich von Cholesterin und somit „lipid raft“-Strukturen abhängt. Neben der VacA-Aufnahme in Epithelzellen (177), wurde auch die Aufnahme von LFA-1 in Neutrophilen als „lipid raft“-abhängig beschrieben (61).

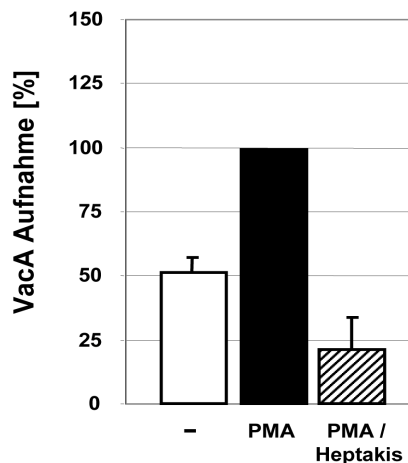


Abb. 32: Aufnahme von VacA in Abhängigkeit von Membran-Cholesterin.

Primäre T-Zellen wurden nach Stimulierung mit PMA für 30 min mit 1 µg/ml Heptakis inkubiert. Je 1 µg/ml VacA-Alexa488 wurde zugegeben und die Aufnahme für 40 min bei 37°C ermöglicht. Die Zellen wurden auf Eis überführt und mit PBS gewaschen. Aufgenommenes VacA wurde mittels FACS-Analyse quantifiziert. Die Aufnahme PMA-stimulierter Zellen wurde als 100% gesetzt und die Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten.

3.4.2.4. Zelluläre Enzyme und die VacA-Aufnahme in T-Zellen

Wie in Kapitel 3.4.2.1 gezeigt werden konnte, wird VacA nur in T-Zellen aufgenommen, die mit PMA oder über den TCR stimuliert wurden. Die Aktivierung mit Zytokinen hatte keinen Effekt. Da es aber in allen Fällen zur Aktivierung von LFA-1 und zu dessen Lokalisation in „lipid rafts“ kommt (61), müssen andere Faktoren für die Aufnahme essentiell sein. Aktivierung von Zellen führt im Allgemeinen zur Stimulierung von Enzymen wie Phospholipase C γ (PLC γ), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) oder Isoenzymen der Protein Kinase C-Familie (PKC). Gebildete Signalmoleküle wie Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃) induzieren daraufhin verschiedene Signalwege, die häufig eng miteinander verknüpft sind. Vor allem Enzyme der PKC-Familie spielen bei der Aktivierung von T-Zellen eine Rolle. Der Effekt von PMA auf die Aktivierung von T-Zellen liegt so z.B. in der Aktivierung klassischer und neuer PKC durch Stimulierung des Co-Faktors DAG. DAG entsteht *in vivo* zusammen mit IP₃ durch Spaltung von PIP₂ durch die PLC γ . Im folgenden Teil sollte die Beteiligung der Enzyme PKC, PLC γ und PI3K bei der Aufnahme von VacA untersucht werden. Die Aktivität der Enzyme wurde mit chemischen Inhibitoren gestört, wobei für PKC der Inhibitor Bisindolylmaleimid II (BIM II) verwendet wurde. Die Kinase PI3K und Phospholipase PLC γ wurden mit Hilfe der Inhibitoren Wortmannin bzw. U79831 gehemmt.

T-Zellen wurden nach Aktivierung mit PMA bzw. TCR für 20–30 min mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt. Die VacA-Aufnahme wurde mittels FACS-Analyse quantifiziert und die Wirkung der Inhibitoren durch Migration auf ICAM-1 mikroskopisch kontrolliert (Daten nicht gezeigt).

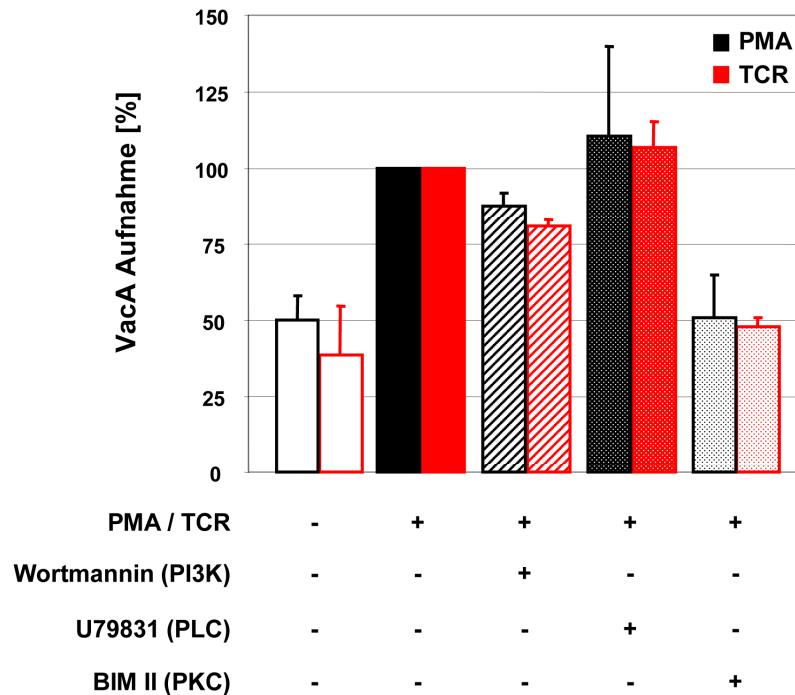


Abb. 33: Effekt der Inhibitoren gegen PKC, PLC γ und PI3K auf die VacA-Aufnahme.

Primäre T-Zellen wurden entweder für 20 h mit CD3/CD28-Latexkugeln (TCR) oder 30 min mit PMA (5 nM) stimuliert. Die entsprechenden Ansätze wurden für 30 min mit den Inhibitoren Wortmannin (PI3K), U79831 (PLC γ) und Bisindolylmaleimid II (BIM II) (PKCs) inkubiert und im Anschluß je 1 μ g/ml VacA-Alexa488 zugegeben. Die Zellen wurden für weitere 40 min bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenz von aufgenommenen VacA-Alexa wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. VacA-Aufnahme stimulierter Zellen ohne Inhibitor wurde als 100% gesetzt. Die Abbildung entspricht den Ergebnissen aus 3 unabhängigen Experimenten.

In Abb. 33 ist die Quantifizierung der VacA-Aufnahme nach Behandlung der Zellen mit den verschiedenen Inhibitoren dargestellt. Dabei zeigt die Hemmung von PI3K und PLC γ keine Wirkung auf die Endozytose von VacA, unabhängig von der Art der Aktivierung. Wird jedoch PKC mit BIM II inhibiert, kann kein VacA mehr aufgenommen werden und entspricht den nicht-stimulierten Zellen. Dies ist auch nach Aktivierung der Zellen mittels TCR-Aktivierung der Fall (rote Balken), so dass die zentrale Rolle der PKCs nicht nur bei der T-Zell-Aktivierung, sondern auch der Aufnahme von VacA deutlich wird.

3.4.2.5. Rolle der PKC-Isoformen bei der Aufnahme von VacA

Die Familie der C Protein Kinasen (PKC) besteht derzeit aus 10 Isoformen, die sich anhand der Substrat-spezifität unterscheiden. Außerdem werden die Kinasen anhand der benötigten Co-Faktoren in 3 Gruppen eingeteilt. Klassische PKCs (PKC α , - β I, - β II, - γ) und neue PKCs (PKC δ , - ϵ , - θ , - η) werden mit DAG oder Phorbolster, wie PMA, aktiviert. Außerdem benötigen Klassische PKCs noch Ca²⁺ für ihre Aktivität. Atypische PKCs (PKC ζ , - λ /i)

hingegen binden weder DAG noch Ca^{2+} (195). BIM II ist ein spezifischer Inhibitor für PKC, der jedoch alle PKC-Isoformen inhibiert. Um die bei der VacA-Aufnahme beteiligten PKC-Isoformen genauer zu charakterisieren, wurden unterschiedliche chemische Inhibitoren verwendet, die spezifischer als BIM II einzelne Gruppen von Isoformen inhibieren. Außerdem wurden Peptide zur Hemmung von PKC α/β und PKC ζ eingesetzt. Sie entsprechen der Pseudosubstrat-Domäne der jeweiligen PKC und sind mit der Substrat-Sequenz (bis auf den Aminosäureaustausch von Ser/Thr zu Alanin) identisch. Um Membran-gängig zu sein, sind die Peptide am N-Terminus mit einem Myristyl-Rest modifiziert (58).

Primäre CD4⁺ T-Zellen wurden, nach Aktivierung über den TCR oder PMA, für 20 min mit den angegebenen Inhibitoren inkubiert und im Anschluss VacA-Alexa488 zugegeben. Die Fluoreszenz von gebundenen VacA wurde mit Alexa488-spezifischem Antikörper unterdrückt und die Fluoreszenz von aufgenommenen VacA-Alexa488 mit FACS-Analyse quantifiziert.

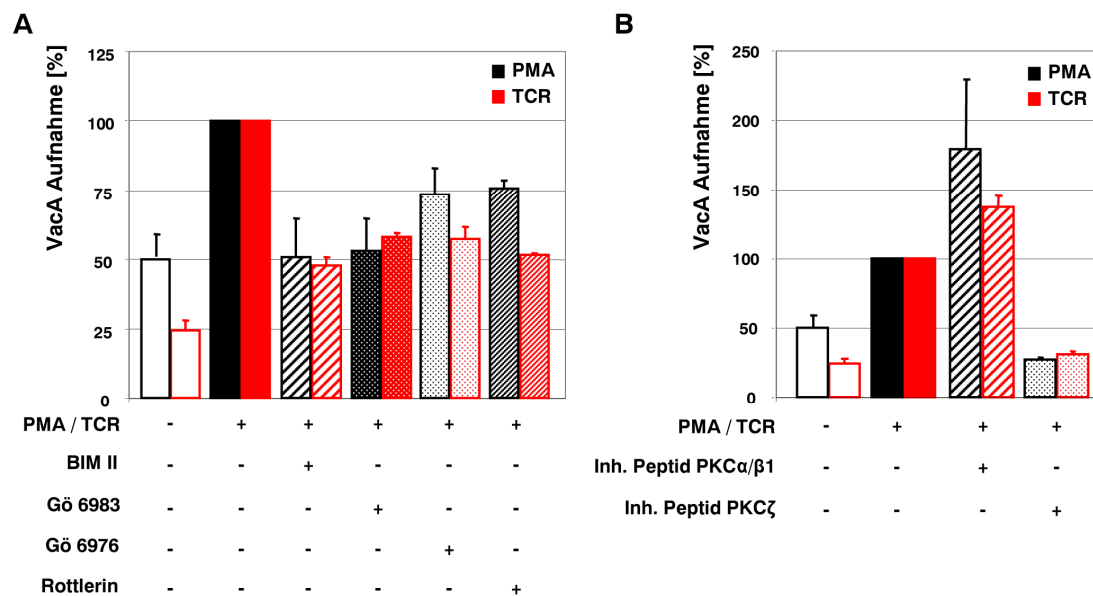


Abb. 34: Rolle der PKC-Isoformen bei der Aufnahme von VacA.

Primäre CD4⁺ T-Zellen wurden für 20 h mit CD3/CD28-Latexkugeln (TCR) oder 30 min mit PMA (5 nM) stimuliert. Den Zellen (je 5×10^5) wurden die entsprechenden Inhibitoren, chemische Inh. (A) und inhibitorsiche Peptide (B), zugegeben und für 20 min bei 37°C inkubiert. Je Ansatz wurden 0,8 $\mu\text{g/ml}$ VacA-Alexa488 hinzugefügt und für weitere 30 min inkubiert um die Aufnahme zu ermöglichen. Nach Waschen mit PBS wurde die Fluoreszenz von gebundenem VacA-Alexa488 mit Alexa488-spezifischem Antikörper unterdrückt. Die Quantifizierung erfolgt mittels FACS-Analyse anhand der mittleren Fluoreszenzintensität. Die Ansätze ohne Inhibitoren wurden als 100% gesetzt. Die Werte entsprechen den Ergebnissen aus 3 unabhängigen Experimenten.

Wie in Abb. 34 A zu erkennen ist, hemmen alle chemischen Inhibitoren die Aufnahme von VacA, wobei es zu leichten Abweichungen in der Stärke kommt. Auch sind im Fall von Gö6976 und Rottlerin Unterschiede in der Hemmung der VacA-Aufnahme, abhängig von der

T-Zell-Aktivierung, zu erkennen. Dabei ist die VacA-Aufnahme PMA-stimulierter T-Zellen weniger sensitiv gegenüber der Hemmung durch Gö6976 und Rottlerin als bei T-Zellen, die mit CD3/CD28-Latexkugeln (TCR) aktiviert wurden. Die durch Gö6976 und Rottlerin inhibierten PKC Isoformen sind alle abhängig von DAG, so dass die Anwesenheit von PMA die geringere Hemmung erklären kann. Da Gö6976, ein selektiver Inhibitor Ca^{2+} -abhängiger PKC-Isoformen, die Aufnahme von VacA hemmt, scheinen vor allem klassische PKC wie PKC α , - β I, - β II, - γ beteiligt zu sein. Eine Rolle neuer PKC kann damit jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Außerdem wurden zwei inhibitorische Peptide gegen PKC α/β und PKC ζ verwendet. Wie in Abb. 34 B zu sehen ist, hemmt das Peptid gegen die PKC ζ -Isoform die VacA-Aufnahme vollständig, unabhängig von der Art der Aktivierung. Hemmung der PKC α/β -Isoformen hat sogar einen stark stimulierenden Effekt. Vergleicht man die Wirkung der einzelnen Inhibitoren, so kann man daraus schließen, dass mit PKC ζ und klassischen PKC mindestens zwei Isoformen beteiligt sind.

3.4.2.6. Funktion kleiner GTPasen der Rho-Familie

Wie gezeigt werden konnte (Abb. 30), spielt das Aktin-Zytoskelett bei der Aufnahme von VacA in primäre T-Zellen eine Rolle. Allgemein kommt es bei der Endozytose zur Umlagerung von Aktin, dem die Aktivierung von Signalkaskaden vorausgeht. Eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Signalen zum Aktin-Zytoskelett nehmen GTPasen ein. Dies sind Proteine, die zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen und inaktiven, GDP-gebundenen Stadium wechseln. Von zentraler Bedeutung sind dabei die kleinen GTPasen RhoA, Rac-1 und Cdc42, die zur Rho-Familie gehören und an dynamischen Prozessen wie Migration, Phagozytose, aber auch Endozytose von Membranproteinen beteiligt sind (125, 141). Für VacA wurde eine Rolle von Cdc42 und Rac-1 bei der Aufnahme in HeLa Zellen beschrieben (77).

Mittels verschiedener chemischer Inhibitoren sollte die Beteiligung der kleinen GTPasen bei der Aufnahme von VacA in CD4⁺ T-Zellen untersucht werden. Dabei wurden ein Rac-1-spezifischer Inhibitor, sowie das C3 Exotoxin von *Clostridium botulinum*, zur Deaktivierung von RhoA verwendet. Cdc42 wurde mit dem spezifischen Inhibitor SecraminA inhibiert. Er verhindert die Membran-Anlagerung von aktivem GTP-Cdc42 (152). Zusätzlich wurden Inhibitoren für die „myosin light chain kinase“ (MLCK) und „RhoA coupled kinase“ (ROCK), beides RhoA-regulierte Kinasen, verwendet. Die Aktivität der Kinasen führt zur Phosphorylierung von „myosin light chain“ (MLC) und somit Umlagerung von Aktin (188).

Die Zellen wurden nach Aktivierung über den TCR mit den jeweiligen Inhibitoren inkubiert und die VacA-Aufnahme mittels FACS-Analyse quantifiziert.

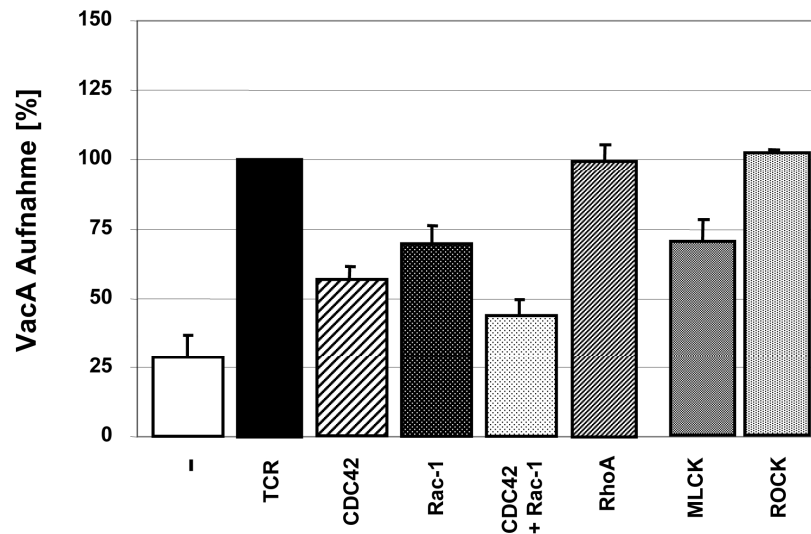


Abb. 35: Rolle der kleinen GTPasen (RhoA, Rac-1, Cdc42) und Effektor-Kinasen (MLCK, ROCK) auf die Aufnahme von VacA in CD4⁺ T-Lymphozyten.

Primäre T-Lymphozyten wurden für 20 h mit CD3/CD28-Latexkugeln aktiviert. Im Anschluß wurden sie für 20 – 30 min mit den Inhibitoren SecraminA (Cdc42), Rac-1-Inh. (Rac-1), MLCK-Inh. (MLCK) bzw. ROCK-Inh. (ROCK) inkubiert. Zur Inhibition von RhoA wurden die Zellen für 5 h mit *Clostridium* Exotoxin C3 inkubiert. Je Ansatz wurde 1 µg/ml VacA-Alexa488 zugegeben und für 40 min bei 37°C kultiviert. Aufgenommenes VacA wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte anhand der mittleren Fluoreszenzintensität. Die Werte der aktivierten T-Zellen ohne Inhibitor wurden als 100% definiert. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abb. 35 zu sehen ist, reduziert die Inhibition von Rac-1 und Cdc42 die VacA-Aufnahme um ~50%. Dies ist auch für die Stimulierung der Zellen mit PMA der Fall (Daten nicht gezeigt). Die Hemmung von RhoA wurde nur für die Aktivierung der Zellen über den TCR durchgeführt, zeigte aber unter diesen Bedingungen keinen Effekt auf die VacA-Aufnahme. Da die Inhibition von RhoA durch das C3 Exotoxin von dessen Aufnahme in die Zellen abhängt, ist es eher ein Indiz als ein Beweis, dass RhoA keine Rolle bei der VacA-Aufnahme spielt. Um dies weiter zu untersuchen, wurden die RhoA-regulierten Kinasen MLCK und ROCK gehemmt. Im Fall der Aktivierung der T-Zellen mit PMA war kein Effekt auf die VacA-Endozytose bei Hemmung der beiden Kinasen erkennbar (Daten nicht gezeigt). Bei Stimulierung der Zellen über den TCR wurde jedoch die Aufnahme von VacA durch den MLCK-Inhibitor gehemmt. Der Inhibitor wirkt dabei auch unspezifisch auf die Aktivität von PKC (166) und reduziert dadurch die VacA-Aufnahme. PMA-stimulierte T-Zellen zeigen diese reduzierte VacA-Aufnahme nicht.

3.5. Zelluläre Lokalisation und Transport von VacA

Der charakteristische Effekt des vakuolisierenden Cytotoxins VacA von *H. pylori* auf Epithelzellen ist die Ausbildung saurer Vakuolen. Die gebildeten Membranvesikel weisen dabei Proteinmarker später Endosomen (Rab7) sowie früher Lysosomen (LAMP1) auf (129). VacA gelangt nach Aufnahme in frühe Endosomen und wird weiter zu späte Endosomen transportiert. Bei diesen Transportprozessen spielen das Aktin-Zytoskelett und Mikrotubuli eine essentielle Rolle (76, 77). Unter anderem wurde für VacA gezeigt, dass der Transport von GEECs zu späten Endosomen polymerisiertes Aktin benötigt. CD2-assoziiertes Protein (CD2AP) verbindet dabei F-Aktin-Strukturen mit frühen Endosomen. Die weitere Reifung der Vesikel zu Lysosomen und somit der Abbau von VacA erfolgt nicht. Diese Arbeiten wurden ausschließlich in Epithelzellen (HeLa Zellen) durchgeführt. Die intrazelluläre VacA-Verteilung in Leukozyten ist unbekannt.

3.5.1. Vergleich der VacA-Verteilung in HeLa Zellen und T-Lymphozyten

Im folgenden Abschnitt sollte die Lokalisation von VacA in primären T-Lymphozyten untersucht und mit HeLa Zellen verglichen werden. Zur Färbung zellulärer Kompartimente wurden Fusionsproteine mit Fluoreszenzproteinen (GFP/YFP/mRFP) benutzt und die Co-Lokalisation mit VacA-Alexa mikroskopisch untersucht. Zur Unterscheidung des endosomalen Systems wurden Markerproteine für frühe Endosomen (Rab5), späte Endosomen (Rab7), frühe Lysosomen (LAMP1) und das Recycling Endosom (Rab11) in HeLa Zellen und CD4⁺ T-Lymphozyten exprimiert. Die transfizierten Zellen wurden mit VacA-Alexa inkubiert und nach 0,5 h, 6 h und 24 h die Verteilung von VacA mittels „live cell“-Mikroskopie beobachtet. Die Bilder zum Zeitpunkt 6 h sind nicht aufgeführt, da sie mit den Ergebnissen zum Zeitpunkt 24 h identisch sind. Wie in Abb. 36 zu sehen ist, findet man nach 0,5 h vor allem in der Peripherie der HeLa Zellen deutliche Überlagerungen zwischen VacA (rot) und Rab5 (grün). Dies ist nach 6 h und 24 h nicht mehr zu erkennen. VacA-Vesikel befinden sich dabei eher im Zell-Zentrum, den perinukleären Bereich. Dort überlagern sie, zum Teil schon nach 30 min, mit dem Marker für späte Endosomen Rab7. Eine fast vollständige Co-Lokalisation ist nach 6 h und 24 h zu erkennen. Nach Zugabe von Ammoniumchlorid zeigt sich auch die ausgeprägte Vakuolisierung. Die gebildeten Vakuolen sind dabei mit den Markerproteinen Rab7 und LAMP1 markiert und weisen punktartig (vor allem an Kontaktstellen zwischen Vakuolen) VacA auf. Eine Überlagerung mit dem Marker für das Recycling Endosom, Rab11, konnte zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden.

