



II. Medizinische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)



**Hemmung der Proliferation von T-Lymphozyten  
durch *Helicobacter pylori*  
als Mechanismus der Immunevasion**

Christian Schmees

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. med. habil. Dr. J. J. Hauner

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. M. Schemann
2. apl. Prof. Dr. med., Dr. med. habil. Chr. Prinz
3. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. D. Haller

Die Dissertation wurde am 3. April 2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung Landnutzung und Umwelt am 26. Juli 2006 angenommen.

*Für Maxi*

## Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

**Hemmung der Proliferation von T-Lymphozyten durch *Helicobacter pylori* als Mechanismus der Immunevasion**

in der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik (Gastroenterologisches Forschungslabor) des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München unter der Anleitung und Betreuung durch Prof. Dr. C. Prinz ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt. Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den.....

Christian Schmees

## Veröffentlichungen

Teile dieser Dissertation sind in folgenden Publikationen veröffentlicht worden:

Gerhard M, **Schmees C**, Voland P, Endres N, Sander M, Reindl W, Rad R, Oelsner M, Decker T, Mempel M, Hengst L, Prinz C. A secreted low-molecular-weight protein from *Helicobacter pylori* induces cell-cycle arrest of T cells. *Gastroenterology*. 2005 May;128(5):1327-39

Prinz C, Gerhard M, Treptau T, Voland P, Schwendy S, Rad R, **Schmees C**. VacA associated inhibition of T cell function: Reviewed and reconsidered. *Helicobacter* 2006 Jun;11(3): 144-146

**Schmees C**, Prinz C, Treptau T, Rad R, Hengst L, Voland P, Bauer S, Brenner L, Schmid RM, Gerhard M. Inhibition of T cell proliferation by *Helicobacter pylori*  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase. (zur Publikation eingereicht)

Ergebnisse dieser Dissertation sind in Teilen in Form von Postern und Vorträgen auf folgenden Kongressen präsentiert worden:

**Schmees C**, Sander M, Voland P, Prinz C, Gerhard M. *H. pylori* induces cell cycle arrest of T cell lines. *Campylobacter Helicobacter and Related Organisms (CHRO) 2003*, Aarhus, Dänemark (Poster-Präsentation)

Gerhard M, **Schmees C**, Sander M, Voland P, Prinz C. An *H. pylori* factor inhibits growth of leukemia cells by inducing cell cycle arrest. *European Helicobacter Study Group (EHS) 2003*, Stockholm, Schweden (Vortrag)

**Schmees C**, Sander M, Voland P, Hafsi N, Mempel M, Prinz C, Gerhard M. *H. pylori* activates T cells while inhibiting their proliferation. (EHS) 2004, Wien, Österreich (Vortrag)

**Schmees C**, Treptau T, Hengst L, Rad R, Voland P, Gerhard M, Prinz C. Low-molecular-weight protein of *H. pylori* inhibits human T cell proliferation. *EHS 2005*, Kopenhagen, Dänemark (Vortrag)

**Schmees C**, Treptau T, Hengst L, Rad R, Voland P, Gerhard M, Prinz C. Ein niedermolekulares Protein aus *Helicobacter pylori* hemmt die Proliferation von humanen T-Lymphozyten. Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern (GFGB) 2005, Amberg, Deutschland (Vortrag)

## **Preise**

„Bester Vortrag“ auf dem Kongress der GFGB 2005 in Amberg, Deutschland

Prof. Dr. **Michael Schemann** danke ich für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München.

Prof Dr. **Christian Prinz** danke ich für die Vergabe des interessanten Themas sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der benötigten Geräte und Materialien. Darüber hinaus möchte ich mich für seine intensive Betreuung und stetige Unterstützung bei den Arbeiten zu dieser Dissertation ganz herzlich bedanken.

Bei Dr. **Markus Gerhard** bedanke ich mich für die Einführung in das Thema meiner Doktorarbeit und seine initiale Unterstützung.

Prof. Dr. **Ludger Hengst** danke ich sehr herzlich zum einen für seine kompetente wissenschaftliche Unterstützung, zum anderen für sein persönliches Engagement und seine Ratschläge auch über die Grenzen dieser Arbeit hinweg.

Mein Dank gilt Dr. **Tilman Treptau** für seine wertvollen Tipps bei der Realisierung von Proteinaufreinigungen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe (**Susanne Schwendy, Nadia Hafsi, Anar Dossumbekova, Sophie Besig, Lena Brener, Barbara Ladwein, Roland Rad, Vidar Stenset, Marco Zeitner, Mathias Friedrich, Markus Sander**) danke ich für die angenehme Atmosphäre und die gute Stimmung. Besonders hervorheben möchte ich Dr. **Petra Voland**. Ihre fachkundigen Ratschläge haben mir sehr geholfen.

Ich danke **Renate Sendermann** und **Maria Novack**, den guten Seelen des Labors, für die Erledigung der wichtigen „Kleinigkeiten“ des Laboralltags.

Ich bedanke mich bei **Ursula Götz** für die gute Gesellschaft, ihre allseits fröhliche Art und die netten Gespräche.

Bei **meinen Eltern** und **meiner Schwester** bedanke ich mich von ganzem Herzen für ihre immerwährende Unterstützung, ihre offenen Ohren in allen Belangen und ihre Hilfe auch in schwierigen Zeiten.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin **Maximiliane**. Du hast mich in allen Phasen meiner Dissertation gestützt und warst immer für mich da. Ohne Dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
BabA	Blood-group-antigen-binding adhesion
BHI	Brain-Heart Infusion
Bis	Bisacrylamid
bp	Base pairs (Basenpaare)
Bq	Becquerel
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
<i>cag</i>	Cytotoxin associated gene
cagPAI	cag Pathogenitätsinsel
CD	Clusters of differentiation
Cdk	Cyclin-dependent kinase
Ci	Curie
DAG	Diacylglycerin
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykolaminoethyltetraessigsäure
Erk	Extracellular signal related kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
GGT	$\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase
GSK3 $\beta$	Glykogensynthasekinase 3 $\beta$
GTP	Guanosintriphosphat

---

h	Stunde(n)
<i>H. pylori</i> /HP	<i>Helicobacter pylori</i>
IARC	International Agency for Research on Cancers
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INK	Inhibitors of Cdk4
Kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LAT	Linker for activation of T cells
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute(n)
MW	Molekulargewicht
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
pH	Potentia hydrogenii
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumjodid
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidifluorid
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ribonukleinsäure
RNI	Reactive nitrogen intermediate (reaktive Sauerstoffintermediate)



---

ROI	Reactive oxygen intermediate (reaktive Stickstoffintermediate)
Rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s/sek	Sekunde(n)
SabA	Sialic acid-binding adhesin A
SDS	Sodium dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SLP-76	SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SV	Säulenvolumen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TCR	T-Zellrezeptor
TGF	Transforming growth factor
TLR	Toll-like-Rezeptor(en)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
v/v	Volume/Volume (Volumen/Volumen)
VacA	Vacuolating cytotoxin A
WC	Wilkins-Chalgren
w/v	Weight/Volume (Gewicht/Volumen)
w/w	Weight/Weight (Gewicht/Gewicht)

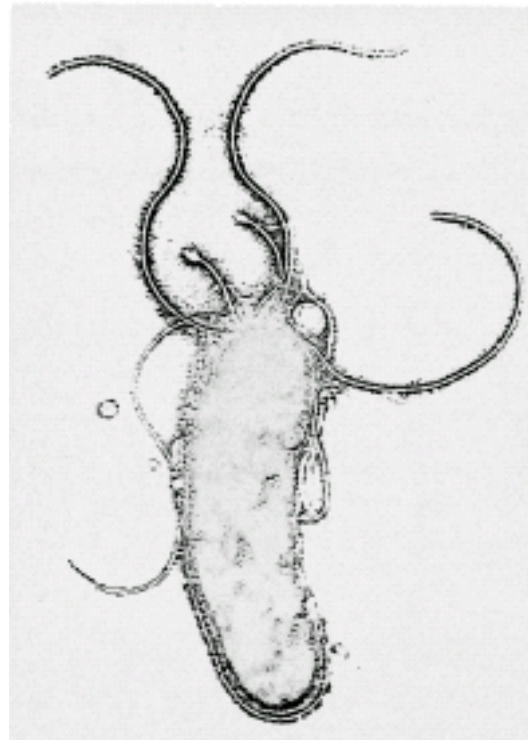
# 1. Einleitung

## 1.1 *Helicobacter pylori*

### 1.1.1. Allgemeine Einführung

*Helicobacter pylori* ist ein gram-negatives, mikroaerophiles Bakterium mit spiralförmigem Aussehen, welches mit etwa 5 ummantelten Flagellen ausgestattet ist (siehe Abb. 1). Im Jahre 1982 gelang es den Medizinern Barry Marshall und J.R. Warren erstmals dieses Bakterium aus Magenbiopsien zu isolieren und zu kultivieren. Der Keim konnte dabei nur aus Biopsiematerial von Patienten mit chronisch aktiver Gastritis, Zwölffingerdarm- oder Magengeschwüren isoliert werden (Marshall et al 1983; Marshall et al 1984). Für die Entdeckung von *H. pylori* und dessen Rolle bei der Entwicklung von Gastritis- und Magengeschwüererkrankungen wurde Warren und Marshall am 3. Oktober 2005 der Nobelpreis für Medizin verliehen. Bis zur erwähnten Entdeckung des Bakteriums *H. pylori* waren Stress und Lebensweise (u.a. Alkoholkonsum, Rauchen) als Hauptauslöser der Magengeschwüre angesehen worden (Domschke et al 1984; Pfeiffer 1982; Wightkin 1980).

Zahlreiche Studien haben mittlerweile nachgewiesen, dass *H. pylori* eine chronisch persistierende Infektion der Magenschleimhaut des Menschen induziert. Die Infektion tritt überproportional häufig im Kindesalter auf und persistiert normalerweise ein Leben lang. Es ist nicht bekannt, wie die Infektion mit *H. pylori* übertragen wird. Eine anerkannte Hypothese ist, dass der Keim meist intrafamiliär (von Mutter zu Kind oder von Kind zu Kind) und zwar hauptsächlich durch menschliche Mageninhalte (gastral-oraler Weg) aber auch menschlichen Fäzes (fäkal-oraler Weg) direkt von einer Person auf die andere übertragen wird (Covacci et al 1999). Weltweit sind etwa 50% der Bevölkerung mit dem Bakterium infiziert, wobei die Infektionsrate in Entwicklungsländern bei über 80% und in Industrienationen (u.a. Europa,



**Abb. 1:** *Helicobacter pylori* (Vergrößerung 11550X, Quelle: P. Hawtin, University of Southampton/Science Photo Library)

USA) bei etwa 30% liegt (Parsonnet 1998). Damit ist die Infektion mit *Helicobacter pylori* eine der häufigsten weltweit. Aufgrund von Überlappungen bei genetisch verschiedenen Populationen des Menschen und von *H. pylori* ist es wahrscheinlich, dass Vorfahren des Menschen schon vor Beginn ihrer Wanderungen aus Afrika heraus vor über 12000 Jahren mit diesem Keim infiziert waren (Covacci et al 1999; Falush et al 2003).

Kennzeichen der Infektion mit *H. pylori* ist die Auslösung einer akuten und chronischen Entzündung der Magenschleimhaut (Marshall et al 1983; Marshall et al 1984). Bei den meisten Patienten hat diese Magenschleimhautentzündung keine weiteren klinischen Konsequenzen. Jedoch entwickeln sich bei etwa einem Drittel der Patienten potentiell lebensbedrohliche Folgeerkrankungen. Das Ausmaß und die Schwere dieser Erkrankungen sind abhängig von genetischen Polymorphismen des Wirts und des Bakteriums und von verschiedenen Umweltfaktoren. So zeigten Patienten mit Polymorphismen des *IL1 $\beta$*  Gens, welche zu erhöhter Sekretion dieses Zytokins führen, ein höheres Krebsrisiko als andere Patienten (El-Omar et al 2000; Rad et al 2004). Auch konnte gezeigt werden, dass Rauchen und eine Vitamin C-arme Diät das Risiko erhöhen an Magenkrebs zu erkranken (You et al 2000). Zu den Erkrankungen, die durch eine Infektion mit *H. pylori* verursacht werden, zählen Zwölffingerdarmgeschwüre, Magengeschwüre, Adenokarzinome des Magens und das so genannte MALT (mucosa-associated-lymphoid-tissue) Lymphom. Zusammengenommen sterben jährlich etwa 7 Millionen Menschen weltweit an diesen *H. pylori*-assoziierten Erkrankungen (Parsonnet 1998). Das Adenokarzinom des Magens ist heutzutage etwa die vierzehnthäufigste und im Jahre 2010 wahrscheinlich die achthäufigste Todesursache auf der Welt (Covacci et al 1999). Dies macht auch die volkswirtschaftliche Bedeutung der Infektion mit *Helicobacter pylori* deutlich. In diesem Zusammenhang wurde der Keim im Jahr 1994 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Typ I Karzinogen klassifiziert (IARC 1994). Neben den erwähnten Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes wurden auch andere Krankheiten mit einer *H. pylori* Infektion in Verbindung gebracht, wie z.B. idiopathische thrombozytopenische Purpura (ITP; Franchini et al 2004) und Eisenmangelanämie (Cuoco et al 2001).

Die Erkenntnis, dass viele Magenerkrankungen aufgrund der Infektion mit *H. pylori* entstehen und daher Infektionskrankheiten sind, hat auch die Art und Weise der Behandlung dieser Krankheiten verändert. Durch Verwendung verschiedener Antibiotika in Kombination mit Protonenpumpeninhibitoren gelingt heute innerhalb von kontrollierten Studien in bis zu 95% der Fälle die vollständige Eradikation von *H. pylori* (McLoughlin et al 2004). Die Standardtherapie bei der Behandlung der *H. pylori* Infektion besteht dabei aus einer

mindestens einwöchigen Triple-Therapie mit einem Protonenpumpeninhibitor (Omeprazol) in Kombination mit zwei Antibiotika (Clarithromycin plus Amoxicillin oder Metronidazol; Malfertheiner et al 2002). Bei dieser Therapie der *H. pylori* Infektion zeigen sich jedoch einige Nebenwirkungen wie Bauchschmerzen, Übelkeit und Durchfall, welche die Compliance der Patienten verringern. Die Effizienz dieser Therapien wird zudem durch immer häufigeres Auftreten von Antibiotika-resistenten *H. pylori* Stämmen (z.B. 50% Resistenz gegenüber Metronidazol) vermindert (Graham 1998). Aufgrund dessen stellt die Behandlung der *H. pylori*-Infektion mit Antibiotika keine endgültige Lösung für die Gesellschaft dar. Eine Vakkzinierungstherapie, welche die effektivste Behandlungsmöglichkeit globaler Infektionskrankheiten darstellt, wäre auch eine geeignete Lösung bei der Therapie der Infektion mit *Helicobacter pylori*. Aus diesem Grund gibt es große Anstrengungen bei der Entwicklung eines solchen Impfstoffs, die jedoch bislang nicht über Versuche in Tiermodellen und erste klinische Phase I Studien herausgekommen sind (Covacci et al 1999).

Obwohl die Infektion mit *H. pylori* zur Ausbildung verschiedener ernsthafter Erkrankungen führen kann (siehe oben), wurden auch positive Effekte des Keims auf den Wirtsorganismus beobachtet. Eine protektive Rolle der Infektion mit *H. pylori* im Bezug auf gastrooesophageale Refluxerkrankungen (GERD) wird kontrovers diskutiert (Peek et al 2002). Auch ein Einfluss von *H. pylori* auf die Bildung der Hormone Leptin und Ghrelin, welche Appetit (Ghrelin) und Sättigkeit (Leptin) des Organismus regulieren, wurde beschrieben (Azuma et al 2001; Nwokolo et al 2003). Die Infektion mit *H. pylori* führt dabei zu einem Anstieg der Leptin- und einem Abfall der Ghrelin-Spiegel im Körper der infizierten Personen. Die Beobachtung, dass es nach Eradikation von *H. pylori* häufig zu einer Gewichtszunahme der Patienten kommt (Azuma et al 2001), wurde mit diesen hormonellen Veränderungen in Verbindung gebracht.

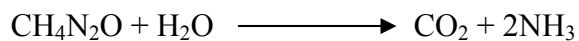
### **1.1.2. Virulenzfaktoren**

Das Bakterium *Helicobacter pylori* infiziert ausschließlich die Magenmukosa des Menschen sowie humaner und nicht-humaner Primaten. Über einen Zeitraum von mindestens 10000 Jahren erfolgte die Anpassung dieses Keims an seinen Lebensraum (siehe 1.1.1.). Die hohe Azidität des Magens stellt normalerweise eine effiziente Todesfalle für die Millionen von Bakterien dar, welche der Mensch täglich schluckt. *H. pylori* hat jedoch verschiedene Mechanismen entwickelt, die es ihm nicht nur ermöglichen in dieser unwirtlichen Umgebung zu überleben, sondern den Wirtsorganismus lebenslang zu infizieren (Merrell et al 2004;

Montecucco et al 2001). Die wichtigsten dieser Virulenzfaktoren und deren Funktionsweise sollen nachfolgend genauer erläutert werden.

### 1.1.2.1. Urease

Bevor *H. pylori* die Magenschleimhaut erreicht und mit den dortigen Epithelzellen des Magens in Kontakt kommt, muss der Keim die hohe Azidität des Magensafts überleben. In Abwesenheit von Nahrung liegt der pH-Wert des Magens im Bereich von 1. Nach Aufnahme von Nahrung steigt der intragastrale pH bis auf einen Wert von 6 an. Das pH-Optimum des Bakteriums *H. pylori* liegt im Bereich von pH 6-8. Bei einem pH-Wert <4 und >8 ist *H. pylori* nicht lebensfähig (Sachs et al 2003). Aus diesem Grund produziert *H. pylori* das zytoplasmatische Enzym Urease, welches von sieben Genen des Bakteriums codiert wird (Hu et al 1990; Labigne et al 1991). Dieser *Urease* Gencluster enthält Gene, welche für die Enzymuntereinheiten Urease A und B sowie fünf weitere Proteine, die für die Aufnahme von Ni<sup>2+</sup> (dem Cofaktor der Urease) wichtig sind, kodieren (Volland et al 2003). Die Menge der gebildeten Urease hängt von den Kulturbedingungen ab und kann einen Anteil von bis zu 10% am Gesamtprotein des Bakteriums erreichen (Bauerfeind et al 1997). Das Enzym Urease katalysiert die folgende Reaktion:



Dabei wird der Harnstoff durch das Bakterium mit Hilfe von protonengesteuerten Kanälen aufgenommen, die nur bei niedrigen pH-Werten geöffnet sind (Weeks et al 2000). Bei neutralem pH sind die Harnstoffkanäle geschlossen, um eine zu starke Alkalisierung des zytoplasmatischen pH-Wertes von *H. pylori* durch den Harnstoff zu verhindern, welche toxisch für den Keim wäre (Clyne et al 1995). Durch die Urease-vermittelte intrazelluläre Hydrolyse des Harnstoffs entsteht die starke Base Ammoniak, welche den pH-Wert des Zytoplasmas und Periplasmas von *H. pylori* auch bei extrem niedrigem extrazellulärem pH-Wert auf nahezu neutrale Werte puffert. Im sauren Milieu entstehen dabei Ammoniumionen, die um das Bakterium herum eine neutrale Schicht bilden, welche vor dem stark sauren pH-Wert des Magensaftes schützt (Stingl et al 2002). Ferner werden die produzierten Ammoniumionen in den Stickstoffmetabolismus von *H. pylori* eingeschleust und letztlich in Form von Aminosäuren zu Proteinen verstoffwechselt (Williams et al 1996). Das Enzym Urease spielt eine essentielle Rolle als Virulenzfaktor von *H. pylori*. Keime, welche dieses Protein nicht exprimieren, können die Magenschleimhaut nicht kolonisieren (Eaton et al 1991).

### 1.1.2.2. Flagellen

Auch wenn *H. pylori* sehr gut an die extrem saure Umgebung des Magens angepasst ist (siehe 1.1.2.1.), ist das Bakterium nicht azidophil und muss darüber hinaus verhindern, dass es aus dem Magenlumen in den Darm abfließt. Aufgrund seiner Flagellen kann der Keim die dicke Mucusschicht erreichen, welche die Epithelzellen der Magenmukosa bedeckt und schützt. Unter anderem Bicarbonationen und Harnstoff werden für diese chemotaktische Bewegung des Keims in Richtung der Magenschleimhaut benötigt (Yoshiyama et al 1999). An der Mukusschicht angelangt, bohrt sich *H. pylori*, angetrieben von den sich propellerartig drehenden Flagellen, in diese wie ein Korkenzieher in einen Korken hinein. Die Schleimschicht des Magens fungiert als semipermeable Grenze zwischen Magenlumen und Epithelzellschicht. Protonen können von den Parietalzellen des Magens in Richtung Magenlumen, aber nicht zurück fließen. Darüber hinaus ist die Mukusschicht nahezu nicht permeabel für Bicarbonationen (Bhaskar et al 1992). Im Ergebnis existiert ein weiter pH-Gradient zwischen dem stark sauren Magenlumen und der nur leicht sauren apikalen Oberfläche der Magenschleimhaut. Das bedeutet, dass *H. pylori* in der Schleimhaut des Magens sowohl vor der Magensäure als auch vor einer Entleerung in den Darm (durch Peristaltik oder Schleimabschilferung) gut geschützt ist.

Die Wichtigkeit der Flagellen als Virulenzfaktor von *H. pylori* wird dadurch unterstrichen, dass unbewegliche Bakterien die Magenmukosa des Wirts nicht kolonisieren können (Eaton et al 1996; Foyne et al 1999).

### 1.1.2.3. Adhäsionsproteine

Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Kolonisation des Wirts durch *H. pylori* ist die Adhäsion des Keims an die apikale Plasmamembran der Epithelzellen des Magens (Rad et al 2002; Prinz et al 2001). Diese Bindung wird durch verschiedene Proteine und Glykolipide des Bakteriums vermittelt. Dadurch verhindert der Keim eine Entfernung aus dem Magen durch die peristaltischen Bewegungen des Magen-Darm-Traktes. Eines der Adhäsionsmoleküle von *H. pylori*, das Protein BabA, ist auf der Außenmembran von *H. pylori* lokalisiert und bindet an Antigenstrukturen vom Typ Lewis B auf humanen Zellen (Boren et al 1993; Ilver et al 1998). Das sialylsäurebindende Adhäsionsprotein SabA bindet an sialylierte Lewis x Antigene, welche im Verlauf chronischer Entzündungsprozesse auf humanen Zellen exprimiert werden (Mahdavi et al 2002). Auch für das Protein HpaA von *H. pylori* wurde eine Bindung an sialylierte Glykokonjugate gezeigt (Evans et al 1993; Jones et al 1997). Ferner

wurden weitere bakterielle Proteine und Glykolipide beschrieben, die eine Rolle bei der Adhäsion von *H. pylori* an Epithelzellen des Magens spielen (Odenbreit et al 1999; Lingwood et al 1993; Namavar et al 1998; Valkonen et al 1997).