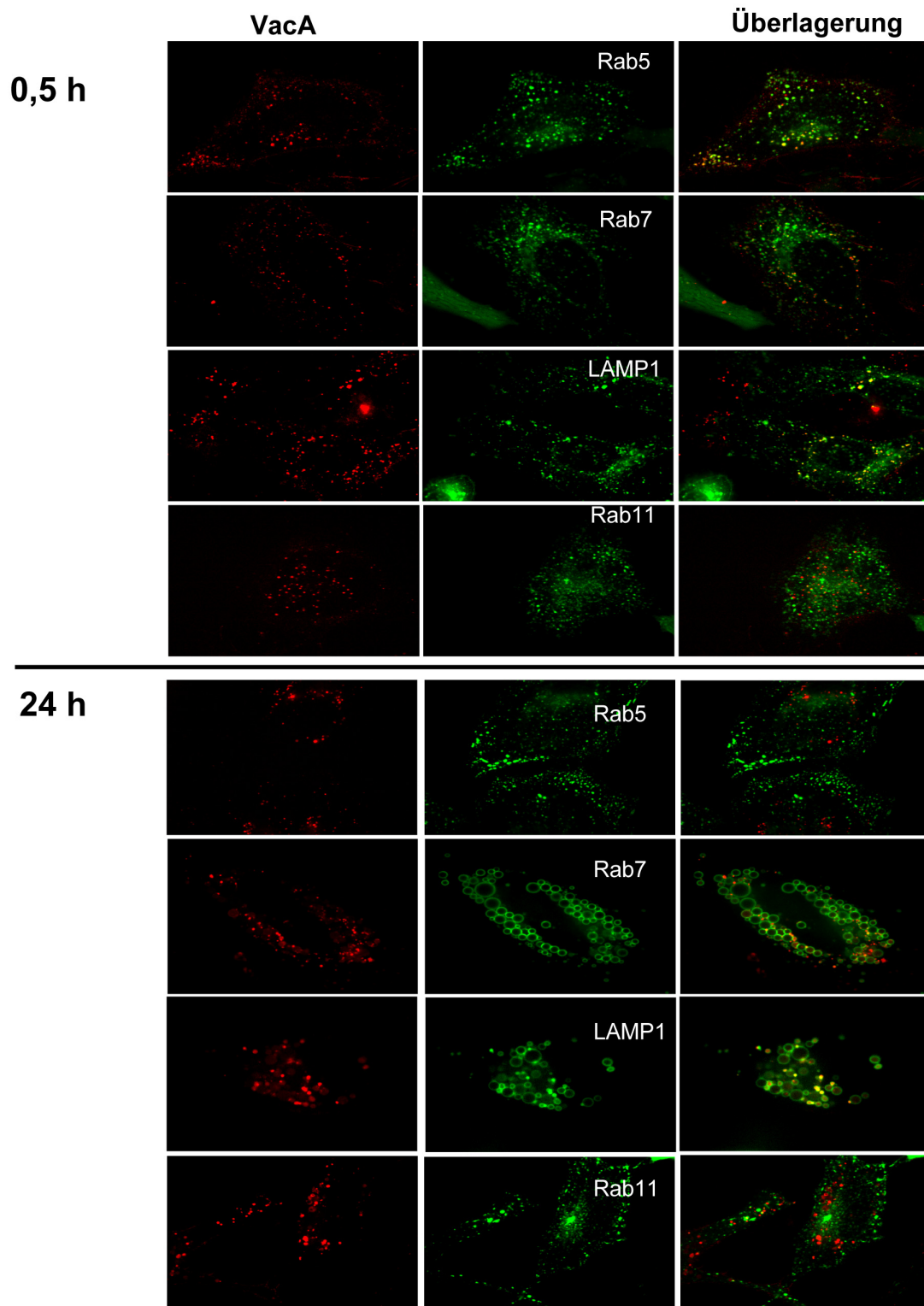


Abb. 36: Charakterisierung der Lokalisation von VacA in HeLa Zellen.

HeLa Zellen wurden mit Plasmiden für unterschiedliche GFP-Fusionsproteine transfiziert. Dabei wurden die Marker für frühe Endosomen (Rab5-GFP), späte Endosomen (Rab7-GFP), recycling Endosom (Rab11-GFP) und frühe Lysosomen (LAMP1-GFP) verwendet. Nach 12 h wurde den Ansätzen VacA-Alexa555 zugegeben und die Lokalisation von VacA nach 0,5 h und 24 h mittels „live cell“-Mikroskopie beobachtet. Dem 24 h-Ansatz wurde 2 mM Ammoniumchlorid zugegeben. In der Abbildung sind exemplarisch Zellen aufgeführt, mit VacA (rot), GFP-Markterprotein (grün) und überlagerten Bild.

Diese Verteilung von VacA konnte auch bei primären CD4⁺ T-Lymphozyten beobachtet werden (Abb. 37). Auch hier wurde VacA nach 30 min noch in frühen Endosomen beobachtet. Jedoch nahmen VacA-Vesikel schneller Marker später Endosomen / früher Lysosomen an, wie nach 30min mit Rab7 und vor allem LAMP1 beobachtet werden konnte. Vergleichbar mit HeLa Zellen bildeten sich nach 24 h mit Ammoniumchlorid deutlich Vakuolen aus, die mit den Markerproteinen Rab7 und LAMP1 gefärbt waren. Eine Überlagerung mit Rab11 konnte in keinem Fall beobachtet werden. Dies ist von Bedeutung, da LFA-1 nach Aufnahme über Rab11-positive Strukturen zur Zytoplasmamembran zurücktransportiert wird. Eine fehlende Überlagerung lässt darauf schließen, dass VacA und LFA-1 zwar zusammen aufgenommen werden, sich im weiteren Verlauf mit Reifung der Vesikel aber wieder trennen.

Der Aufnahmeweg von VacA scheint somit in Epithelzellen und T-Lymphozyten identisch zu sein. Auch in der B-Zelllinie Raji und Jurkat T-Zelllinie war die Verteilung von VacA entsprechend (Daten nicht gezeigt).

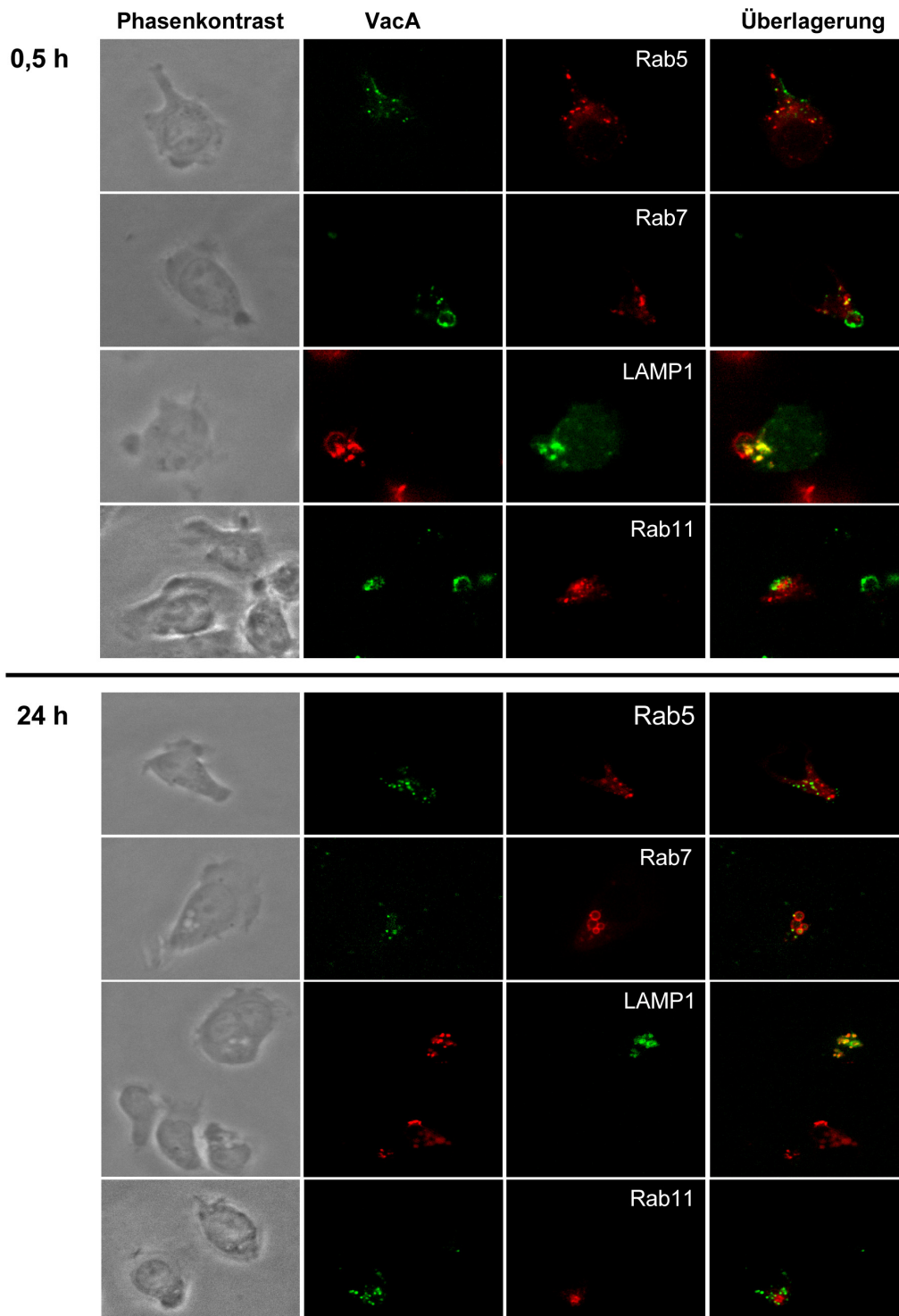


Abb. 37: Lokalisation von VacA im endosomalen System primärer T-Lymphozyten.

CD4⁺ T-Zellen wurden mit T-Zell Nucleofector-Kit (Amaxa) transfiziert. Dabei wurden die Marker für frühe Endosomen (Rab5-GFP), späte Endosomen (Rab7-GFP), Recycling Endosom (Rab11-GFP) und frühe Lysosomen (LAMP1-GFP) verwendet. 12 h nach Transfektion wurden die Zellen mit PMA stimuliert und auf ICAM-1-gekoppelte Glasbodenschälchen überführt. Je 1 µg/ml VacA-Alexa555 wurde zugegeben. Nach 0,5 h und 24 h wurde die Lokalisation mittels „live cell“-Mikroskopie beobachtet. Dem 24 h-Ansatz wurde 2 mM Ammoniumchlorid zugegeben.

3.5.2. Lokalisation von VacA bei Kontakt von T-Lymphozyten mit APC

VacA bindet an LFA-1 und lokalisiert dabei vor allem am Uropodium migrierender bzw. polarisierter T-Lymphozyten. LFA-1 spielt für das Immunsystem eine zentrale Rolle, da es nicht nur für die Migration von Leukozyten essentiell ist, sondern vor allem auch bei der Signalgebung eine Rolle spielt. Unter anderem wird die Aktivierung von T-Zellen durch APC von so genannten „outside-in“-Signalen über LFA-1 beeinflusst (93, 133, 185). LFA-1 ist dabei bei der Ausbildung der Immunologischen Synapse (IS), der Kontaktzone zwischen T-Lymphozyten und APC, und somit der Antigen-spezifischen Aktivierung von T-Zellen essentiell (54, 71).

Im folgenden Abschnitt sollte die Lokalisation von VacA während der Interaktion von APC und T-Lymphozyten untersucht werden. Dabei wurde als APC entweder die B-Zelllinie Raji oder dendritische Zellen (DC), differenziert aus PBMC, verwendet. Um die Ausbildung eines TCR-MHC-Komplexes zu simulieren, wurde das Superantigen *Staphylococcus* Enterotoxin B (SEB) verwendet. Dies führt zur Antigen-unspezifischen Aktivierung von T-Zellen durch Bindung an MHC I/II und TCR (192, 193). Es wurden primäre T-Lymphozyten mit VacA infiziert und dessen Verteilung nach Ausbildung des T-Zell/APC-Komplexes untersucht. Zu Beginn wurden CD4⁺ T-Lymphozyten für 1 h mit VacA-Alexa555 inkubiert, die Zellen mit PBS gewaschen und für weitere 3 h inkubiert. Die T-Zellen wurden mit Raji Zellen in Anwesenheit von SEB auf ICAM-1-gekoppelter Oberfläche inkubiert. Die Färbung von LFA-1 erfolgte mit Alexa488-markiertem Antikörper gegen CD11a. Nach 1 h und 24 h wurden die Lokalisation von VacA-Alexa555 und LFA-1 mit „live cell“-Mikroskopie bestimmt. Dabei zeigte sich, dass es zur Ausbildung stabiler, lang anhaltender Aggregate von T-Zellen und APC kam (Abb. 38). LFA-1 (rot) war an der Kontaktstelle der beiden Zelltypen stark konzentriert. Außerdem war zu beobachten, dass aufgenommenes VacA (Vesikel in T-Zellen) an der Kontaktstelle zur APC lokalisiert war. Diese Verteilung war immer noch nach 24 h zu erkennen (Abb. 38). Obwohl die T-Zellen nicht mehr zur APC orientiert waren, wurde VacA zusammen mit LFA-1 immer noch an der Kontaktstelle zur APC lokalisiert. Deutlich ist die veränderte Morphologie der primären T-Lymphozyten nach 24 h zu beobachten. Dabei handelt es sich vermutlich um aktivierte T-Lymphozyten.

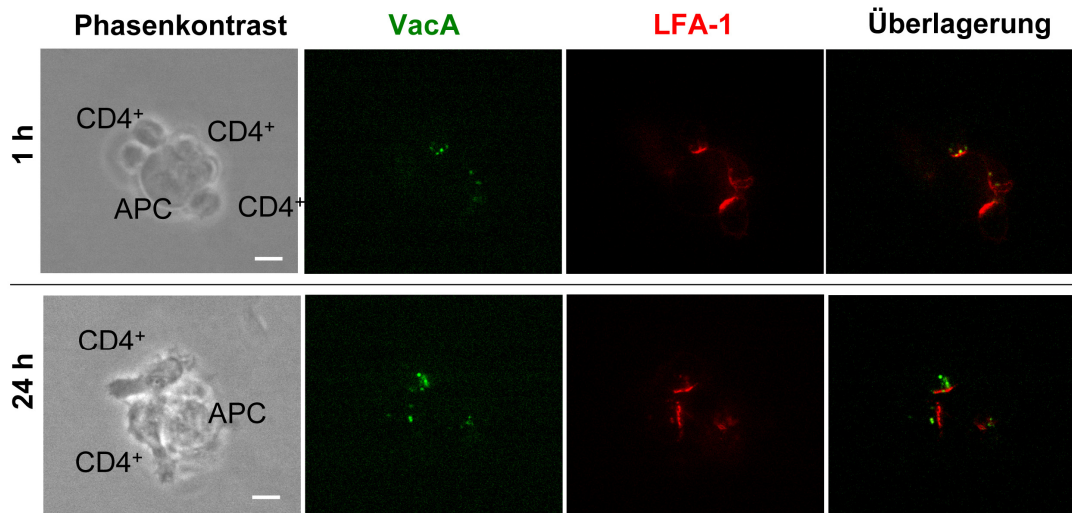


Abb. 38: Verteilung von VacA und LFA-1 auf T-Zellen bei Kontakt mit APC.

Primäre T-Zellen wurden mit PMA stimuliert, für 1 h mit VacA-Alexa555 inkubiert und nach Entfernen von ungebundenem VacA weitere 3 h kultiviert. Raji Zellen wurde für 0,5 h das Superantigen *Staphylococcus* Enterotoxin B zugegeben. T-Zellen und Raji Zellen wurden im Anschluß für 1 h und 24 h auf ICAM-1-gekoppelten Glasbodenschälchen co-kultiviert. Zur Detektion von LFA-1 wurde der Fluoreszenz-markierte Antikörper gegen CD11a verwendet. Die Ansätze wurden mittels „live cell“-Mikroskopie beobachtet. Der Balken entspricht 5 μ m.

Zusätzlich wurde die Interaktion primärer CD4⁺ T-Lymphozyten mit differenzierten DC untersucht. Wie oben beschrieben wurden T-Lymphozyten 1 h mit VacA-Alexa infiziert, gewaschen und für weiter 3 h inkubiert. LFA-1 wurde mit CD11a-spezifischem Antikörper gefärbt. Die T-Lymphozyten wurden mit differenzierten DC auf Kulturschälchen mit ICAM-1-gekoppelter Oberfläche gegeben. Die T-Zellen und DC stammten dabei von unterschiedlichen Spendern und die Ausbildung eines Immunkomplexes wurde durch das Superantigen SSB induziert. Bilder der co-kultivierten Zellen wurden mit „live cell“-Mikroskopie aufgenommen. Wie in der Bildsequenz zu sehen ist (Abb. 39), verteilt sich LFA-1 (grün) über die gesamte Oberfläche der T-Zellen, wobei es sich deutlich am Uropodium konzentriert und mit VacA (rot) überlagert. VacA ist bei vielen Zellen sowohl am Uropodium als auch intrazellulären Vesikeln vorzufinden. Die Dynamik der gerichteten VacA-Umverteilung soll am Beispiel der mit Stern markierten T-Zelle, die sich auf eine DC zu bewegt, verdeutlicht werden. Nach dem ersten Kontakt (5 s) kommt es im weiteren Verlauf zur Zunahme von LFA-1 in diesem Bereich (Pfeile; Bilder 5-20 s). Gleichzeitig wird VacA, das am Uropodium lokalisiert ist (20 s, Pfeilkopf) über einen Zeitraum von 35 s zur Kontaktstelle umgelagert. Die T-Zellen scheinen über die ehemalige Uropodium-Struktur mit der DC zu interagieren, wobei diese Interaktion über einen Zeitraum von >15 min beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt)

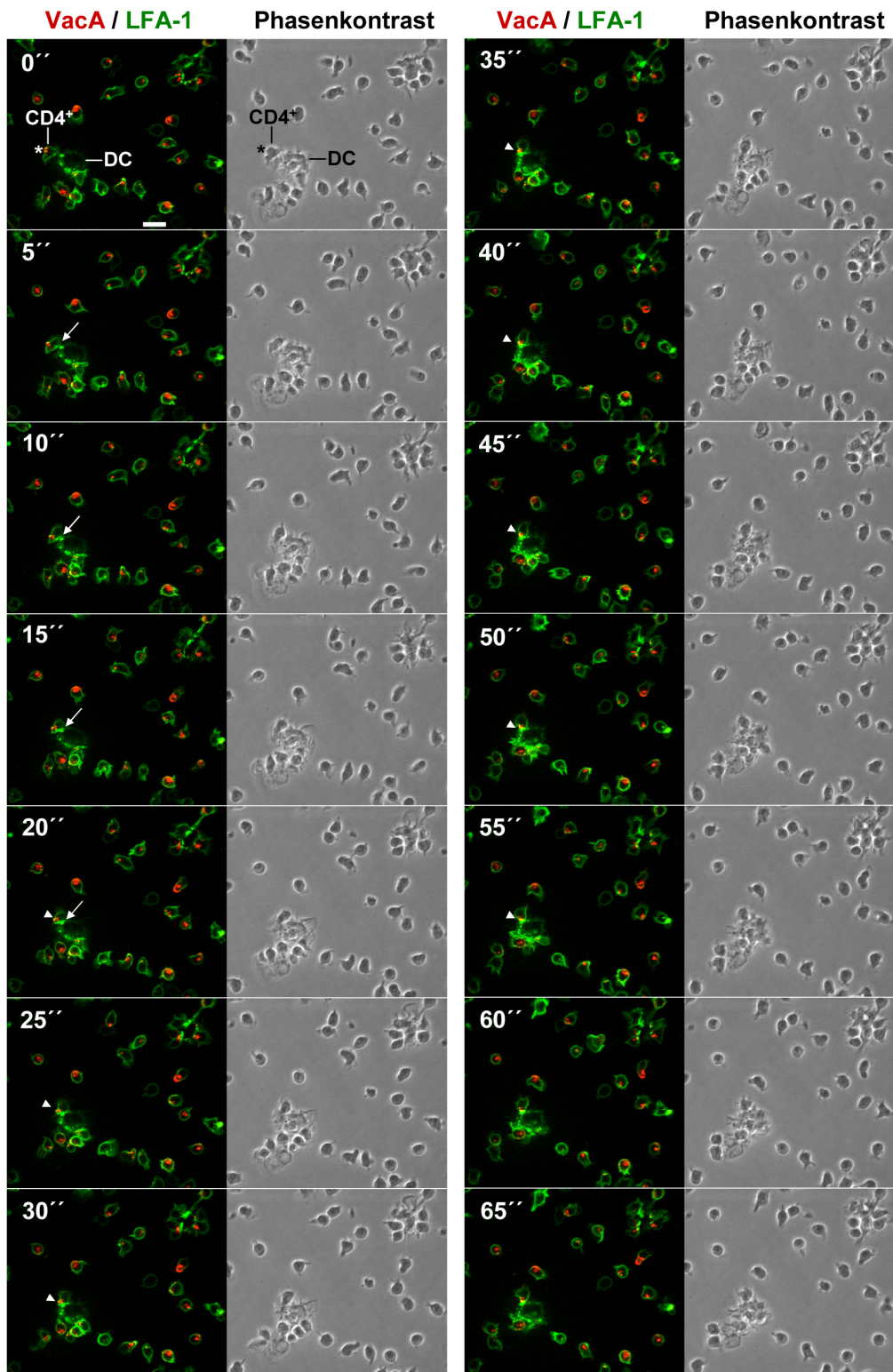


Abb. 39: Lokalisation von VacA und LFA-1 bei Interaktion von T-Lymphozyten und DCs.

Primäre T-Zellen wurden mit PMA stimuliert und für 1 h mit VacA-Alexa555 inkubiert. Nach Entfernen von ungebundenen VacA wurden die Zellen weitere 3 h kultiviert. DC wurde das Superantigen SEB zugegeben. Die beiden Ansätze wurden für 1 h auf ICAM-1-gekoppelten Glasbodenschälchen co-kultiviert. Die Detektion von LFA-1 erfolgte mit Alexa488-markiertem anti-CD11a Antikörper. Die Ansätze wurden mit „live cell“-Mikroskopie beobachtet und Bilder in Abständen von 5 s über einen Zeitraum von 65 s aufgenommen. In der Abbildung sind die Phasenkontrast-Aufnahmen und die überlagerten Fluoreszenz-Bilder mit VacA (rot) und LFA-1 (grün) zu sehen. Weitere Erklärungen sind im Text aufgeführt. Der Balken entspricht 10 μ m.

In dem vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass sich VacA an der Kontaktzone von APC und T-Lymphozyten konzentriert. Der Kontakt von T-Zellen und APC führt dabei *in vivo* zur Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen die zur Produktion von IL-2 und somit Proliferation angeregt werden.

Ob VacA die IL-2-Expression von T-Zellen nach Aktivierung durch APC, hemmen kann, wurde in Experimenten mit primären CD4⁺ T-Lymphozyten und Raji Zellen (APC) untersucht. Die Aktivierung erfolgte dabei durch Verknüpfung von MHCII und TCR durch SEB. Es konnte unter diesen Bedingungen keine Inhibition festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dabei muß in Betracht gezogen werden, dass die Stimulierung durch das Superantigen möglicherweise zu stark ist, um durch VacA inhibiert zu werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass durch SEB nur ein Teil der T-Zellen aktiviert wird, der wiederum schlechter von VacA gehemmt wird. In einer Arbeit von Cover und Kollegen (200) wurde gezeigt, dass VacA die Proliferation DC-aktivierter CD4⁺ T-Lymphozyten (auch mit Superantigen) inhibieren kann. Hemmung der IL-2-Expression wurde dabei nicht untersucht.

4. Diskussion

H. pylori kolonisiert die Magenmukosa von 50% der Weltbevölkerung und führt zur Ausbildung chronischer Entzündungen, von Magengeschwüren bis hin zum Adenokarzinom (52). Das Immunsystem kann die Infektion jedoch nicht beseitigen. *H. pylori* besitzt neben passiven auch aktive Mechanismen um den Zellen des Immunsystems zu entgehen. Als passive Mechanismen sind Modifikationen von LPS, Flagellin und DNA durch Glykosylierung, Phosphorylierung und Methylierung zu nennen (79, 134). Die Erkennung dieser Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMPs) durch spezifische Rezeptoren wie die „toll-like receptors“ (TLR) wird dadurch erschwert oder verhindert. Außerdem führen von *H. pylori* produzierte Faktoren aktiv zur Modulation oder gar Hemmung der Immunreaktion. Eine zentrale Rolle spielt dabei das vakuolisierende Cytotoxin VacA. Zum einen stört VacA die Antigenpräsentation von B-Lymphozyten und verhindert somit die Antigen-spezifische Aktivierung von T-Lymphozyten (130). Dieser Effekt ist vermutlich indirekt. Durch Störung des intrazellulären Vesikeltransports durch VacA, wird eine Prozessierung aufgenommener Antigene verhindert. Ein direkterer Effekt der Immunsupprimierung durch VacA ist die Hemmung der IL-2-Expression und somit der Proliferation von T-Lymphozyten (20, 78, 194). Die Inhibition findet dabei auf Ebene der Transkription statt, indem VacA die Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT in den Nukleus verhindert (20, 78). Dies geschieht vermutlich durch Hemmung der Ca^{2+} -abhängigen Phosphatase Calcineurin. Genexpressionsanalysen zeigen Ähnlichkeiten des VacA-Effektes mit der Hemmung von Calcineurin durch die immunsuppressive Substanz FK506 (78). Um den Mechanismus der Inhibition der IL-2-Expression zu verstehen, ist das Verständnis der Interaktion von VacA mit T-Zellen von zentraler Bedeutung.

4.1. CD18 ist der VacA-Rezeptor von Leukozyten

In dieser Arbeit wurden die Bindung und Aufnahme von VacA bei T-Lymphozyten untersucht. Dabei konnte CD18 als Rezeptor von VacA auf T-Zellen identifiziert und die Bindung weiter charakterisiert werden. CD18 ist die β -Untereinheit Leukozyten-spezifischer Integrine. Generell stellen Integrine eine Gruppe von Oberflächen-Rezeptoren auf eukaryontischen Zellen dar, die unterschiedlichste Funktionen erfüllen (100). Zum einen vermitteln sie die Adhäsion der Zellen an die extrazelluläre Matrix (ECM) sowie ihre Migration. Außerdem nehmen sie als Teil von Signalwegen Einfluß auf zentrale Prozesse wie

Proliferation und Differenzierung von Zellen. Derzeit sind 24 unterschiedliche Integrine beschrieben, die sich als Heterodimere aus jeweils einer α - und β -Untereinheit zusammensetzen. 18 α - und 8 β -Untereinheiten sind bekannt, wobei die Expression Zelltypspezifisch erfolgt (100). Eine wichtige Rolle kommt Integrinen bei Zellen des Immunsystems zu, da Prozesse wie Adhäsion und Migration von Leukozyten auf Endothel-Zellen, die Extravasation und Aktivierung von T-Lymphozyten durch APC von Integrinen abhängen (93, 190, 209). Ein dominierendes Integrin auf Zellen des Immunsystems ist LFA-1, bestehend aus den Untereinheiten α_L (CD11a) und β_2 (CD18). Außerdem werden mit Mac-1 (α_M/β_2), α_X/β_2 und α_D/β_2 weitere β_2 -Integrine auf Leukozyten exprimiert. Mac-1 wird von phagozytischen Zellen wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen (DC) und natürlichen Killer- (NK-) Zellen produziert und spielt eine Schlüsselrolle bei der Phagozytose von Komplement-gebundenen Mikroorganismen (57). Die Bindung von VacA an CD18 ist somit der Schlüssel zur Intoxikation einer Vielzahl von Immunzellen. Dies wurde durch Experimente mit DC deutlich, da auch in diesem Zelltyp VacA und LFA-1 am Uropodium co-lokalisierten, was der Beobachtung in primären T-Lymphozyten entsprach. Ob es dabei auch zur direkten Interaktion von VacA und CD18 und zur funktionellen Aufnahme von VacA kommt, muß in weiteren Experimenten geklärt werden. Daß jedoch die α -Untereinheit keine Rolle bei der Bindung spielt, wurde durch die Expression von α_L/β_2 , α_M/β_2 und α_X/β_2 in CHO Zellen gezeigt. Die Sensitivität gegenüber VacA (Vakuolisierung) war unabhängig vom Typ der α -Untereinheit und verhielt sich proportional zur Expressionsstärke der Integrine (Daten nicht gezeigt). Auch die Expression von humanem LFA-1 und Mac-1 in murinen T-Lymphozyten machte die Zellen in gleicher Weise empfindlich gegenüber der VacA-induzierten Bildung saurer Vakuolen. In Co-Präzipitationsexperimenten konnte zudem im Immunoblot kein CD11a bzw. CD11b detektiert werden. Dies kann jedoch auch auf die experimentellen Bedingungen (z.B. Detergens) zurückgeführt werden, die eine schwache Interaktion stören könnten.

Durch die Bindung von VacA an CD18 werden wichtige Funktionen von LFA-1 nicht beeinflusst. Die Adhäsion von T-Zellen an ICAM-1 ist selbst bei hohen VacA-Konzentrationen von 3 $\mu\text{g/ml}$ nicht gestört (Abb. 15). Dies unterstützt weiter die Annahme, dass VacA an CD18 und nicht die α -Untereinheit bindet, da die Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1 über die I-Domäne von CD11a erfolgt (104, 182, 183). Außerdem wird die Affinität von der Propeller-Domäne auf CD11a reguliert. Die „I-like“-Domäne von CD18 hat zwar ebenso Einfluss auf die Bindung an ICAM-1, scheint aber durch VacA nicht beeinflusst zu

werden. Auch andere Toxine wie das Leukotoxin LtxA von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und α -Hämolyisin HlyA von *E. coli* nutzen LFA-1 als Rezeptor auf humanen Zellen, stören dabei aber die Bindung von löslichem ICAM-1 an LFA-1 nicht (49, 50, 103). Des Weiteren wird auch die Migration primärer T-Lymphozyten auf ICAM-1 nicht direkt durch Bindung von VacA an LFA-1 beeinträchtigt. Erst im späteren Verlauf, 48 h nach Zugabe von VacA, zeigen T-Zellen eine Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit (Abb. 16). Diese Abnahme ist vermutlich auf eine Störung des Vesikel-Transportes zurückzuführen, wie sie auch bei der Hemmung der Antigenpräsentation vermutet wird (130). Trotzdem ist dieser Effekt spezifisch für LFA-1 bei Migration auf ICAM-1, da er nicht bei Migration auf „vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM-1), vermittelt durch α_4/β_1 -Integrin, beobachtet wurde. Der Grund hierfür ist unklar. Die Beobachtung, dass sich das Uropodium schlecht von der Oberfläche löst kann ein möglicher Grund für die Reduktion der Geschwindigkeit sein. Dies kann durch Störung von Signalwegen verursacht werden. So führt beispielsweise die Hemmung der RhoA-abhängigen Kinase ROCK mit dem Inhibitor Y27632 zu einem ähnlichen Phänotyp migrierender T-Lymphozyten (188).

4.2. Die Rolle von Oligosacchariden und des Co-Rezeptors für VacA

Die Bindung von VacA an CD18 wird über Oligosaccharide vermittelt. Behandlung der Membranpräparation von Jurkat T-Zellen mit Neuraminidase führt zur Abspaltung von Sialyl-Resten von CD18, wie am veränderten Laufverhalten von CD18 in der SDS-PAGE zu erkennen ist. Die Abspaltung führt in Co-Präzipitationsexperimenten mit VacA-Biotin zum Verlust der Bindung an CD18 (Abb. 27), wie es auch für die Interaktion von VacA mit RPTP β beschrieben ist (222). Für das Glykoprotein RPTP β , einem VacA-Rezeptor auf Epithelzellen, wurde die Bindestelle genauer charakterisiert. Im membrannahen Bereich von RPTP β vermitteln 5 Aminosäuren die Bindung von VacA und sind für Vakuolisierung und Phosphorylierung von Git-1 essentiell. Dies wurde durch Deletion verschiedener Rezeptor-Domänen im extrazellulären Bereich von RPTP β untersucht. Interessanterweise entspricht die AS-Sequenz 747-751 mit QTTQP einem Glykosylierungs-Motiv, dessen Threonin-Reste modifiziert werden. Austausch beider Threonin-Aminosäuren (T748, T749) mit Alanin reduziert die Vakuolisierung und Git-1 Phosphorylierung. Der Austausch von T748 oder T749 zu Alanin hat hingegen keinen Effekt (222). Behandlung der Zellen mit Neuraminidase und O-Glykosidase reduzierten die Bindung von VacA an RPTP β und die Vakuolisierung der Zellen deutlich. Sequenzanalysen zeigen auch im extrazellulären Bereich von CD11a und

CD18 mehrere potentielle N- und O-Glykosylierungsstellen (Asn-X-Ser/Thr). Eine Analyse der CD18-Glykosylierung zeigt Modifikationen mit Zucker des Mannose-Typs, sowie hochkomplexen Zucker-Ketten aus bi-, tri- und tetra-Antennären Komplexen (10, 42).

Auch andere Toxine nutzen LFA-1 oder andere β_2 -Integrine als Rezeptoren für Immunzellen. So bindet das *Bordetella pertussis* Adenylatcyclase Hämolyisin-Toxin (CyaA) an Mac-1 und überträgt die aktive Adenylatcyclase (AC)-Domäne in die Zielzelle, was zur Synthese von cAMP und somit zur Hemmung der Phagozytose führt (28). Auch das Leukotoxin LtxA von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, das α -Hämolyisin HlyA von *E. coli* und das Leukotoxin LktA von *Mannheimia haemolytica* binden mit LFA-1 an ein Integrin der β_2 -Familie (44). Diese Toxine gehören zur Familie der RTX („repeat in toxin“-)Toxine und sind durch Wiederholungen eines C-terminal gelegenen Peptidmotivs aus 9 Aminosäuren (LXGGXG(D/N)DX) charakterisiert. Wie kürzlich in einer Arbeit von Sebo und Kollegen (135) gezeigt wurde, erfolgt die Bindung von CyaA an Mac-1 über Oligosaccharide. Abspaltung der Oligosaccharide mit den Enzymen Neuraminidase, Endoglykosidase N und Peptid-N-Glykosidase führt zum Verlust der Bindung an Mac-1 sowie der gesamten Zelle. Dies führt zur Resistenz der Zellen gegenüber der lytischen Wirkung des Hämolyisins. Erstaunlicherweise zeigten andere Toxine der RTX-Familie ein identisches Verhalten, so dass von einem generellen Mechanismus dieser Toxin-Familie auszugehen ist (135). Auch im Fall von LtxA und HlyA verhindert die Behandlung der Zellen mit Glukosidasen oder die Zugabe spezifischer Zucker die Bindung an die Zelloberfläche sowie die zytotoxische Wirkung. Die kompetitive Zugabe von Chitobiose, Chitotriose, D-Mannose oder Sialinsäure hemmt zum Beispiel die Bindung von CyaA an humane Neutrophile und an Makrophagen. Vermutlich ist die Toxin-Bindung an Rezeptoren über Oligosaccharide ein verbreiteter Mechanismus. Im Fall von VacA würde die Erkennung spezifischer Oligosaccharide an variablen Proteinrezeptoren einen interessanten Weg darstellen, unterschiedliche Zelltypen wie Magenepithelzellen oder Leukozyten zu infizieren. Dies wäre unabhängig von der Aminosäuresequenz des Rezeptors und somit nur durch die Zuckermodifikation bestimmt.

Die funktionelle Aufnahme von VacA in T-Lymphozyten erfolgt über CD18. LFA-1-negative T-Zellen (J- $\beta_2.7$) können trotzdem unverändert VacA binden und aufnehmen (Daten nicht gezeigt), sind jedoch bezüglich Vakuolisierung und Hemmung der IL-2-Expression deutlich resistenter (Abb. 17 und 18). Auch die VacA-Bindung an Magenepithelzellen, deren Expression von RPTP α und β mit siRNA reduziert ist, bleibt unverändert. Vermutlich vermittelt die Bindung an einen Co-Rezeptor den Kontakt mit der Zelloberfläche von T-

Zellen und Epithelzellen. Für die funktionelle Aufnahme von VacA in T-Zellen reicht die Interaktion jedoch nicht aus. Auch für viele andere Toxine sind mehrere Rezeptoren auf eukaryontischen Zellen beschrieben, die gemeinsam zur Toxin-Bindung und –Aufnahme führen. So wurde mit dem „low density lipoprotein receptor-6“ (LRP6) eine weitere Komponente des Rezeptor-Komplexes für das Anthrax-Toxin von *Bacillus anthracis* identifiziert (215). LRP6 ist zusammen mit den Rezeptoren TEM8 und CMG2 für die Aufnahme essentiell. Auch „human immunodeficiency virus“ (HIV) benötigt zur Aufnahme in T-Zellen neben CD4 auch den Chemokin-Rezeptor CCR5 (112).

Interessanterweise führt die Behandlung der Epithelzellen mit Neuraminidase zwar zum Verlust der Interaktion von VacA mit RPTP α und β , die Bindung an die Zelloberfläche wird jedoch nicht beeinflusst. Dies ist ebenso mit der T-Lymphozyten Zelllinie Jurkat und primären T-Zellen zu beobachten. In diesem Fall kommt es sogar zu einer deutlichen Zunahme der VacA-Bindung an die Zelloberfläche, obwohl auch hier die Interaktion mit LFA-1 verloren geht. Vermutlich werden durch die Abspaltung von Sialyl-Resten andere Bindungsstellen besser zugänglich, die zuvor maskiert sind. Für VacA ist zudem *in vitro* die Bindung an Glykosphingolipide auf Dünnschichtchromatographie-Platten beschrieben (161). Obwohl die Relevanz dieser Interaktion *in vivo* nicht gezeigt ist, könnte auch hier die Bindung an Oligosaccharide diese Interaktion vermitteln. VacA bindet vor allem an Mono- und Di-Glykosylceramide vom Typ Gal β 1-, Glc β 1-, Gal β 4Glc β 1- oder Gal α 4Gal β 1-Ceramide. Diese Zucker werden nicht durch das Enzym Neuraminidase gespalten und sind möglicherweise nach Entfernen von Sialyl-Resten besser zugänglich für die Bindung mit VacA, was die verstärkte Bindung erklären würde. Auch für CyaA wurde die Bindung an Glykosylceramide beschrieben, wobei die Bindung an Mac-1-negativen Zellen niedrig affin und nicht sättigend ist (84). Diese Eigenschaft ist auch für VacA beschrieben. So lässt sich die Bindung von VacA an Epithelzellen (HeLa) nicht sättigen, so dass eine niedrig-affine Bindung, möglicherweise an Glykosphingolipide, und eine spezifische Bindung an einen Proteinrezeptor postuliert wurde (124). Dieser Doppel-Rezeptor-Mechanismus ist so für das Botulinum Neurotoxin A (BoNT-A) beschrieben (162). Dabei dienen Ganglioside (163) als niedrig-affiner Rezeptor und das „synaptic vesicle protein“ (SV2) als Protein-Rezeptor auf Neuronen (51). Interessanterweise erfolgt auch die Bindung von BoNT-A an Ganglioside über Oligosaccharide (162). Nimmt man für VacA die Interaktion mit zwei Rezeptoren an, wären auch zwei Rezeptor-Bindedomänen denkbar. Interessanterweise wurde in der kürzlich veröffentlichten Kristallstruktur der VacA p55-Untereinheit eine konservierte Bindedomäne am C-Terminus beschrieben (75). Aufgrund ihrer Orientierung zur Peripherie des VacA-

Oligomers, könnte diese Region die Bindung an den (Co)-Rezeptor vermitteln. Die zweite Region, die zur Zelltyp-spezifischen Bindung von VacA führt, befindet sich am N-Terminus der p55-Untereinheit (94).

Wie im Modell von Abb. 40 dargestellt ist, interagiert VacA zu Beginn vermutlich mit Strukturen auf der Zelloberfläche, die keine Oligosaccharide darstellen, oder zumindest keine Sialyl-Reste besitzen. Die Bindung ist abhängig von monomeren VacA, was durch Säureaktivierung erreicht wird (1). Der initiale Bindungspartner entspricht nicht den beschriebenen VacA-Rezeptoren auf Epithelzellen (RPTP α und $-\beta$) oder Lymphozyten (LFA-1). Möglicherweise führen erst strukturelle oder räumliche Umlagerungen zur Bindung an die funktionellen Rezeptoren LFA-1 und RPTP α bzw. $-\beta$ (2). Dieser Schritt setzt ebenso monomeres VacA voraus und ist abhängig von Oligosaccharide. Die Interaktion führt zum „Clustern“ des VacA/Rezeptor-Komplexes (3) und dadurch zur funktionellen Aufnahme von VacA in die Zielzelle (4). VacA gelangt über frühe Endosomen in Membranstrukturen mit Markern für späte Endosomen/frühe Lysosomen (5). Die Kanalaktivität von VacA induziert die Bildung saurer Vakuolen in Anwesenheit schwacher Basen wie Ammoniumchlorid (6). Möglicherweise führt die Ansäuerung des Lumens früher Endosomen zur Membraninsertion von VacA und Translokation in das Zytosol (7). Dort hemmt VacA die IL-2-Expression, indem es die Kern-Translokation von NFAT verhindert. Dies geschieht vermutlich auf Stufe der Phosphatase Calcineurin.