Der durch Adhäsionsmoleküle vermittelte Kontakt von *H. pylori* mit der Plasmamembran der Magenepithelzellen ist sehr eng und nahezu irreversibel. Aufgrund einer durch den Keim induzierten Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts kommt es zu einer Veränderung der Form der Plasmamembran, wodurch diese mit einem größeren Anteil der bakteriellen Oberfläche in Kontakt tritt (Segal et al 1996). Ein Teil dieser Veränderungen wird durch bakterielle Proteine, welche von *H. pylori* in die Epithelzelle injiziert werden, ausgelöst (siehe 1.1.2.4.).

#### 1.1.2.4. **cag-Pathogenitätsinsel**

Abhängig von der Anwesenheit einer chromosomalen Pathogenitätsinsel (PAI) genannt *cag* werden Isolate von *H. pylori* als *cag*-positiv (*cag*<sup>+</sup>) oder *cag*-negativ (*cag*<sup>-</sup>) bezeichnet. Diese PAI enthält etwa 30 Gene und hat eine Größe von 40kb (Censini et al 1996). *H. pylori* Stämme ohne die *cag* PAI können diesen Gencluster durch Transformation komplett aus anderen Stämmen erhalten (Kersulyte et al 1999). Die Tatsache, dass *cag*<sup>+</sup> Stämme von *H. pylori* sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell im Vergleich zu *cag*<sup>-</sup> Stämmen schwerere Magenerkrankungen (Magengeschwüre und -tumore) verursachen, zeigt, dass die *cag* PAI eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der *H. pylori* Infektion spielt (Ogura et al 2000; Perez-Perez et al 1999b; Parsonnet et al 1997; Webb et al 1999). Etwa ein Drittel der Gene der *cag* PAI kodieren für Bestandteile eines Typ IV Sekretionssystem, mit dessen Hilfe bakterielle Proteine direkt in das Zytosol der Wirtszelle injiziert werden können (Christie et al 2000). Eine der prinzipiellen Funktionen dieser Pathogenitätsinsel ist die Aktivierung der Expression von IL-8 in Magenepithelzellen (Naumann et al 2004). Dieses Zytokin fungiert als starker chemotaktischer Faktor für Neutrophile.

Das einzige bisher bekannte Protein, welches von *H. pylori* mit Hilfe des erwähnten Sekretionssystems in Wirtszellen (Epithelzellen des Magens) injiziert wird, ist CagA (*cytotoxin-associated gene A*; Covacci et al 1993). CagA ist ein Protein mit einer Größe von 128 – 150kDa (unterschiedliche Größe des Proteins in verschiedenen *H. pylori* Stämmen (Xiang et al 1995)), welches im Zytosol der Wirtszellen von Kinasen der Src-Familie phosphoryliert wird (Asahi et al 2000; Segal et al 1999; Stein et al 2000; Stein et al 2002; Selbach et al 2002). Weder in anderen Bakterien noch in anderen *Helicobacter* Spezies wurden *cagA*-Homologe beschrieben, was darauf hindeutet, dass es sich bei *cagA* um ein für den menschlichen Magen spezifisches Gen handelt. Durch die Injektion von CagA kommt es

zu morphologischen Veränderungen der Wirtszellen, die als verstreuter oder „hummingbird“ Phänotyp bezeichnet werden (Segal et al 1999; Higashi et al 2002). Kürzlich wurde das CagA Protein auch mit der Spaltung von epithelialen Zell-Zell-Verbindungen (tight junctions) in Zusammenhang gebracht (Amieva et al 2003). Die durch die geöffneten tight junctions ausströmenden Ionen und Makromoleküle stellen eine zusätzliche wichtige Versorgungsmöglichkeit des Keims mit Nährstoffen dar (siehe auch 1.1.2.5.).

Es ist wahrscheinlich, dass andere Proteine von *H. pylori* in gleicher Weise wie CagA in die Wirtszellen übertragen werden, da die Induktion der IL-8-Sekretion durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1 in Epithelzellen durch *H. pylori* von der Anwesenheit des TypIV-Sekretionssystems jedoch nicht von CagA abhängig ist (Crabtree et al 1995; Naumann et al 1999; Pomorski et al 2001).

#### **1.1.2.5. VacA**

In der Magenschleimhaut ist die Versorgung mit Nährstoffen für *H. pylori* zum einen aufgrund der geringen Permeabilität der Mukusschicht für essentielle Ionen wie  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$  (siehe 1.1.2.1.) und zum anderen wegen der durch tight junctions eng miteinander verknüpften Schicht aus Epithelzellen begrenzt. Zur Verbesserung der Nährstoffversorgung sezerniert *H. pylori* daher verschiedene Proteine wie z.B. das „vacuolating cytotoxin“ VacA. Das *vacA* Gen kodiert für ein etwa 140kDa großes Protoxin, welches posttranslational in ein 88kDa Protein gespalten wird (Cover et al 1992). Im Gegensatz zum *cagA* Gen ist das *vacA* Gen in allen *H. pylori*-Stämmen vorhanden, wobei bestimmte Polymorphismen bestehen. *VacA* Allele enthalten einen der beiden Typen der Signal (s)-Region s1 oder s2, welche für das Signalpeptid und den N-Terminus von VacA kodiert und eine der beiden mittleren (m) Regionen m1 oder m2, welche für einen Teil der zellbindenden Domäne des Toxins kodiert. Die Allele treten dabei in allen möglichen Kombinationen auf. Die Forschung konzentriert sich auf den interaktivsten Typ von *vacA* Allelen s1/m1 (Atherton et al 1995). Ein Teil des prozessierten VacA Proteins wird in das extrazelluläre Medium des Keims sezerniert, wohingegen etwa 40-60% des Toxins mit der Außenmembran des Bakteriums assoziiert bleiben. Nach der Sekretion wird das VacA-Toxin in die Plasmamembran von Magenepithelzellen eingebaut und bildet dort anionenspezifische Kanäle mit niedriger Leitfähigkeit. Durch diese Kanäle werden Bicarbonationen, organische Anionen und Harnstoff aus den Wirtszellen freigesetzt, die das Wachstum der *H. pylori* Bakterien unterstützen. Wie bereits erwähnt (siehe 1.1.2.1.) katalysiert das *H. pylori* Protein Urease die Hydrolyse von Harnstoff, wodurch der Keim vor der Azidität des Magens geschützt wird. Im



Gegensatz zu s1- wurden *vacA* s2-Stämme von *H. pylori* selten aus Patienten mit Magengeschwüren oder Magenkarzinomen isoliert (Atherton et al 1995, Atherton et al 1997). Darüber hinaus korrelieren *vacA* s1/m1-Stämme von *H. pylori* am engsten mit dem Auftreten von Magenkarzinomen (Kidd et al 1999; Miehle et al 2000). Eine weitere Möglichkeit, wie das VacA-Toxin die Versorgung von *H. pylori* mit Nährstoffen verbessert, ist die Öffnung von Zell-Zell-Verbindungen, wie u.a. tight junctions. Es konnte gezeigt werden, dass durch VacA die Permeabilität zwischen einzelnen Zellen von Epithelzellschichten erhöht wird. Dadurch kommt es u.a. zur verstärkten Freisetzung von  $\text{Fe}^{3+}$ - und  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen und größerer Moleküle (z.B. Mannitol, Saccharose), welche für das Wachstum von *H. pylori* wichtig sind (Papini et al 1998; Pelicic et al 1999).

Im Magenepithel von Patienten, die mit *H. pylori* infiziert waren, wurde ein verstärktes Ausmaß von Apoptose beobachtet, die möglicherweise eine Rolle für das Auftreten von atrophischer Gastritis im Verlauf der Infektion mit *H. pylori* spielt (Shirin et al 1998). Durch vermehrtes Absterben von Epithelzellen würden auch weitere Nährstoffe im Bereich der Magenmukosa freigesetzt, welche von *H. pylori* genutzt werden könnten.

Es ist nicht klar, welche der hier beschriebenen *in vitro*-Effekte von VacA auch *in vivo* eine Rolle spielen. In Tiermodellen zeigte sich bei Schweinen, mongolischen Wüstenrennmäusen und Mäusen kein Unterschied bezüglich der Persistenz von *vacA* ko-Stämmen im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypstämmen (Eaton et al 1997; Wirth et al 1998; Salama et al 2001). In Konkurrenzexperimenten mit Mäusen zeigten *vacA* ko-Stämme jedoch eine schlechtere Kolonisation als die jeweiligen Wildtypstämme (Salama et al 2001).

## **1.2. Immunantwort und *H. pylori***

Das menschliche Immunsystem besteht aus 2 Teilen: zum einen aus den innatem oder angeborenen Immunmechanismen, welche ohne vorherige Konfrontation die Erkennung und Reaktion auf Mikroorganismen ermöglichen, zum anderen aus der adaptiven oder erworbenen Immunantwort, welche den meisten Säugetieren, welche eine Infektion überlebt haben, Immunität gegenüber einer erneuten Infektion mit dem gleichen Keim verleiht (Janeway et al 2002).

### **1.2.1. Innate Immunantwort und *H. pylori***

Den ersten Abschnitt der innatem Immunabwehr stellen die Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts dar (Otte et al 2004). Diese Zellen exprimieren verschiedene

Immunrezeptoren wie z.B. die Toll-like-Rezeptoren (TLR) (Schmausser et al 2004). Die TLR dienen der Erkennung spezifischer Moleküle (z.B. LPS) von Mikroorganismen. Dadurch werden nukleäre Transkriptionsfaktoren wie NFκB und AP-1 aktiviert, wodurch wichtige zelluläre Immunabwehrmechanismen aber auch Zelltod und Angiogenese reguliert werden (Akira et al 2004). Gastrointestinale Epithelzellen reagieren praktisch nicht auf *H. pylori* LPS, da dieses durch Tetraacylierung 100-1000 fach weniger aktivierend auf TLR4 wirkt als LPS anderer Bakterien (Backhed et al 2003). Weitere Arbeiten zeigten, dass *H. pylori cag*<sup>+</sup>-Stämme, welche die *cag* PAI besitzen (siehe 1.1.2.4.), die Aktivierung eines intrazellulären leuzinreichen Rezeptors des innate Immunsystems (NOD1) auslösen. Die Aktivierung von NOD1 führt zu verstärkter Aktivierung von NFκB und AP-1 Transkriptionsfaktoren und damit u.a. zu vermehrter Freisetzung des Chemokins IL-8, welches die vermehrte Einwanderung von Neutrophilen in die Magenschleimhaut auslöst und damit zu schwereren Entzündungsreaktionen führt (Viala et al Nat Immunol 2004). Dies ist eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, dass *cag*<sup>+</sup>-Stämme schwerere Krankheitssymptome auslösen als *cag*<sup>-</sup>-Stämme (Nilsson et al 2003).

Neben Epithelzellen fungieren auch Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten als Bestandteil der innate Immunabwehr. Diese Zellen sind in der Lage pathogene Bakterien wie *H. pylori* zu phagozytieren oder diese durch Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROI und RNI) zu zerstören. Um oxidativer Schädigung zu entgehen, produziert *H. pylori* verschiedene Enzyme wie Katalase, Superoxiddismutase und NADPH-abhängige Chinonreduktase zum Abbau dieser Verbindungen (McGee et al 1999a; Wang et al 2004). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass *H. pylori* die induzierbare Stickstoffoxid-Synthase (iNOS) sowohl in der Magenschleimhaut als auch in Makrophagen aktiviert, welche mit vermehrter Apoptose und Schädigung von Epithelzellen in Zusammenhang steht (Mannick et al 1996). NO ist jedoch auch ein wichtiger Bestandteil der innate Immunantwort aufgrund eines stark antimikrobiellen Effekts. Durch die Produktion des Enzyms Arginase verhindert *H. pylori* die eigene Abtötung durch NO. Arginase wandelt Arginin in Harnstoff und Ornithin um. Da Arginin jedoch auch von der iNOS verwendet wird, um NO zu produzieren, kompetiert die bakterielle Arginase mit der iNOS um das Arginin, wodurch Makrophagen in Anwesenheit von *H. pylori* weniger NO produzieren als in Abwesenheit des Keims (McGee et al 1999b; Gobert et al 2001). Ein weiterer Mechanismus der Evasion der innate Immunantwort durch *H. pylori*, der von einigen Studien postuliert wurde, ist die im Vergleich zu anderen gram-negativen Bakterien erhöhte Resistenz des Keims gegenüber Abtötung durch Phagozytose (Allen et al 2001).

Einige Studien haben sich mit der Interaktion von *H. pylori* mit dendritischen Zellen (DC), bestimmten antigenpräsentierenden Zellen, beschäftigt. Es zeigte sich, dass DC durch *H. pylori* unabhängig von LPS zur Aktivierung und Reifung stimuliert werden, wobei es vor allem zu einer gesteigerten Sekretion von IL-12 kommt. Dadurch kommt es unter anderem zu einer gesteigerten Aktivierung von natürlichen Killer (NK) Zellen, einer weiteren Komponente der innate Immunantwort (Hafsi et al 2004; Kranzer et al 2004). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass NK-Zellen auch direkt, also unabhängig von DCs durch *H. pylori* aktiviert werden (Yun et al 2005).

### **1.2.2. Adaptive Immunantwort**

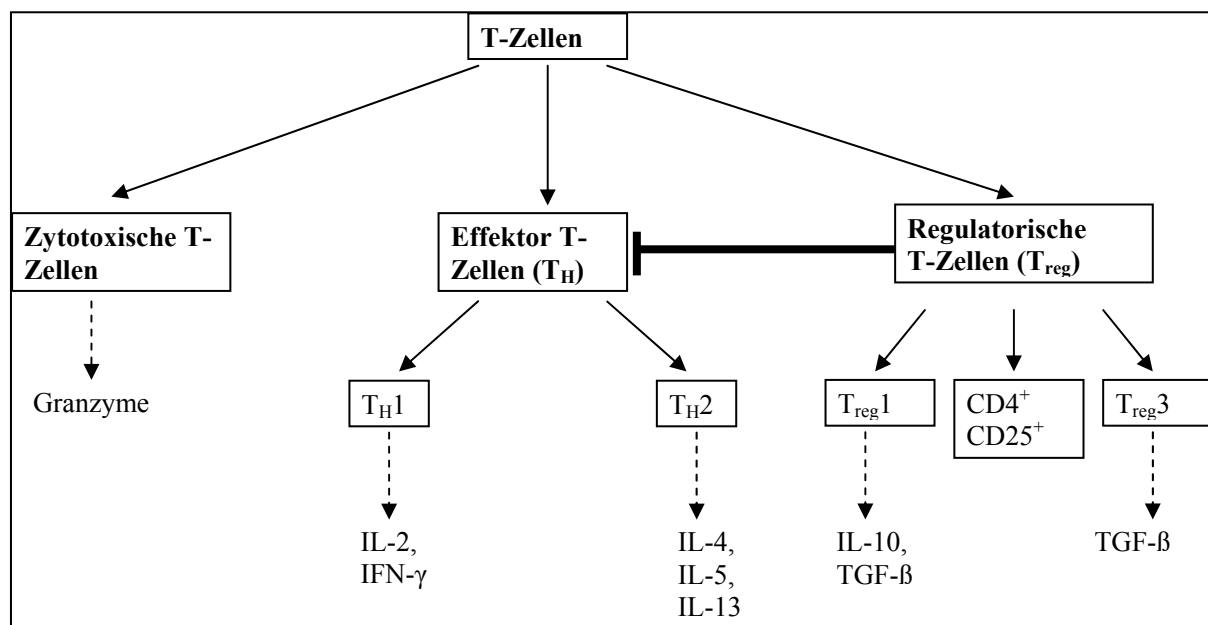
Da die Infektion mit *H. pylori* im Unterschied zu anderen pathogenen Mikroorganismen wie z.B. dem Choleraerreger *Vibrio cholerae* in einem langsamen Prozess besteht, der zur chronischen Persistenz des Keims führt, muss *H. pylori* nicht nur die schnelle, innate sondern auch die spätere, adaptive Immunantwort des Wirtes umgehen. Die adaptive Immunantwort besteht aus bestimmten Immunzellen, den Leukozyten, die durch Stammzellen im Knochenmark gebildet werden und darauf folgend im Thymus oder dem Knochenmark reifen. Bei den meisten Spezies einschließlich der Säugetiere unterscheidet man zwei Teile des adaptiven Immunsystems: die humorale und die zelluläre Immunantwort. Die humorale Immunantwort bekämpft mit Hilfe von Immunglobulin-Proteinen (Antikörpern), die von B-Zellen produziert werden, Bakterien und Viren in den Körperflüssigkeiten. Die zelluläre Immunantwort zerstört unter anderem virusinfizierte Zellen durch Einsatz von T-Zellen.

### **1.2.3. Zelluläre Immunantwort**

Die zelluläre Komponente der humanen adaptiven Immunantwort wird durch T-Lymphozyten vermittelt. Man unterscheidet dabei drei Gruppen von T-Zellen (siehe Abb. 2). Zum einen zytotoxische T-Zellen, welche z.B. virusinfizierte Zellen mit Hilfe spezifischer T-Zell-Rezeptoren erkennen können. Bei Erkennen solcher Zellen sezernieren diese T-Zellen Granzyme und andere Proteine, welche zur Induktion von Apoptose in der infizierten Zelle führen. Zum anderen gibt es Helfer- oder Effektor-T-Zellen ( $T_H$ -Zellen), welche Makrophagen zur Phagozytose von Bakterien oder Viruspartikeln stimulieren können oder auch Zytokine sezernieren können, welche die Proliferation von T- und B-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen verstärken. Aufgrund der Sekretion unterschiedlicher Zytokine und unterschiedlicher Effektorfunktionen unterscheidet man  $T_{H1}$ - und  $T_{H2}$ -Zellen (Mosmann et al

1986). T<sub>H</sub>1-Zellen produzieren vor allem die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2, wohingegen T<sub>H</sub>2-Zellen hauptsächlich die Zytokine IL4, IL-5 und IL-13 sezernieren (siehe Abb. 2). Die sowohl von T<sub>H</sub>1 als auch von T<sub>H</sub>2-Zellen sezernierten Zytokine fungieren gleichzeitig als Wachstumsfaktoren für diese Zellen. Durch diese autokrinen Effekte kommt es daher zu einer selbstvermittelten Aktivierung der Zelldifferenzierung (Kidd 2003).

Ein anderer Typ von Immunzellen, die regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>; siehe Abb. 2), kann die Funktion der T<sub>H</sub>1- und/oder T<sub>H</sub>2-Zellen blockieren. Es gibt verschiedene Untergruppen regulatorischer T-Zellen, die sich in Funktion und Phänotyp von T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2-Zellen unterscheiden. T<sub>reg</sub> vom Typ 1 produzieren große Mengen an IL-10 und wenig TGF- $\beta$ . T<sub>reg</sub> vom Typ 3 produzieren dagegen hauptsächlich TGF- $\beta$ . Das Zytokin IL-10 zeigt suppressierende Effekte u.a. auf die T<sub>H</sub>1-Zytokin-Produktion, die Funktion von APC und NK-Zellen und die Proliferation von T-Zellen (Huang et al 1995). Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen hemmen Immunreaktionen hingegen durch Zell-Zell-Kontakt und nicht durch Sekretion von Zytokinen (McGuirk et al 2002).



**Abb. 2:** Einteilung von T-Zellen. Die Abbildung zeigt die verschiedenen Gruppen von T-Zellen (zytotoxische, Effektor- und regulatorische T-Zellen) sowie die von diesen Zellen produzierten Zytokine bzw. Proteasen.

#### 1.2.4. Humorale Immunantwort

Die humorale Immunantwort fungiert als Schutzmechanismus der Extrazellularräume des menschlichen Organismus. Extrazelluläre Pathogene werden dabei durch Antikörper, welche von B-Lymphozyten gebildet werden, zerstört und darüber hinaus die Ausbreitung

intrazellulärer Infektionen verhindert. Eine B-Zelle wird durch Bindung vieler Antigene und vor allem monomerer Proteine an den Immunoglobulinrezeptor (B-Zellrezeptor) auf ihrer Oberfläche aktiviert. Im Anschluss daran muss diese B-Zelle mit antigenspezifischen T-Helferzellen interagieren. Durch Nichtproteinantigene, die aufgrund ihrer Struktur nicht zur Präsentation von Peptid-MHC-Komplexen durch B-Zellen gegenüber T-Helferzellen führen, können B-Zellen jedoch auch direkt, d.h. ohne Beteiligung der T-Zellen, zur Produktion von Antikörpern stimuliert werden. Die von den B-Zellen produzierten Antikörper wirken auf verschiedene Arten gegenüber Pathogenen oder auch bakteriellen Toxinen. Zum einen verhindern sie durch Anheftung an extrazelluläre Viren, Bakterien oder Toxine deren Eindringen in Körperzellen (Neutralisierung). Zum anderen wird durch die Anheftung der Antikörpermoleküle an die Oberfläche extrazellulärer Bakterien deren Phagozytose durch spezialisierte Zellen verstärkt (Opsonierung). Darüber hinaus werden durch Antikörper auf der Oberfläche von Pathogenen die Proteine des Komplementsystems aktiviert, welche ebenfalls die verstärkte Phagozytose aber auch direkte Lyse von Mikroorganismen auslösen. Je nach Isotyp oder Klasse der gebildeten Antikörper kommt einer dieser Effektormechanismen zum Einsatz (Janeway et al 2002).

### **1.2.5. Evasion der zellulären Immunantwort durch *H. pylori***

Im Verlauf seiner Coevolution mit Menschen und Primaten hat *H. pylori* offensichtlich Mechanismen entwickelt, um den Bestandteilen der adaptiven Immunantwort zu entgehen und dadurch eine lebenslange Infektion der Magenmukosa zu ermöglichen. Trotz dieser Mechanismen der Immunevasion kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems durch *H. pylori*, welche durch Infiltration der Magenmukosa mit Neutrophilen, Makrophagen und Lymphozyten in Antwort auf die verstärkte Sekretion von IL-8 aus Epithelzellen gekennzeichnet ist (Atherton et al 1996; Blaser et al 2004). Es kommt auch zur Ausbildung einer *H. pylori* spezifischen adaptiven Immunantwort einschließlich der Bildung spezifischer Antikörper und Effektor-T-Zellen mit T<sub>H</sub>1 und -2 Phänotyp, wobei das in der Magenmukosa auftretende Zytokinprofil ein Vorherrschen des T<sub>H</sub>1-Phänotyps anzeigt (Bamford et al 1998). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die T-Zell-abhängige Immunantwort für den Schutz vor einer Infektion mit *H. pylori* essentiell notwendig ist. Auch in Antikörperdefizienten Mäusen konnte eine protektive Immunantwort gegenüber *H. pylori* erreicht werden, was nochmals die Schlüsselrolle der T-Zellen bei dieser Infektion unterstreicht (Ermak et al 1998). Normalerweise reagiert das Immunsystem auf extrazelluläre toxinproduzierende Pathogene wie *H. pylori* mit einer T<sub>H</sub>2-Antwort, die durch Aktivierung

von B-Zellen und verstärkte Produktion von Antikörpern gekennzeichnet ist. Eine nicht ausreichende Balance der T-Zell-Antwort auf die Infektion mit *H. pylori*, bestehend aus T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Antwort, führt, wie in Tiermodellen gezeigt werden konnte, zu einer verstärkten Schädigung des Wirtsorganismus (Mohammadi et al 1996; Mattapallil et al 2000; Eaton et al 2001). Diese Beobachtung wurde indirekt dadurch belegt, dass in Patienten, deren T<sub>H</sub>1-Antwort unterdrückt war, z.B. aufgrund einer Nierentransplantation, oder die eine verstärkte T<sub>H</sub>2-Antwort zeigten wie z.B. schwangere Frauen, bei denen eine Verminderung der T<sub>H</sub>1-Antwort die Mutter immuntolerant gegenüber dem Nachwuchs macht, die Bildung von Magengeschwüren und entzündlichen Reaktionen in der Magenschleimhaut bei Infektion mit *H. pylori* deutlich reduziert war (Hruby et al 1997; Piccinni et al 1998). Auch die Erklärung des als „afrikanisches Rätsel“ (african enigma) bezeichneten Phänomens einer sehr geringen Rate an Magengeschwüren trotz weiter Verbreitung von *H. pylori* Infektionen könnte mit der Art der Immunantwort auf diese Infektion zusammenhängen. In Afrika sind auch Infektionen mit Parasiten (Helminthen) weit verbreitet, welche zur Induktion einer T<sub>H</sub>2-Antwort führen, wodurch die gelinderten Symptome einer gleichzeitigen Infektion mit *H. pylori* erklärt werden könnten (Brooker et al 2004; Holcombe 1992). Auch im Tiermodell zeigte sich das gleiche Bild bei Coinfektion von Mäusen mit *Helicobacter felis* und Helminthen (Fox et al 2000). Die Übertragbarkeit dieses Tiermodells auf die Situation beim Menschen ist jedoch umstritten (Feldmeier et al 2000; MacDonald 2001).