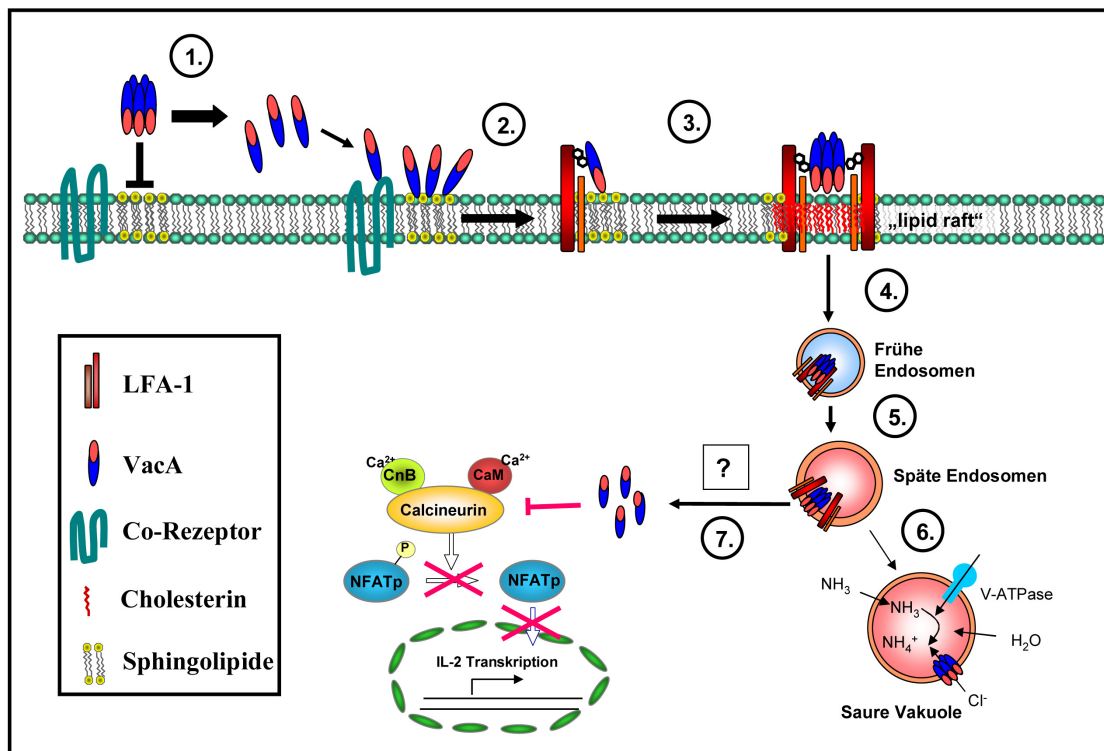


Abb. 40: Schema der Bindung und Aufnahme von VacA bei T-Lymphozyten. Erläuterungen siehe Text.

4.3. VacA-Resistenz muriner T-Zellen durch Spezies-spezifische Interaktion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass VacA Spezies-spezifisch mit primären T-Zellen interagiert, wobei murine T-Lymphozyten kaum VacA binden und aufnehmen (Abb. 20 und 21). Dies wird als Erklärung für die beobachtete Resistenz gegenüber der VacA-induzierten Vakuolisierung und Hemmung der IL-2-Expression muriner T-Zellen angesehen (Abb. 22 und 23). Grundsätzlich ist die VacA-Bindung an murine T-Zellen um den Faktor 7 geringer als an humane Zellen. Auch die Expression des humanen T-Zell Rezeptors CD18, in Kombination mit CD11a oder CD11b, führt zu keiner starken Zunahme der VacA-Bindung an die Zelloberfläche. Dies ist ein Indiz dafür, dass LFA-1 oder Mac-1 nicht dem primären Interaktionspartner auf Lymphozyten entspricht. Zwar zeigen sich die mit hLFA-1 oder hMac-1 „humanisierten“ murinen T-Zellen signifikant sensitiver gegenüber der Ausbildung saurer Vakuolen, es sind dazu aber deutlich höhere VacA-Konzentrationen nötig als im Fall humaner T-Zellen. Dies kann unterschiedliche Gründe haben. Wie erwähnt, kann das Fehlen des ersten Interaktionspartners auf der Zelloberfläche eine effiziente Übertragung oder Bindung an den funktionellen Rezeptor LFA-1 stören. Dies würde die hohen VacA-Konzentrationen zur Ausbildung von Vakuolen trotz Expression von hLFA-1 oder hMac-1 erklären. Prinzipiell ist die Bindung von VacA an humanes CD18 möglich, da auch in murinen T-Zellen hCD18 mit VacA-Biotin co-präzipitiert werden kann. Auch für das Leukotoxin LktA von *Mannheimia haemolytica* wurde eine Spezies-spezifische Bindung an CD18 boviner Zellen beschrieben. Humanes CD18 wird von LktA nicht gebunden. Die Interaktion erfolgt dabei Spezies-spezifisch mit der sogenannten I-EGF-Domäne von CD18 (50).

Außerdem kann das Glykosylierungsmuster auf der Zelloberfläche muriner T-Zellen Ursache für die fehlende Bindung und Aufnahme von VacA sein. Eine Spezies-spezifische Glykosylierung des ersten Bindungspartners und/oder murinen β_2 -Integrins auf murinen T-Zellen würde die Zellen resistent gegenüber VacA machen (Eine Bindung von VacA an murines CD18 konnte nicht gezeigt werden, da kein geeigneter Antikörper zur Verfügung steht). Diese Spezies-spezifische Erkennung einer Zielstruktur durch einen Pathogenitätsfaktor wäre vergleichbar mit der Ligand-Rezeptor Interaktion von Internalin A (InlA) von *Listeria monocytogenes* an E-Cadherin. InlA bindet dabei ausschließlich an humanes und nicht murines E-Cadherin, was eine Infektion von Mäusen durch *L. monocytogenes* verhindert. Die fehlende Interaktion wird durch die unterschiedliche Aminosäure an Position 16 von E-Cadherin verursacht. Austausch der Aminosäure Glutamat zu Prolin macht Maus-Zellen sensitiv für eine Infektion mit *L. monocytogenes* (105, 106).

Die Resistenz muriner T-Lymphozyten besteht jedoch vermutlich noch aus einer weiteren Komponente. So kommt es zwar durch Expression von hLFA-1 bzw. hMac-1 zur verstärkten Vakuolisierung muriner T-Zellen (Abb. 23), eine Hemmung der IL-2-Expression ist jedoch nicht erkennbar (Daten nicht gezeigt). Die meisten Toxine werden Rezeptor-vermittelt in das endosomale System aufgenommen. Die Gruppe der AB-Toxine transloziert im weiteren Verlauf die aktive (A)-Untereinheit über eine Membran in das Zytosol der Zelle wo es zur Hemmung der Zielstruktur kommt (171, 174). Die Translokation erfolgt entweder aus frühen/späten Endosomen oder nach retrogradem Transport aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) in das Zytosol. Zieht man eine Translokation von VacA in Betracht, für die derzeit wenig experimentelle Beweise vorliegen, kann dies auch eine Ursache für die Resistenz muriner T-Zellen bzgl. einer Hemmung der IL-2-Expression sein. So könnten zelluläre Faktoren für eine Translokation fehlen oder nicht rekrutiert werden. Außerdem sind Variationen in der Zielstruktur (Signalwege, Calcineurin, usw.) in Betracht zu ziehen, so dass VacA trotz Transport in das Zytosol die Expression von IL-2 nicht hemmen kann.

4.4. Sensitivität stimulierter T-Lymphozyten gegenüber VacA

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Vorstimulierung primärer CD4⁺ T-Lymphozyten mit PMA oder CD3/CD28-Latexkugeln zur Aufnahme von VacA führt (Abb. 29). Die Zellen werden dadurch sensitiv gegenüber einer Hemmung der IL-2-Expression durch VacA (Abb. 6). Dieser inhibitorische VacA-Effekt wurde bisher nur für die humane T-Zelllinie Jurkat beschrieben (20, 78). VacA hemmt die IL-2-Expression von Jurkat T-Zellen, indem es die Translokation von NFAT in den Nukleus verhindert. Die Infektion mit einem Bakterium pro Jurkat T-Zelle (MOI=1) führte schon zur Reduktion der IL-2 Expression um 25%. Als Konsequenz wird die Proliferation von Jurkat T-Zellen gehemmt, ein Effekt der auch für PBLC gezeigt werden konnte (78). Cover und Kollegen (194) zeigten, dass die Hemmung der Proliferation primärer CD4⁺ T-Lymphozyten nicht auf die verhinderte Translokation von NFAT und IL-2-Expression zurückzuführen ist. Experimentell wurden hierzu ruhende primäre T-Zellen für 1 h mit VacA inkubiert und im Anschluß mit α -CD3-gekoppelten Kugeln und löslichen α -CD28 oder PMA/Ionomycin stimuliert. Dabei war nur eine geringe Hemmung der IL-2-Expression zu erkennen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass es zu keiner funktionellen Aufnahme von VacA in CD4⁺ T-Zellen kommt. Die Vorstimulierung mit PMA hingegen führt zur Migration der Zellen und induziert die Aufnahme von VacA.

Nicht nur die Stimulierung mit PMA ermöglicht die Aufnahme von VacA in primäre CD4⁺ T-Lymphozyten. Auch die Aktivierung der Zellen über Nacht mit CD3/CD28-Latexkugeln induziert die Aufnahme von VacA. Im Gegensatz dazu hat eine transiente Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen mit den Zytokinen SDF-1 (CCL12) oder Exodus-2 (CXCL21) keinen Effekt auf die Aufnahme. Um diese Unterschiede erklären zu können, muss man die Signalwege der verschiedenen Stimuli, soweit bekannt, berücksichtigen. PMA ähnelt in der Wirkung Diacylglycerin (DAG), einem Spaltprodukt von PIP₂ durch PLC γ , indem es zur massiven Aktivierung klassischer und neuer PKC-Isoformen kommt. Auch die Stimulierung des T-Zell-Rezeptors hat eine Aktivierung vieler Signalkaskaden mit Beteiligung von PI3K, PLC γ und PKC zur Folge. SDF-1 und CXCL21 induzieren durch Aktivierung von Cytohesin-1 und PI3K ein vorübergehendes „Clustern“ von LFA-1 und eine Zunahme der Affinität von LFA-1 für ICAM-1. Dabei sind die GTPase RhoA und atypische Kinase PKC ζ beteiligt. Eine umfangreiche Aktivierung von Signalkaskaden mit verschiedenen PKC-Isoformen erfolgt jedoch nicht. Chemokine führen nur zu einer schnellen (innerhalb Sekunden) aber transienten Aktivierung von T-Zellen. Im Gegensatz dazu steht die Aktivierung durch PMA und TCR, die ein langsames aber lang anhaltendes „Clustern“ von LFA-1 und somit Adhäsion und Migration zur Folge hat. Möglicherweise führt die schnelle Aktivierung mit Chemokinen nur zur festen Adhäsion der T-Lymphozyten, wie es beim Austritt aus dem Blutstrom ins Gewebe nötig ist (25). Die weitere Aktivierung und Migration wird *in vivo* von anderen Komponenten bestimmt und kann *in vitro* schlecht simuliert werden. Am ehesten wird dies möglicherweise durch die Aktivierung mit PMA oder TCR simuliert. In beiden Fällen kommt es zur starken Migration der T-Zellen, was die Aufnahme von LFA-1 und VacA zur Folge hat. Im Gegensatz zu einer Stimulierung der T-Zellen mit den Chemokinen SDF-1 und Exodus-2, kommt es zur Aktivierung der PKC ζ sowie klassischer und neuer PKC-Isoformen.

4.5. Lokalisation von VacA am Uropodium und die Rolle von „lipid rafts“

Mikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation von VacA auf primären T-Lymphozyten zeigten, dass VacA auf naiven T-Zellen gleichmäßig über die Oberfläche verteilt ist. Nach Aktivierung der Zellen und Adhäsion an der Oberfläche kommt es zur Polarisierung der primären T-Zellen und zur dynamischen Umverteilung und Konzentrierung von VacA am Uropodium (Abb. 11). Dies ist auch bei Bindung der Zellen an CD3/CD28-Latexkugeln zu beobachten. Die polarisierten Zellen haben dabei neben VacA auch die beiden Untereinheiten von LFA-1, CD18 und CD11a, lokalisiert (Abb. 12). Adhäsion und Migration auf einer

ICAM-1-beschichteten Oberfläche sowie Polarisierung durch Quervernetzung des TCR und Co-Rezeptors (CD28) haben eine Umverteilung von VacA und LFA-1 zur Folge. Diese Dynamik der Lokalisation nach Kontaktaufnahme primärer T-Zellen mit der Oberfläche wurde auch für LFA-1 beschrieben (189). Die Menge an LFA-1 am Uropodium ist dabei 5-mal so hoch wie an der Kontaktzone zur Oberfläche und entspricht damit der Verteilung von VacA auf primären T-Zellen. Die Polarisierung von Zellen ist eine Voraussetzung für die Migration und anderer essentieller Prozesse von Immunzellen, wie die Aktivierung von T-Zellen durch APC oder Zellyse durch $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen (179). Wie in Abb. 41 dargestellt, kommt es durch Umlagerungen von F-Aktin im vorderen Bereich der Zelle zur Ausbildung von Lamellipodien, die Kontakt mit der Oberfläche aufnehmen. Durch Verlängerung dieser Zellfortsätze und Kontraktion des Zellkörpers entstehen Kräfte, die zur Fortbewegung der Zelle führen. Das Uropodium stellt eine Pseudopod-artige Projektion dar, die bei migrierenden Leukozyten beobachtet wird und aufgrund der Ansammlung von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, CD2, CD44, PSGL-1 und L-Selectin eine wichtige Adhäsions-Struktur ist (18, 47).

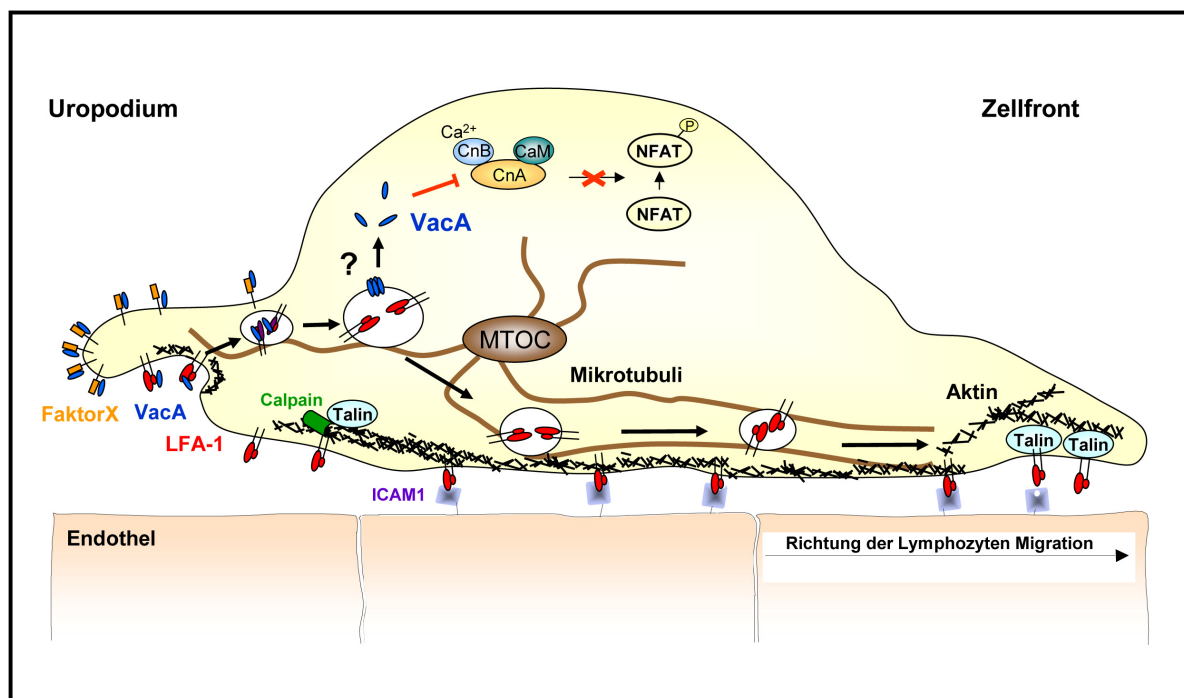


Abb. 41: Schematische Darstellung des Aufnahmeweges von VacA in eine migrierende T-Zelle.

Die 2-dimensionale Migration von $CD4^+$ T-Lymphozyten auf Endothelzellen erfolgt über den Kontakt von LFA-1 mit ICAM-1. Nach Kontaktaufnahme an der Zellfront und Bewegung der Zelle durch Kontraktion des Zellkörpers, wird LFA-1 vermutlich am Uropodium aufgenommen und wieder nach vorne transportiert. Dieses Recycling nutzt VacA zur Aufnahme in die Zelle. Die primäre Bindung an die Zelloberfläche erfolgt über einen Co-Rezeptor (Faktor X), dessen Identität unbekannt ist. Nach Aufnahme mit LFA-1 kann VacA die Aktivität der Phosphatase Calcineurin und somit IL-2-Expression hemmen. Ob es zur Translokation aus endosomalen Vesikeln kommt ist unbekannt.

Die Polarisierung der Zellen führt jedoch nicht nur zu Umlagerungen von Membranproteinen oder von zytosolischen Kompartimenten, sondern es kommt auch zur Ausbildung von Lipid-Mikrodomänen unterschiedlicher Zusammensetzung (82, 116). Diese sogenannten „lipid rafts“ dienen als Plattform für viele Adaptor- und Signalmoleküle zahlreicher Signalwege. Aufgrund der Glykosphingolipid-Zusammensetzung bilden T-Zellen nach Aktivierung mit PMA oder Zytokinen Mikrodomänen an der Zellfront und am Uropodium aus. „Lipid rafts“ an der Zellfront zeichnen sich durch das Gangliosid GM3, am Uropodium durch GM1 aus. Beide Membrandomänen sind angereichert mit Cholesterin. Für VacA wurde die Lokalisation und Aufnahme über „lipid raft“-Membranstrukturen gezeigt. Die Lokalisation von VacA und LFA-1 am Uropodium nach Aktivierung der Zellen, sowie die Abhängigkeit der Bindung und Aufnahme von VacA verdeutlichen die Funktion der „lipid rafts“. Welches Signal zur Re-Lokalisation von LFA-1 in die Cholesterin-reichen Membranstrukturen führt ist unklar. Interessant ist eine Studie zur Aufnahme des Leukotoxins LtxA von *A. actinomycetemcomitans*, das LFA-1 als funktionellen Rezeptor auf Leukozyten benutzt (68). Nach Bindung von LtxA an einen noch unbekanntem Co-Rezeptor, kommt es zum Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration in Jurkat T-Zellen. Dies hat die Ansammlung von LFA-1 in Cholesterin- und Sphingolipid-reichen Membranstrukturen zur Folge und ist Voraussetzung für die Interaktion von LtxA mit LFA-1. Die Bindung von LtxA und LFA-1 führt nun zur Lyse der Zelle. Ein vergleichbarer Mechanismus wäre auch für VacA denkbar, da in Epithelzellen eine Induktion der Ca^{2+} -Oszillation durch VacA beschrieben ist (45). Die Bindung von VacA an den unbekanntem Co-Rezeptor (Abb. 41; Faktor X) könnte zum zytoplasmatischen Anstieg von Ca^{2+} führen und damit zur Aktivierung von Calpain, der Spaltung von Talin, und somit zur Re-Organisation von LFA-1 und VacA in „lipid rafts“ führen. Dies könnte möglicherweise die Aufnahme von VacA induzieren.

4.6. Aufnahmemechanismus von VacA in primären T-Lymphozyten

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Aufnahme von VacA in primäre T-Zellen charakterisiert. VacA wird zusammen mit LFA-1 in Vesikel aufgenommen, wie mittels „live cell“-Mikroskopie gezeigt werden konnte (Abb. 13). Wird mit Heptakis Cholesterin aus der Membran entfernt, hemmt dies die VacA-Aufnahme. Auch die Endozytose und das Recycling von LFA-1 in Neutrophilen benötigt Cholesterin (61). Zusätzlich wird durch Heptakis die Bindung von VacA an die Zelloberfläche stark reduziert. Dies lässt vermuten, dass eine effiziente Bindung von VacA an der Zytoplasmamembran durch Oligomerisierung (Erhöhung

der Avidität) ermöglicht wird. Sind die Interaktionspartner von VacA durch Auflösen der Domänen-Struktur der Membran über die Oberfläche verteilt, ist die Bindung negativ beeinträchtigt. Eine direkte Bindung von VacA an Cholesterin, wie für Perfringolysin O und andere Cholesterin-bindende Toxine beschrieben (204), scheint für VacA unwahrscheinlich. Cholesterin zeigte in VacA-Bindungsstudien keine kompetitive Hemmung. Außerdem lassen Experimente mit der VacA-Deletionsmutante VacA Δ 6-27 darauf schließen, dass die hydrophoben N-terminalen Aminosäuren nicht zur Bindung an die Zytoplasmamembran und zur Aufnahme in primäre T-Zellen beitragen (Daten nicht gezeigt). Der hydrophobe N-terminale Bereich besitzt 3 Sequenzwiederholungen eines GXXXG-Motivs. Eine Deletion oder Sequenzveränderung dieses Motivs zerstört die Kanalaktivität von VacA, was einen dominant-negativen Effekt auf die Vakuolisierung von HeLa und Jurkat T-Zellen ausübt (Daten nicht gezeigt).