*In vivo* und *in vitro* Studien haben gezeigt, dass T-Zellen in der mit *H. pylori* infizierten Magenmukosa einen aktivierten Phänotyp mit erhöhter Expression von CD69 und CD25 (IL-2-Rezeptor alpha-Kette) zeigen (Terres et al 1998; Strömberg et al 2003; Enarsson et al 2005). Wie bereits erwähnt, zeigen diese Zellen hauptsächlich einen T<sub>H</sub>1-Phänotyp, was auf eine funktionierende Aktivierung der T-Zellen durch T<sub>H</sub>1-Zytokine schließen lässt (Bamford et al 1998). Eine mögliche Erklärung für die trotz funktionierender Aktivierung unzureichende T-Zell-Antwort auf die Infektion mit *H. pylori*, die auch innerhalb der vorliegenden Doktorarbeit weitergehend untersucht wird, wäre die verminderte Proliferation der T-Zellen. Dabei käme es zwar zur Sekretion von Zytokinen wie IL-2 und IFN- $\gamma$  aus den T-Zellen. Bei gehemmter Proliferation der Zellen wäre das Ausmaß der Zytokinsekretion jedoch nicht ausreichend, um die Infektion mit dem Keim zu besiegen. Im Einklang mit dieser Hypothese zeigten Studien mit *H. pylori* infizierten Patienten eine verminderte Proliferation der T-Zellen dieser Patienten im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe (Karttunen 1991; Fan et al 1994).

Verschiedene *in vitro* Studien bestätigten das Vorhandensein eines solchen immunsupprimierenden Effekts von *H. pylori* (Knipp et al 1993; Knipp et al 1994; Chen et al 2000). In diesen Studien wurde eine Beteiligung der Virulenzfaktoren CagA und VacA an dem beobachteten Effekt ausgeschlossen, der verantwortliche Faktor aus *H. pylori* konnte in diesen Studien jedoch nicht näher charakterisiert werden. Im Gegensatz dazu veröffentlichte eine weitere Arbeitsgruppe widersprüchliche Daten bezüglich dem Virulenzfaktor CagA und der Proliferation von Lymphozyten. In diesen Arbeiten wurde sowohl eine Inhibition als auch eine Aktivierung der Lymphozytenproliferation durch das CagA-Protein beschrieben (Paziak-Domanska et al 2000; Chmiela et al 1996). Als Mechanismus der reduzierten Proliferation von T-Zellen bei Infektion mit *H. pylori* wurde innerhalb einer *in vitro* und *in vivo* Studie die verstärkte Induktion von FasL-induzierter Apoptose in T-Zellen durch Antigene von *H. pylori* postuliert (Koyama 2000; Wang J et al 2001). Dadurch käme es zur negativen Selektion von T-Zellen und folglich zu einer Unterdrückung der T-Zell-Antwort durch *H. pylori*. In weiteren Arbeiten wurde ein von *H. pylori* sezerniertes Peptid Hp(2-20) identifiziert, welches die Produktion von Sauerstoffradikalen aus Monozyten aktivierte und dadurch indirekt zu vermehrter Fehlfunktion und Apoptose von T-Zellen führte (Putsep et al 1999; Betten et al 2001). Die physiologische Relevanz der beschriebenen Mechanismen wurde bislang nicht geklärt.

### **1.2.6. Evasion der humoralen Immunantwort durch *H. pylori***

Ein Mechanismus der Evasion humoraler Immunantworten durch *H. pylori* stellt die Nachahmung fukosylierter (Lewis-) Antigene von Magenepithelzellen dar (Wirth et al 1997; Heneghan et al 2000). Aufgrund von Mutationen und intrachromosomaler Rekombination homologer Gensequenzen kommt es darüber hinaus zur Variation von Oberflächenantigenen wie z.B. der Proteine CagY, BabA und BabB (Tomb et al 1997; Pride et al 2001; Appelmelk et al 2000; Aras et al 2003). Im Verlauf der Infektion mit *H. pylori* kommt es trotz dieser Mechanismen zu einer deutlich ausgeprägten B-Zell-Antwort und es werden spezifische Antikörper gegen verschiedene *H. pylori* Antigene wie z.B. Urease, Flagellin und HpaA im Serum und Magensaft der infizierten Patienten gebildet (Mattsson et al 1998a; Mattsson et al 1998b; Perez-Perez et al 1999a). Der Keim wird dadurch jedoch nicht ausgeschaltet. Darüber hinaus zeigte sich im Tiermodell, dass eine schützende Immunität gegenüber der Infektion mit *H. pylori* auch in Abwesenheit funktioneller Antikörper erreicht werden kann, was darauf hindeutet, dass die B-Zell-Antwort bei der Kolonisation mit *H. pylori* eine weniger zentrale Rolle spielt als die zelluläre T-Zell-Antwort (Ermak et al 1998). In einer *in vitro* Studie

konnte gezeigt werden, dass der von *H. pylori* sezernierte Virulenzfaktor VacA die Prozessierung und anschließende Präsentation von Antigenen durch B-Zellen gegenüber T-Zellen antagonisiert (Molinari et al 1998). Dabei führte eine Präinkubation von B-Zellen mit VacA-Protein zu einer verminderten Produktion von li-abhängigen Epitopen auf B-Zellen, wodurch die Proliferation der T-Zellen inhibiert wurde. Eine weitere *in vitro* Studie konnte zwar zeigen, dass eine Überexpression des *H. pylori* Proteins CagA in B-Zellen zur Inhibition der Proliferation dieser Zellen führt, die physiologische Relevanz dieses Ergebnisses ist jedoch nicht klar (Umehara et al 2003).

Trotz der sich aus der bisherigen Datenlage andeutenden Hypothese, dass B-Zellen bei der Immunantwort gegenüber *H. pylori* eine eher untergeordnete Rolle spielen, spielt die Infektion mit diesem Pathogen eine klar erwiesene Rolle bei der Entwicklung des MALT-Lymphoms im Magen (Isaacson et al 2004). Das MALT-Lymphom entsteht aus der unkontrollierten, polyklonalen Expansion einer Untergruppe von IgM Memory-B-Zellen, welche zur Entwicklung eines monoklonalen Tumors führt. Allem Anschein nach sind die zytolytischen Mechanismen *H. pylori*-spezifischer T-Zellen aus MALT-Lymphom-Gewebe, durch die normalerweise aktivierte B-Zellen entfernt werden, unzureichend (D'Elis et al 1999). Dies führt dann zum unkontrollierten Wachstum der B-Zellen im MALT-Lymphom.

### 1.3. T-Zell-Aktivierung

Die vorliegende Doktorarbeit befasst sich mit dem Einfluss von *H. pylori* auf die Proliferation von T-Zellen. Eine Voraussetzung für die Vermehrung von T-Zellen ist deren Aktivierung zum Beispiel durch Antigenpräsentation oder mitogene Stimulation. Die Prinzipien dieser Aktivierungsmechanismen stellen also eine wichtige Grundlage für die vorliegende Arbeit dar und sollen daher im folgenden Teil der Einleitung eingehender erläutert werden.

Die Wechselwirkung von T-Lymphozyten mit spezifischen Antigenen erfolgt durch Bindung dieser Antigenstrukturen an den hoch komplexen T-Zellrezeptorkomplex (TCR). Es existieren zwei Formen des TCR, der TCR $\alpha\beta$  und der TCR $\gamma\delta$ , durch die verschiedene T-Zelllinien definiert werden. Zusätzlich zu diesen beiden Heterodimeren gibt es drei Untereinheiten des CD3-Rezeptors ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) sowie den CD4- oder CD8- (je nach Typ der T-Zelle) Corezeptor (siehe Abb. 3; Aringer 2002).

T-Zell-Rezeptoren erkennen mit unterschiedlicher Effizienz spezifische Antigene, welche als Peptide in MHC-Oberflächenstrukturen antigenpräsentierender Zellen eingebettet sind. Der CD4-Corezeptor erkennt dagegen das MHC II-Protein selbst, wogegen der CD8-Rezeptor das



MHC I-Protein erkennt. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des TCR sind nichtkovalent mit einem Komplex aus niedermolekularen Transmembranproteinen assoziiert, deren Gesamtheit als CD3-Komplex bezeichnet wird. Der CD3-Komplex initiiert Signaltransduktionsprozesse im Anschluss an spezifische Antigenerkennung durch den TCR (Alegre et al 2001).

Bei der Bindung des TCR an Peptidantigene kommt es zum Ablauf verschiedener Phosphorylierungsschritte (Kersh et al 1998). Dabei werden Tyrosinreste so genannter ITAMs (Immunreceptor tyrosine-based activation motif) der TCR  $\zeta$ -Kette phosphoryliert (Kersh et al 1998). Im Unterschied zu Tyrosinkinaserzeptoren zeigt der TCR-Komplex keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität, sondern bindet zytosolische Proteintyrosinkinasen der Src-, Syk- und Tec-Familie. Nach Phosphorylierung von Tyrosinresten durch Kinasen der Src-Familie fungieren die ITAMs als Proteinbindungsstellen (Koretzky et al 2001). Die nächsten Schritte beinhalten unter anderem die Tyrosinkinase ZAP-70, welche ebenfalls an ITAM-Motive bindet und aktiviert wird. Im Anschluss daran werden unter anderem die Moleküle LAT, SLP-76 und die Phospholipase  $C\gamma 1$  ( $PLC\gamma 1$ ) phosphoryliert (siehe Abb. 3). Das Molekül LAT ist ein transmembranäres Adapterprotein, welches verschiedene Proteine wie den SLP76/Vav-Komplex,  $PLC\gamma 1$  und die Phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) an die Zellmembran rekrutiert (Sasaki et al 2000; Bachmaier et al 2000). Dieser Prozess ist für eine effiziente Signalübertragung des T-Zellrezeptors notwendig. SLP76 ist ein weiteres Adapterprotein. Durch Bindung weiterer Proteine an SLP-76 kommt es zur Aktivierung von calciumabhängigen und NF $\kappa$ B- und Erk-Signalwegen (Aghazadeh et al 2000; Costello et al 1999). Das Adapterprotein SLP76 aktiviert darüber hinaus den Ras-Signalweg, durch den wiederum die Signalmoleküle Raf, MEK und ERK aktiviert werden, sowie die  $PLC\gamma 1$  (Aringer 2002). Die aktivierte  $PLC\gamma 1$  spaltet hydrolytisch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in die sekundären Botenstoffe (second messenger) Inositol-1, 4, 5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG). DAG aktiviert daraufhin Mitglieder der Proteinkinase C-Familie von Serin/Threonin-Kinasen, welche die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF $\kappa$ B aktivieren und zu deren nukleärer Translokation führen (Sun et al 2000; Villalba et al 2000). Das Molekül IP<sub>3</sub> wirkt auf Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums (ER), wodurch es zur Öffnung von Calciumkanälen des ER und daher zu einem Calciumausstrom und anschließendem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration kommt. Durch diesen Anstieg der Calciumkonzentration wird die Phosphatase Calcineurin aktiviert und es kommt schließlich zur Translokation des dephosphorylierten Transkriptionsfaktors NFAT (nuclear factor of activated T cells) in den Zellkern (siehe Abb. 3). Das Molekül PIP<sub>2</sub> wird nicht nur durch  $PLC\gamma 1$ , sondern auch durch die PI3-Kinase umgesetzt, wodurch jedoch

Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphat entsteht, welches ebenfalls als second messenger (wie DAG und IP3) die Proteinkinase B (PKB, AKT) und S6 abhängige Kinasen (z.B. p70S6-Kinase) aktiviert. Dadurch kommt es unter anderem zur Hemmung von zellulärer Apoptose (Vanhaesebroeck et al 2000).

Durch die beschriebene Aktivierung von intrazellulären Signalwegen der T-Zellen kommt es also zur verstärkten Translokation verschiedener Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1, NFκB und NFAT in den Zellkern, deren Bindung an die Promoterregion verschiedener Gene und zur anschließenden Produktion von Proteinen wie z.B. dem Zytokin IL-2 und dem Membranrezeptor CD69.

In der Promoterregion des *IL-2* Gens sind Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z.B. NFκB, NFAT und AP-1 enthalten (McGuire et al 1997; Serfling et al 1995). Durch nukleäre Translokation dieser Transkriptionsfaktoren infolge der T-Zell-Aktivierung kommt es also zur verstärkten Transkription des *IL-2* Gens und somit zu vermehrter Sekretion dieses Zytokins. Darüber hinaus enthält auch die Promoterregion des Gens für die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren wie NFκB und Stat5 (John et al 1995; Algarte et al 1995; Lecine et al 1996). Somit bewirkt die T-Zell-Aktivierung nicht nur die vermehrte Freisetzung von IL-2 sondern auch die vermehrte Expression des IL-2-Rezeptors. Durch Bindung von IL-2 an den IL-2-Rezeptor wird eine Signalkaskade aktiviert, wodurch es schließlich zur Stimulation der Proliferation von T-Zellen kommt (Moriggl et al 1999).

Das *CD69* Gen kodiert für ein Typ II C-Typ Lektin aus der Familie der NK-Zell-Rezeptoren. Der CD69-Rezeptor wird nach Zellaktivierung in allen Zellen des Knochenmarks außer den Erythrozyten gebildet (Testi et al 1994). Dieser Rezeptor fungiert als früher Aktivierungsmarker, der *in vivo* selektiv in chronischen Entzündungsinfiltraten und in Regionen aktiver Immunantwort exprimiert wird. Kürzlich wurde auch eine Beteiligung von CD69 an der Deletion von Lymphozyten durch Apoptose im Anschluss an die T-Zell-Aktivierung sowie bei der Regulation der  $T_H1/T_H2$ -Balance der T-Zell-Differenzierung postuliert (Sancho et al 2005).

Für die effiziente Aktivierung von Signalwegen im Verlauf der T-Zell-Aktivierung und damit für eine produktive Immunantwort ist die zusätzliche Stimulation der T-Zelle über so genannte costimulatorische Rezeptoren wie z.B. den CD28-Rezeptor erforderlich. Daneben existiert auch ein inhibierender Co-Rezeptor, CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4). Die Bindung an diesen Rezeptor führt zu einer Erhöhung des Schwellenwerts für eine T-Zell-Antwort (Koretzky et al 2001).

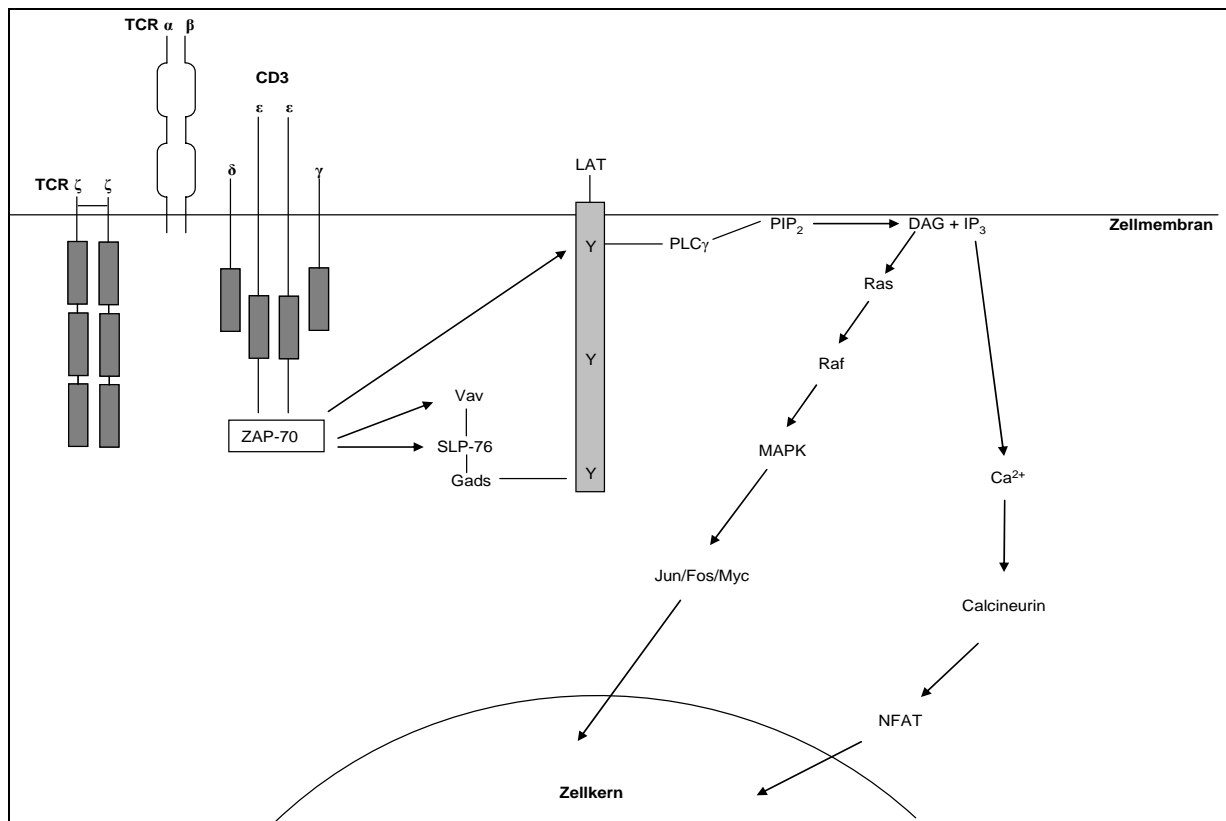


Abb. 3: Frühe Ereignisse der T-Zell-Aktivierung

## 1.4. Zellzyklus

Die Untersuchung der Inhibition der Proliferation von T-Lymphozyten durch *H. pylori* ist ein Bestandteil der vorliegenden Doktorarbeit. Die Grundlage der Teilung und Vermehrung humaner Zellen ist der Ablauf des Zellzyklus. Eine mögliche Erklärung der reduzierten Vermehrungsrate von T-Zellen bei Inkubation mit *H. pylori* wäre daher die Beeinflussung bestimmter Mechanismen des Zellzyklus. Zum besseren Verständnis der Relevanz dieses Forschungsfeldes für die vorliegende Doktorarbeit sollen nachfolgend die wichtigsten Grundprinzipien der Zellzyklusregulation erläutert werden.

### 1.4.1. Allgemeine Grundlagen

Die Vermehrung von Zellen erfolgt in der Regel durch Teilung einer Zelle in zwei Tochterzellen. Der Prozess der Zellteilung besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Abschnitten: zum einen der Replikation der DNA und zum anderen der Aufteilung der replizierten Chromosomen auf zwei getrennte Zellen. Ursprünglich wurde die Zellteilung dabei in zwei Stufen aufgeteilt: die Mitose, dem Prozess der Kernteilung, der wiederum aus den vier Abschnitten Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase besteht und die Interphase,

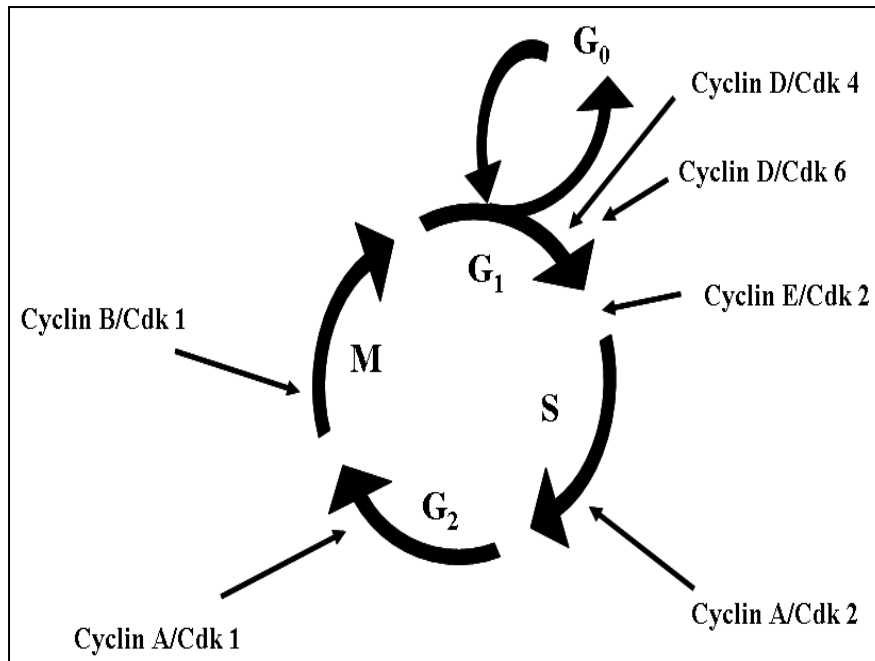
dem Abschnitt zwischen zwei Mitosen. Es zeigte sich jedoch, dass auch die Interphase mechanistisch in verschiedene Abschnitte untergliedert werden kann, obwohl die Zellen im Verlauf der Interphase im Gegensatz zur Mitose außer einer Größenzunahme keine mikroskopisch sichtbaren morphologischen Veränderungen durchlaufen. Mit Hilfe verschiedener Techniken konnte gezeigt werden, dass die Interphase aus drei Phasen, nämlich  $G_1$ -, S- und  $G_2$ -Phase, besteht. Dem Prozess der DNA-Replikation, welcher in der S-Phase stattfindet, ist eine  $G_1$ -Phase vorgeschaltet, in der die Zelle sich quasi auf die DNA-Synthese vorbereitet. Im Anschluss an die S-Phase folgt eine  $G_2$ -Phase, in der sich die Zelle auf die anschließende Mitose vorbereitet (Norbury et al 1992). Innerhalb der  $G_1$ -Phase können die Zellen alternativ zur S-Phase in eine Art von Ruhephase ( $G_0$ -Phase) eintreten. Der Hauptanteil der Zellen des menschlichen Körpers, der sich nicht teilt, befindet sich in dieser  $G_0$ -Phase (Vermeulen et al 2003).