Neben Cholesterin sind weitere Komponenten an der Aufnahme von VacA beteiligt. So führt die Depolymerisierung des Aktin-Zytoskeletts mit unterschiedlichen Inhibitoren zur starken Reduktion der VacA-Aufnahme. Depolymerisierung der Mikrotubuli mit Nocodazol zeigt hingegen keine Wirkung. Dieser Effekt der Störung des Aktin-Zytoskeletts kann mehrere Ursachen haben. Zum einen ist Aktin direkt an der Ausbildung von Membranvesikeln beteiligt, indem es durch Erzeugung von Kraft zum Einstülpen der Membran beiträgt. Zum anderen vermittelt das Aktin-Skelett ein „Clustern“ von LFA-1 in der Membran. LFA-1 ist über verschiedene Adaptorproteine wie Talin, Filamin und α -Aktinin an das Zytoskelett gekoppelt. Die Regulation dieser Interaktion trägt zur Regulation der Funktion von LFA-1 bei. So verhindert beispielsweise der Aktin-Inhibitor Jasplakinolid nach Aktivierung der T-Zellen durch den TCR oder mit PMA das „Clustern“ von LFA-1 (191). Weitere Experimente zeigten, dass es nach Aktivierung der T-Zellen zur Spaltung von Talin durch die Ca^{2+} -abhängige Cystein-Protease Calpain kommt, was ein Ablösen von LFA-1 vom Aktin-Zytoskelett zur Folge hat. Ein „Clustern“ von LFA-1 in der Membran ist nun möglich. Wird die Aktivität von Calpain durch Komplexbildung von Ca^{2+} (BAPTA) oder Hemmung mit Calpeptin verhindert, wird das „Clustern“ von LFA-1 und damit die Adhäsion und Migration von T-Zellen auf ICAM-1 gestört. Auch die Aufnahme von VacA wird durch Hemmung von Calpain mit Calpeptin oder Ca^{2+} -Bindung mit BAPTA-AM verhindert (Daten nicht gezeigt). Vermutlich ist das Oligomerisieren von VacA und das Konzentrieren des VacA-Rezeptors LFA-1 in Cholesterin-reichen „lipid raft“-Membrandomänen Voraussetzung für die Aufnahme in die Zelle. Auch im Fall des Anthrax-Toxins ist die Umverteilung des

Toxin/Rezeptor-Komplexes in „lipid raft“-Strukturen Voraussetzung für die Aufnahme (2). Auch das Leukotoxin LtxA benötigt, wie oben erwähnt, eine Umverteilung von LFA-1 für die hämolytische Wirkung. Dabei ist zu beachten, dass nur die monomere Form von VacA an den (Co)-Rezeptor bindet. Oligomeres VacA kann weder mit der Zelloberfläche noch mit CD18 interagieren, wie mit FACS-Bindungsstudien und Co-Präzipitation gezeigt wurde. Generell führt die Bindung von Toxinen an einen spezifischen Rezeptor zur Oligomerisierung und weiter zur Ansammlung in „lipid raft“-Membranstrukturen. Bindung und „Clustern“ erhöht dabei die lokale Toxin-Konzentration deutlich (102).

In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass VacA über einen Clathrin-unabhängigen Weg in primäre T-Lymphozyten aufgenommen wird. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen zur Aufnahme von VacA in HeLa Zellen. Dabei konnte die Endozytose von VacA nicht mit dominant-negativen Eps15 und Dynamin2, Komponenten des Clathrin-Komplexes, inhibiert werden (77). Da primäre T-Zellen nur uneffizient transfiziert werden können, wurde der Zusammenbau des Clathrin-Komplexes mit chemischen Inhibitoren gehemmt. Chlorpromazin führt zur Umlagerung des Adaptor Proteins (AP)-2 von der Plasmamembran in endosomale Vesikel (212), so daß die Verbindung zwischen Rezeptor und „coated pit“ nicht mehr zustande kommt. Mit mono-Dansylcadaverin wird vermutlich das „Clustern“ des Clathrin-Komplexes verhindert (175). Der Alkohol 1-Butanol hemmt die Aktivität der Phospholipase D (181). Das Produkt Phosphatidinsäure, gebildet durch die Spaltung von Phosphatidylcholin, trägt zur Vesikel-Bildung bei. Eine Clathrin-abhängige Aufnahme wurde somit mit Inhibitoren verschiedener Wirkungsweise gehemmt. Dynasore, ein spezifischer Inhibitor verschiedener Isoformen der GTPase Dynamin (115), hemmt die VacA-Aufnahme jedoch nur zum Teil (Abb. 31). Dabei muß berücksichtigt werden, dass Dynamin-Isoformen auch an verschiedenen Clathrin-unabhängigen Wegen, wie der Caveolae-abhängigen Endozytose und der RhoA-regulierten Endozytose von IL-2R beteiligt sind (121).

4.7. Die Rolle der Protein Kinase C-Familie bei der VacA-Aufnahme

Der Mechanismus der VacA-Aufnahme in primäre T-Zellen wurde durch Verwendung verschiedener chemischer Inhibitoren, die zentrale Enzyme wie PI3K, PLC γ und PKC hemmen, weiter charakterisiert. Der allgemeine PKC-Inhibitor BIM II hemmte die Endozytose von VacA (Abb. 33). Der beobachtete Effekt war unabhängig davon, ob die T-Zellen mit PMA oder TCR aktiviert wurden. Hemmung der PI3K oder PLC γ , beides Schlüsselenzyme bei der Aktivierung von T-Zellen durch den TCR, zeigten keinen deutlichen

Effekt. Im Fall der PI3K war eine leichte Reduktion der VacA-Aufnahme zu erkennen, die bei Aktivierung über den TCR deutlicher ausfiel als nach Aktivierung mit PMA. PI3K ist an der Chemokin-induzierten Verteilung von LFA-1 und der Polarisierung durch Regulation des Zytoskeletts beteiligt (170). PMA-induziertes „Clustern“ von LFA-1 ist jedoch unabhängig von der Aktivität der PI3K. Da die Hemmung nicht sehr stark war, wird eine direkte Beteiligung der PI3K ausgeschlossen. Möglicherweise nimmt die PI3K indirekt Einfluß auf die Endozytose von VacA.

Die Rolle der PKC-Isoformen bei der Endozytose von VacA wurde weiter charakterisiert. Die Protein Kinase-Familie C (PKC) besteht aus 10 Isoformen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten. Zentrales Kriterium der Einteilung sind die benötigten Co-Faktoren, so dass PKCs in klassische, neue und atypische Isoformen unterschieden werden. Klassische PKC (Isoform PKC α , - β 1, - β 2, - γ) benötigen für die Aktivität sowohl Ca²⁺ als auch Diacylglycerin (DAG), wohingegen neue PKC (Isoform PKC δ , - ϵ , - θ , - η) unabhängig von Ca²⁺ sind und nur DAG binden. Die Aktivität atypischer PKC (Isoform PKC ζ , ι/λ) ist unabhängig von beiden Faktoren (195).

Experimente mit verschiedenen chemischen Inhibitoren und spezifischen Peptid-Inhibitoren ergaben, daß mindestens zwei unterschiedliche Isoformen der Protein Kinase C-Familie an der Aufnahme von VacA beteiligt sind. Eindeutig ist dabei die Rolle der PKC ζ . Myristoylierte inhibitorische Peptide die den Pseudosubstrat-Domänen von PKC ζ bzw. PKC α/β 1 entsprechen wurden verwendet. Eine Hemmung der Aufnahme von VacA konnte nur im Fall des PKC ζ -Peptids festgestellt werden (Abb. 34 B). Hemmung von PKC α bzw. - β 1 hatte keinen Effekt auf die VacA-Aufnahme. Bei PKC ζ handelt es sich um eine atypische PKC-Isoform, deren Aktivität unabhängig von den Co-Faktoren DAG und Ca²⁺ ist. Die Aktivität wird wie bei allen PKC-Isoformen durch Phosphorylierung und Lokalisation an der Membran reguliert (91). Die Hemmung von PKC ζ verhindert die Zytokin- und PMA-induzierte Adhäsion und die chemotaktische Migration von Lymphozyten (80). Daß PKC ζ auch die PMA-induzierte Adhäsion vermittelt, lässt darauf schließen, dass zusätzlich noch DAG-abhängige PKC-Isoformen an der Signaltransduktion zur Adhäsion beteiligt sind. Dies ist auch bei der Aufnahme von VacA in T-Lymphozyten zu erkennen. Der Inhibitor Gö6973, der vor allem auf Ca²⁺- und DAG-abhängige klassische PKC wirkt, hemmt die VacA-Aufnahme. Da das inhibitorische Peptid gegen PKC α/β 1 keinen Effekt hat, scheinen neben PKC ζ vor allem PKC β 2 und PKC γ an der Aufnahme von VacA in primäre T-Lymphozyten beteiligt zu sein. Aufgrund der unspezifischen Wirkung der Inhibitoren ist dies jedoch nicht mit absoluter Sicherheit zu bestimmen. Möglicherweise sind weitere PKC-Isoformen beteiligt. Da die

Hemmung der PKC ζ mit spezifischen inhibitorischen Peptiden die VacA-Aufnahme vollständig unterdrückt, steht möglicherweise PKC ζ am Ende der Signalkaskade. Wäre eine DAG-abhängige PKC nach PKC ζ lokalisiert, wäre die PMA-stimulierte VacA-Aufnahme unabhängig von der atypischen PKC. Außerdem führt die alleinige Aktivität von PKC ζ als Effektor kinase nicht zur Aufnahme von VacA in primären T-Zellen, obwohl Zytokine (SDF-1) die Translokation von PKC ζ an die Plasmamembran (80), als einen zentralen Schritt für die Aktivität der PKC, induzieren

Wie in verschiedenen Arbeiten gezeigt wurde, führt die Aktivität unterschiedlicher PKC-Isoformen zur Phosphorylierung von CD18-Sequenzmotiven (63). Der zytoplasmatische Teil von CD18 besteht aus 50 Aminosäuren und besitzt neben einem NPXY-artigen Motiv (NPLF), dessen Funktion für LFA-1 noch unklar ist, zwei weitere Bereiche, die für die Aktivität von LFA-1 essentiell sind. Ein Tyrosinrest (Y735) des Sequenzmotivs YRRF ist in den β_2 - und β_7 -Untereinheiten konserviert und Phosphorylierung von Y735 vermittelt die Aufnahme von LFA-1 in Vesikel (62). Dies ist für die Migration der Zellen essentiell. Austausch von Tyrosin zu Alanin (Y735A) führt zu einer stark reduzierten Migrationsgeschwindigkeit, deren Ursache in der verminderten Aufnahme vermutet wird. Ein weiteres konserviertes Sequenz-Motiv von CD18 besteht aus 3 Threonin-Resten, deren Phosphorylierung für die Regulation von LFA-1 essentiell ist, da sie eine zentrale Rolle bei der Kopplung von LFA-1 an das Aktin-Zytoskelett spielen (64, 169). Studien mit primären T-Zellen sowie *in vitro*-Experimente zeigten, dass die Threonin-Reste von CD18 nach Aktivierung der T-Zellen mit PMA, Zytokinen und TCR durch PKC-Isoformen phosphoryliert werden (63, 206). Das Muster der Phosphorylierung unterscheidet sich dabei von der Aktivierungsart. PKC δ und PKC β phosphorylieren *in vitro* Ser745 und Thr758, PKC α neben Thr758 zusätzlich Thr760. Diese Phosphorylierungsstelle wird nach TCR-Aktivierung nicht beobachtet (nur mit PMA). Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Aktivierung über den TCR zur Aktivierung von PKC β und/oder PKC δ und nicht PKC α führt. Auch bei der Aufnahme von VacA ist vermutlich PKC β beteiligt, PKC α jedoch nicht. Die Hemmung mit PKC α -spezifischen, inhibitorischen Peptid hat keinen Effekt auf die Aufnahme von VacA, weder nach TCR- noch PMA-Aktivierung.

Der zytoplasmatische Teil von CD18 spielt auch bei der Aufnahme von VacA eine wichtige Rolle. Expression von CD18 und CD11a in CHO Zellen führt zu einer Zunahme der VacA-induzierten Vakuolisierung, was vermutlich an der vermehrten Aufnahme von VacA liegt. Wurden jedoch CHO Zellen mit CD18, das eine Deletion des kompletten zytoplasmatischen Teils aufweist, transfiziert, hatte dies im Vergleich zu Kontroll-Zellen keinen Anstieg der

Vakuolisierungsrate zur Folge (Daten nicht gezeigt). Dies wurde jedoch bisher nur in CHO-Zellen gezeigt. Die Rolle der zytoplasmatischen Domäne von CD18 sowie der Beitrag der Threonin-Phosphorylierung bei der Aufnahme von VacA soll in zukünftigen Experimenten weiter untersucht werden. Dazu sollen Peptid-Fragmente von CD18 mittels Träger-Peptid (Penetratin-1) in primäre T-Zellen transfiziert werden und die Effekte auf die VacA-Aufnahme untersucht werden.

Auch im Fall des Anthrax-Toxins von *Bacillus anthracis* spielen posttranslationale Modifikationen der Rezeptoren „capillary morphogenesis protein 2“ (CMG2) oder „tumor endothelial marker 8“ (TEM8) bei der Aufnahme eine essentielle Rolle (3, 224). So kommt es nach Bindung der „protective antigen“ (PA)-Untereinheit an den Rezeptor und Spaltung von PA durch die Endoprotease Furin zur Oligomerisierung (Heptamer) von PA. Die Ausbildung dieser Prä-Pore ist Voraussetzung für die Endozytose von Anthrax Toxin und ist mit der Umverteilung des Rezeptors von Glycerophospholipid-Regionen in „lipid rafts“ verbunden (2). Bindung von PA an die Rezeptoren führt zur Abspaltung eines Palmitoyl-Restes, der die „lipid raft“-Lokalisation des Rezeptors verhindert. Nach Umverteilung und „Clustern“ in „lipid rafts“ wird die Ubiquitinierung des Rezeptors durch die E3 Ubiquitin Ligase Cbl und somit die Aufnahme induziert (1).

4.8. Die Beteiligung der Rho-Familie GTPasen an der Aufnahme von VacA

Die Aufnahme von VacA in primäre T-Lymphozyten ist abhängig von den kleinen GTPasen der Rho-Familie Cdc42 und Rac-1 (Abb. 35). Dies wurde durch Verwendung chemischer Inhibitoren NSC23766 (Rac-1) sowie Secramin (Cdc42) gezeigt. Hemmung von RhoA zeigte, ebenso wie die Hemmung der RhoA-regulierten Effektorkinasen „myosin light chain kinase“ (MLCK) und „Rho kinase“ (ROCK) keinen Effekt. Beide Kinasen phosphorylieren die leichte Kette von Myosin und stimulieren dadurch deren Motorprotein-Aktivität. Inhibition der Kinasen stört die Adhäsion und Migration von T-Zellen (188). Zwar ist in Abb. 35 nach Aktivierung der T-Lymphozyten über den TCR eine leichte Reduktion der Aufnahme zu erkennen, der verwendete MLCK-Inhibitor ML-7 führt jedoch unspezifisch zur Hemmung von PKC (166). Bei Aktivierung der T-Zellen mit PMA ist keine Hemmung der VacA-Aufnahme mit ML-7 zu erkennen (Daten nicht gezeigt), da PMA vermutlich deutlich stärker PKC aktiviert als dies mit dem TCR der Fall ist. Auch in Epithelzellen wurde die Aufnahme von VacA als abhängig von Cdc42 und Rac-1 beschrieben (77). Dabei scheint Rac-1 vor

allem am „Clustern“ von VacA beteiligt zu sein, Cdc42 hingegen eher an der Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts, um Membranvesikel zu generieren.

Bei der Regulation der Aktivität von Cdc42 und Rac-1 spielt die CD18-Phosphorylierung eine Rolle. Phosphorylierung von Thr758 führt zur Aktivierung der kleinen GTPasen Rac-1 und Cdc42, nicht aber RhoA (143). Die aktiven GTPasen haben eine Umlagerung des Aktin-Zytoskeletts zur Folge. Allein die Transfektion mit Thr758-phosphorylierten CD18-Fragmenten induziert die Adhäsion von T-Lymphozyten auf ICAM-1 durch Aktivierung von Cdc42 und Rac-1. Dominant negative Konstrukte der kleinen GTPasen verhindern die P-Thr758-CD18-induzierte Adhäsion. Dabei führt die Bindung des Adaptor-Proteins 14-3-3 an phosphoryliertes CD18 zur Aktivierung von Cdc42 und Rac-1 (65, 143, 144). Dies geschieht vermutlich durch Rekrutierung von Vav, einem „guanine nucleotide exchange factor“ (GEF) von Rac-1. Die Aktivität von GTPasen wird im Allgemeinen durch GEF und „GTPase activating protein“ (GAP) Faktoren reguliert. GEFs stimulieren den Austausch von GDP zu GTP und wirken aktivierend auf GTPasen. GAPs hingegen stimulieren die GTPase-Aktivität und führen zur Hydrolyse von GTP zu GDP, was zur Inaktivierung führt. Interessanterweise wurde von Baldari und Kollegen beschrieben, dass es in Jurkat T-Zellen durch VacA zur Aktivierung des GEF-Faktors Vav kommt (20). Die Aktivierung ist unabhängig von der Kanalaktivität von VacA und erfolgt vermutlich nach Rezeptor-Bindung. Vav kann durch Src phosphoryliert werden und möglicherweise nach Bindung an 14-3-3 zur Aktivierung von Rac-1 führen. Der mögliche Mechanismus, der zur Aufnahme von VacA in primäre T-Zellen führt, ist in Abb. 42 aufgeführt.

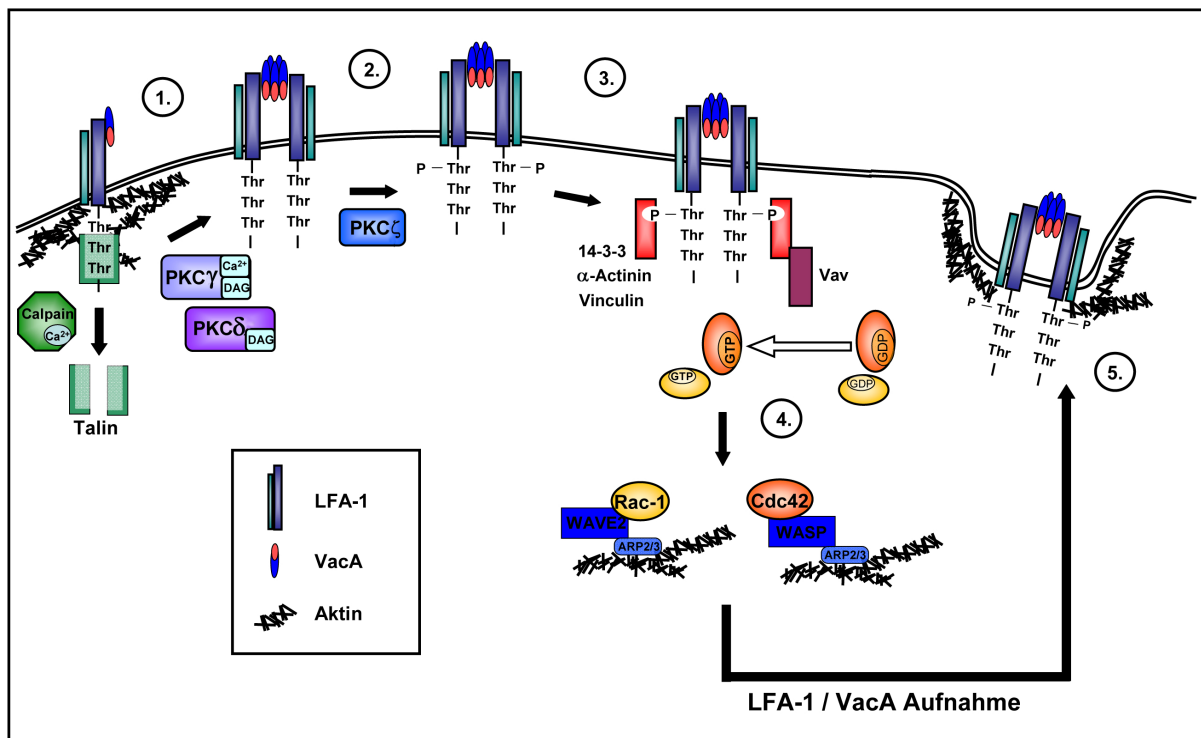


Abb. 42: Modell der Signalwege zur Aufnahme von VacA in T-Lymphozyten.

Spaltung von Talin durch die Ca²⁺-abhängige Protease Calpain ermöglicht die Re-Lokalisation und das „Clustern“ von LFA-1 in der Membran. An diesem Prozess sind klassische PKC beteiligt (1). Phosphorylierung von Thr758 im TTT-Motiv von CD18 durch die atypische Isoform PKCζ (2) führt zur Bindung von 14-3-3 oder anderer Adaptorproteine (α-Aktinin, Vinculin) (3). 14-3-3 induziert, möglicherweise über Vav, die Aktivierung der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac-1 (4). Umlagerungen des Aktin-Zytoskeletts ermöglichen die Endozytose von LFA-1 und damit auch VacA (5).

4.9. Lokalisation und Transport von VacA in CD4⁺ T-Zellen

Neben den gezeigten Parallelen bei der Aufnahme von VacA, ist auch die intrazelluläre Lokalisation von VacA in primären T-Lymphozyten mit der in HeLa Zellen zu vergleichen (Abb. 36 und 37). Dies ist interessant da VacA mit RPTPα und -β bzw. LFA-1 über unterschiedliche Rezeptoren in Epithelzellen und primäre T-Lymphozyten aufgenommen wird. Auch in der B-Lymphozyten Zelllinie Raji konnte VacA in den entsprechenden endosomalen Strukturen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). VacA gelangt nach Aufnahme über einen Clathrin-unabhängigen Weg in frühe Endosomen, die sich durch die Anwesenheit der GTPase Rab5 charakterisieren. Rab5 reguliert dabei den Vesikeltransport von der Plasmamembran zu frühen Endosomen und die homotypische Fusion früher Endosomen (22, 83). Nach ca. 1 h ist der Großteil von VacA in einem Hybridkompartiment mit den Markerproteinen Rab7 und LAMP1 lokalisiert. Der Transport der VacA-Vesikel von der Zellperipherie in den perinukleären Bereich erfolgt dabei entlang von Mikrotubuli. Dies konnte mittels „live cell“-Mikroskopie beobachtet werden und unter Verwendung des

depolymerisierenden Moleküls Nocodazol blockiert werden (Daten nicht gezeigt). Auf die VacA-Aufnahme hat Nocodazol jedoch keinen Einfluß. Vermutlich vermitteln Rab-Proteine auf den Vesikeln die Interaktion mit Dynein/Kinesin-Motorproteinen zum Transport entlang der Mikrotubuli. So konnte gezeigt werden, dass Rab7 mit frühen Endosomen assoziiert und den Transport zu späten Endosomen vermittelt (210). Rab7 interagiert im aktiven, GTP-gebundenen Zustand über das Protein RILP („Rab7-interacting lysosomal protein“) mit dem Dynein-Motorprotein, und führt so zum gerichteten Transport zum (-)-Ende der Mikrotubuli (95, 96).