#### **1.4.2. Kontrolle des Zellzyklus**

Der Übergang von einer Zellzyklusphase in die andere verläuft in geordneter Weise und wird durch verschiedene zelluläre Proteine reguliert. Zu diesen Proteinen gehören cyclinabhängige Kinasen (Cdk) und deren Substrate, Cycline, Cdk-Inhibitoren und Checkpoint-Proteine (wie z.B. p53). Im Folgenden soll ein Überblick über die Regulation und Funktionsweise dieser wichtigen Regulatoren des Zellzyklus gegeben werden.

#### **1.4.3. Regulation cyclinabhängiger Kinasen**

Die cyclinabhängigen Kinasen bilden eine Familie von Serin/Threonin-Proteinkinasen, welche an spezifischen Punkten des Zellzyklus aktiviert werden. Bis heute wurden neun verschiedene Cdk identifiziert. Für fünf dieser Proteine wurde eine wichtige Funktion bei der Regulation des Zellzyklus beschrieben. Im Verlauf der  $G_1$ -Phase spielen Cdk2, 4 und 6, im Verlauf der S-Phase Cdk2 sowie in der  $G_2$  und M-Phase Cdk1 eine Rolle. Die Cdk-Proteine werden zum einen durch Bindung an eine weitere Gruppe zellzyklus-regulatorischer Proteine, die Cycline, aktiviert. Bisher wurden sechzehn Cyclin - Proteine identifiziert, von denen jedoch wie bei den Cdk-Proteinen nicht alle an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (Peng et al 1998; Okamoto et al 1994; Rickert et al 1996). In den verschiedenen Phasen des Zellzyklus werden unterschiedliche Cyclin-Proteine benötigt. Die drei Typ-D Cycline (Cyclin D1, D2 und D3) binden an Cdk4 und Cdk6 und sind von essentieller Bedeutung für den



**Abb. 4** Zellzyklus-Phasen

Die Abbildung zeigt die verschiedenen Phasen des Zellzyklus (G<sub>0</sub>-, G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>-, M-Phase) sowie die innerhalb dieser Phasen aktiven Cyclin/Cdk-Komplexe.

Eintritt der Zelle aus der G<sub>0</sub>- in die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus (Sherr 1994). Im Unterschied zu den anderen Cyclin-Proteinen wird Cyclin D im Verlauf des Zellzyklus nicht periodisch gebildet, sondern nur solange ein Wachstumsfaktor- oder mitogener Stimulus vorhanden ist (Assoian et al 1997). Cyclin D

fungiert also sozusagen als Wachstumssensor der Zelle und verknüpft mitogene Stimuli mit dem Zellzyklus. Ein weiteres Cyclin-Protein, welches den Übertritt der Zelle aus der G<sub>1</sub>- in die S-Phase reguliert und an Cdk2 bindet, ist Cyclin E (Ohtsubo et al 1995). Das Cyclin A-Protein assoziiert ebenfalls mit Cdk2. Dieser Komplex wird im Verlauf der S-Phase benötigt (Girard et al 1991). Darüber hinaus bindet Cyclin A in der späten G<sub>2</sub>- und frühen M-Phase des Zellzyklus an Cdk1 und treibt dadurch den Eintritt der Zelle in die M-Phase voran. Die Mitose-Phase wird ferner durch den Komplex aus Cyclin B und Cdk1 reguliert (King et al 1994; Arellano et al 1997). Aufgrund einer bestimmten Signalsequenz (nuclear exclusion signal) verbleibt das Cyclin B-Protein bis zum Beginn der Mitose außerhalb des Zellkerns. Dadurch wird ein zu frühes Einsetzen der Mitose der Zelle verhindert (Vermeulen et al 2003)

Am Ende des Zellzyklus werden die Cyclin-Proteine mit Hilfe spezifischer Enzymsysteme an Ubiquitinmoleküle gekoppelt und im Anschluss daran proteasomal abgebaut. Für den effizienten Ablauf dieser Proteolyse enthalten die Proteinsequenzen der Cycline bestimmte Abschnitte wie z.B. eine so genannte „destruction box“ im Falle der Cycline A und B bzw. eine PEST-Sequenz (reich an Prolin- (P), Glutaminsäure- (E), Serin- (S) und Threonin- (T) Resten) im Falle der Cycline D und E (Glutzer et al 1991; Rechsteiner et al 1996). Neben der Bindung an Cyclin-Proteine wird die Aktivität der Cdk auch durch Phosphorylierung bestimmter Threonin- und Tyrosin-Reste reguliert. Durch diese Phosphorylierung kommt es zu Konformationsänderungen der Cdk-Proteine und einer verstärkten Bindung an die Cycline

(Jeffrey et al 1995; Paulovich et al 1995). Im Falle der Cdk1 wurden jedoch auch inhibitorische Phosphorylierungen durch bestimmte Kinasen beschrieben, welche zur Inaktivierung der Cdk1 führen. Die Dephosphorylierung dieser Aminosäurereste in diesem Fall durch das Enzym Cdc25 ist daher für die Aktivierung der Cdk1 und den Fortschritt des Zellzyklus notwendig (Lew et al 1996).

#### **1.4.4. Cdk-Inhibitoren**

Die Aktivität der Cdk-Proteine kann durch inhibitorische Proteine des Zellzyklus, die so genannten Cdk-Inhibitoren (CKI), antagonisiert werden. Diese CKI binden an die Cdk-Proteine oder Komplexe aus Cdk und Cyclin und regulieren dadurch die Aktivität der Cdk. Man unterscheidet zwei Familien von CKI-Proteinen, die INK4- und die Cip/Kip-Familie (Sherr et al 1995). Zur INK4-Familie gehören die Proteine p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c) und p19 (INK4d), welche spezifisch die in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus aktiven cyclinabhängigen Kinasen 4 und 6 inaktivieren. Die CKI der INK4-Familie bilden dabei stabile Komplexe mit dem Cdk-Enzym noch bevor eine Bindung mit dem jeweiligen Cyclin erfolgt, d.h. sie verhindern eine Assoziation mit Cyclin D-Proteinen (Carnero et al 1998).

Zur zweiten Familie der CKI, der Cip/Kip-Familie, gehören die Proteine p21 (Waf1, Cip1), p27 (Kip1, Cip2) und p57 (Kip2). Diese CKI inaktivieren bereits gebildete Komplexe aus Cdk- und Cyclin-Proteinen vor allem in der G<sub>1</sub>-Phase und in geringerem Ausmaß Komplexe aus Cdk1 und Cyclin B (Polyak et al 1994; Harper et al 1995; Lee et al 1995; Hengst et al 1998).

Die Regulation der CKI-Proteine erfolgt sowohl durch interne Signale wie z.B. die transkriptionelle Kontrolle der Expression von p21 durch das p53 Tumorsuppressorgen (el Deiry et al 1993) als auch durch externe Signale, z.B. die vermehrte Expression und Aktivierung von p15 und p27 bei Einwirkung von TGF- $\beta$ , welche zum Wachstumsarrest der Zelle führt (Hannon et al 1994; Reynisdottir et al 1995).

#### **1.4.5. Substrate der Cdk-Enzyme**

Die aktivierten Cdk-Proteine phosphorylieren Zielproteine an bestimmten Cdk-Erkennungssequenzen. Dadurch werden Veränderungen induziert, die für das Fortschreiten des Zellzyklus wichtig sind. Das Substrat des Cdk4/6-CyclinD-Komplexes, das Produkt des Retinoblastoma Tumorsuppressorgens (pRb), ist das am besten untersuchte Zielprotein der Cdk-Proteine. In der frühen G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus wird pRb phosphoryliert. Dies führt zur Auflösung des Komplexes aus pRb und dem Histondeacetylase Protein (HDAC) und zur

Freisetzung der Transkriptionsfaktoren E2F-1 und DP-1. Diese verstärken daraufhin die Transkription verschiedener Gene (z.B. *cyclin A*, *cyclin E*, *cdc25*), deren Produkte für den Eintritt und das Fortlaufen der S-Phase des Zellzyklus benötigt werden (Buchkovich et al 1989; Kato et al 1993; Brehm et al 1998). Der Cdk2-CyclinE-Komplex ist an der Aufrechterhaltung der Hyperphosphorylierung des pRb-Proteins für den Rest des Zellzyklus beteiligt. Darüber hinaus phosphoryliert dieser Komplex auch den CKI p27 am Aminosäurerest Thr 187, wodurch dessen proteasomaler Abbau induziert wird (Hinds et al 1992; Montagnoli et al 1999; Vlach et al 1997). Ein weiteres Zielprotein des Cdk2-Cyclin E- und auch des Cdk1-Cyclin B-Komplexes ist das Protein Histon H1. Die Phosphorylierung von Histon H1 spielt eine Rolle bei der Chromosomenkondensation im Verlauf der DNA-Replikation (Bradbury et al 1974). Weitere Cdk-Substrate sind die DNA-Polymerase-alpha-Primase sowie Proteine des Zytoskeletts wie z.B. nukleäre Lamine, Mikrotubuli und Vimentin, die für den korrekten Ablauf der Mitose benötigt werden (Voitenleitner et al 1997; Heald et al 1990; Courvalin et al 1992; Hoffmann et al 1993; Blangy et al 1995).

#### **1.4.6. Kontrollpunkte des Zellzyklus: „Restriction points“ und „Checkpoints“**

Der „restriction point“ R des Zellzyklus ist als der Punkt in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus definiert, nach dem die Zelle praktisch verpflichtet ist, in den Zellzyklus einzutreten und ihn auch zu beenden. Nach Überschreiten des R-Punkts gibt es für die Zelle in Bezug auf die Absolvierung des Zellzyklus also, einfach formuliert, kein zurück mehr. Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass Zellen, denen vor dem R-Punkt das Serum im Medium entzogen wurde, in eine Art G<sub>0</sub>-Phase eintreten. Dagegen durchliefen Zellen, denen nach dem R-Punkt das Serum entzogen wurde, den vollständigen Zellzyklus und wurden erst dann in der G<sub>0</sub>-Phase arretiert (Pardee 1974). Das bedeutet, dass nur ein kleiner Teil zu Beginn des Zellzyklus von der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren abhängig ist und von diesen reguliert wird. Die Zelle tritt also nur dann in den Zellzyklus ein, wenn bis zu einem bestimmten Zeitpunkt genügend Wachstumsfaktoren vorhanden sind, welche die Absolvierung des Zellzyklus ermöglichen (Jones et al 2001). Neben dem R-Punkt existieren noch mehrere andere Kontrollpunkte, sogenannte „Checkpoints“, innerhalb des Zellzyklus. Bis heute wurden Kontrollpunkte für DNA-Schädigungen und zur Kontrolle des Spindelapparates beschrieben (Hartwell et al 1989). Am „Spindel-Checkpoint“ werden ungenaue Anordnungen der Chromosomen auf der mitotischen Spindel detektiert. Der Zellzyklus wird in einem solchen Fall in der Metaphase gestoppt (Vermeulen et al 2003).

Bei Schädigung der DNA wird die Zelle aufgrund des Kontrollpunkts im Zellzyklus arretiert, um Zeit für eine Reparatur der DNA zu erhalten, bevor sich die Zelle teilt. Solche Kontrollpunkte für DNA-Schädigungen sind unter anderem am Übergang der Zelle in die S-Phase (G<sub>1</sub>-S-Checkpoint) und in der Phase nach der DNA-Replikation (G<sub>2</sub>-M-Checkpoint) lokalisiert. Am G<sub>1</sub>-S-Checkpoint ist der durch DNA-Schädigung induzierte Zellzyklusarrest abhängig vom Protein p53. Bei Schädigung der DNA kommt es dabei zu einer raschen Aktivierung verschiedener Proteinkinasen (z.B. ATM ataxia-telangiectasia-mutated, ATR ataxia and rad3 related), welche das p53-Protein phosphorylieren und dadurch aktivieren (Levine 1997; Siliciano et al 1997). Das p53-Protein stimuliert die Transkription verschiedener Gene wie z.B. des *p21*-, *Mdm2*- und *Bax*-Gens. Die Induktion des CKI-Proteins p21 führt zur Inhibition von Cdk-Cyclin-Komplexen und löst dadurch einen Zellzyklusarrest aus (Agarwal et al 1998). Im Falle einer sehr starken Schädigung der DNA induziert p53 den Tod der Zelle durch Aktivierung von Genen, welche an apoptotischen Signalwegen (z.B. *bax*, *fas*) und der Induktion von oxidativem Stress beteiligt sind (Owen-Schaub et al 1995; Polyak et al 1997; Gottlieb et al 1998). Eine Schädigung der DNA am G<sub>2</sub>-M-Checkpoint führt in An- oder auch Abwesenheit von p53 zur Induktion eines Zellzyklusarrests. Unter Beteiligung von p53 kommt es analog zum G<sub>1</sub>-S-Checkpoint zur vermehrten transkriptionellen Aktivierung des *p21* Gens, aber auch des Gens für das 14-3-3-sigma Protein, welches den intrazellulären Transport verschiedener Proteine reguliert. Durch vermehrte Bindung von Cyclin B an 14-3-3-sigma wird es aus dem Zellkern entfernt und dadurch ein Fortschreiten des Zellzyklus in die Mitose-Phase verhindert.

## 1.5. Zielsetzung der Arbeit:

Im Vorfeld dieser Doktorarbeit wurde gezeigt, dass das Magenbakterium *H. pylori* in der Lage ist, die Proliferation humaner T-Lymphozyten zu hemmen (z.B. Knipp et al 1993, Knipp et al 1994; Chen et al 2000). Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist die Identifizierung des für die Inhibition der T-Zell-Proliferation verantwortlichen Faktors von *H. pylori*. Im Labor stehen verschiedene Mutanten des Keims zur Verfügung, die bereits bekannte Virulenzfaktoren (z.B. CagA, VacA, BabA; siehe 1.1.2.) nicht exprimieren. Durch Verwendung dieser Mutanten soll eine mögliche Beteiligung der erwähnten Virulenzfaktoren am proliferationshemmenden Effekt von *H. pylori* gegenüber T-Zellen bestimmt werden. Sollte es sich um einen neuen, in diesem Zusammenhang nicht beschriebenen Faktor handeln, soll dieser mit Hilfe chromatographischer Techniken aus den Bakterien aufgereinigt und identifiziert werden.



Als nächstes sollen die Mechanismen der T-Zell-Proliferationshemmung durch Produkte von *H. pylori* charakterisiert werden. Da es Hinweise auf zytotoxische Wirkungen von *H. pylori* gegenüber T-Zellen gibt (Wang et al 2001), soll die Induktion von Apoptose als mögliche Ursache der Proliferationshemmung gegenüber T-Zellen analysiert werden.

Darüber hinaus sollen die an der Hemmung der T-Zell-Proliferation durch *H. pylori* beteiligten Signalwege charakterisiert werden. Dabei soll die Frage geklärt werden, ob und welche Mechanismen der T-Zell-Aktivierung (siehe 1.3.) durch Produkte von *H. pylori* beeinflusst werden und wie es dadurch zur Antagonisierung der T-Zell-Proliferation kommt.

Eine denkbare Ursache für die Inhibition der T-Zell-Proliferation durch *H. pylori*, die innerhalb dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden soll, ist die Induktion eines Arrests im Zellzyklus der T-Zellen (siehe 1.4.). Mit Hilfe von Western-Blot Versuchen sollen Veränderungen der zellulären Spiegel regulatorischer Proteine des Zellzyklus wie der Cycline, Cdk und Cdk-Inhibitoren (z.B. p27), aber auch die Rolle von Checkpointproteinen wie p53 und Rb bei Inkubation der Zellen mit Produkten von *H. pylori* erforscht werden. Darüber hinaus sollen mit Hilfe von FACS-Analysen Einflüsse dieser Produkte auf den Ablauf des Zellzyklus in T-Lymphozyten untersucht werden.

## 2. Material und Geräte

### 2.1. Häufig verwendete Puffer und Medien

Alle Puffer und Medien werden mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

#### 2.1.1. Puffer

- 1xPBS  
137mM NaCl  
1,5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
4,3mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
2,6mM KCl  
pH 7,4 (muss nicht eingestellt werden)
- 1xTBS  
20mM Tris Base  
150mM NaCl  
pH 7,4 (HCl)
- 1xTAE  
40mM Tris Base  
1mM EDTA  
0,7% Essigsäure (v/v) (100%)  
pH 7,0 (NaOH)

#### 2.1.2. Bakteriennährmedien

- LB-Agar  
0,5% (w/v) NaCl  
0,5% (w/v) Hefeextrakt  
1,0% (w/v) Trypton  
1,5% (w/v) Agar  
pH 7,4 (NaOH)  
- autoklavieren, auf 50-60°C abkühlen lassen, mit

Antibiotikum (z.B. 100µg/ml Ampicillin, 25µg/ml Kanamycin) versetzen, in Kulturschalen gießen und erkalten lassen, bei 4 °C lagern

- LB-Medium
  - 1,0% (w/v) Trypton
  - 0,5% (w/v) Hefeextrakt
  - 1,0% (w/v) NaCl
  - pH 7,4 (NaOH)
  - autoklavieren, auf 50-60 °C abkühlen lassen, mit Antibiotikum (s. oben) versetzen, bei 4 °C lagern
  
- BHI-Medium
  - 3,7% (w/v) BHI Broth (Fa. ICN)
  - autoklavieren, auf 50-60 °C abkühlen lassen, mit Antibiotikum (s. oben) versetzen, bei 4 °C lagern
  
- BHI-Agar
  - 5,2% (w/v) BHI Agar (Fa. ICN)
  - siehe LB-Agar (oben)
  
- WC-Agar
  - 4,3% (w/v) WC Agar (Fa. Oxoid)
  - siehe LB-Agar (oben)

## 2.2. Chemikalien

Die innerhalb dieser Doktorarbeit verwendeten Chemikalien stammten, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) und Applichem (Darmstadt).

## 2.3. Geräte und sonstige Materialien

- Thermocycler Fa. Biometra
- pH-Meter Fa. WTW
- pH-Elektrode Fa. Neolab
- Laborwaage Fa. Kern

- Laborfeinwaage Fa. Sartorius Analytic
- Vortex Schüttler Fa. Bender&Hobein AG
- Kühlschrank 4-8 °C Fa. Bosch
- Gefrierschrank -20 °C Fa. Liebherr
- Gefrierschrank -80 °C Fa. GFL
- Zellkultur Brutschrank Fa. Heraeus
- Brutschrank mit HEPA-Filter für *H. pylori* Kultur Fa. Forma Scientific Inc.
- Sterilbank mit S2 Zertifikat + Zubehör Fa. BDK
- Mikroskop Fa. Zeiss
- Tischzentrifuge Fa. Eppendorf
- Tisch-Kühlzentrifuge Fa. Eppendorf
- Ultrazentrifuge Fa. Beckman
- UV/Vis Spektrophotometer Fa. Eppendorf
- Thermomixer Fa. Eppendorf
- Schüttel-Heizwasserbad Fa. GFL
- Netzgerät für Gelelektrophorese und Western Blot Fa. BioRad
- Elektrophoresesystem (XCell™ Sure Lock) und  
Western-Blot System (XCell™ II Blot Module)  
mit Zubehör Fa. Invitrogen
- Heizbarer Magnetrührer Fa. IKA
- Kolbenhubpipetten mit Zubehör Fa. Eppendorf
- Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 48-, 96-well) Fa. BD Labware
- Zellkulturflaschen (12,5; 75; 175 cm<sup>2</sup>) Fa. BD Labware
- Zellkulturschalen (Ø 10, 20mm) Fa. BD Labware
- Sterilfilter 0,2µM Fa. Nalgene
- Serologische Pipetten (1, 2, 5, 10, 25ml) Fa. BD Labware
- Safe Lock Reaktionsgefäße (0,5; 1,0; 2,0ml) Fa. Eppendorf
- Rundbodenröhrchen 5ml mit Deckel für  
Durchflusszytometrie Fa. BD Labware
- Glas-Pasteurpipetten 150mm Volac
- Neubauer Zählkammer  
(Tiefe: 0,1mm; 0,0025mm<sup>2</sup>) Fa. Brand
- Kryoröhrchen (1,5ml) Fa. Nalgene

- Konische Zentrifugationsröhrchen (15, 50ml) Fa. BD Labware
- Glasgeräte (Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Messzylinder, Glasflaschen mit Schraubverschluss etc.) Fa. VWR
- Bakterienkulturschalen Fa. Schubert&Weiss
- Reaktionsgefäßständer Fa. Neolab
- Einmalspritzen (1, 5, 10, 30ml) Fa. Codan Medical
- Multipipette (Multipipette plus) Fa. Eppendorf
- Spitzen für Multipipette (0,5; 5ml) Fa. Eppendorf
- 8-Kanal-Pipette Fa. Abimed
- Einmalküvetten halbmikro 1,5ml Fa. Brand GmbH
- UV-Küvetten (steril, pyrogenfrei ) 50-2000µl Fa. Eppendorf
- Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten Fa. Biozym Scientific
- Autoklaven-Indikatorband Fa. 3M
- Zellstofftücher fusselfrei Fa. Kimberly-Clark
- Latex-Untersuchungshandschuhe Fa. Kimberly-Clark
- Nitril-Untersuchungshandschuhe Fa. Kimberly-Clark
- PCR-Reaktionsgefäße 0,2ml Fa. Biozym
- Filmkassetten Fa. Kodak
- Eisbad Fa. Neolab
- Stickstofftank Fa. MVE Cryogenics
- Verschlussfolie (Parafilm) Fa. Pechiney Plastic Packaging
- Ultraschall-Desintegrator mit Mikrospitze Fa. Branson
- Autoklav Fa. KSG
- Mikrowellengerät Fa. Siemens
- Bakterienerschüttler (für *E. coli* Kultur) Fa. Gerhardt
- Abzug Fa. Köttermann
- Orbital-Schüttler (für *H. pylori* Kultur) Fa. Peqlab
- Impfschlingen (1, 10µl) Fa. Sarstedt
- Plastik-Drygalskyspatel (steril) Fa. VWR
- Stieltupfer (steril) Fa. Lohmann&Rauscher
- Glasfaserfilter (6,3x3,8 inch) Fa. Packard Instruments B.V.
- Kühlbare Zellkulturzentrifuge Fa. Hettich
- ELISA-Reader Fa. Thermo Labsystems

- Durchflusszytometer FACSCalibur mit Zubehör Fa. BD Biosciences
- Zell-Harvester Fa. Molecular Devices
- $\beta$ -Counter Fa. Packard Instruments
- Eismaschine Fa. Scotsman

## 2.4. Zelllinien

- **CCRF-CEM**

Beschreibung: Eine T-Zell-Linie aus dem peripheren Blut einer 4-jährigen Kaukasierin mit akuter lymphoblastoider Leukämie.

Spezies: human

Morphologie: Lymphoblasten (humane akute lymphoblastoide Leukämie); adhärent

Erhalten von: ATCC, Rockville, Maryland, USA

Nährmedium: RPMI + 20% FCS

Inkubation: 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>

- **EL-4.IL-2**

Beschreibung: Eine T-Zell-Linie, die aus einem Lymphom, welches durch 9,10-Dimethyl-1,2- Benzantracen in einer C57/BL6-Maus induziert wurde, etabliert wurde.

Spezies: Maus

Morphologie: Lymphoblasten; Suspension

Erhalten von: ATCC, Rockville, Maryland, USA

Nährmedium: DMEM + 10% Pferdeserum

Inkubation: 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>

- **Jurkat**

Beschreibung: Eine T-Zell-Linie, die aus einer humanen, akuten T-Zell-Leukämie etabliert wurde.

Spezies: Human

Morphologie: Lymphoblasten; Suspension

Erhalten von: ATCC, Rockville, Maryland, USA

Nährmedium: RPMI + 10% FCS

Inkubation: 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>

- **Jurkat cyclinD3**

Beschreibung: siehe Jurkat; stabil transfiziert mit Konstrukt zur Überexpression des Cyclin D3-Proteins (Klon S8)

Spezies: Human

Morphologie: Lymphoblasten; Suspension

Erhalten von: Dr. S. Sharma, Dept. of Pediatrics, Providence, RI, USA

Nährmedium: RPMI + 10% FCS

Inkubation: 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>

- **Kato III**

Beschreibung: Erhalten aus einer Metastase eines Magenkarzinoms in einem 55-jährigen männlichen Down-Syndrom Patienten.

Spezies: Human

Morphologie: spherisch; adhärent

Erhalten von: ATCC, Rockville, Maryland, USA

Nährmedium: RPMI + 20% FCS

Inkubation: 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>

- **Embryonale Maus-Fibroblasten (p27 +/+; p27 -/-)**

Spezies: Maus

Morphologie: Fibroblasten

Erhalten von: Dr. L. Hengst, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

Nährmedium: DMEM, 10% FCS, 1mM Na-Pyruvat

Inkubation: 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>



## 2.5. Plasmid-DNA Vektoren

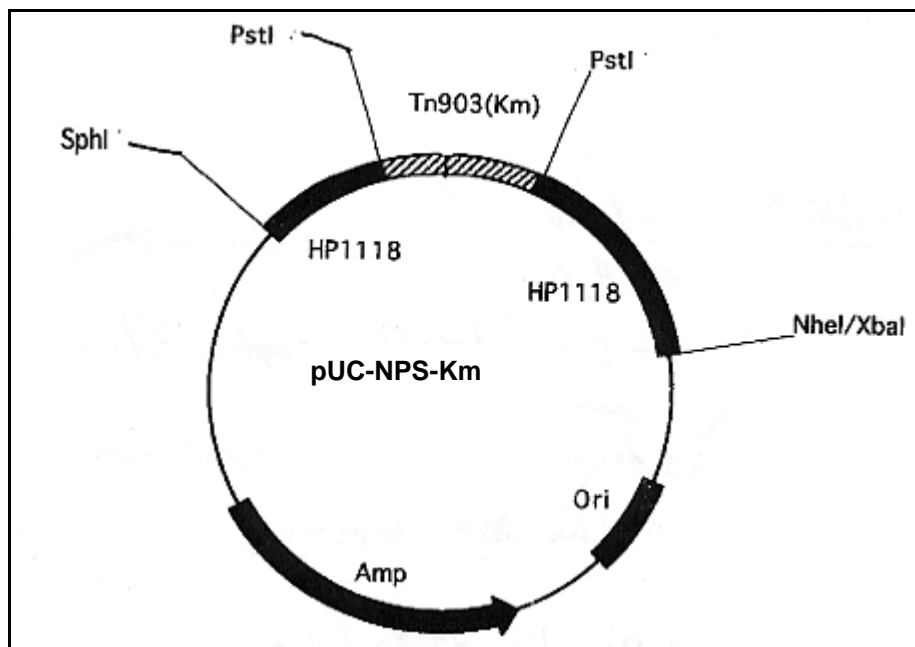
- **GGT-knock out Plasmid (pUC-NPS-Km)**

Beschreibung: Plasmid-DNA zur Herstellung von GGT-defizienten *H. pylori* Mutanten

Quelle: Dr. K. Shibayama (Nagoya University Hospital, Nagoya, Japan)

Promoter/Enhancer: Plac

Antibiotikaresistenz: Ampicillin (Selektion in *E. coli*); Kanamycin (Selektion in *H. pylori*)



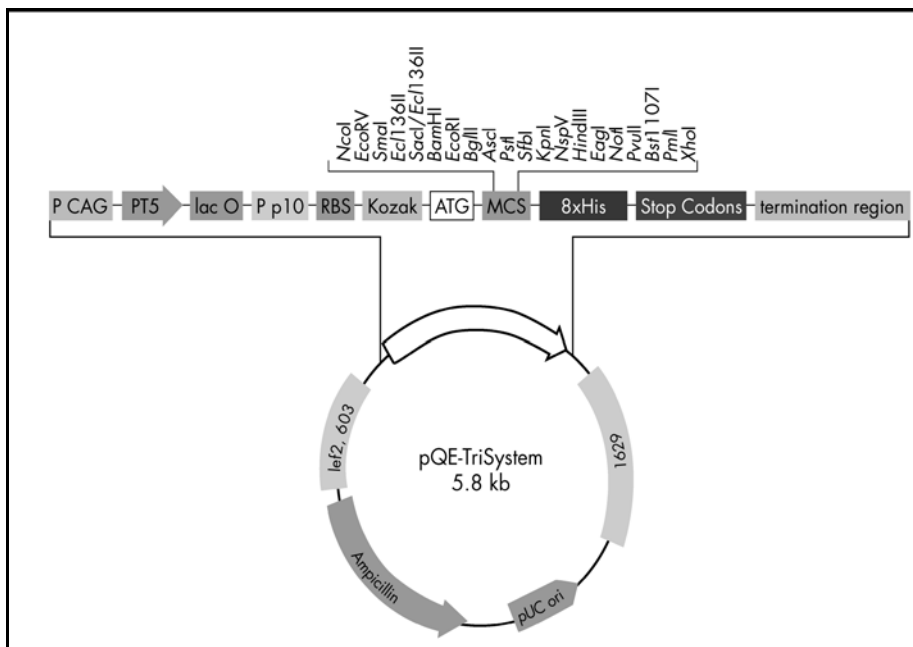
- **pQETri**

**Beschreibung:** Expressionsvektor zur rekombinanten Proteinexpression in *E. coli*, Insektenzellen und Säugerzellen.

**Quelle:** Fa. Qiagen

**Promoter/Enhancer:** T5 (Expression in *E. coli*); CAG (Expression in Säugerzellen); p10 (Expression in Insektenzellen)

**Antibiotikaresistenz:** Ampicillin



### 3. Methoden

#### 3.1. *Helicobacter pylori* Routinekultivierung

Die innerhalb der vorliegenden Arbeit verwendeten *Helicobacter pylori* Stämme und deren Herkunft sind in Tabelle 1 (s. unten) beschrieben. Zur Kultivierung der Bakterien auf Agar-Platten wird Wilkins-Chalgren- oder Brain-Heart-Infusion (BHI)-Agar und zur Anzucht in Flüssigmedium BHI-Medium verwendet, welches jeweils mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und zur Selektion von *Helicobacter*-Kulturen mit 1% eines Antibiotika-Mix (Dent-Supplement, Fa. Oxoid) versetzt wird. Zur Kultivierung verschiedener knock-out-Mutanten der Bakterien wird den Nährmedien jeweils das entsprechende Selektionsantibiotikum in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt (siehe Tabelle 1). Die Anzucht und Inkubation der Bakterien erfolgt unter mikroaerophilen (5%O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85%N<sub>2</sub>) Bedingungen in einem Brutschrank bei 37°C. Alle Arbeiten mit *H. pylori* werden unter einer sterilen Werkbank in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 (S2-Labor) durchgeführt.

Stamm	Quelle	Resistenz
G27 WT	A. Covacci (IRIS, Siena, Italien)	--
G27 ΔGGT	diese Arbeit	Kanamycin (25µg/ml)
60190 WT	R. Atherton (Uni. Nottingham, Großbritannien)	--
60190 ΔVacA	R. Atherton (Uni. Nottingham, Großbritannien)	Kanamycin (25µg/ml)
P12 WT	S. Odenbreit (LMU, München)	--
P12 ΔVacA	S. Odenbreit (LMU, München)	Chloramphenicol (6µg/ml)
84183 WT	R. Atherton (Uni. Nottingham, Großbritannien)	--
Tx30a	J. Kusters (Erasmus MC, Rotterdam, Niederlande)	--
SS1	R. Ferrero (Monash Uni., Victoria, Australien)	--
SS1 ΔGGT	diese Arbeit	Kanamycin (25µg/ml)

**Tabelle 1:** Art, Herkunft und Resistenz der verwendeten *H. pylori* Stämme.

### 3.1.1. Kultivierung auf Agar-Platten

Glycerinstocks (siehe 3.1.3.) der entsprechenden *H. pylori* Stämme werden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Bakteriensuspension wird anschließend auf die jeweilige Agarplatte (siehe oben), welche zuvor für etwa 20 min im Brutschrank vorgewärmt wurde, mit Hilfe eines sterilen Drygalsky-Spatels gleichmäßig ausgestrichen. Nachdem die Platte im Anschluss daran solange im Brutschrank inkubiert wurde, bis die Bakteriensuspension getrocknet ist, wird sie umgedreht und für unterschiedliche Zeiträume (24-72h), entsprechend der Versuchsanordnung, weiter inkubiert. Zur Passagierung der Bakterien auf eine neue Agarplatte, werden die gewachsenen Bakterien mit einem sterilen Wattestäbchen, welches zuvor mit ein wenig Nährmedium angefeuchtet wurde, von der Platte geerntet. Das Wattestäbchen wird im Anschluss daran in ein 1,5ml-Eppendorf-Röhrchen, welches 500µl steriles, vorgewärmtes (37°C) Flüssigmedium (siehe oben: BHI-Medium +10% FCS + 1% Dent-Supplement) enthält, überführt. Durch schnelles Drehen werden die geernteten Bakterien vom Wattestäbchen in das Flüssigmedium überführt, resuspendiert und auf eine neue Agarplatte, wie oben beschrieben, ausgestrichen.

### 3.1.2. Kultivierung in Flüssigmedium

Um für die Kultivierung in Flüssigmedium viele vitale und intakte Bakterien zu erhalten, werden diese zunächst auf Agarplatten kultiviert (siehe 3.1.1.). Die gewachsenen Bakterien werden dann von der Platte in ein 1,5ml-Eppendorf-Röhrchen, welches 1ml steriles, vorgewärmtes (37°C) Flüssigmedium enthält, überführt und resuspendiert (siehe 3.1.1.). Mit Hilfe eines Spektrophotometers wird die optische Dichte (OD) der Bakteriensuspension bei 590nm bestimmt. Durch Verdünnung der Ausgangssuspension mit Flüssigmedium wird die OD auf einen Wert von 0,1 eingestellt. Die erhaltene Bakteriensuspension wird darauf folgend in eine sterile Zellkulturflasche überführt und unter Verwendung eines Orbital-Schüttlers solange im Brutschrank geschüttelt (180rpm) bis die gewünschte optische Dichte erreicht ist. Mit Hilfe eines Mikroskops wird die Intaktheit und Vitalität der Bakterien zwischenzeitlich routinemäßig kontrolliert.

### 3.1.3. Herstellung von Glycerin-Stocks

Nach Kultivierung auf Agarplatten werden die Bakterien von der Platte geerntet (siehe 3.1.1.). Das Wattestäbchen wird dann in ein 1,5ml-Eppendorf-Röhrchen, welches 500µl eines sterilen Gemisches aus BHI-Broth (autoklaviert) und 20%-Glycerin (sterilfiltriert) enthält,

überführt. Die geernteten Bakterien werden in der Glycerinlösung resuspendiert (siehe 3.1.1.). Zur Herstellung von Glycerin-Stocks aus einer Flüssigkultur der Bakterien, wird ein Aliquot dieser Kultur zunächst abzentrifugiert (10000g, 1 min, RT). Der erhaltene Überstand wird verworfen und das Pellet in 500µl der BHI/Glycerin-Lösung resuspendiert. Die Bakteriensuspensionen werden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **3.1.4. Herstellung von *H. pylori* Kulturüberständen**

Um Kulturüberstände von *H. pylori*, welche die sezernierten Proteine der Bakterien enthalten, zu gewinnen, werden diese zunächst in Flüssigmedium kultiviert (siehe 3.1.2.). Sobald die Flüssigkultur eine OD von 1,0 erreicht hat (normalerweise nach ca. 24h), wird die Bakteriensuspension in Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (1500g, 10 min RT). Der erhaltene Überstand wird verworfen, das Bakterienpellet in 50ml 1xPBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert (siehe oben). Um Reste des Kulturmediums (BHI/FCS/Dent) vollständig zu entfernen, wird dieser Vorgang einmal wiederholt. Zur Gewinnung einer möglichst konzentrierten Lösung der sezernierten Proteine von *H. pylori*, wird das Bakterienpellet im Anschluss daran in einem Fünftel des Volumens der Ausgangsflüssigkultur resuspendiert (OD 5) und in einer Zellkulturflasche für 3h im Brutschrank geschüttelt (siehe 3.1.2.). Zur Gewinnung der sezernierten Proteine, wird die Bakteriensuspension anschließend in auf Eis vorgekühlte Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (3000g, 10 min, 4°C). Das erhaltene Bakterienpellet wird verworfen, der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen (auf Eis vorgekühlt) überführt und erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt. Nun erfolgt die Aufkonzentrierung des erhaltenen Kulturüberstandes per Ultrafiltration.

#### **3.1.4.1. Aufkonzentrierung der Überstände (Ultrafiltration)**

##### **3.1.4.2 Prinzip**

Die Ultrafiltration ist eine der Dialyse (siehe 3.16.1.b) verwandte Technik, die zur Aufkonzentrierung makromolekularer Lösungen verwendet wird. Dabei wird eine solche Lösung unter Druck (z.B. durch Zentrifugation) durch eine semipermeable Membran gepresst. Lösungsmittelmoleküle aber auch Makromoleküle, deren Molekulargewicht kleiner als die Porengröße der Membran sind, werden durch die Membran gedrückt. Moleküle deren Molekulargewicht größer als die Porengröße ist, verbleiben oberhalb der Membran und

werden dadurch aufkonzentriert. Es sind verschiedene Ultrafiltrationssysteme mit unterschiedlichen Membranen und Ausschlussgrenzen erhältlich. Innerhalb der vorliegenden Doktorarbeit wird eine Filtermembran mit einer Ausschlussgrenze von 10kDa verwendet.

### 3.1.4.3. Durchführung

Die Aufkonzentrierung der Kulturüberstände von *H. pylori* erfolgt unter Verwendung spezieller Zentrifugenröhrchen, welche eine Filtermembran mit einer Proteinausschlussgrenze von 10kDa enthalten (Amicon®Ultra, Fa. Millipore). Der Gebrauch dieser Zentrifugenröhrchen erfolgt gemäß der Anweisung des Herstellers. Bei Zentrifugation des Kulturüberstandes in diesen Zentrifugenröhrchen (3000g, 4°C), wird dieser durch die Filtermembran gepresst, wobei alle Proteine mit einer Größe unterhalb von 10kDa die Poren der Membran passieren können. Dagegen verbleiben alle Proteine mit einer Größe über 10kDa oberhalb der Membran. Die Zentrifugation wird solange durchgeführt, bis das Volumen des Kulturüberstandes oberhalb der Filtermembran bei etwa 5ml (bei 100ml Volumen der Ausgangsflüssigkultur) liegt. Um ein Präzipitieren von Proteinen aufgrund von zu hohen lokalen Proteinkonzentrationen zu verhindern, wird der Kulturüberstand oberhalb der Filtermembran zwischenzeitlich mehrmals durch Schütteln gemischt. Nach Beendigung der Aufkonzentrierung werden die erhaltenen Fraktionen (> und < 10kDa) zur Entfernung von Membranresten und Zelltrümmern abzentrifugiert (10000g, 10 min, 4°C). Im Anschluss daran werden die Fraktionen in 500µl-Aliquots auf vorgekühlte 1,5ml Eppendorf-Röhrchen verteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Um den Proteingehalt der Fraktionen zu bestimmen, wird eine Bradford-Proteinbestimmung (siehe 3.4.) durchgeführt.

### 3.1.5. Isolierung von RNA aus *H. pylori*

Um die RNA aus den Bakterien zu isolieren, werden diese zunächst auf Agarplatten kultiviert (siehe 3.1.1.). Die gewachsenen Bakterien werden dann mit 1ml Lyse-Puffer (7,2M Harnstoff + 1,2% SDS + 35mM NaCl + 15mM EDTA in 10mM Tris/HCl) von der Platte abgespült, in ein steriles 2ml-Eppendorf-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt. Beim Auftragen des Puffers auf die Bakterienplatte kommt es, aufgrund der hohen Harnstoff-Konzentration direkt zur Lyse der Bakterien, wodurch sich ein zähflüssiges Lysat bildet, welches sich durch mehrmaliges Pipettieren von der Agarplatte abspülen lässt. Zum Lysat werden 80µl Natriumacetat (1M), 800µl Phenol und 200µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) pipettiert. Die Suspension wird gut gemischt (Vortex) und für 20-30 min auf Eis inkubiert, bis es zur

Trennung der wässrigen und phenolischen Phase kommt. Nach Zentrifugation (15000rpm, 30 min, 4°C) wird die wässrige Phase abgenommen und zur Ausfällung der RNA mit dem gleichen Volumen Isopropanol (100%) versetzt. Die Fällung erfolgt über Nacht bei -20°C. Am nächsten Tag wird die ausgefällte RNA abzentrifugiert (15000 rpm, 4°C, 1 min). Das erhaltene Pellet wird zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen (Zentrifugation: 15000rpm, 4°C, 1min), für etwa 5-10 min an der Luft getrocknet und in einem adäquaten Volumen an H<sub>2</sub>O gelöst. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgt mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers bei einer Wellenlänge von 260nm (siehe 3.17.3.).

### **3.1.6. Isolierung von DNA aus *H. pylori***

#### **3.1.6.1. Prinzip**

Um die chromosomale DNA aus den Bakterien zu isolieren, wird ein kommerziell erhältlicher Kit (High Pure PCR Template Preparation Kit, Fa.Roche) verwendet. Mit diesem Kit werden Zellen durch kurze Inkubation mit Proteinase K in der Anwesenheit eines chaotropen Salzes (Guanidiniumhydrochlorid) lysiert, wobei auch vorhandene Nukleasen inaktiviert werden. Die freigesetzten Nukleinsäuren werden dann an Glasfasern in einem mitgelieferten Filterröhrchen gebunden. Durch mehrere Waschschriffe werden zelluläre Verunreinigungen entfernt. Die DNA wird schließlich mit einem Nidrigsalzpuffer von der Glasfasermatrix eluiert. Im Vergleich zu anderen Methoden (z.B. Phenolextraktion der DNA) ist diese Methode in deutlich kürzerer Zeit für viele Proben durchführbar.

#### **3.1.6.2. Durchführung**

Die Bakterien werden auf Agarplatten kultiviert, in einem 2ml Eppendorf-Röhrchen in 1ml 1xPBS resuspendiert und zweimal gewaschen (Zentrifugationen: 3000g, 5 min, RT). Das erhaltene Zellpellet wird mit einer 100µl-Pipette in 200µl 1xPBS resuspendiert. Zur Lyse der Bakterienzellen wird Lysozym (Endkonzentration: 250µg/ml) zur Probe pipettiert und diese für 15 min bei 37°C (Heizblock) inkubiert. Die weitere Durchführung der DNA-Isolierung aus *H. pylori* erfolgt gemäß den Herstellerangaben. Die Bestimmung der DNA-Konzentration der erhaltenen Probe erfolgt mittels eines UV-Photometers (siehe 3.18.3.). Bis zur weiteren Verwendung wird die DNA bei 4°C oder für längere Zeiträume bei -20°C gelagert.

### 3.1.7. Transformation von *H. pylori* zur Herstellung von knock-out

#### Mutanten

Die Transformation von *H. pylori* mit DNA erfolgt im Rahmen dieser Doktorarbeit durch natürliche Transformation (Prinzip der homologen Rekombination). Zum Einbringen von DNA (chromosomal oder Plasmid-DNA) in *H. pylori* werden die Bakterien zunächst auf Agarplatten angezüchtet (siehe 3.1.1.). Dann werden die Bakterien mit einer Impföse von der Platte geerntet, auf einer neuen Agarplatte auf mehrere, etwa pfenniggroßen Bereiche (Plaques) verteilt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Dann werden 10µg der jeweiligen DNA auf je einen Plaque pipettiert. Die Agarplatten werden im Anschluss daran über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag werden die Plaques unter Verwendung steriler Impfösen von der Platte geerntet und auf neue Agarplatten, welche das zur Selektion der entstandenen Mutanten nötige Antibiotikum (z.B. Kanamycin) enthält, passagiert. Diese Selektionsplatten werden solange im Brutschrank inkubiert, bis erste Einzelkolonien erkennbar sind. Diese werden dann mit Impfösen einzeln auf einen Bereich einer neuen Selektionsplatte überführt, die zuvor in mehrere Abschnitte unterteilt wurde. Die Einzelklone werden in der Folgezeit solange mit Impfösen ausgebreitet, bis der jeweilige Abschnitt der Selektionsplatte vollständig mit Kolonien des jeweiligen Klons bewachsen ist. Dann werden die Klone geerntet und auf jeweils eine neue Selektionsplatte überführt. Am Schluss wird aus den erhaltenen Mutanten DNA bzw. RNA isoliert (siehe 3.1.5. und 3.1.6.) und mittels Durchführung einer PCR-Reaktion (siehe 3.20.) unter Verwendung spezifischer Primerpaare kontrolliert, ob die Transformation der Bakterien erfolgreich war. Von den erfolgreich auf diese Weise hergestellten Mutanten werden Glycerinstocks (siehe 3.1.3.) und Kulturüberstände (siehe 3.1.4.) für weitere Versuche hergestellt.

#### 3.1.7.1. Herstellung von GGT-defizienten Mutanten

Die innerhalb dieser Doktorarbeit verwendeten GGT knock-out ( $\Delta$ GGT) Mutanten verschiedener *H. pylori* Stämme werden durch natürliche Transformation der Bakterien (siehe 3.1.7.) hergestellt. Die dafür notwendige Plasmid-DNA (puC-NPS-Km) wurde freundlicherweise von Dr. K. Shibayama (Nagoya University Hospital, Nagoya, Japan) zur Verfügung gestellt. Die Plasmid-DNA wird zunächst in *E. coli* Bakterien eingebracht (siehe 3.22.e) und vermehrt. Nach Aufreinigung der Plasmid-DNA (siehe 3.18.) werden *H. pylori* Bakterien damit transformiert. Die Selektion der  $\Delta$ GGT Mutanten erfolgt mit WC-Dent-Agarplatten, denen das Selektionsantibiotikum Kanamycin (25µg/ml) zugesetzt wurde. Die



erfolgreiche Insertion des GGT-knock-out-Plasmids wird mittels eines entsprechenden Primerpaares durch PCR (siehe 3.20. und Tabelle 6) sowie GGT-Enzymtest (siehe 3.12.) und Western-Blot (3.8.) der Kulturüberstände der Mutanten überprüft.