Zudem wurde VacA weder in HeLa Zellen noch T-Zellen zu irgendeinem Zeitpunkt in dem Rab11-positiven Recycling Kompartiment detektiert. Dies ist von Bedeutung, da das Recycling von LFA-1 zur Zytoplasmamembran über dieses Rab11-Kompartiment erfolgt (153). Nach Aktivierung Neutrophiler kommt es zur Organisation von LFA-1 in „lipid rafts“ und zur Ligand-unabhängigen Aufnahme (62). Mehr als 75% des aufgenommenen Integrins LFA-1 wird nach 15 min wieder zur Plasmamembran transportiert um weitere Zyklen von Aufnahme und Rücktransport zu durchlaufen. Dieser Mechanismus ist vermutlich die Grundlage für die Migration. Fabbri und Kollegen (61) zeigten, dass LFA-1 nicht in LAMP-1-positiven Vesikeln detektiert werden kann. Somit ist davon auszugehen, dass VacA und LFA-1, trotz gemeinsamer Aufnahme über frühe Endosomen, unterschiedlich sortiert werden. Der Weg der Aufnahme ist anscheinend für die Funktion von VacA von Bedeutung. Die LFA-1-negative Zelllinie J- β 2.7 kann VacA binden und aufnehmen, bildet jedoch signifikant weniger Vakuolen aus und zeigt kaum eine Hemmung der IL-2-Expression. LFA-1 vermittelt dementsprechend vermutlich essentielle Signale für den Transport von VacA im endosomalen System.

Ein spezifischer endosomaler Transport ist dabei für die Funktion vieler Toxine essentiell. Nur wenn ein Toxin in das spezifische Kompartiment gelangt, kann es mit den für die Translokation der aktiven Domäne nötigen zellulären Faktoren interagieren. Dabei lassen sich, bezogen auf den Transport durch das endosomale System, zwei Gruppen von Toxinen unterscheiden (Abb. 43).

Toxine werden, wie das Cholera Toxin (Ctx) von *Vibrio cholerae*, nach Rezeptor-vermittelter Endozytose über frühe Endosomen und den Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) oder Golgi-Apparat in das ER transportiert. Dort kommt es unter Beteiligung zellulärer Faktoren, wie der Proteindisulfid-Isomerase (PDI) und den Sec61-Transporterkomplex zur

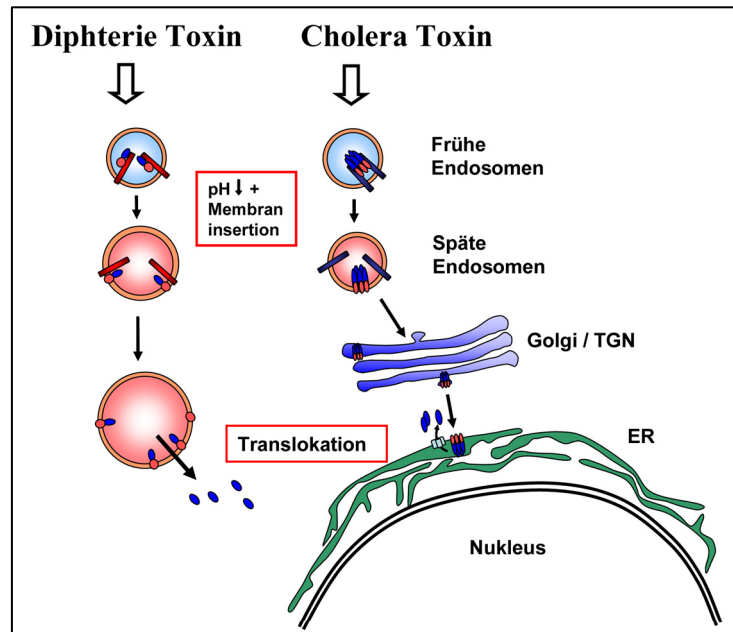


Abb. 43: Model des intrazellulären Transports von Diphtherie – und Cholera Toxin. Erläuterungen siehe Text.

Translokation der aktiven Domäne (107). Die zweite Gruppe von Toxinen überführt ihre aktive

Domäne nach Rezeptor-vermittelter Aufnahme direkt aus dem Endosom in das Zytosol der Ziel-Zelle. Induziert wird dies durch Ansäuerung des Vesikellumens. Ein niedriger pH-Wert führt zu Konformationsänderungen des Toxins und dadurch meist zur Membran-Insertion hydrophober Domänen. Die gebildete Pore ist an der Translokation der aktiven Domäne beteiligt. Auch hier spielen zelluläre Faktoren eine Rolle. So benötigt das Diphtherie Toxin von *Clostridium diphtheriae* zur Translokation die Faktoren Hsp90, Thioredoxin, β -COP und ATP (156). Der hier beschriebene Mechanismus der pH-induzierten Membran-Insertion von Toxin-Domänen zur Translokation ist auch für VacA denkbar.

4.10. VacA und die Interaktion von T-Zellen mit APC

Erste Studien zur Lokalisation von VacA bei Kontakt primärer CD4⁺ T-Lymphozyten mit APC zeigten, dass sich VacA an der Kontaktzone zwischen den Zellen konzentriert (Abb. 38 und 39). Dies wurde mit der B-Zelllinie Raji sowie *in vitro*-differenzierten DC gezeigt. Der TCR/MHC-Komplex, dessen Signale zur Ausbildung der Immunologischen Synapse führen,

wurde mit dem Superantigen *Staphylococcus* Enterotoxin B (SEB) induziert (192, 193). Dabei war es irrelevant, welcher Zelltyp mit VacA vorinkubiert wurde. Wurden Raji Zellen 4 h mit VacA inkubiert und im Anschluss mit T-Lymphozyten co-kultiviert, konnte auch hier VacA an der Kontaktstelle beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dabei konzentrierte sich in diesem Bereich neben VacA auch LFA-1. Das β_2 -Integrin ist als strukturelle Komponente des Supramolekularen Aktivierungskomplexes (SMAC) beteiligt, wobei auch Signale durch LFA-1 generiert werden, welche die Aktivierung der T-Zelle modulieren (185). Aufgrund der Struktur wird der Komplex in zwei Bereiche, der pSMAC in der Peripherie und cSMAC im Zentrum, unterteilt. LFA-1 konzentriert sich zusammen mit anderen Proteinen ringförmig (pSMAC) um die zentrale Ansammlung des TCR-Komplexes und Co-Rezeptors (cSMAC). Zusätzlich konnte auch durch Co-Infektion mit der Cholera Toxin B-Untereinheit gezeigt werden, dass es sich bei der Kontaktstelle um „lipid raft“-Membranstrukturen handelt. CtxB konzentriert sich ebenso wie VacA und LFA-1 in den Zwischenbereich der Zellen (Daten nicht gezeigt). Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung bei Kontaktaufnahme primärer T-Zellen mit DC. Migrierende T-Lymphozyten wiesen VacA und LFA-1 konzentriert am Uropodium, einer mit Gangliosid GM1 angereicherten „lipid raft“-Struktur, auf. Im Verlauf der Interaktion kam es zur Re-Orientierung des Uropodiums an die DC. VacA und LFA-1 wurden dadurch an die Kontaktstelle gebracht und dieser Komplex blieb über einen Zeitraum von > 15 min bestehen. Ob VacA die Aktivierung der T-Lymphozyten durch die APC aufgrund der räumlichen Nähe beeinflusst, muss in weiteren Studien gezeigt werden. Erste Experimente zur Hemmung der IL-2-Expression von T-Lymphozyten durch VacA nach Aktivierung mit DC zeigten keinen Effekt. Die Aktivierung erfolgte dabei durch Co-Kultivierung in Anwesenheit von SEB. Dies stellt möglicherweise einen zu starken oder unphysiologischen Stimulus dar, so dass ein VacA-Effekt nicht zu erkennen war. Weitere Studien zeigten, dass es durch Superantigene zur CD4-unabhängigen Aktivierung von T-Lymphozyten und somit IL-2-Expression kam (23). Der Prozess unterscheidet sich von dem klassischen Weg der T-Zell-Aktivierung, da auch Lck-negative Zellen durch Superantigene aktiviert wurden. Dieser Aspekt muss in zukünftigen Experimenten weiter untersucht werden, zumal die Aktivierung der T-Lymphozyten mit DC besser die Situation *in vivo* widerspiegelt.

5. Zusammenfassung

Das humanpathogene Bakterium *H. pylori* kolonisiert die Mukosa des Magens von ~ 50% der Menschen. Dabei kommt es zur Ausbildung chronischer Entzündungen der Magenmukosa, die jedoch meist unbemerkt bleiben. Es kann jedoch auch zu schwerwiegenden Erkrankungen wie Magengeschwüren oder Magenkrebs kommen. Trotz der starken Reaktionen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, wird *H. pylori* nicht beseitigt. Neben passiven besitzt *H. pylori* aktive Mechanismen, dem Immunsystem zu entgehen. Die Hemmung der IL-2-Expression und somit Proliferation von T-Lymphozyten durch VacA spielt eine zentrale Rolle. Dies geschieht vermutlich auf Stufe der Ca^{2+} -abhängigen Phosphatase Calcineurin und verhindert die Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors NFAT. In dieser Arbeit wurde die Interaktion von VacA und T-Lymphozyten genauer untersucht. Im Fokus stand dabei die Identifizierung des VacA-Rezeptors auf T-Zellen und den Mechanismus der zellulären Aufnahme von VacA genauer zu charakterisieren. Mit der β_2 -Untereinheit CD18 des Leukozyten-spezifischen Integrins LFA-1 konnte der funktionelle Rezeptor identifiziert werden. Die Bindung an CD18 führt zur gemeinsamen Aufnahme von VacA und LFA-1 in T-Zellen. Die Aufnahme, die bei primären T-Zellen nur nach deren Stimulierung erfolgt, ist Voraussetzung für die VacA-induzierte Ausbildung saurer Vakuolen und der Hemmung der IL-2-Expression. Durch die Bindung an CD18 wird die Interaktion von LFA-1 mit dem natürlichen Liganden nicht gestört. Weitere Experimente zeigten, dass die Bindung von VacA an CD18 über Oligosaccharide erfolgt. Abspaltung von Sialyl-Resten verhindert die Bindung von VacA an CD18, nicht jedoch die Bindung an die Zelloberfläche der T-Zellen. Zusammen mit der Beobachtung, dass auch LFA-1-negative T-Zellen VacA binden können, wird vermutet, dass es noch mindestens einen weiteren Interaktionspartner (Co-Rezeptor) auf T-Zellen gibt. Experimente mit murinen T-Zellen zeigten einen Spezies-spezifischen Effekt von VacA. Murine T-Lymphozyten sind dabei resistent gegenüber der VacA-induzierten Ausbildung von Vakuolen und der Hemmung der IL-2-Expression. VacA bindet nicht an murine T-Zellen und wird nicht aufgenommen. Möglicherweise wird kein spezifischer VacA-Rezeptor auf murinen T-Zellen exprimiert. Da *H. pylori* ein human-pathogenes Bakterium ist, scheint dies eine Spezies-spezifische Anpassung zur Modulation der Immunantwort zu sein. Werden die humanen Formen der Integrine LFA-1 und Mac-1 in murinen T-Zellen exprimiert, zeigen sich die Zellen sensitiv gegenüber der Ausbildung saurer Vakuolen. Die Hemmung der IL-2-Expression durch VacA ist jedoch weiterhin nicht möglich. Zusätzliche Spezies-spezifische Faktoren für die Intoxikation von Zellen müssen angenommen werden.

VacA wird in primäre humane T-Lymphozyten über einen vergleichbaren Mechanismus wie in Epithelzellen aufgenommen. Die Charakterisierung des Aufnahmeweges von VacA in primäre CD4⁺ T-Zellen zeigte, dass VacA Clathrin-unabhängig aufgenommen wird. Monomeres VacA ist dabei Voraussetzung, um an die Zelloberfläche zu binden und um über „lipid raft“-Membrandomänen aufgenommen zu werden. Für die Aufnahme ist ein funktionelles Aktin-Zytoskelett erforderlich. Aufnahmestudien zeigten zudem eine zentrale Rolle der PKC-Isoformen PKC ζ und PKC γ und/oder $-\delta$. Vermutlich führt die Phosphorylierung konservierter Threonin-Reste im zytoplasmatischen Teil von CD18 durch PKC ζ zur Bindung des Adaptor-Proteins 14-3-3. Dies hat die Aktivierung von Vav und somit der GTPasen Cdc42 und Rac-1 zur Folge. Die Hemmung dieser GTPasen verhindert die Aufnahme von VacA in primäre T-Zellen. VacA wird, wie in der Zelllinie HeLa, über frühe Endosomen (Rab5-positiv) zum Hybridkompartiment aus späten Endosomen/frühe Lysosomen (Rab7 und LAMP1) transportiert. Der Transport der Membranvesikel erfolgt dabei entlang von Mikrotubuli. Zudem wurde begonnen die Rolle von VacA bei der Interaktion primärer T-Zellen mit Antigen-präsentierenden Zellen zu untersuchen, Bedingungen wie sie *in vivo* bei der Immunreaktion gegen *H. pylori* stattfinden. Dabei zeigte sich, dass sich VacA spezifisch an der Kontaktstelle zwischen T-Zelle und APC konzentriert. Dieser Bereich ist für die Immunreaktion von zentraler Bedeutung, da es hier zur Antigen-spezifischen Aktivierung von T-Zellen kommt. Die Untersuchung dieses Aspektes ist ein Schwerpunkt für zukünftige Studien.

6. Literaturverzeichnis

1. **Abrami, L., S. H. Leppla, and F. G. van der Goot.** 2006. Receptor palmitoylation and ubiquitination regulate anthrax toxin endocytosis. *J Cell Biol.* **172**:309-320.
2. **Abrami, L., S. Liu, P. Cosson, S. H. Leppla, and F. G. van der Goot.** 2003. Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J Cell Biol.* **160**:321-328.
3. **Abrami, L., N. Reig, and F. G. van der Goot.** 2005. Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill. *Trends Microbiol* **13**:72-78.
4. **Aebischer, T., B. Lucas, J. Koesling, D. Bumann, and T. F. Meyer.** 2000. How CD4(+) T cells may eliminate extracellular gastric *Helicobacter*? *J Biotechnol.* **83**:77-84.
5. **Algood, H. M., V. J. Torres, D. Unutmaz, and T. L. Cover.** 2007. Resistance of primary murine CD4+ T cells to *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Infect. Immun.* **75**:334-341.
6. **Allen, L. A.** 2007. Phagocytosis and persistence of *Helicobacter pylori*. *Cell Microbiol* **9**:817-828.
7. **Amedei, A., A. Cappon, G. Codolo, A. Cabrelle, A. Polenghi, M. Benagiano, E. Tasca, A. Azzurri, M. M. D'Elios, G. Del Prete, and M. de Bernard.** 2006. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *J Clin. Invest* **116**:1092-1101.
8. **Amieva, M. R. and E. M. El-Omar.** 2008. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* **134**:306-323.
9. **Amieva, M. R., R. Vogelmann, A. Covacci, L. S. Tompkins, W. J. Nelson, and S. Falkow.** 2003. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* **300**:1430-1434.
10. **Asada, M., K. Furukawa, C. Kantor, C. G. Gahmberg, and A. Kobata.** 1991. Structural study of the sugar chains of human leukocyte cell adhesion molecules CD11/CD18. *Biochemistry* **30**:1561-1571.
11. **Asahi, M., T. Azuma, S. Ito, Y. Ito, H. Suto, Y. Nagai, M. Tsubokawa, Y. Tohyama, S. Maeda, M. Omata, T. Suzuki, and C. Sasakawa.** 2000. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp. Med* **191**:593-602.
12. **Aspholm, M., F. O. Olfat, J. Norden, B. Sonden, C. Lundberg, R. Sjostrom, S. Altraja, S. Odenbreit, R. Haas, T. Wadstrom, L. Engstrand, C. Semino-Mora, H. Liu, A. Dubois, S. Teneberg, A. Arnqvist, and T. Boren.** 2006. SabA is the *H. pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. *PLoS. Pathog.* **2**:e110.

13. **Aspholm-Hurtig, M., G. Dailide, M. Lahmann, A. Kalia, D. Ilver, N. Roche, S. Vikstrom, R. Sjostrom, S. Linden, A. Backstrom, C. Lundberg, A. Arnqvist, J. Mahdavi, U. J. Nilsson, B. Velapatino, R. H. Gilman, M. Gerhard, T. Alarcon, M. Lopez-Brea, T. Nakazawa, J. G. Fox, P. Correa, M. G. Dominguez-Bello, G. I. Perez-Perez, M. J. Blaser, S. Normark, I. Carlstedt, S. Oscarson, S. Teneberg, D. E. Berg, and T. Boren.** 2004. Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. *Science* **305**:519-522.
14. **Atherton, J. C.** 2006. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu. Rev. Pathol.* **1**:63-96.
15. **Atherton, J. C., P. Cao, R. M. Peek, Jr., M. K. Tummuru, M. J. Blaser, and T. L. Cover.** 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol. Chem.* **270**:17771-17777.
16. **Atherton, J. C., P. M. Sharp, T. L. Cover, G. Gonzalez-Valencia, R. M. Peek, Jr., S. A. Thompson, C. J. Hawkey, and M. J. Blaser.** 1999. Vacuolating cytotoxin (*vacA*) alleles of *Helicobacter pylori* comprise two geographically widespread types, *m1* and *m2*, and have evolved through limited recombination. *Curr. Microbiol* **39**:211-218.
17. **Bamford, K. B., X. Fan, S. E. Crowe, J. F. Leary, W. K. Gourley, G. K. Luthra, E. G. Brooks, D. Y. Graham, V. E. Reyes, and P. B. Ernst.** 1998. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* **114**:482-492.
18. **Barreiro, O., F. H. de la, M. Mittelbrunn, and F. Sanchez-Madrid.** 2007. Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol. Rev.* **218**:147-164.
19. **Bauerfeind, P., R. Garner, B. E. Dunn, and H. L. Mobley.** 1997. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut* **40**:25-30.
20. **Boncristiano, M., S. R. Paccani, S. Barone, C. Ulivieri, L. Patrussi, D. Ilver, A. Amedei, M. M. D'Elios, J. L. Telford, and C. T. Baldari.** 2003. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp. Med* **198**:1887-1897.
21. **Boren, T., P. Falk, K. A. Roth, G. Larson, and S. Normark.** 1993. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* **262**:1892-1895.
22. **Bucci, C., R. G. Parton, I. H. Mather, H. Stunnenberg, K. Simons, B. Hoflack, and M. Zerial.** 1992. The small GTPase *rab5* functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**:715-728.
23. **Bueno, C., C. D. Lemke, G. Criado, M. L. Baroja, S. S. Ferguson, A. K. Rahman, C. D. Tsoukas, J. K. McCormick, and J. Madrenas.** 2006. Bacterial superantigens bypass Lck-dependent T cell receptor signaling by activating a Galpha11-dependent, PLC-beta-mediated pathway. *Immunity.* **25**:67-78.

24. **Burrone, D., P. Lupetti, C. Pagliaccia, J. M. Reyrat, R. Dallai, R. Rappuoli, and J. L. Telford.** 1998. Deletion of the major proteolytic site of the *Helicobacter pylori* cytotoxin does not influence toxin activity but favors assembly of the toxin into hexameric structures. *Infect. Immun.* **66**:5547-5550.
25. **Campbell, D. J., C. H. Kim, and E. C. Butcher.** 2003. Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunol. Rev.* **195**:58-71.
26. **Censini, S., C. Lange, Z. Xiang, J. E. Crabtree, P. Ghiara, M. Borodovsky, R. Rappuoli, and A. Covacci.** 1996. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:14648-14653.
27. **Churin, Y., L. Al-Ghoul, O. Kepp, T. F. Meyer, W. Birchmeier, and M. Naumann.** 2003. *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *J Cell Biol.* **161**:249-255.
28. **Confer, D. L. and J. W. Eaton.** 1982. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* **217**:948-950.
29. **Constantin, G., M. Majeed, C. Giagulli, L. Piccio, J. Y. Kim, E. C. Butcher, and C. Laudanna.** 2000. Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity.* **13**:759-769.
30. **Correa, P. and J. Houghton.** 2007. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **133**:659-672.
31. **Cover, T. L. and S. R. Blanke.** 2005. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat. Rev. Microbiol* **3**:320-332.
32. **Cover, T. L. and M. J. Blaser.** 1992. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol. Chem.* **267**:10570-10575.
33. **Cover, T. L., S. A. Halter, and M. J. Blaser.** 1992. Characterization of HeLa cell vacuoles induced by *Helicobacter pylori* broth culture supernatant. *Hum. Pathol.* **23**:1004-1010.
34. **Cover, T. L., P. I. Hanson, and J. E. Heuser.** 1997. Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *J Cell Biol.* **138**:759-769.
35. **Cover, T. L., M. K. Tummuru, P. Cao, S. A. Thompson, and M. J. Blaser.** 1994. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol. Chem.* **269**:10566-10573.
36. **Crabtree, G. R.** 2001. Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J. Biol. Chem.* **276**:2313-2316.
37. **Crabtree, G. R. and E. N. Olson.** 2002. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* **109 Suppl**:S67-S79.

38. **Crabtree, J. E., A. Covacci, S. M. Farmery, Z. Xiang, D. S. Tompkins, S. Perry, I. J. Lindley, and R. Rappuoli.** 1995. Helicobacter pylori induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J Clin. Pathol.* **48**:41-45.
39. **Czajkowsky, D. M., H. Iwamoto, T. L. Cover, and Z. Shao.** 1999. The vacuolating toxin from Helicobacter pylori forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:2001-2006.
40. **D'Elíos, M. M., A. Amedei, and G. Del Prete.** 2003. Helicobacter pylori antigen-specific T-cell responses at gastric level in chronic gastritis, peptic ulcer, gastric cancer and low-grade mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *Microbes. Infect.* **5**:723-730.
41. **D'Elíos, M. M., M. Manghetti, C. M. De, F. Costa, C. T. Baldari, D. Burróni, J. L. Telford, S. Romagnani, and G. Del Prete.** 1997. T helper 1 effector cells specific for Helicobacter pylori in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J Immunol.* **158**:962-967.
42. **Dahms, N. M. and G. W. Hart.** 1985. Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) contains sulfated N-linked oligosaccharides. *J Immunol.* **134**:3978-3986.
43. **Dahms, N. M. and G. W. Hart.** 1986. Influence of quaternary structure on glycosylation. Differential subunit association affects the site-specific glycosylation of the common beta-chain from Mac-1 and LFA-1. *J Biol. Chem.* **261**:13186-13196.
44. **Dassanayake, R. P., S. Shanthalingam, W. C. Davis, and S. Srikumaran.** 2007. Mannheimia haemolytica leukotoxin-induced cytolysis of ovine (Ovis aries) leukocytes is mediated by CD18, the beta subunit of beta2-integrins. *Microb. Pathog.* **42**:167-173.
45. **de Bernard, M., A. Cappon, L. Pancotto, P. Ruggiero, J. Rivera, G. G. Del, and C. Montecucco.** 2005. The Helicobacter pylori VacA cytotoxin activates RBL-2H3 cells by inducing cytosolic calcium oscillations. *Cell Microbiol* **7**:191-198.
46. **Del Giudice, G. and P. Michetti.** 2004. Inflammation, immunity and vaccines for Helicobacter pylori. *Helicobacter.* **9 Suppl 1**:23-28.
47. **del Pozo, M. A., M. Nieto, J. M. Serrador, D. Sancho, M. Vicente-Manzanares, C. Martínez, and F. Sanchez-Madrid.** 1998. The two poles of the lymphocyte: specialized cell compartments for migration and recruitment. *Cell Adhes. Commun.* **6**:125-133.
48. **Del Prete, G.** 1998. The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int Rev. Immunol.* **16**:427-455.
49. **Dileepan, T., S. C. Kachlany, N. V. Balashova, J. Patel, and S. K. Maheswaran.** 2007. Human CD18 is the functional receptor for Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin. *Infect. Immun.* **75**:4851-4856.
50. **Dileepan, T., M. S. Kannan, B. Walcheck, and S. K. Maheswaran.** 2007. Integrin-EGF-3 domain of bovine CD18 is critical for Mannheimia haemolytica leukotoxin species-specific susceptibility. *FEMS Microbiol Lett.* **274**:67-72.

51. **Dong, M., F. Yeh, W. H. Tepp, C. Dean, E. A. Johnson, R. Janz, and E. R. Chapman.** 2006. SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science* **312**:592-596.
52. **Dunn, B. E., H. Cohen, and M. J. Blaser.** 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol Rev.* **10**:720-741.
53. **Dustin, M. L. and T. A. Springer.** 1989. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* **341**:619-624.
54. **Dustin, M. L., S. Y. Tseng, R. Varma, and G. Campi.** 2006. T cell-dendritic cell immunological synapses. *Curr. Opin. Immunol.* **18**:512-516.
55. **Eaton, K. A., C. L. Brooks, D. R. Morgan, and S. Krakowka.** 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* **59**:2470-2475.
56. **Eaton, K. A., D. R. Morgan, and S. Krakowka.** 1992. Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* **37**:123-127.
57. **Ehlers, M. R.** 2000. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes. Infect.* **2**:289-294.
58. **Eichholtz, T., D. B. de Bont, W. J. de, R. M. Liskamp, and H. L. Ploegh.** 1993. A myristoylated pseudosubstrate peptide, a novel protein kinase C inhibitor. *J Biol. Chem.* **268**:1982-1986.
59. **El-Bez, C., M. Adrian, J. Dubochet, and T. L. Cover.** 2005. High resolution structural analysis of *Helicobacter pylori* VacA toxin oligomers by cryo-negative staining electron microscopy. *J Struct. Biol.* **151**:215-228.
60. **El-Omar, E. M., M. Carrington, W. H. Chow, K. E. McColl, J. H. Bream, H. A. Young, J. Herrera, J. Lissowska, C. C. Yuan, N. Rothman, G. Lanyon, M. Martin, J. F. Fraumeni, Jr., and C. S. Rabkin.** 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* **404**:398-402.
61. **Fabbri, M., M. S. Di, M. C. Gagliani, E. Consonni, R. Molteni, J. R. Bender, C. Tacchetti, and R. Pardi.** 2005. Dynamic partitioning into lipid rafts controls the endo-exocytic cycle of the alphaL/beta2 integrin, LFA-1, during leukocyte chemotaxis. *Mol. Biol. Cell* **16**:5793-5803.
62. **Fabbri, M., L. Fumagalli, G. Bossi, E. Bianchi, J. R. Bender, and R. Pardi.** 1999. A tyrosine-based sorting signal in the beta2 integrin cytoplasmic domain mediates its recycling to the plasma membrane and is required for ligand-supported migration. *EMBO J* **18**:4915-4925.
63. **Fagerholm, S., N. Morrice, C. G. Gahmberg, and P. Cohen.** 2002. Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the integrin CD18 chain by protein kinase C isoforms in leukocytes. *J Biol. Chem.* **277**:1728-1738.

-
64. **Fagerholm, S. C., T. J. Hilden, and C. G. Gahmberg.** 2004. P marks the spot: site-specific integrin phosphorylation regulates molecular interactions. *Trends Biochem. Sci.* **29**:504-512.
65. **Fagerholm, S. C., T. J. Hilden, S. M. Nurmi, and C. G. Gahmberg.** 2005. Specific integrin alpha and beta chain phosphorylations regulate LFA-1 activation through affinity-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Biol.* **171**:705-715.
66. **Falush, D., T. Wirth, B. Linz, J. K. Pritchard, M. Stephens, M. Kidd, M. J. Blaser, D. Y. Graham, S. Vacher, G. I. Perez-Perez, Y. Yamaoka, F. Megraud, K. Otto, U. Reichard, E. Katzowitsch, X. Wang, M. Achtman, and S. Suerbaum.** 2003. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* **299**:1582-1585.
67. **Fomina, A. F., T. J. Deerinck, M. H. Ellisman, and M. D. Cahalan.** 2003. Regulation of membrane trafficking and subcellular organization of endocytic compartments revealed with FM1-43 in resting and activated human T cells. *Exp. Cell Res.* **291**:150-166.
68. **Fong, K. P., C. M. Pacheco, L. L. Otis, S. Baranwal, I. R. Kieba, G. Harrison, E. V. Hersh, K. Boesze-Battaglia, and E. T. Lally.** 2006. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin requires lipid microdomains for target cell cytotoxicity. *Cell Microbiol* **8**:1753-1767.
69. **Forsyth, M. H., J. C. Atherton, M. J. Blaser, and T. L. Cover.** 1998. Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. *Infect. Immun.* **66**:3088-3094.
70. **Friedl, P. and E. B. Brocker.** 2000. T cell migration in three-dimensional extracellular matrix: guidance by polarity and sensations. *Dev. Immunol.* **7**:249-266.
71. **Friedl, P., A. T. den Boer, and M. Gunzer.** 2005. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* **5**:532-545.
72. **Fujikawa, A., D. Shirasaka, S. Yamamoto, H. Ota, K. Yahiro, M. Fukada, T. Shintani, A. Wada, N. Aoyama, T. Hirayama, H. Fukamachi, and M. Noda.** 2003. Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by *VacA* of *Helicobacter pylori*. *Nat. Genet.* **33**:375-381.
73. **Fujimoto, L. M., R. Roth, J. E. Heuser, and S. L. Schmid.** 2000. Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *Traffic.* **1**:161-171.
74. **Galmiche, A., J. Rasso, A. Doye, S. Cagnol, J. C. Chambard, S. Contamin, T. de, V. I. Just, V. Ricci, E. Solcia, O. E. Van, and P. Boquet.** 2000. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J* **19**:6361-6370.
75. **Gangwer, K. A., D. J. Mushrush, D. L. Stauff, B. Spiller, M. S. McClain, T. L. Cover, and D. B. Lacy.** 2007. Crystal structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin p55 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**:16293-16298.

76. **Gauthier, N. C., P. Monzo, T. Gonzalez, A. Doye, A. Oldani, P. Gounon, V. Ricci, M. Cormont, and P. Boquet.** 2007. Early endosomes associated with dynamic F-actin structures are required for late trafficking of *H. pylori* VacA toxin. *J Cell Biol.* **177**:343-354.
77. **Gauthier, N. C., P. Monzo, V. Kaddai, A. Doye, V. Ricci, and P. Boquet.** 2005. *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin: a probe for a clathrin-independent and Cdc42-dependent pinocytic pathway routed to late endosomes. *Mol. Biol. Cell* **16**:4852-4866.
78. **Gebert, B., W. Fischer, E. Weiss, R. Hoffmann, and R. Haas.** 2003. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* **301**:1099-1102.
79. **Gewirtz, A. T., Y. Yu, U. S. Krishna, D. A. Israel, S. L. Lyons, and R. M. Peek, Jr.** 2004. *Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *J Infect. Dis.* **189**:1914-1920.
80. **Giagulli, C., E. Scarpini, L. Ottoboni, S. Narumiya, E. C. Butcher, G. Constantin, and C. Laudanna.** 2004. RhoA and zeta PKC control distinct modalities of LFA-1 activation by chemokines: critical role of LFA-1 affinity triggering in lymphocyte in vivo homing. *Immunity.* **20**:25-35.
81. **Gobert, A. P., D. J. McGee, M. Akhtar, G. L. Mendz, J. C. Newton, Y. Cheng, H. L. Mobley, and K. T. Wilson.** 2001. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:13844-13849.
82. **Gomez-Mouton, C., R. A. Lacalle, E. Mira, S. Jimenez-Baranda, D. F. Barber, A. C. Carrera, A. Martinez, and S. Manes.** 2004. Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. *J Cell Biol.* **164**:759-768.
83. **Gorvel, J. P., P. Chavrier, M. Zerial, and J. Gruenberg.** 1991. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**:915-925.
84. **Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery, and S. Amigorena.** 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:621-667.
85. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
86. **Hatakeyama, M. and H. Higashi.** 2005. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci.* **96**:835-843.
87. **Henrickson, S. E., T. R. Mempel, I. B. Mazo, B. Liu, M. N. Artyomov, H. Zheng, A. Peixoto, M. P. Flynn, B. Senman, T. Junt, H. C. Wong, A. K. Chakraborty, and U. H. von Andrian.** 2008. T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation. *Nat. Immunol.* **9**:282-291.

88. **Hessey, S. J., J. Spencer, J. I. Wyatt, G. Sobala, B. J. Rathbone, A. T. Axon, and M. F. Dixon.** 1990. Bacterial adhesion and disease activity in Helicobacter associated chronic gastritis. *Gut* **31**:134-138.
89. **Higashi, H., R. Tsutsumi, S. Muto, T. Sugiyama, T. Azuma, M. Asaka, and M. Hatakeyama.** 2002. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein. *Science* **295**:683-686.
90. **Higashi, H., K. Yokoyama, Y. Fujii, S. Ren, H. Yuasa, I. Saadat, N. Murata-Kamiya, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2005. EPIYA motif is a membrane-targeting signal of Helicobacter pylori virulence factor CagA in mammalian cells. *J Biol. Chem.* **280**:23130-23137.
91. **Hirai, T. and K. Chida.** 2003. Protein kinase C ζ (PKC ζ): activation mechanisms and cellular functions. *J Biochem.* **133**:1-7.
92. **Ho, M. K. and T. A. Springer.** 1983. Biosynthesis and assembly of the alpha and beta subunits of Mac-1, a macrophage glycoprotein associated with complement receptor function. *J Biol. Chem.* **258**:2766-2769.
93. **Hogg, N., M. Laschinger, K. Giles, and A. McDowall.** 2003. T-cell integrins: more than just sticking points. *J Cell Sci.* **116**:4695-4705.
94. **Ji, X., T. Fernandez, D. Burrioni, C. Pagliaccia, J. C. Atherton, J. M. Reyrat, R. Rappuoli, and J. L. Telford.** 2000. Cell specificity of Helicobacter pylori cytotoxin is determined by a short region in the polymorphic midregion. *Infect. Immun.* **68**:3754-3757.
95. **Jordens, I., M. Fernandez-Borja, M. Marsman, S. Dusseljee, L. Janssen, J. Calafat, H. Janssen, R. Wubbolts, and J. Neefjes.** 2001. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr. Biol.* **11**:1680-1685.
96. **Jordens, I., M. Marsman, C. Kuijl, and J. Neefjes.** 2005. Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic.* **6**:1070-1077.
97. **Kavermann, H., B. P. Burns, K. Angermuller, S. Odenbreit, W. Fischer, K. Melchers, and R. Haas.** 2003. Identification and characterization of Helicobacter pylori genes essential for gastric colonization. *J. Exp. Med.* **197**:813-822.
98. **Kehrl, J. H.** 2006. Chemoattractant receptor signaling and the control of lymphocyte migration. *Immunol. Res.* **34**:211-227.
99. **Kim, S., A. K. Chamberlain, and J. U. Bowie.** 2004. Membrane channel structure of Helicobacter pylori vacuolating toxin: role of multiple GXXXG motifs in cylindrical channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**:5988-5991.
100. **Kinashi, T.** 2005. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **5**:546-559.
101. **Krummel, M. F. and I. Macara.** 2006. Maintenance and modulation of T cell polarity. *Nat. Immunol.* **7**:1143-1149.

102. **Lafont, F., L. Abrami, and F. G. van der Goot.** 2004. Bacterial subversion of lipid rafts. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:4-10.
103. **Lally, E. T., I. R. Kieba, A. Sato, C. L. Green, J. Rosenbloom, J. Korostoff, J. F. Wang, B. J. Shenker, S. Ortlepp, M. K. Robinson, and P. C. Billings.** 1997. RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J Biol. Chem.* **272**:30463-30469.
104. **Landis, R. C., A. McDowall, C. L. Holness, A. J. Littler, D. L. Simmons, and N. Hogg.** 1994. Involvement of the "I" domain of LFA-1 in selective binding to ligands ICAM-1 and ICAM-3. *J Cell Biol.* **126**:529-537.
105. **Lecuit, M., S. Dramsi, C. Gottardi, M. Fedor-Chaiken, B. Gumbiner, and P. Cossart.** 1999. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* **18**:3956-3963.
106. **Lecuit, M., S. Vandormael-Pournin, J. Lefort, M. Huerre, P. Gounon, C. Dupuy, C. Babinet, and P. Cossart.** 2001. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* **292**:1722-1725.
107. **Lencer, W. I. and B. Tsai.** 2003. The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. *Trends Biochem. Sci.* **28**:639-645.
108. **Letley, D. P. and J. C. Atherton.** 2000. Natural diversity in the N terminus of the mature vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* determines cytotoxin activity. *J Bacteriol.* **182**:3278-3280.
109. **Leunk, R. D., P. T. Johnson, B. C. David, W. G. Kraft, and D. R. Morgan.** 1988. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* **26**:93-99.
110. **Li, Y., A. Wandinger-Ness, J. R. Goldenring, and T. L. Cover.** 2004. Clustering and redistribution of late endocytic compartments in response to *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Mol. Biol. Cell* **15**:1946-1959.
111. **Linz, B., F. Balloux, Y. Moodley, A. Manica, H. Liu, P. Roumagnac, D. Falush, C. Stamer, F. Prugnolle, S. W. van der Merwe, Y. Yamaoka, D. Y. Graham, E. Perez-Trallero, T. Wadstrom, S. Suerbaum, and M. Achtman.** 2007. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* **445**:915-918.
112. **Liu, R., W. A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S. R. Martin, R. Horuk, M. E. MacDonald, H. Stuhlmann, R. A. Koup, and N. R. Landau.** 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**:367-377.
113. **Logan, R. P.** 1994. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Lancet* **344**:1078-1079.
114. **Lupetti, P., J. E. Heuser, R. Manetti, P. Massari, S. Lanzavecchia, P. L. Bellon, R. Dallai, R. Rappuoli, and J. L. Telford.** 1996. Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Cell Biol.* **133**:801-807.

115. **Macia, E., M. Ehrlich, R. Massol, E. Boucrot, C. Brunner, and T. Kirchhausen.** 2006. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev. Cell* **10**:839-850.
116. **Manes, S., L. R. Ana, C. Gomez-Mouton, and A. Martinez.** 2003. From rafts to crafts: membrane asymmetry in moving cells. *Trends Immunol.* **24**:320-326.
117. **Marshall, B. J. and J. R. Warren.** 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**:1311-1315.
118. **Massol, R. H., J. E. Larsen, Y. Fujinaga, W. I. Lencer, and T. Kirchhausen.** 2004. Cholera toxin toxicity does not require functional Arf6- and dynamin-dependent endocytic pathways. *Mol. Biol. Cell* **15**:3631-3641.
119. **Mattsson, A., M. Quiding-Jarbrink, H. Lonroth, A. Hamlet, I. Ahlstedt, and A. Svennerholm.** 1998. Antibody-secreting cells in the stomachs of symptomatic and asymptomatic *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect. Immun.* **66**:2705-2712.
120. **Mattsson, A., A. Tinnert, A. Hamlet, H. Lonroth, I. Bolin, and A. M. Svennerholm.** 1998. Specific antibodies in sera and gastric aspirates of symptomatic and asymptomatic *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* **5**:288-293.
121. **Mayor, S. and R. E. Pagano.** 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:603-612.
122. **McClain, M. S., P. Cao, H. Iwamoto, A. D. Vinion-Dubiel, G. Szabo, Z. Shao, and T. L. Cover.** 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**:6499-6508.
123. **McClain, M. S., H. Iwamoto, P. Cao, A. D. Vinion-Dubiel, Y. Li, G. Szabo, Z. Shao, and T. L. Cover.** 2003. Essential role of a GXXXG motif for membrane channel formation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J Biol. Chem.* **278**:12101-12108.
124. **McClain, M. S., W. Schraw, V. Ricci, P. Boquet, and T. L. Cover.** 2000. Acid activation of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) results in toxin internalization by eukaryotic cells. *Mol. Microbiol* **37**:433-442.
125. **Miletic, A. V., M. Swat, K. Fujikawa, and W. Swat.** 2003. Cytoskeletal remodeling in lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.* **15**:261-268.
126. **Mimuro, H., T. Suzuki, S. Nagai, G. Rieder, M. Suzuki, T. Nagai, Y. Fujita, K. Nagamatsu, N. Ishijima, S. Koyasu, R. Haas, and C. Sasakawa.** 2007. *Helicobacter pylori* dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. *Cell Host. Microbe* **2**:250-263.
127. **Mimuro, H., T. Suzuki, J. Tanaka, M. Asahi, R. Haas, and C. Sasakawa.** 2002. Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol. Cell* **10**:745-755.
128. **Molinari, M., C. Galli, M. de Bernard, N. Norais, J. M. Ruyschaert, R. Rappuoli, and C. Montecucco.** 1998. The acid activation of *Helicobacter pylori* toxin

- VacA: structural and membrane binding studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**:334-340.
129. **Molinari, M., C. Galli, N. Norais, J. L. Telford, R. Rappuoli, J. P. Luzio, and C. Montecucco.** 1997. Vacuoles induced by *Helicobacter pylori* toxin contain both late endosomal and lysosomal markers. *J Biol. Chem.* **272**:25339-25344.
130. **Molinari, M., M. Salio, C. Galli, N. Norais, R. Rappuoli, A. Lanzavecchia, and C. Montecucco.** 1998. Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp. Med* **187**:135-140.
131. **Monack, D. M., A. Mueller, and S. Falkow.** 2004. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat. Rev. Microbiol* **2**:747-765.
132. **Montecucco, C. and M. de Bernard.** 2003. Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes. Infect.* **5**:715-721.
133. **Mor, A., G. Campi, G. Du, Y. Zheng, D. A. Foster, M. L. Dustin, and M. R. Philips.** 2007. The lymphocyte function-associated antigen-1 receptor costimulates plasma membrane Ras via phospholipase D2. *Nat. Cell Biol.* **9**:713-719.
134. **Moran, A. P.** 1995. Cell surface characteristics of *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol. Med Microbiol* **10**:271-280.
135. **Morova, J., R. Osicka, J. Masin, and P. Sebo.** 2008. RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**:5355-5360.
136. **Mosmann, T. R. and S. Sad.** 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* **17**:138-146.
137. **Naito, M., T. Yamazaki, R. Tsutsumi, H. Higashi, K. Onoe, S. Yamazaki, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2006. Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology* **130**:1181-1190.
138. **Nakayama, M., J. Hisatsune, E. Yamasaki, Y. Nishi, A. Wada, H. Kurazono, J. Sap, K. Yahiro, J. Moss, and T. Hirayama.** 2006. Clustering of *Helicobacter pylori* VacA in lipid rafts, mediated by its receptor, receptor-like protein tyrosine phosphatase beta, is required for intoxication in AZ-521 Cells. *Infect. Immun.* **74**:6571-6580.
139. **Nakayama, M., M. Kimura, A. Wada, K. Yahiro, K. Ogushi, T. Niidome, A. Fujikawa, D. Shirasaka, N. Aoyama, H. Kurazono, M. Noda, J. Moss, and T. Hirayama.** 2004. *Helicobacter pylori* VacA activates the p38/activating transcription factor 2-mediated signal pathway in AZ-521 cells. *J Biol. Chem.* **279**:7024-7028.
140. **Nguyen, V. Q., R. M. Caprioli, and T. L. Cover.** 2001. Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infect. Immun.* **69**:543-546.
141. **Niedergang, F. and P. Chavrier.** 2005. Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Curr. Top. Microbiol Immunol.* **291**:43-60.