## **3.2. Zellkultur**

Alle Arbeiten mit den verwendeten Zellkulturen und aufgereinigten primären Zellen werden unter aseptischen Bedingungen an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Es werden ausschließlich sterile Materialien verwendet (u. a. einzeln steril verpackte Einmalpipetten und Zellkulturplatten/-flaschen; autoklavierte Glasflaschen, Kolbenhubpipetten, autoklavierte Pipettenspitzen). Die für die Arbeit mit Zellkulturen hergestellten Puffer und Lösungen werden zuvor autoklaviert oder sterilfiltriert (Porendurchmesser: 0,22µm). Alle verwendeten Zelllinien und primären Zellen werden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert und inkubiert. Vor jeder Arbeit mit den Zellkulturen werden diese mikroskopisch auf Vitalität, Zelldichte und vorhandene Kontaminationen überprüft.

### **3.2.1. Routinekultivierung der Zellkulturen**

Die verwendeten Zelllinien werden ausschließlich in dem für die jeweilige Zelllinie angegebenen Kulturmedium (siehe 2.4.) kultiviert. Das verwendete Serum (FCS und Pferdeserum) wird zunächst hitzeinaktiviert (30 min 56°C im Wasserbad) und bis zum Einsatz in der Zellkultur in Aliquots (50ml) bei -20°C gelagert. Die Passagierung der Zellen erfolgt je nach Wachstumsrate 2-3 mal wöchentlich (Montag, Mittwoch, Freitag).

### **3.2.2. Passagierung**

#### **3.2.2.1. Suspensionszellkultur**

Die Zellen einer Suspensionskultur werden zur Passagierung aus der Kulturflasche in ein Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (300g, 10 min, RT). Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 10ml 1xPBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (siehe oben). Der Überstand wird erneut verworfen und das Pellet in 10ml Zellkulturmedium (inklusive Serum) resuspendiert. Anschließend wird ein Aliquot dieser Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Zellkulturmedium überführt.

### 3.2.2.2. Adhärenente Zellkultur

Zur Passagierung der adhärenenten Zellen wird zunächst das vorhandene Medium mit einer sterilen Pasteur-Pipette abgesaugt. Der Zellrasen wird anschließend mit 1xPBS gewaschen. Nach Absaugen wird Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen pipettiert. Die Zellen werden dann für etwa 5 min im Brutschrank inkubiert, bis sie sich vom Boden der Zellkulturflasche lösen. Durch vorsichtiges Schlagen und Schwenken der Flasche werden die Zellen weiter vom Boden gelöst. Das vollständige Ablösen der Zellen wird mikroskopisch kontrolliert. Durch Zugabe von Zellkulturmedium inklusive Serum in vierfacher Menge des Trypsin/EDTA-Volumens (siehe oben) wird die Trypsinreaktion aufgrund eines im Serum enthaltenen Trypsininhibitors gestoppt. Die Zellen werden durch mehrmaliges Pipettieren mit einer Einmalpipette resuspendiert. Ein Aliquot dieser Zellsuspension wird dann in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium (inklusive Serum) überführt.

### 3.2.3. Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung werden adhärenente Zellen zunächst, wie unter 3.2.2.2. beschrieben, trypsiniert. Eine vorbereitete Neubauer-Zählkammer wird möglichst luftblasenfrei mit 10µl einer Verdünnung der Zellsuspension (1:10-1:100 je nach Dichte der Zellsuspension) gefüllt. Bei jeder Zellzahlbestimmung werden 8 Quadrate der Zählkammer, bestehend aus je 16 Kleinstquadraten (Volumen von 16 Kleinstquadraten: 0,1µl), ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl in der Zellsuspension erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Zellzahl in 8 Quadraten} / 8) \times 10000 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 3.2.4. Herstellung von Kryostocks

Adhärenente Zellen werden zunächst trypsiniert (siehe 3.2.2.2.). Die Zellsuspension adhärenenter Zellen oder Suspensionszellen wird in ein Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (300g, 10 min RT). Der Überstand wird abgenommen und verworfen und das Zellpellet in 10ml auf Eis vorgekühltes FCS mit 10% DMSO aufgenommen und resuspendiert. Im Anschluss daran wird die Suspension in auf Eis vorgekühlte, beschriftete Kryoröhrchen überführt. Zur schonenden Abkühlung der Zellsuspension werden die Kryoröhrchen in eine Styroporbox gelegt und für 24-72h bei -80°C gelagert, bevor sie, zur weiteren Lagerung, in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt werden. Zum Auftauen der Zellkulturen aus Kryostocks wird die benötigte Anzahl Kryoröhrchen aus dem Stickstoffbehälter entnommen

und die darin enthaltene Zellsuspension auf Eis aufgetaut. Dann wird die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen mit 50ml Medium (ohne Serum) überführt, um das in der Gefrierlösung enthaltene zytotoxische DMSO zu verdünnen, und abzentrifugiert (300g, 10 min, RT). Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 5ml Kulturmedium (inklusive Serum) resuspendiert, in eine Zellkulturflasche mit Kulturmedium überführt und im Brutschrank inkubiert.

### 3.2.5. Isolierung primärer, humaner Zellen

Die innerhalb dieser Doktorarbeit verwendeten primären humanen Zellen (PBMC und T-Lymphozyten) wurden aus frisch entnommenem, heparinisiertem Blut gesunder, freiwilliger Personen isoliert.

#### 3.2.5.1. Isolierung von PBMC aus Vollblut

##### 3.2.5.1.1. Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation

Die Art der Trennung unterschiedlich großer oder dichter Partikel, wie z.B. der verschiedenen Zelltypen im Blut, durch Zentrifugation hängt von verschiedenen Faktoren ab. Diese Faktoren werden durch das Stokesche Gesetz berücksichtigt, mit dessen Hilfe die Sedimentationsgeschwindigkeit verschieden großer oder dichter Partikel nach folgender Formel berechnet werden kann:

$$V = \frac{d^2 \rho (\rho_p - \rho_M)}{18 \eta} xg \quad (1)$$

Dabei sind:

V: Sedimentationsgeschwindigkeit (m/s)

D: Partikeldurchmesser

$\rho_p$ : Dichte des Partikels ( $\text{kg/m}^3$ )

$\rho_M$ : Dichte des Zentrifugationsmediums ( $\text{kg/m}^3$ )

$\eta$ : dynamische Viskosität des Zentrifugationsmediums ( $\text{Ns/m}^2$ )

g: Erdbeschleunigung ( $9,81\text{m/s}^2$ )

Aus der Formel (1) ergibt sich bei gleicher Partikeldichte und Dichte des Zentrifugationsmediums eine Sedimentationsgeschwindigkeit von 0m/s.

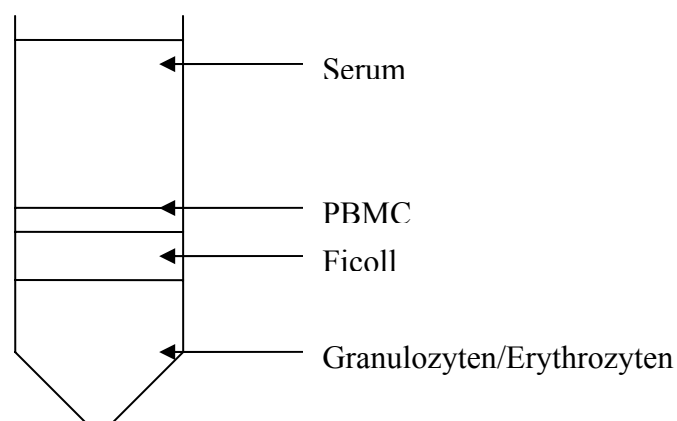
Darüber hinaus spielt der Partikeldurchmesser eine Rolle bei der Sedimentationsgeschwindigkeit. Die angegebene Formel gilt jedoch nur für kugelförmige

Partikel und kann deshalb bei der Trennung von Zellen nur sehr bedingt verwendet werden, da diese nur selten die Form einer Kugel einnehmen. Außerdem spielen bei Zellen noch Wechselwirkungen zwischen Membranoberflächen und Zentrifugationsmedium eine Rolle für die Berechnung der Sedimentationsgeschwindigkeit.

Bei der Dichtegradientenzentrifugation von Zellen ist die Dichte einzelner Schichten des Zentrifugationsmediums größer als die Dichte bestimmter Zellen. Zellen deren Dichte kleiner als die der Ficoll-Lösung ist, verbleiben oberhalb dieser Lösung, wohingegen Zellen mit einer größeren Dichte als der der Ficolllösung durch diese hindurch zentrifugiert werden (siehe auch Abb. 5).

### 3.2.5.1.2. Durchführung

Die Isolierung der PBMC erfolgt per Dichtegradientenzentrifugation. Dazu werden in einem 50ml Zentrifugenröhrchen 15ml Ficoll-Lösung (Biocoll-Solution) bei Raumtemperatur vorsichtig mit 35ml verdünntem Blut (1:2 in 1xPBS/2mM EDTA) überschichtet. Dabei ist darauf zu achten, dass sich das Blut so wenig wie möglich mit der Ficoll-Lösung vermischt. Dieser Ansatz wird nun in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor abzentrifugiert (400g, 45 min, RT ohne Bremse!). Die zu isolierenden PBMC befinden sich am Ende der Zentrifugation in der Grenzschicht zwischen Serum und Ficoll-Lösung (siehe Abb. 5).



**Abb. 5:** Schichtverteilung nach Dichtegradientenzentrifugation von heparinisiertem Blut

Im Anschluss an die Zentrifugation werden die PBMC vorsichtig mit Hilfe einer Pipette abgesaugt, in ein neues 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1xPBS/2mM EDTA gewaschen (Zentrifugation: 300g, 20 min, RT). Der Überstand wird abgesaugt und verworfen,

das Pellet zur Auflösung noch vorhandener Erythrozyten in 5ml eiskaltem Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden 45ml 1xPBS/2mM EDTA zugegeben und die Suspension wird abzentrifugiert (300g, 15 min, RT). Zur Entfernung der Thrombozyten wird das Pellet im Anschluss noch zweimal mit 1xPBS/2mM EDTA gewaschen (Zentrifugationen: 300g, 15 min, RT). Zum Abschluss wird das Zellpellet in 5ml Kulturmedium (inkl. Serum) resuspendiert und die Zellzahl der Suspension bestimmt (siehe 3.2.3.).

### **3.2.5.2. Aufreinigung primärer T-Lymphozyten**

Die Isolierung humaner T-Zellen erfolgt unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits (Pan T Cell Isolation Kit II, Fa. Miltenyi Biotec) aus den zuvor aufgereinigten PBMC (siehe 3.2.5.1.).

#### **3.2.5.2.1. Prinzip**

Der verwendete Kit beruht auf dem Prinzip der negativen Selektion. Dabei werden humane T-Lymphozyten durch Depletion der anderen, innerhalb der PBMC-Suspension enthaltenen Zellen (B-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten, Erythrozyten) isoliert. Diese „Nicht-T-Zellen“ werden zunächst unter Verwendung einer Mischung von Biotin-markierten Antikörpern (Anti-CD14, -CD16, -CD19, -CD36, -CD56, -CD123, -Glycophorin A), als primäre Markierung, und einer Suspension an magnetische Mikrobeads gekoppelter monoklonaler Anti-Biotin Antikörper, als sekundäre Markierung, indirekt magnetisch markiert. Die so markierten „Nicht-T-Zellen“ werden dann in einem magnetischen Feld auf einer Säule zurückgehalten, während die unmarkierten T-Zellen dieses Magnetfeld ungehindert passieren können. Durch Einsatz von Säulen unterschiedlicher Größe können mit diesem Kit bis zu  $1 \times 10^9$  T-Zellen aus maximal  $2 \times 10^{10}$  PBMC isoliert werden.

#### **3.2.5.2.2. Durchführung**

Zunächst wird die Zellzahl der eingesetzten PBMC-Suspension bestimmt (siehe 3.2.3.). Danach wird die Zellsuspension abzentrifugiert (300g, 10 min, RT), der Überstand abgenommen und das Zellpellet in Puffer (1xPBS/0,5%BSA/2mM EDTA pH 7,2) resuspendiert (pro  $1 \times 10^7$  Zellen 40µl Puffer). Die weitere Aufreinigung der T-Zellen erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers. Die so gewonnene T-Zellsuspension wird mit Puffer gewaschen (Zentrifugation: 300g, 10min, RT) und das erhaltene Pellet in Medium (inklusive

Serum) aufgenommen. Schließlich wird die Zahl der isolierten T-Zellen bestimmt (siehe 3.2.3.).

### **3.2.6. Bestimmung der Zellproliferation**

#### **3.2.6.1. Prinzip**

Zur Messung der Proliferationsrate der verwendeten Zellen wurde das Prinzip der Inkorporation radioaktivmarkierten Thymidins angewendet. Diese Methode beruht darauf, dass es im Verlauf der Zellteilung zur Synthese von DNA kommt. Dabei werden die vorhandenen Nukleoside, wie z.B. auch Thymidin durch die DNA-Polymerase zu neuen DNA-Strängen verknüpft. Je höher die Proliferationsrate der jeweiligen Zelle ist, desto höher ist auch die Syntheserate der DNA und damit auch die Einbaurrate der Nukleoside, wie auch des Thymidins. Um das Ausmaß der Proliferation der eingesetzten Zellen quantifizieren zu können, werden unterschiedlich markierte Nukleoside oder –analoge, wie z.B. radioaktiv-( $^3\text{H}$ ) markiertes Thymidin eingesetzt. Je höher die Proliferationsrate der Zellen desto mehr radioaktiv markiertes Thymidin wird in die Zellen eingebaut. Die in dieser Weise radioaktiv markierte DNA wird aus den Zellen freigesetzt und auf Glasfaserfilter geerntet. Im Anschluss daran kann die Radioaktivität mit Hilfe eines  $\beta$ -Zähler quantifiziert werden

#### **3.2.6.2. Durchführung**

#### **3.2.6.3. Allgemeine Grundlagen für die Arbeit mit radioaktiven**

##### **Substanzen**

Alle bei der Durchführung des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporationstests anfallenden festen und flüssigen radioaktiven Abfälle werden getrennt vom nicht-radioaktiven Abfall in entsprechend gekennzeichneten Behältern gesammelt und am Ende des Versuchs gemäß den Richtlinien der Strahlenschutzverordnung entsorgt. Zur Überwachung der Arbeitsbereiche auf eventuell auftretende Kontaminationen mit  $^3\text{H}$ -Thymidin werden regelmäßig Wischproben durchgeführt, deren Messergebnisse protokolliert werden. Die Durchführung aller Abschnitte des Versuchs erfolgt ausschließlich in für radioaktive Arbeiten freigegebenen und entsprechend gekennzeichneten Laboratorien (Isotopenlabor).

### 3.2.6.4. Ablauf des Proliferationstests

Für den  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporationstest werden die jeweiligen Zellen zunächst gezählt (siehe 3.2.3.) und dann je nach Zelllinie in definierter Zellzahl (Zelllinien:  $1 \times 10^4$  Zellen/well; primäre Zellen:  $1 \times 10^5$  Zellen/well) auf die wells einer 96-well-Platte verteilt. In jedes well werden  $100\mu\text{l}$  der Zellsuspension pipettiert. Im Anschluss daran werden die Zellen je nach Versuchsaufbau mit unterschiedlichen Proben behandelt. Um die Proliferation der eingesetzten primären humanen Zellen (PBMC und T-Zellen) zu stimulieren, werden diese direkt vor der Behandlung mit den jeweiligen Proben je nach Versuchsanordnung mit verschiedenen Stimulantien (PMA + Ionomycin, PHA + IL-2) behandelt. Die Konzentration der eingesetzten Stimulantien ist aus Tabelle 2 ersichtlich.

Stimulans	Endkonzentration im well (96-well-Platte)
PMA	20ng/ml
Ionomycin	100ng/ml
PHA	10 $\mu\text{g}$ /ml
IL-2	20U/ml

**Tabelle 2:** eingesetzte Stimulantien

Die Zellen werden daraufhin für 48h im Brutschrank inkubiert. Für die letzten 18h wird Methyl- $^3\text{H}$ -Thymidin (Fa. Amersham-Biosciences) zu den Zellen gegeben. Die Konzentration der Ausgangslösung beträgt  $37\text{mBq/ml}$  ( $1\text{mCi/ml}$ ). Diese wird zunächst 1:10 in Kulturmedium und dann erneut 1:10 in den wells der Zellkulturplatte verdünnt ( $10\mu\text{l}$  auf  $100\mu\text{l}$  Zellsuspension; Endkonzentration:  $0,37\text{MBq/well}$  bzw.  $0,01\text{mCi/well}$ ). Im Anschluss daran werden die Zellen, wie erwähnt, für weitere 18h im Brutschrank inkubiert, um den Einbau des radioaktiv markierten Thymidins in die DNA der Zellen zu ermöglichen. Am Ende dieser Inkubation wird die Zellkulturplatte mit Parafilm eingewickelt, um Kontaminationen durch Austreten der radioaktiven Zellsuspension zu verhindern, und bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Nachdem die Zellsuspension in den einzelnen wells vollständig gefroren ist, wird die Platte wieder aufgetaut. Durch diesen Einfrier-Auftau-Wechsel werden die Zellen lysiert und die radioaktiv markierte DNA wird freigesetzt. Mit Hilfe eines speziellen Geräts (Cell Harvester, Fa. Molecular Devices Corp.) werden die Lysate aus den einzelnen wells einer Zellkulturplatte auf einen Glasfaserfilter gespült. Dieses Gerät wird vor und nach Benutzung zunächst gründlich mit entmineralisiertem, gefiltertem (Millipore-Filter) Wasser und 70% Ethanol gespült, um eine Übertragung von Radioaktivität von einem Experiment auf

das folgende zu verhindern. Im Verlauf des Erntens der Lysate aus den wells der Zellkulturplatte kommt es zur Bindung der radioaktiv markierten DNA-Moleküle an die Glasfasern der Filtermembran. Der Filter wird danach an der Luft getrocknet. Das Ausmaß der Radioaktivität der an den Filter gebundenen DNA-Moleküle aus den einzelnen wells wird mit Hilfe eines  $\beta$ -Counters (Packard Direct Beta Counter Matrix<sup>TM</sup> 9600, Fa. Packard Instruments) gemessen. Mit Hilfe der zugehörigen Software werden die Messwerte (in cpm (counts per minute) pro well) für jedes well der Zellkulturplatte ermittelt und ausgedruckt. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgt mit dem Programm Microsoft Excel.

### 3.3. Vorinkubationsexperimente

Im Verlauf der vorliegenden Doktorarbeit werden verschiedene Lösungen (Kulturmedium, verschiedene Gemische von Aminosäuren) mit Kulturüberständen unterschiedlicher *H. pylori* Stämme und rekombinanten *Helicobacter* Proteinen vorbehandelt. Dazu werden die jeweiligen Überstände (Endkonzentration: 10 $\mu$ g/ml) bzw. rekombinanten Proteine (Endkonzentration: 2 $\mu$ g/ml) in Reaktionsgefäßen mit den Lösungen gemischt und diese dann für 24h bei 37°C im Zellkulturbrutschrank inkubiert.

Zur Aufhebung der GGT-Enzymaktivität werden die Proben dann für 10 min bei 95°C in einem Heizblock inkubiert. Im Anschluss daran werden die Proben mit Kulturmedium verdünnt und in einem <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporationstest auf proliferationshemmende Eigenschaften untersucht.

#### 3.3.1 Vorbehandlung rekombinanter HP GGT und *H. pylori*

##### Kulturüberstände

Zur Untersuchung der Temperaturstabilität der GGT aus *H. pylori* werden Kulturüberstände von *H. pylori* Stämmen bzw. rekombinante HP GGT bei unterschiedlichen Temperaturen (37, 56, 72, 95°C) für 10 min im Heizblock vorbehandelt. Im Anschluss daran werden die einzelnen Proben im Proliferationstest untersucht (siehe 3.2.6.).

Darüber hinaus werden die gleichen Proben mit dem irreversiblen GGT Inhibitor Acivicin (Endkonzentration 50 $\mu$ M) für 2h bei 37°C vorinkubiert. Dann wird die Aktivität der GGT in der Probe mit dem GGT-Enzymtest (siehe 3.12.) und Proliferationstest (siehe 3.2.6.) untersucht.



### **3.4. Proteinbestimmung (Methode nach Bradford 1976)**

#### **3.4.1. Prinzip**

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) beruht auf der Bindung eines Triphenylmethanfarbstoffes (Coomassie Blue G250) an Protein(e). Durch diese Bindung entsteht ein Protein-Farbstoff-Komplex mit einem gegenüber dem freien Farbstoff veränderten Absorptionsmaximum. Der Test wird bei saurem pH-Wert durchgeführt, so dass die Farbstoffmoleküle und auch Aminogruppen der Proteine protoniert vorliegen. Unter diesen Bedingungen liegt das Absorptionsmaximum des gelösten Farbstoffs bei 465nm. Aufgrund von Wechselwirkungen zwischen Farbstoffmolekülen und protonierten Aminogruppen der Proteine kommt es zur Bindung zwischen Protein und Farbstoffmolekül und es bildet sich ein Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 595nm. Diese Zunahme der Absorption bei 595nm wird mit Hilfe eines Spektrophotometers erfasst und als Maß für die Berechnung der Proteinkonzentration in der Probe verwendet. Ein Nachteil des Bradford-Tests liegt in seiner starken Abhängigkeit von der Zusammensetzung der in der Probe vorhandenen Proteine. Aufgrund seiner schnellen und einfachen Durchführbarkeit und hohen Sensitivität wird dieser Test jedoch sehr häufig verwendet (Sapan et al 1999).

#### **3.4.2. Durchführung**

Die Proteinbestimmung wird in 1,5ml Eppendorf-Röhrchen durchgeführt.

Zunächst wird für jede Messung eine Standardreihe pipettiert, bei der bekannte Konzentrationen (0-100µg/ml) eines Proteinstandards (BSA; Stocklösung 200µg/ml) in die Reaktionsgefäße gegeben werden. Für den Standard wird bei jeder Messung eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die zu messenden Proben (z.B. Zelllysate) werden vor der Proteinbestimmung je nach Versuchsansatz in 1xPBS verdünnt (1:2-1:100), um eine zu hohe Absorption im Verlaufe der Messung zu verhindern. Zu jedem Röhrchen (Standard und Proben) wird nun 1ml einer kommerziell erhältlichen Reaktionslösung (Fa. BioRad), die zuvor 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnt wurde, pipettiert. Die Proben werden gemischt und für 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird zunächst die Extinktion der Standardreihe und dann die der Proben bei 595nm mit Hilfe eines Spektrophotometers gemessen. Zur Auswertung der Messung berechnet das Messgerät aus den Mittelwerten der Standard-Doppelbestimmungen eine BSA-Standardkurve, welche im gewählten Konzentrationsbereich (siehe oben) linear verlaufen sollte. Anhand dieser Standardkurve wird

unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors die Proteinkonzentration der Proben berechnet. Damit eine verlässliche Berechnung der Proteinkonzentration in den Proben möglich ist, müssen die Absorptionswerte innerhalb des Absorptionsbereichs der BSA-Standardkurve liegen. Durch die Verdünnung der Proben zu Beginn des Tests (siehe oben) wird dieses gewährleistet. Die für die einzelnen Proben erhaltenen Messwerte entsprechen der Proteinkonzentration in  $\mu\text{g}$  pro ml der Probe.

### **3.5. Herstellung von Zellysaten**

Zur Herstellung von Gesamtllysaten werden die nach Versuchsanordnung inkubierten und gesammelten Zellen mit 100 $\mu\text{l}$  eiskaltem 1xLysepuffer (Endkonzentration: 20mM Tris/HCl pH 7,5; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 1% (v/v) Triton X-100; 2,5mM  $\text{Na}_4\text{O}_7\text{P}_2\text{x}10\text{H}_2\text{O}$ ; 1mM  $\beta$ -Glycerophosphat; 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin; vor Benutzung frisch zugegeben: 1mM PMSF) versetzt und mit Hilfe einer 100 $\mu\text{l}$ -Pipette gründlich resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis (5 min) werden die Zellen mit Ultraschall (Sonifier W-250; Fa. Branson) lysiert (30 Stöße bei Stufe 2,5). Während dieses Vorgangs werden die Proben auf Eis inkubiert, um ein zu starkes Erhitzen der Proben und dadurch verstärkten Proteinabbau zu verhindern. Die erhaltenen Lysate werden dann abzentrifugiert (10000g, 10 min, 4°C), um Membranreste zu entfernen. Der Überstand ist das Zellysat und wird in neue auf Eis vorgekühlte 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Ein Aliquot des Lysats wird zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet (siehe 3.4.). Der Rest wird bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **3.6. Kernextraktion**

#### **3.6.1. Prinzip**

Bei der Kernextraktion werden unterschiedlich behandelte Zellen lysiert und in diesen Gesamtllysaten dann die nukleären von den zytoplasmatischen Proteinen getrennt. Mit Hilfe verschiedener Detektionstechniken (z.B. Western-Blotting, Gelshift, DNA footprinting) ist es möglich, die Lokalisation z.B. von Transkriptionsfaktoren (z.B. NFAT, NFkB) in der Zelle (nukleär oder zytoplasmatisch) und dadurch den Aktivierungszustand dieser Transkriptionsfaktoren in unterschiedlich behandelten Zellen zu untersuchen.

### **3.6.2. Durchführung**

Zur Extraktion nukleärer und zytoplasmatischer Proteine wird innerhalb dieser Doktorarbeit ein kommerziell verfügbarer Kit (Nuclear Extract Kit, Fa. Active Motif) verwendet. Die Durchführung erfolgt gemäß den Herstellerangaben.

Bis zur weiteren Verwendung werden die erhaltenen Kern- und Zytoplasmaextrakte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wird eine Proteinbestimmung (siehe 3.4.) durchgeführt. Dabei werden die erhaltenen Extrakte etwa 1:200 verdünnt, um eine Interferenz des Proteintests mit dem Detergenz in den Extrakten auszuschließen. Darüber hinaus wird der verwendete Lyse-Puffer als Nullwert (Blank) für die Proteinbestimmung verwendet.

## **3.7. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)**

### **3.7.1. Prinzip**

Unter Elektrophorese versteht man die Bewegung von Ionen in einem elektrischen Feld. Die elektrische Kraft, die auf ein Ion in einem elektrischen Feld wirkt, ist nach den Gesetzen der Elektrostatik abhängig von der Ladung des Ions und der Stärke des elektrischen Feldes.

Die Technik der Elektrophorese wird zur analytischen Trennung biologischer Moleküle (z.B. Proteine, DNA, RNA) verwendet. Wenn ein elektrisches Feld z.B. in einer Lösung von Proteinen in einem Puffer aufgebaut wird, so wandern die Proteine aufgrund ihrer Ladung und der einwirkenden Kraft des elektrischen Feldes in Richtung der Elektrode mit der ihrer eigenen Ladung entgegengesetzten Polarität. Im Bereich ihres isoelektrischen Punktes (pI) weisen die Proteine keine Nettoladung auf und wandern daher auch nicht weiter im elektrischen Feld. Aufgrund der unterschiedlichen isoelektrischen Punkte von Makromolekülen können diese daher mit Hilfe der Elektrophorese aufgetrennt werden. Durch Verwendung fester Trägermaterialien, wie z.B. Polyacrylamid-/Agarosegele wandern die Makromoleküle dabei als gut zu analysierende diskrete Zonen (Banden). Diese Gele weisen Poren in molekularen Dimensionen auf, deren Größe durch Variation der Agarose- bzw. Polyacrylamidkonzentration spezifiziert werden kann. Die Trennung von Makromolekülen durch Gelelektrophorese beruht also zum einen auf den unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (siehe oben) und zum anderen auf der unterschiedlichen Größe der Moleküle in der zu analysierenden Lösung. Aufgrund der definierten Porengröße des verwendeten Gels werden große Moleküle relativ zu kleineren zurückgehalten und legen kürzere Strecken im

Gel zurück. Durch Verwendung von SDS (Natriumdodecylsulfat) in Polyacrylamidgelen bei der PAGE werden Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen molekularen Massen und nicht Unterschieden in ihrer Ladung aufgetrennt (SDS-PAGE). Das SDS ist ein Detergenz, welches sehr stark an Proteine bindet, wodurch diese eine stäbchenartige Struktur bekommen. Dabei binden die meisten Proteine SDS im gleichen Verhältnis (1,4g SDS pro g Protein; etwa ein SDS-Molekül auf zwei Aminosäurereste). SDS vermittelt also eine große negative Ladung, wodurch die intrinsische Ladung des Proteins maskiert wird. Dadurch haben SDS-behandelte Proteine tendenziell identische Verhältnisse von Ladung zu Masse und eine ähnliche Form. Die relative Beweglichkeit von Proteinen verändert sich bei der SDS-PAGE linear zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Durch Behandlung mit SDS werden nichtkovalente Bindungen zwischen verschiedenen Polypeptiduntereinheiten eines Proteins gelöst. Da die zum Auftrag der Proteinproben auf das Gel verwendeten Probenpuffer auch Reduktionsmittel, wie z.B.  $\beta$ -Mercaptoethanol oder DTT enthalten, werden auch Disulfidbindungen zwischen Proteinuntereinheiten gelöst. Das bedeutet, dass die SDS-PAGE Informationen über das Molekulargewicht der einzelnen Untereinheiten eines Proteins und nicht des intakten Proteins liefert. Zur Bestimmung der molekularen Masse der aufgetrennten Proteine werden bei der Gelelektrophorese parallel zu diesen Proteinen verschiedene Markerproteine mit bekanntem Molekulargewicht eingesetzt.

Bei der Auftrennung von Proteinen durch Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) werden Puffer mit leicht basischem pH (etwa pH 9) verwendet. Dadurch tragen die Makromoleküle negative Ladungen und wandern von der Stelle des Probenauftrags (Kathode, -Pol) in Richtung der Anode (+Pol). Bei der diskontinuierlichen PAGE wird ein Trenngel, in dem die Auftrennung der Proteine stattfindet, mit einem kurzen, großporigen Sammelgel überschichtet. Der pH-Wert des Sammelgels liegt dabei etwa 2 Einheiten niedriger als der des restlichen Systems. Der für die PAGE verwendete Puffer enthält eine schwache Säure (z.B. Glycin, Tricin) und hat an der Anode und Kathode den gleichen pH-Wert. Wenn an diesem System eine Spannung angelegt wird, wandern die Ionen des Laufpuffers von der Kathode in Richtung Anode in das Sammelgel hinein und die Ionen des Sammelgels wandern ihnen voraus. Durch Verwendung dieses diskontinuierlichen Systems wird die Auflösung der Proteinreinigung im Vergleich zu kontinuierlichen PAGE-Systemen verbessert. Die Lokalisation der Proteinbanden einer Gelelektrophorese kann auf unterschiedliche Art und Weise wie zum Beispiel durch Färbung (z.B. Coomassie-Blau- oder Silberfärbung; siehe 3.7.3.) oder Western-Blotting (siehe 3.8.) erfolgen.

### 3.7.2. Durchführung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Tricin-SDS-PAGE-System nach Schägger und Jagow verwendet. Durch Austausch der Pufferkomponente Glycin gegen Tricin wird die Auflösung von Peptiden im Größenbereich von 1-100kDa verbessert. Darüber hinaus kann die Acrylamidkonzentration im System im Vergleich zum System mit Glycin reduziert werden. Bei der Tricin-SDS-PAGE werden Proteine mit einer Größe über 30 kDa bereits im Sammelgel getrennt und gelangen dadurch leichter in das Trenngel. Dadurch werden in diesem System Überladungseffekte reduziert (Schägger et al 1987).

#### a) Verwendete Puffer

Zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen werden folgende Pufferlösungen benötigt.

3M Tris/HCl +0,3% SDS pH 8,5 (Gelpuffer)

48% Acrylamid + 1,5% Bisacrylamid in H<sub>2</sub>O (AA/Bis 1)

46,5% Acrylamid + 3% Bisacrylamid in H<sub>2</sub>O (AA/Bis 2)

Temed

10% APS in H<sub>2</sub>O

Das Trenngel (ca. 11,5ml) für die SDS-PAGE wird nach folgendem Schema in der jeweils benötigten Acrylamidkonzentration hergestellt:

	<b>7,5%</b>	<b>10%</b>	<b>12,5%</b>	<b>15%</b>	<b>16,5%</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	5,76 ml	5,19 ml	4,62 ml	4,06 ml	3,71 ml
<b>Gelpuffer</b>	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
<b>AA/Bis 2</b>	1,71 ml	2,27 ml	2,84 ml	3,41 ml	3,75 ml
<b>Temed</b>	3,75 µl	3,75 µl	3,75 µl	3,75 µl	3,75 µl
<b>10% APS</b>	56µl	56µl	56µl	56µl	56µl

Das Sammelgel (ca. 3,5ml) mit einer Acrylamidkonzentration von 4% wird nach folgendem Schema pipettiert:

	<b>1 Gel</b>	<b>3 Gele</b>	<b>4 Gele</b>	<b>6 Gele</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2,08 ml	4,2 ml	6,23 ml	8,3 ml
<b>Gelpuffer</b>	0,78 ml	1,55 ml	2,33 ml	3,1 ml
<b>AA/Bis 1</b>	0,25 ml	0,5 ml	0,75 ml	1 ml
<b>Temed</b>	2,5 µl	5 µl	7,5 µl	10 µl
<b>10% APS</b>	37,5 µl	75 µl	112,5 µl	150 µl

Als Laufpuffer für die Elektrophorese wird der folgende Puffer verwendet:

0,1M Tris  
 0,1M Tricin  
 → entspricht pH 8,25  
 0,1% (w/v) SDS

Zum Auftrag der Proben wird der folgende Ladepuffer (5X) verwendet:

312,5mM Tris/HCl (pH 6,8)  
 10% (w/v) SDS  
 50% (v/v) Glycerin  
 0,05% (w/v) Bromphenol Blau  
 Vor Verwendung des Puffers wird frisch zugegeben:  
 250mM DTT

### **b) Herstellung des Polyacrylamidgels**

Die Herstellung des Polyacrylamidgels erfolgt in speziellen, kommerziell erhältlichen Gelkassetten (Fa. Invitrogen), anhand der oben angegebenen Pipettierschemata. Die Kassetten werden senkrecht in einen passenden Ständer gestellt. Zunächst wird die Trenngellösung hergestellt, gemischt und mit Hilfe einer Pasteurpipette luftblasenfrei bis etwa 2cm unterhalb des oberen Randes in die Gelkassette gegossen. Im Anschluss wird die Trenngellösung in der Kassette vorsichtig mit 70% Ethanol überschichtet, um die Entstehung einer glatten Oberfläche des Trenngels bei dessen Polymerisation zu gewährleisten. Nach etwa 30 min Inkubation der Gelkassette bei Raumtemperatur ist die Trenngellösung polymerisiert. Nun wird der Alkohol oberhalb des Trenngels abgegossen und der Bereich der Kassette oberhalb des Trenngels gründlich mit H<sub>2</sub>O gewaschen, um den Alkohol vollständig zu entfernen. Das H<sub>2</sub>O wird gründlich entfernt. Dann wird die Sammelgellösung hergestellt, gemischt und bis

zum oberen Rand der Kassette auf das Trenngel gegossen. Zur Formung der Taschen für die zu analysierenden Proben wird ein Gelkamm mit unterschiedlicher Zinkenzahl (je nach Probenanzahl 10-15 Zinken) in die noch flüssige Sammelgellösung gesetzt. Dabei wird der Kamm auf der einen Seite der Gelkassette angesetzt und dann langsam in die Sammelgellösung eingeführt, bis beide Enden des Kammes in der richtigen Position sitzen. Dadurch wird der Einschluss von Luftblasen in den Geltaschen verhindert. Zur Polymerisation des Sammelgels wird die Gelkassette für etwa 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung kann das Gel für maximal eine Woche in feuchte Tücher eingewickelt bei 4-8°C gelagert werden.

### **c) Probenauftrag und Gellauf**

Zum Auftrag der zu analysierenden Proben wird das fertige Gel gemäß den Herstellerangaben in eine Gelkammer eingesetzt. Diese wird bis zum oberen Rand der Kammer mit Gelllaufpuffer (1x) gefüllt. Dann wird der Gelkamm vorsichtig aus der Gelkassette gezogen. Die durch den Kamm im Sammelgel entstandenen Geltaschen werden mit Gelllaufpuffer unter Verwendung einer Spritze gründlich ausgespült, um unvollständig polymerisierte Reste des Sammelgels zu entfernen. Zum Auftrag auf das Polyacrylamidgel werden die je nach Versuchsansatz benötigten Proteinmengen der Proben (z.B. Zelllysate) mit 1/5 Ladepuffer (5x; siehe 3.7.2.a) gemischt und für 5 min bei 95°C in einem Heizblock unter Schütteln (1200rpm) inkubiert. Im Anschluss daran werden die Proben mit Hilfe von Gellade-Pipettenspitzen in die Taschen des Polyacrylamidgels pipettiert. Zur späteren Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine in den Proben, wird auch ein Größenmarker auf das Gel geladen. Dieser besteht aus einer Mischung bereits gefärbter Proteine unterschiedlicher Größe. Da die einzelnen Proteine des Größenmarkers vorgefärbt sind, kann die Auftrennung der Markerproteine, und damit auch indirekt die der Proteine in den Proben, im Gel während des Gellaufs kontrolliert werden. Die Gelkammer wird nun an eine Spannungsquelle angeschlossen und durch Anlegen einer Spannung wird der Gellauf gestartet. Für die Durchführung von Polyacrylamid-Elektrophoresen innerhalb dieser Doktorarbeit wurden folgende Spannungen verwendet:

- Stufe 1: konstant 60V
- Stufe 2: konstant 110V

Die Stufe 1 wird dabei solange beibehalten, bis die Proben in das Trenngel hineingewandert sind. Dann wird Stufe 2 eingestellt, bis die Proben am unteren Ende des Trenngels angekommen sind.

Am Ende des Gellaufs wird die Gelkassette aus der Gelkammer entnommen. Mit einem Metallspatel wird die Kassette durch Hebelbewegungen geöffnet und das Gel für weitere Untersuchungen (z.B. Färbungen, Western-Blot) entnommen.

### **3.7.3. Gelfärbung**

Nach Beendigung der Gelelektrophorese werden die Probenproteine im Gel lokalisiert. Dies geschieht durch Immunfärbung (siehe 3.8.2.d) oder unter Verwendung verschiedener Proteinfarbstoffe. Je nach der auf das Gel aufgetragenen Proteinmenge wird dabei eine Silber- oder Coomassie-Blau-Färbung durchgeführt.

### **3.7.4. Coomassie-Blau-Färbung**

Bei dieser Färbemethode werden die aufgetrennten Proteine zunächst durch Denaturierung mit einer sauren, alkoholischen Farbstofflösung im Gel fixiert und mit dem Farbstoff komplexiert. Dann wird überschüssiger Farbstoff durch intensives Waschen des Gels in saurer Lösung entfernt. Die untere Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei einer 0,5cm großen Proteinbande bei etwa 200-400ng. Ein Vorteil dieser Färbemethode ist die geringe Variabilität der Färbung bei verschiedenen Proteinen.

#### **3.7.4.1. Durchführung**

Zur Coomassie-Blau-Färbung werden folgende Lösungen benötigt:

Färbelösung:	50% (v/v) Methanol
	10% (v/v) Essigsäure
	0,1% (w/v) Coomassie Brillant Blau R250
Entfärbelösung:	20% (v/v) Methanol
	7,5% (v/v) Essigsäure

Die Coomassie-Blau-Färbung der Polyacrylamidgele erfolgt bei Raumtemperatur. Die Proteingele werden unter leichtem Schütteln (100rpm) auf einem Horizontalschüttler für 1h in der Färbelösung gleichzeitig fixiert und gefärbt. Die Entfärbung des Gels erfolgt durch



Inkubation in der Entfärbelösung, wobei die Lösung immer wieder gewechselt wird, bis die Proteinbanden in der gewünschten Intensität zu erkennen sind.

Bis zur weiteren Verwendung kann das gefärbte Gel in H<sub>2</sub>O bei 4-8°C aufbewahrt werden.

### **3.7.5. Silberfärbung (nach Heukeshoven et al 1988)**

Gelbanden, die weniger als 200-400ng Protein pro Bande enthalten, können durch Silberfärbung sichtbar gemacht werden. Diese Methode ist etwa 50fach sensitiver als die Coomassie-Blau Färbung. Bei der Silberfärbung bilden die Ag<sup>+</sup>-Ionen der eingesetzten Silbernitratlösung Komplexe mit verschiedenen Aminosäureresten (Glu, Asp, Cys) der Proteine. Durch alkalisches Formaldehyd wird Ag<sup>+</sup> in diesen Komplexen zu elementarem Silber reduziert. Dieser Vorgang führt zur Schwarzfärbung der Proteinbanden im Gel. Die Nachweisgrenze dieser Färbung liegt je nach verwendeter Methode bei 5-30ng für eine Proteinbande von 0,5cm Größe. Nachteile dieser Färbemethode liegen in der langwierigen Prozedur und der hohen Variabilität der Farbtintensität bei verschiedenen Proteinen.

#### **3.7.5.1. Durchführung**

Zur Silberfärbung nach Heukeshoven werden folgende Lösungen benötigt:

Fixierer I: 30% (v/v) EtOH  
10% (v/v) Essigsäure

Fixierer II: 30% (v/v) EtOH  
0,5M (w/v) Natriumacetat  
0,5% (v/v) Glutaraldehyd  
0,2% (v/v) Natriumthiosulfat

Silberlösung: 0,1% (w/v) Silbernitrat  
0,02% (v/v) Formaldehyd  
→ immer frisch ansetzen!

Entwickler: 2,5% (w/v) Natriumcarbonat  
0,01% (v/v) Formaldehyd

Stopplösung: 1% (v/v) Essigsäure

Die einzelnen Schritte der Silberfärbung werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Ein Polyacrylamidgel wird unter leichtem Schütteln (100rpm) auf einem Horizontalschüttler für 30 min in Fixierer I und anschließend 30 min in Fixierer II inkubiert. Im Anschluss daran wird das Gel für 1h mit H<sub>2</sub>O gewaschen, wobei die Waschlösung alle 10 min gewechselt wird. Dann erfolgt eine 30 min Inkubation des Gels in der Silberlösung. Zur Visualisierung der Proteine wird das Gel kurz mit H<sub>2</sub>O gewaschen und dann in die Entwicklerlösung überführt. Bei ausreichender Entwicklung der Proteinbanden wird die Entwicklerlösung schnell gegen die Stopplösung ausgetauscht. Bis zur weiteren Verwendung können die gefärbten Gele lichtgeschützt bei 4-8°C in der Stopplösung aufbewahrt werden.

### **3.7.6. Dokumentation und Trocknung der Gele**

Die unterschiedlich gefärbten Gele werden zur Dokumentation zunächst eingescannt (Flachbett-Scanner mit Durchlichteinheit, Fa. Epson) und die erhaltenen Bilder auf einem Computer gespeichert. Danach werden die Gele getrocknet. Dazu werden sie zunächst dreimal für 2 min in H<sub>2</sub>O gewaschen und dann für 15-20 min in einer Geltrocknungslösung (30% (v/v) Methanol, 5% (v/v) Glycerin in H<sub>2</sub>O) bei Raumtemperatur schüttelnd (100rpm) inkubiert. Im Anschluss daran werden die Gele luftblasenfrei zwischen zwei Zellophanfolien in einen Plastikrahmen eingespannt und für maximal 48h bei Raumtemperatur getrocknet. Das getrocknete Gel wird zur Begradigung gepresst und dann archiviert.

## **3.8. Western-Blot**

### **3.8.1. Prinzip**

Die spezifische Detektion eines Proteins in einem Gel ist, wenn ein gegen das interessierende Protein gerichteter Antikörper erhältlich ist, durch einen Immunoblot (Western-Blot) möglich. Dabei wird eine Proteinprobe durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteinbanden des Gels werden auf eine Membran (z.B. aus Nitrozellulose, PVDF oder Nylon) übertragen. Dabei wird auf das Proteingel eine solche Membran gefolgt von einer Schicht aus Filterpapier und Schwämmen gelegt (siehe Abb. 6). Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden die Proteinbanden in der gleichen Orientierung, die sie im Gel hatten auf die Membran übertragen (geblottet). Dieser Vorgang beruht auf dem gleichen Prinzip wie die

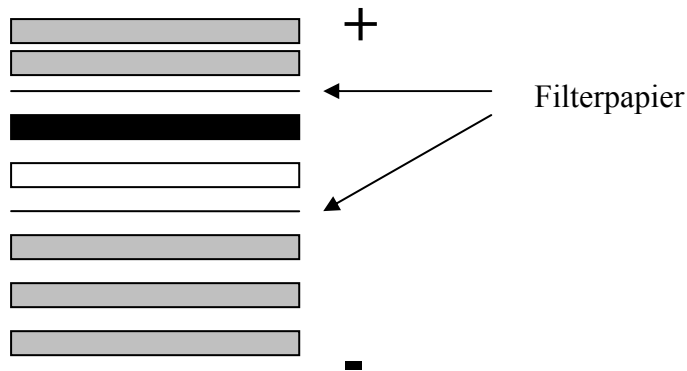
Elektrophorese (siehe 3.7.1.). Die überschüssigen Adsorptionsstellen der Membran werden im Anschluss daran mit unspezifischem Protein (z.B. Milchprotein in Form von Magermilchpulver) blockiert (geblockt), um unspezifische Bindung der verwendeten Antikörper, die ebenfalls Proteine sind, an die Membran zu verhindern. Die Membran (oder: der Blot) wird dann mit einem Antikörper, der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist (Primärantikörper) inkubiert. Nachdem ungebundene Primärantikörpermoleküle gewaschen wurden, wird der Blot mit einem Antikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist (Sekundärantikörper) inkubiert. An diesen Sekundärantikörper ist ein leicht zu detektierendes Enzym (z.B. Horseradishperoxidase HRP, alkalische Phosphatase) kovalent gebunden. Nachdem ungebundene Sekundärantikörper von der Membran gewaschen wurden, wird durch Zugabe einer Substratlösung die Enzymreaktion des Sekundärantikörpers gestartet. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol in der Substratlösung, wodurch es zur Freisetzung von Licht an der Stelle auf dem Blot kommt, wo das zu untersuchende Protein gebunden ist (Chemilumineszenz). Dadurch wird ein Film belichtet und die Position des zu detektierenden Antigens dokumentiert. Der Blot kann nach der Filmentwicklung erneut zur Detektion anderer Proteine verwendet werden. Dazu werden Primär- und Sekundärantikörper durch Inkubation des Blots in speziellen Puffern (z.B. Glycin-HCl pH 1,8) von der Membran entfernt. Nach dieser als „strippen“ bezeichneten Behandlung der Membran kann diese mit anderen Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert werden (siehe oben). Aufgrund der extremen pH-Werte der Stripping-Puffer und des mehrmaligen Waschens der Membran wird jedoch auch Protein von der Membran gelöst, so dass ein Blot nur eingeschränkt häufig gestrippt werden kann.