142. **Noach, L. A., N. B. Bosma, J. Jansen, F. J. Hoek, S. J. van Deventer, and G. N. Tytgat.** 1994. Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand. J Gastroenterol.* **29**:425-429.
143. **Nurmi, S. M., M. Autero, A. K. Raunio, C. G. Gahmberg, and S. C. Fagerholm.** 2007. Phosphorylation of the LFA-1 integrin beta2-chain on Thr-758 leads to adhesion, Rac-1/Cdc42 activation, and stimulation of CD69 expression in human T cells. *J Biol. Chem.* **282**:968-975.
144. **Nurmi, S. M., C. G. Gahmberg, and S. C. Fagerholm.** 2006. 14-3-3 proteins bind both filamin and alphaLbeta2 integrin in activated T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1090**:318-325.
145. **Obermaier, B., M. Dauer, J. Hertel, K. Schad, S. Endres, and A. Eigler.** 2003. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biol. Proced. Online.* **5**:197-203.
146. **Odenbreit, S., J. Puls, B. Sedlmaier, E. Gerland, W. Fischer, and R. Haas.** 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* **287**:1497-1500.
147. **Odenbreit, S., M. Till, D. Hofreuter, G. Faller, and R. Haas.** 1999. Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol. Microbiol* **31**:1537-1548.
148. **Ohnishi, N., H. Yuasa, S. Tanaka, H. Sawa, M. Miura, A. Matsui, H. Higashi, M. Musashi, K. Iwabuchi, M. Suzuki, G. Yamada, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2008. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**:1003-1008.
149. **Pagliaccia, C., B. M. de, P. Lupetti, X. Ji, D. Burrone, T. L. Cover, E. Papini, R. Rappuoli, J. L. Telford, and J. M. Reytrat.** 1998. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:10212-10217.
150. **Papini, E., B. Satin, C. Bucci, M. de Bernard, J. L. Telford, R. Manetti, R. Rappuoli, M. Zerial, and C. Montecucco.** 1997. The small GTP binding protein rab7 is essential for cellular vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. *EMBO J* **16**:15-24.
151. **Parkin, D. M.** 2006. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* **118**:3030-3044.
152. **Pelish, H. E., J. R. Peterson, S. B. Salvarezza, E. Rodriguez-Boulan, J. L. Chen, M. Starnes, E. Macia, Y. Feng, M. D. Shair, and T. Kirchhausen.** 2006. Secramine inhibits Cdc42-dependent functions in cells and Cdc42 activation in vitro. *Nat. Chem. Biol.* **2**:39-46.
153. **Pellinen, T. and J. Ivaska.** 2006. Integrin traffic. *J Cell Sci.* **119**:3723-3731.
154. **Polenghi, A., F. Bossi, F. Fischetti, P. Durigutto, A. Cabrelle, N. Tamassia, M. A. Cassatella, C. Montecucco, F. Tedesco, and B. M. de.** 2007. The neutrophil-

- activating protein of *Helicobacter pylori* crosses endothelia to promote neutrophil adhesion in vivo. *J Immunol.* **178**:1312-1320.
155. **Prinz, C., M. Schoniger, R. Rad, I. Becker, E. Keiditsch, S. Wagenpfeil, M. Classen, T. Rosch, W. Schepp, and M. Gerhard.** 2001. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res.* **61**:1903-1909.
156. **Ratts, R., C. Trujillo, A. Bharti, J. vanderSpek, R. Harrison, and J. R. Murphy.** 2005. A conserved motif in transmembrane helix 1 of diphtheria toxin mediates catalytic domain delivery to the cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:15635-15640.
157. **Rektorschek, M., A. Buhmann, D. Weeks, D. Schwan, K. W. Bensch, S. Eskandari, D. Scott, G. Sachs, and K. Melchers.** 2000. Acid resistance of *Helicobacter pylori* depends on the UreI membrane protein and an inner membrane proton barrier. *Mol. Microbiol* **36**:141-152.
158. **Rektorschek, M., D. Weeks, G. Sachs, and K. Melchers.** 1998. Influence of pH on metabolism and urease activity of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **115**:628-641.
159. **Rhead, J. L., D. P. Letley, M. Mohammadi, N. Hussein, M. A. Mohagheghi, H. M. Eshagh, and J. C. Atherton.** 2007. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* **133**:926-936.
160. **Ricci, V., A. Galmiche, A. Doye, V. Necchi, E. Solcia, and P. Boquet.** 2000. High cell sensitivity to *Helicobacter pylori* VacA toxin depends on a GPI-anchored protein and is not blocked by inhibition of the clathrin-mediated pathway of endocytosis. *Mol. Biol. Cell* **11**:3897-3909.
161. **Roche, N., D. Ilver, J. Angstrom, S. Barone, J. L. Telford, and S. Teneberg.** 2007. Human gastric glycosphingolipids recognized by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin VacA. *Microbes. Infect.* **9**:605-614.
162. **Rummel, A., T. Eichner, T. Weil, T. Karnath, A. Gutcaits, S. Mahrhold, K. Sandhoff, R. L. Proia, K. R. Acharya, H. Bigalke, and T. Binz.** 2007. Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double-receptor concept. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**:359-364.
163. **Rummel, A., S. Mahrhold, H. Bigalke, and T. Binz.** 2004. The HCC-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction. *Mol. Microbiol* **51**:631-643.
164. **Saadat, I., H. Higashi, C. Obuse, M. Umeda, N. Murata-Kamiya, Y. Saito, H. Lu, N. Ohnishi, T. Azuma, A. Suzuki, S. Ohno, and M. Hatakeyama.** 2007. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* **447**:330-333.
165. **Sachs, G., D. L. Weeks, K. Melchers, and D. R. Scott.** 2003. The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu. Rev. Physiol* **65**:349-369.

166. **Saitoh, M., T. Ishikawa, S. Matsushima, M. Naka, and H. Hidaka.** 1987. Selective inhibition of catalytic activity of smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol. Chem.* **262**:7796-7801.
167. **Salama, N. R., G. Otto, L. Tompkins, and S. Falkow.** 2001. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect. Immun.* **69**:730-736.
168. **Sambrook, J.** 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
169. **Sampath, R., P. J. Gallagher, and F. M. Pavalko.** 1998. Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin beta2 cytoplasmic tail. Activation-dependent regulation of associations with talin and alpha-actinin. *J Biol. Chem.* **273**:33588-33594.
170. **Sanchez-Martin, L., N. Sanchez-Sanchez, M. D. Gutierrez-Lopez, A. I. Rojo, M. Vicente-Manzanares, M. J. Perez-Alvarez, P. Sanchez-Mateos, X. R. Bustelo, A. Cuadrado, F. Sanchez-Madrid, J. L. Rodriguez-Fernandez, and C. Cabanas.** 2004. Signaling through the leukocyte integrin LFA-1 in T cells induces a transient activation of Rac-1 that is regulated by Vav and PI3K/Akt-1. *J Biol. Chem.* **279**:16194-16205.
171. **Sandvig, K. and D. B. van.** 2002. Membrane traffic exploited by protein toxins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**:1-24.
172. **Satin, B., G. Del Giudice, V. Della Bianca, S. Dusi, C. Laudanna, F. Tonello, D. Kelleher, R. Rappuoli, C. Montecucco, and F. Rossi.** 2000. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp. Med.* **191**:1467-1476.
173. **Satin, B., N. Norais, J. Telford, R. Rappuoli, M. Murgia, C. Montecucco, and E. Papini.** 1997. Effect of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin on maturation and extracellular release of procathepsin D and on epidermal growth factor degradation. *J Biol. Chem.* **272**:25022-25028.
174. **Schiavo, G. and F. G. van der Goot.** 2001. The bacterial toxin toolkit. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:530-537.
175. **Schlegel, R., R. B. Dickson, M. C. Willingham, and I. H. Pastan.** 1982. Amantadine and dansylcadaverine inhibit vesicular stomatitis virus uptake and receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**:2291-2295.
176. **Schmitt, W. and R. Haas.** 1994. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol.* **12**:307-319.
177. **Schraw, W., Y. Li, M. S. McClain, F. G. van der Goot, and T. L. Cover.** 2002. Association of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) with lipid rafts. *J Biol. Chem.* **277**:34642-34650.

178. **Schreiber, S., M. Konradt, C. Groll, P. Scheid, G. Hanauer, H. O. Werling, C. Josenhans, and S. Suerbaum.** 2004. The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**:5024-5029.
179. **Serrador, J. M., M. Nieto, and F. Sanchez-Madrid.** 1999. Cytoskeletal rearrangement during migration and activation of T lymphocytes. *Trends Cell Biol.* **9**:228-233.
180. **Sharma, S. A., M. K. Tummuru, G. G. Miller, and M. J. Blaser.** 1995. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. *Infect. Immun.* **63**:1681-1687.
181. **Shen, Y., L. Xu, and D. A. Foster.** 2001. Role for phospholipase D in receptor-mediated endocytosis. *Mol. Cell Biol.* **21**:595-602.
182. **Shimaoka, M., C. Lu, R. T. Palframan, U. H. von Andrian, A. McCormack, J. Takagi, and T. A. Springer.** 2001. Reversibly locking a protein fold in an active conformation with a disulfide bond: integrin alphaL I domains with high affinity and antagonist activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:6009-6014.
183. **Shimaoka, M., T. Xiao, J. H. Liu, Y. Yang, Y. Dong, C. D. Jun, A. McCormack, R. Zhang, A. Joachimiak, J. Takagi, J. H. Wang, and T. A. Springer.** 2003. Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell* **112**:99-111.
184. **Simons, K. and D. Toomre.** 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**:31-39.
185. **Sims, T. N. and M. L. Dustin.** 2002. The immunological synapse: integrins take the stage. *Immunol. Rev.* **186**:100-117.
186. **Sipponen, P. and B. J. Marshall.** 2000. Gastritis and gastric cancer. Western countries. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **29**:579-5vi.
187. **Skibinski, D. A., C. Genisset, S. Barone, and J. L. Telford.** 2006. The cell-specific phenotype of the polymorphic vacA midregion is independent of the appearance of the cell surface receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Infect. Immun.* **74**:49-55.
188. **Smith, A., M. Bracke, B. Leitinger, J. C. Porter, and N. Hogg.** 2003. LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. *J Cell Sci.* **116**:3123-3133.
189. **Smith, A., Y. R. Carrasco, P. Stanley, N. Kieffer, F. D. Batista, and N. Hogg.** 2005. A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *J Cell Biol.* **170**:141-151.
190. **Smith, A., P. Stanley, K. Jones, L. Svensson, A. McDowall, and N. Hogg.** 2007. The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration. *Immunol. Rev.* **218**:135-146.
191. **Stewart, M. P., A. McDowall, and N. Hogg.** 1998. LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by a Ca²⁺-dependent protease, calpain. *J Cell Biol.* **140**:699-707.

192. **Sundberg, E. J., L. Deng, and R. A. Mariuzza.** 2007. TCR recognition of peptide/MHC class II complexes and superantigens. *Semin. Immunol.* **19**:262-271.
193. **Sundberg, E. J., Y. Li, and R. A. Mariuzza.** 2002. So many ways of getting in the way: diversity in the molecular architecture of superantigen-dependent T-cell signaling complexes. *Curr. Opin. Immunol.* **14**:36-44.
194. **Sundrud, M. S., V. J. Torres, D. Unutmaz, and T. L. Cover.** 2004. Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**:7727-7732.
195. **Tan, S. L. and P. J. Parker.** 2003. Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling. *Biochem. J* **376**:545-552.
196. **Telford, J. L., P. Ghiara, M. Dell'Orco, M. Comanducci, D. Burroni, M. Bugnoli, M. F. Tecce, S. Censini, A. Covacci, Z. Xiang, and .** 1994. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp. Med* **179**:1653-1658.
197. **Teysse, S., S. T. Chari, J. Scheid, and M. V. Singer.** 1995. Effect of repeated boluses of intravenous omeprazole and primed infusions of ranitidine on 24-hour intragastric pH in healthy human subjects. *Dig. Dis. Sci.* **40**:247-255.
198. **Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzegerald, N. Lee, M. D. Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelley, M. D. Cotton, J. M. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Wathley, E. Wallin, W. S. Hayes, M. Borodovsky, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser, and J. C. Venter.** 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**:539-547.
199. **Tonello, F., W. G. Dundon, B. Satin, M. Molinari, G. Tognon, G. Grandi, G. Del Giudice, R. Rappuoli, and C. Montecucco.** 1999. The *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein is an iron-binding protein with dodecameric structure. *Mol. Microbiol* **34**:238-246.
200. **Torres, V. J., S. E. VanCompernelle, M. S. Sundrud, D. Unutmaz, and T. L. Cover.** 2007. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits activation-induced proliferation of human T and B lymphocyte subsets. *J Immunol.* **179**:5433-5440.
201. **Tsutsumi, R., H. Higashi, M. Higuchi, M. Okada, and M. Hatakeyama.** 2003. Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J Biol. Chem.* **278**:3664-3670.
202. **Tsutsumi, R., A. Takahashi, T. Azuma, H. Higashi, and M. Hatakeyama.** 2006. Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol. Cell Biol.* **26**:261-276.

203. **Tummuru, M. K., S. A. Sharma, and M. J. Blaser.** 1995. Helicobacter pylori picB, a homologue of the Bordetella pertussis toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Mol. Microbiol* **18**:867-876.
204. **Tweten, R. K.** 2005. Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infect. Immun.* **73**:6199-6209.
205. **Valmu, L., S. Fagerholm, H. Suila, and C. G. Gahmberg.** 1999. The cytoskeletal association of CD11/CD18 leukocyte integrins in phorbol ester-activated cells correlates with CD18 phosphorylation. *Eur. J Immunol.* **29**:2107-2118.
206. **Valmu, L. and C. G. Gahmberg.** 1995. Treatment with okadaic acid reveals strong threonine phosphorylation of CD18 after activation of CD11/CD18 leukocyte integrins with phorbol esters or CD3 antibodies. *J Immunol.* **155**:1175-1183.
207. **Vicari, J. J., R. M. Peek, G. W. Falk, J. R. Goldblum, K. A. Easley, J. Schnell, G. I. Perez-Perez, S. A. Halter, T. W. Rice, M. J. Blaser, and J. E. Richter.** 1998. The seroprevalence of cagA-positive Helicobacter pylori strains in the spectrum of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* **115**:50-57.
208. **Vinion-Dubiel, A. D., M. S. McClain, D. M. Czajkowsky, H. Iwamoto, D. Ye, P. Cao, W. Schraw, G. Szabo, S. R. Blanke, Z. Shao, and T. L. Cover.** 1999. A dominant negative mutant of Helicobacter pylori vacuolating toxin (VacA) inhibits VacA-induced cell vacuolation. *J Biol. Chem.* **274**:37736-37742.
209. **von Andrian, U. H. and C. R. Mackay.** 2000. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J Med* **343**:1020-1034.
210. **Vonderheit, A. and A. Helenius.** 2005. Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS. Biol.* **3**:e233.
211. **Wang, G., P. Alamuri, and R. J. Maier.** 2006. The diverse antioxidant systems of Helicobacter pylori. *Mol. Microbiol* **61**:847-860.
212. **Wang, L. H., K. G. Rothberg, and R. G. Anderson.** 1993. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol.* **123**:1107-1117.
213. **Webb, Y., L. Hermida-Matsumoto, and M. D. Resh.** 2000. Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. *J Biol. Chem.* **275**:261-270.
214. **Weeks, D. L., S. Eskandari, D. R. Scott, and G. Sachs.** 2000. A H⁺-gated urea channel: the link between Helicobacter pylori urease and gastric colonization. *Science* **287**:482-485.
215. **Wei, W., Q. Lu, G. J. Chaudry, S. H. Leppla, and S. N. Cohen.** 2006. The LDL receptor-related protein LRP6 mediates internalization and lethality of anthrax toxin. *Cell* **124**:1141-1154.

216. **Willhite, D. C. and S. R. Blanke.** 2004. Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol* **6**:143-154.
217. **Willhite, D. C., T. L. Cover, and S. R. Blanke.** 2003. Cellular vacuolation and mitochondrial cytochrome c release are independent outcomes of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin activity that are each dependent on membrane channel formation. *J Biol. Chem.* **278**:48204-48209.
218. **Wirth, H. P., M. H. Beins, M. Yang, K. T. Tham, and M. J. Blaser.** 1998. Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant Helicobacter pylori strains. *Infect. Immun.* **66**:4856-4866.
219. **Wunder, C., Y. Churin, F. Winau, D. Warnecke, M. Vieth, B. Lindner, U. Zahringer, H. J. Mollenkopf, E. Heinz, and T. F. Meyer.** 2006. Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by Helicobacter pylori. *Nat. Med* **12**:1030-1038.
220. **Yahiro, K., T. Niidome, M. Kimura, T. Hatakeyama, H. Aoyagi, H. Kurazono, K. Imagawa, A. Wada, J. Moss, and T. Hirayama.** 1999. Activation of Helicobacter pylori VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase beta. *J Biol. Chem.* **274**:36693-36699.
221. **Yahiro, K., A. Wada, M. Nakayama, T. Kimura, K. Ogushi, T. Niidome, H. Aoyagi, K. Yoshino, K. Yonezawa, J. Moss, and T. Hirayama.** 2003. Protein-tyrosine phosphatase alpha, RPTP alpha, is a Helicobacter pylori VacA receptor. *J Biol. Chem.* **278**:19183-19189.
222. **Yahiro, K., A. Wada, E. Yamasaki, M. Nakayama, Y. Nishi, J. Hisatsune, N. Morinaga, J. Sap, M. Noda, J. Moss, and T. Hirayama.** 2004. Essential domain of receptor tyrosine phosphatase beta (RPTPbeta) for interaction with Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin. *J Biol. Chem.* **279**:51013-51021.
223. **Yokoyama, K., H. Higashi, S. Ishikawa, Y. Fujii, S. Kondo, H. Kato, T. Azuma, A. Wada, T. Hirayama, H. Aburatani, and M. Hatakeyama.** 2005. Functional antagonism between Helicobacter pylori CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:9661-9666.
224. **Young, J. A. and R. J. Collier.** 2007. Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annu. Rev. Biochem.* **76**:243-265.
225. **Zheng, P. Y. and N. L. Jones.** 2003. Helicobacter pylori strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. *Cell Microbiol* **5**:25-40.

7. Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
AP-1	Aktivator-Protein 1
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-Bis (2-Aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CaM	Calmodulin
Cam	Chloramphenicol
CD	“cluster of differentiation”, Oberflächenmarker
CnA	Calcineurin A
CnB	Calcineurin B
C-Terminus	Carboxyterminaler Teil eines Proteins
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DAG	Diacylglycerin
DC	dendritische Zellen
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreit
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	“enzyme-linked immunosorbent assay”
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erm	Erythromycin
F	Farad
FACS	“fluorescent activated cell sorter”, Durchflusszytometer
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszein-isothiocyanat
GAP	“guanine nucleotide exchange factor”
GEF	“GTPase activating protein“

GFP	Grün fluoreszierendes Protein
ICAM	“intercellular adhesion molecule“; interzelluläres Adhäsionsmolekül
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-2R	IL-2 Rezeptor
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IS	Immunologische Synapse
kDa	Kilo-Dalton
LFA-1	“lymphocyte function-associated antigen-1“, CD18/CD11a-Integrin
LPS	Lipopolysaccharid
MOI	„multiplicity of infection“; Anzahl der Bakterien/Viren pro Wirtszelle
Neo	Neomycin
NFAT	Nukleärer Faktor von aktivierten T-Zellen
NF-κB	Nukleärer Faktor kappa B
NRU	„neutral red unit“, Einheiten an Neutralrot
N-Terminus	Aminoterminaler Teil eines Proteins
OD ₅₅₀	Optische Dichte bei Wellenlänge 550 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
PBLC	Periphere Blutlymphozyten
PBMC	Periphere Blutmonozyten
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Protein-Kinase C
PLC γ	Phospholipase C γ
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Meerrettichperoxidase
P-Tyr	Phosphotyrosin
P-Thr	Phosphothreonin
RNA	Ribonukleinsäure

RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEB	<i>Staphylococcus</i> Enterotoxin B; Superantigen von <i>S. aureus</i>
TCR	T-Zell Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGN	<i>trans</i> -Golgi Netzwerk
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
WT	Wildtyp
α -	anti-
°C	Grad Celsius

Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rainer Haas für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Er war durch seine stete Diskussionsbereitschaft maßgeblich am Gelingen der Arbeit beteiligt. Für die Möglichkeit, sich wissenschaftlich frei zu entfalten und eigenen Ideen nachzugehen, möchte ich mich insbesondere bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei Evelyn Weiss und Friederike Aicher, die mich über den gesamten Zeitraum der Arbeit, sowohl in ruhigen als auch hektischen Zeiten, mit viel Geduld unterstützt und mir manch ungeliebte Arbeit abgenommen haben. Zusätzlich bedanke ich mich bei Evelyn sehr für die ausgezeichnete Arbeit im Labor.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem meiner Kollegin und Freundin „am Luisal“, die immer ein offenes Ohr für fachliche aber auch private Probleme hatte und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Ihre Sichtweise der Dinge war außerordentlich hilfreich und motivierend.

Wolfgang Fischer danke ich für seine Hilfe bei größeren und kleineren Problemen im Labor, für seine Diskussionsbereitschaft, sowie für die kritische Durchsicht dieses Manuskripts.

Mein Dank gilt ebenso den aktiven und nicht mehr-aktiven Mitgliedern der AG Haas Tina, Isabell, Kirstin, Claudia, Herbert, Steffi, Iris, Sandra, Stefan, Claudia, Matthias, Kristina für ein super Arbeitsklima und die Unterstützung meiner Arbeit. Außerdem den „falschen“ Haasen Victoria, Gudrun, Stefan, Klaus, Tina und Andrea.

Mein herzlichster Dank gilt jedoch meiner Familie. Die Unterstützung durch meine Eltern Franz und Stefanie, sowie meiner Schwester Anna-Maria und Wolfgang hat diese Arbeit erst ermöglicht. Ihnen ist diese Arbeit in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.