### **3.8.2. Durchführung**

#### **a) Proteintransfer**

Nach beendeter Elektrophorese (siehe 3.7.) wird das Sammelgel des Polyacrylamidgels mit Hilfe eines Metallspatels abgeschnitten und verworfen. Das Trenngel wird durch Abtrennen einer Ecke des Gels markiert, um später die Orientierung der Proben nachvollziehen zu können. Dann wird das Gel für 10 min bei Raumtemperatur in Transferpuffer (Endkonzentration: 190mM Glycin, 25mM Tris, 20% (v/v) Methanol, 0,01% (w/v) SDS) äquilibriert. In der Zwischenzeit werden Nitrozellulosemembran, Filterpapiere und Schwämme auf Gelgröße zurechtgeschnitten und gründlich in Transferpuffer eingeweicht.

Dann werden das Gel und die vorbereiteten Materialien wie in Abb. 2 gezeigt übereinander geschichtet.



**Abb. 6:** Schichten bei einem Western-Blot (grau: Schwamm, schwarz Nitrozellulosemembran, weiß: Gel)

Diese Anordnung wird so in die Blotkammer gelegt, dass das Gel in Richtung des –Pols (Kathode) und die Nitrozellulosemembran in Richtung +Pol (Anode) zu liegen kommt. Dann wird die Blotkammer in den Puffertank eingesetzt und mit einer Klammer fest eingespannt. Im Anschluss daran wird die Blotkammer bis zum oberen Rand mit Transferpuffer gefüllt und mit der Spannungsquelle verbunden. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgt durch Anlegen einer Stromstärke von konstant 230mA über einen Zeitraum von 90 min.

### **b) Ponceaus-S-Färbung**

Zur Überprüfung des erfolgreichen Proteintransfers wird die Nitrozellulosemembran aus der Blotanordnung (siehe oben) entnommen und für 1 min in Ponceau S-Färbelösung (3% (v/v) Trichloressigsäure + 0,2% (w/v) Ponceau S) geschüttelt. Die Membran wird dann solange mit H<sub>2</sub>O entfärbt, bis die Proteinbanden in gewünschter Intensität zu erkennen sind. Aufgrund der in der Ponceau S-Färbelösung enthaltenen Trichloressigsäure werden die transferierten Proteine auf der Nitrozellulosemembran fixiert. Die untere Nachweisgrenze der Ponceau S-Färbung liegt bei etwa 50ng pro Bande. Für eine anschließende Immunfärbung der Nitrozellulosemembran wird diese solange mit H<sub>2</sub>O gewaschen bis sie vollständig entfärbt ist.

### **c) Blocken der Membran**

Bevor die Nitrozellulosemembran für die Immunfärbung der transferierten Proteine mit Antikörpern inkubiert wird, werden die restlichen, noch auf der Membran vorhandenen Proteinbindungsstellen abgesättigt (geblockt). Innerhalb der vorliegenden Doktorarbeit wurde eine Mischung aus Magermilch und Tween-20 als Blockingpuffer verwendet.

Zum Blocken wird die Nitrozellulosemembran für 1h bei Raumtemperatur in 25ml Blockingpuffer geschüttelt (100rpm). Im Anschluss daran erfolgt die Immunfärbung der Nitrozellulosemembran.

### **d) Immunfärbung**

Die geblockte Nitrozellulosemembran wird zunächst mit einem Primärantikörper gegen das zu detektierende Antigen inkubiert. Dabei wird der Primärantikörper entsprechend den Herstellerangaben (siehe Tabelle 3) in BSA- (bei monoklonalem Primärantikörper) oder Magermilch- (bei polyklonalem Primärantikörper) Blockingpuffer verdünnt. Die Inkubation der Nitrozellulosemembran mit dem Primärantikörper erfolgt über Nacht (ca. 18h) bei 4°C.

Im Anschluss daran wird die Membran dreimal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen, und dann für 1h bei Raumtemperatur mit einem HRP-markierten Sekundärantikörper unter Schütteln (100rpm) inkubiert. Der Sekundärantikörper wird dazu entsprechend den Herstellerangaben in Magermilch-Blockingpuffer verdünnt. Nach dieser Inkubation wird die Membran dreimal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen.

Die Visualisierung der antikörpermarkierten Proteinbanden auf der Membran erfolgt unter Anwendung der ECL-Reaktion. Dazu wird ein 2-Komponenten-System (SuperSignal West Pico Chemiluminescent System, Fa. Pierce) verwendet. Die beiden Lösungen werden kurz vor der Verwendung im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Nitrozellulosemembran wird für 5 min in diesem Gemisch bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wird die Lösung von der Membran entfernt, diese auf eine flache Unterlage gelegt, mit Plastikfolie eingewickelt und in eine Filmkassette gelegt. In einer Dunkelkammer werden für unterschiedliche Zeiträume Chemilumineszenzfilme auf die Membran gelegt und aufgrund der ECL-Reaktion belichtet. Die Filme werden mit einer Entwicklungsmaschine entwickelt, getrocknet und nach Einscannen am Computer ausgewertet.

Zur Kontrolle der Größe der erhaltenen Proteinsignale werden die Markerproteinbanden von der Membran auf den belichteten Film übertragen.

Antigen	Spezies	verw. Puffer	Verdünnung	Firma
β-Aktin	Kanninchen polyklonal	TBST/5% Magermilch	1:5000	Sigma
Retinoblastoma (Rb) Ab-1 (1F8)	Maus IgG1 monoklonal	TBST/5% Magermilch	1:200	Dianova
Ras	Maus IgG2a/κ monoklonal	TBST/3% BSA	1:200	Pierce
Phospho-Tyrosin P-Tyr-100	Maus IgG1 monoklonal	TBST/5% BSA	1:2000	Cell Signaling
Phospho- P70S6K (Thr389)	Kanninchen polyklonal	TBST/5% BSA	1:1000	Cell Signaling
Phospho-p38 (Thr180/Tyr182) (3D7)	Kanninchen IgG monoklonal	TBST/5% BSA	1:1000	Cell Signaling
Phospho-p27 (Thr187)	Kanninchen polyklonal	TBST/5% Magermilch	1:1000	BD Transduction Lab.
Phospho- FKHRL1 (Foxo3) (Thr32)	Kanninchen IgG polyklonal	TBS/5% Magermilch	1:250	Upstate
Phospho-Erk ½ (Thr202/Tyr204)	Maus IgG1 monoklonal	TBST/5% Magermilch	1:2000	Cell Signaling
Phospho-cRaf (Ser 338) (56A6)	Kanninchen IgG Monoklonal	TBST/5%BSA	1:1000	Cell Signaling
Phospho-AKT (Ser473) (587F11)	Kanninchen IgG monoklonal	TBST/5% BSA	1:1000	Cell Signaling
Penta-His	Maus IgG1 monoklonal	TBST/5% Magermilch	1:5000	Qiagen
GGT ( <i>H. pylori</i> )	Kanninchen Polyklonal	TBST/5% Magermilch	1:5000	Charles River

P70S6K (C-18)	Kanninchen polyklonal	TBST/5% Magermilch	1:200	Santa Cruz
p53 (1C12)	Maus IgG1 monoklonal	TBST/5% BSA	1:2000	Cell Signaling
p38	Kanninchen polyklonal	TBST/5% BSA	1:1000	Cell Signaling
p27Kip1 Ab-1 (DCS-72.F6)	Maus IgG1/ $\kappa$ monoklonal	TBST/5% Magermilch	1:200	Dianova
NFAT2 (7A6)	Maus IgG1 monoklonal	TBST/0,5% Magermilch	1:2000	Affinity Bioreagents
FKHRL1 (Foxo3)	Kanninchen IgG polyklonal	TBS/3% Magermilch	1:250	Upstate
Erk $\frac{1}{2}$	Kanninchen polyklonal	TBST/5% BSA	1:1000	Cell Signaling
Cyclin E1 Ab-2 (HE12)	Maus IgG1 monoklonal	TBST/5% Magermilch	1:200	Dianova
Cyclin D3 Ab-2 (DCS-28.1)	Maus IgG1 Monoklonal	TBST/5% Magermilch	1:200	Dianova
Cyclin A Ab-1 (E23)	Maus IgG2a monoklonal	TBST/5% Magermilch	1:200	Dianova
c-Myc Ab-5 (67P05)	Maus IgG1 monoklonal	TBST/5% Magermilch	1:200	Dianova
Cdk4 Ab-2 (DCS-31)	Maus IgG1 monoklonal	TBST/5% Magermilch	1:200	Dianova
Cdk2 (M2)	Kanninchen polyklonal	TBST/5% Magermilch	1:200	Santa Cruz
PKB $\alpha$ /AKT (7)	Maus IgG1 monoklonal	TBST/5% Magermilch	1:250	BD Transduction Lab.
Anti-Kanninchen IgG POX	Esel IgG	TBST/5% Magermilch	1:10000	Dianova

Anti-Maus IgG POX	Esel IgG	TBST/5% Magermilch	1:10000	Dianova
Anti-Human IgG POX	Ziege IgG	TBST/5% Magermilch	1:10000	Dianova

**Tabelle 3:** Verwendete Antikörper (Antigen, Spezies, Puffersystem, Verdünnung, Firma).

TBST, 1xTBS + 0,1% Tween-20.

### e) Strippen der Membran

Zur Entfernung der Antiköpermoleküle von der Blotmembran wird ein kommerziell erhältlicher Stripping-Puffer verwendet (Mild Antibody Stripping Solution, Fa. Chemicon). Die Blotmembran wird nach der Filmentwicklung kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen und dann für 15 min in Stripping-Puffer bei Raumtemperatur geschüttelt (100rpm). Gemäß den Angaben des Herstellers werden für eine 7cm x 10cm große Membran 20ml Pufferlösung verwendet. Der Blot wird dann zweimal für 5 min in H<sub>2</sub>O gewaschen und erneut mit Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert (siehe oben).

## 3.9. Produktion eines Antikörpers gegen die GGT aus

### *H. pylori*

Zur Produktion eines polyklonalen Antikörpers gegen die GGT aus *H. pylori* wird zunächst unter Verwendung des Computerprogramms Protean<sup>TM</sup> (Fa. DNASTar Inc.) anhand der Proteinsequenz der GGT eine Peptidantigensequenz ausgewählt, gegen die der Antikörper gerichtet sein soll und die für die nachfolgende Immunisierung von Kanninchen verwendet werden soll. Dazu wird im Verlauf dieser Doktorarbeit die folgende Peptidsequenz verwendet:

IQPDTVTPSSQIKPGM (Aminosäureposition 356-371 der *H. pylori* GGT Proteinsequenz)

Diese Sequenz wird an die Firma Charles River (Kißlegg) gesendet, die im Anschluss daran alle weiteren Schritte der Antikörperproduktion durchführt. Im Verlauf dieser Produktion wird zunächst das ermittelte Peptid (s. oben) synthetisiert (Reinheit: 70-95%). Das Peptid wird dann zur anschließenden Immunisierung mit Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH; 2mg Peptid pro 20mg KLH) konjugiert. Im Anschluss werden 4 weibliche, SPF (specific pathogen free) Kanninchen (Rasse: Weisse Neuseeländer (NZW)) in einem 70 Tage Protokoll



immunisiert. Dabei werden pro Känninchen 4 Immunisierungsinjektionen durchgeführt. Der Antikörper wird über eine Peptid-Immunaﬃnitätsäule aufgereinigt und per ELISA auf seine Spezifität getestet. Dabei ergab sich für den hergestellten Peptidantikörper gegen die GGT aus *H. pylori* ein Verdünnungsfaktor von 1:500000 im ELISA. Die Immunisierung hat demnach sehr gut funktioniert.

## **3.10. Immunpräzipitation**

### **3.10.1. Prinzip**

Mit Hilfe einer Immunpräzipitation kann ein bestimmtes Antigen aus einer Vielzahl von Antigenen einer Lösung (z.B. Zellysate) isoliert (präzipitiert) werden. Im erhaltenen Präzipitat wird das Antigen über eine bestimmte Funktion (z.B. Enzymaktivität, Ligandenbindung) oder sein Molekulargewicht in der SDS-PAGE (siehe 3.7.) mit anschließendem Western-Blot (siehe 3.8.) identifiziert. Innerhalb dieser Doktorarbeit wird die Immunpräzipitation mit immobilisiertem Protein A durchgeführt. Dabei werden der Antigenlösung Antikörper im Überschuss zugesetzt, so dass sich kein Präzipitat bilden kann. Dann werden die Antigen-Antikörperkomplexe und freien Antikörper mit Protein-A-Sepharose ausgefällt. Durch mehrmaliges Waschen des Präzipitats wird unspezifisch an die Protein-A-Sepharose adsorbiertes Protein (z.B. Aktin) entfernt. Durch Aufkochen des Komplexes aus Antigen Antikörper und Protein-A-Sepharose wird der Antigen-Antikörperkomplex freigesetzt und kann dann zur Bestimmung der Menge des präzipitierten Antigens in der Probe per Western-Blot aufgetrennt und analysiert werden (siehe 3.8.).

### **3.10.2. Durchführung**

Während des gesamten Ablaufs der Immunpräzipitation werden die Proben bei 4°C oder auf Eis inkubiert, um enzymatischen Abbau der Proteine durch Proteasen zu verhindern. Darüber hinaus wird von den verwendeten Pipettenspitzen ein kleiner Teil abgeschnitten, um die Protein A-Sepharose-Beads pipettieren zu können. Zur Immunpräzipitation werden Zellysate verwendet, die, wie unter 3.5. beschrieben, hergestellt wurden. Der Proteingehalt der Zellysate wird bestimmt (siehe 3.4.). Zu 250µg Gesamtprotein pro Probe werden 2µg Primärantikörper pipettiert, der gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet ist. Die Lysate werden dann über Nacht (ca. 18h) bei 4°C auf einem Rollrad unter ständigem Mischen inkubiert. Im Anschluss daran werden zu jeder Probe 20µl Protein A-Sepharose-Beads

pipettiert, die zuvor dreimal mit 1xPBS gewaschen wurden (Zentrifugation: 14000rpm, 2 min, 4°C). Die Lösung wird für 1h bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert (siehe oben). Daran anschließend wird die Suspension abzentrifugiert (14000rpm, 2 min, 4°C) und das Pellet zweimal mit 500µl Lysispuffer (1x) gewaschen (Zentrifugation: 14000rpm, 2 min, 4°C).

Die Proben werden dann mit 1/5 ihres Volumens an 5x SDS-Ladepuffer (siehe 3.7.2.a) versetzt, gut gemischt und 5 min bei 95°C unter Schütteln (1000rpm) in einem Heizblock inkubiert. Nach Zentrifugation der Proben (14000rpm, 2 min, 4°C) werden die erhaltenen Überstände auf ein zuvor hergestelltes SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und aufgetrennt (siehe 3.7.2.). Das immunpräzipitierte Protein wird nun per Western-Blot weiter analysiert (siehe 3.8.). Beim Entwickeln der Chemilumineszenzfilme ist zusätzlich zur Bande des analysierten Proteins eine Bande bei etwa 50kDa zu sehen, welche dem IgG-Molekül des Antikörpers entspricht, mit dem die Immunpräzipitation durchgeführt worden ist.

### **3.11. Ras activation assay**

#### **3.11.1. Prinzip**

Zur Untersuchung des Aktivierungszustandes des kleinen GTP-bindenden Proteins Ras wird innerhalb dieser Doktorarbeit ein käuflich zu erwerbender Kit (EZ-Detect<sup>TM</sup> Ras activation Kit, Fa. Pierce) verwendet. Dieser Kit beruht auf der Tatsache, dass Ras, wie andere GTP-bindende Proteine, bei Bindung von GTP aktiv und bei Bindung von GDP inaktiv ist. Das aktive Ras-Protein (Ras-GTP) bindet spezifisch an die Ras-bindende Domäne (RBD) des Proteins Raf1, wodurch letzteres aktiviert wird. Im verwendeten Kit wird die RBD von Raf1 dazu benutzt, die aktive Form von Ras aus Zelllysaten zu isolieren. Dabei wird ein Fusionsprotein aus GST (Glutathion-S-Transferase) und der RBD von Raf1 zur Immunpräzipitation (pull-down) von aktivem Ras verwendet. Das Fusionsprotein GST-Raf1-RBD (ca. 42kDa) wird mit Zelllysat inkubiert und das dadurch präzipitierte aktive Ras-Protein (ca. 21kDa) im Anschluss daran durch Western-Blot unter Verwendung eines Anti-Ras-Antikörpers detektiert.

#### **3.11.2. Durchführung**

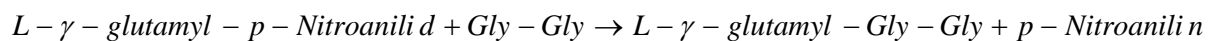
Nach der Behandlung werden die Zellen in Zentrifugationsröhrchen überführt und abzentrifugiert (200g, 5 min, RT). Zur Durchführung des Ras activation assays wird nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Als Positiv- und Negativkontrolle fungieren bei diesem

Test Zellysate, denen vor der Präzipitation des Ras-Proteins entweder GTP $\gamma$ S (Endkonzentration 0,1mM; Positivkontrollle) oder GDP (Endkonzentration 1mM; Negativkontrolle) zugesetzt wurde.

## 3.12. Bestimmung der Enzymaktivität der $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase (GGT)

### 3.12.1. Prinzip

Das am häufigsten verwendete Substrat zur Bestimmung der Enzymaktivität der GGT ist L- $\gamma$ -Glutamyl-p-Nitroanilid. Im Verlauf der GGT-katalysierten Transpeptidierungsreaktion und Hydrolyse dieses Substrats wird der gelbe Farbstoff p-Nitroanilin freigesetzt, dessen Absorption bei 405nm mit einem Spektrophotometer gemessen werden kann. Je mehr p-Nitroanilin bei der Reaktion entsteht, desto höher sind die gemessene Absorption bei 405nm und damit auch die Aktivität des GGT Enzyms in der Probe. Durch Zugabe des Dipeptids Glycylglycin zum Reaktionspuffer werden die Hydrolyse und die Autotranspeptidationsreaktion des Substrats unterdrückt, so dass durch die GGT unter diesen Bedingungen die folgende Reaktion katalysiert wird:



### 3.12.2. Durchführung

Die Bestimmung der Enzymaktivität der GGT erfolgte nach der Methode von Meister (Meister et al 1981). Für die Durchführung des GGT-Enzymtests werden folgende Lösungen verwendet:

0,1M Tris/HCl pH 8,0 (Lagerung: RT)

0,1M Glycylglycin in H<sub>2</sub>O pH 8,0 (NaOH) (Lagerung: -20°C)

5mM L- $\gamma$ -Glutamyl-p-Nitroanilid in H<sub>2</sub>O pH 8,0 (HCl) (Lagerung: -20°C)

Zur Bestimmung der Transpeptidaseaktivität der GGT wird aus den oben angegebenen Komponenten ein Reaktionspuffer hergestellt (20mM Gly-Gly, 2,5 mM L-  $\gamma$  -Glutamyl-p-Nitroanilid in 100mM Tris HCl pH 8,0). In eine 96-well-Platte werden 10 $\mu$ g Protein aus

Kulturüberständen verschiedener *H. pylori*-Stämme oder 2µg rekombinanter GGT-Proteine pro well pipettiert. Dann werden 200µl Reaktionspuffer zu den Proben pipettiert und die Platte wird für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Freisetzung von p-Nitroanilid wird durch Messung der Absorption bei 405nm spektrophotometrisch bestimmt. Eine Aktivitätseinheit (U) ist dabei definiert als die Enzymmenge, die bei 37°C zur Freisetzung von 1µmol p-Nitroanilid pro min und pro Milligramm Protein führt.

### 3.12.3. Berechnungen

Die Berechnungen im Rahmen der Auswertung der Ergebnisse des GGT Test beruhen auf dem *Lambert-Beerschen* Gesetz:

$$(1) \quad E = \varepsilon * c * d$$

Dabei sind: E = Extinktion bei 405nm

c = Konzentration des entstandenen Reaktionsprodukts in mmol/ml

ε = millimolare Proportionalitätskonstante (für Nitroanilid = 11300 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)

d = Schichtdicke der Küvette in cm

Nach Umformung der Gleichung (1) gilt für die Konzentration des entstandenen Reaktionsprodukts (p-Nitroanilid):

$$(2) \quad c = \frac{E}{\varepsilon * d}$$

Zur Berechnung der Konzentration von p-Nitroanilid in Abhängigkeit vom Reaktionsvolumen (Vol; in ml) und der Reaktionszeit (t; in min) ergibt sich daraus:

$$(3) \quad c = \frac{E * Vol}{\varepsilon * d * t}$$

Die Berechnung der Enzymaktivität (U) und der spezifischen Aktivität (U/mg Protein) der GGT, ergibt sich aus der Menge des entstandenen Reaktionsproduktes nach folgenden Gleichungen:

$$(4) \quad U = \frac{(Stoffmenge\ p - p - Nitroanilid)[\mu mol]}{t}$$

$$(5) \quad \text{spez. Aktivität}[U / mg] = \frac{\text{Enzymaktivität}[U]}{(\text{Proteinmenge})[mg]}$$

Die Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgt mit dem Computerprogramm Microsoft Excel.

### 3.13. Glutathion-Test

#### 3.13.1. Prinzip

Zur Bestimmung der intrazellulären Glutathion-Konzentration in den verwendeten Zelllinien wird die so genannte Enzymrecycling-Methode unter Beteiligung der Glutathionreduktase verwendet. Dabei reagiert die Sulfhydrylgruppe (SH-Gruppe) des Glutathionmoleküls (GSH) mit DTNB (5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure, Ellmans Reagenz) unter Bildung der gelb gefärbten 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB). Das gemischte Disulfid GSTNB (Mischung aus GSH und TNB) welches ebenfalls im Verlauf der Reaktion gebildet wird, wird durch die Glutathionreduktase zu GSH und TNB recycelt, wodurch sich die Konzentration dieser beiden Komponenten weiter erhöht. Das Ausmaß der TNB-Produktion ist direkt proportional zu dieser Recyclingreaktion, welche wiederum selbst direkt proportional zur Konzentration von GSH in der Probe ist. Durch Messung der Absorption des TNB bei 405nm kann die GSH-Konzentration in der Probe demnach genau bestimmt werden. Da bei diesem Testverfahren die Glutathionreduktase verwendet wird, liegt das gesamte Glutathion der Probe (GSH + GSSG) im Verlauf der Messung in reduzierter Form (GSH) vor. Mit diesem Test wird also die Gesamtkonzentration an Glutathion in der Probe gemessen (Tietze 1969).

#### 3.13.2. Durchführung

##### a) Zellyse

Für diesen Test werden  $1 \times 10^6$  Zellen pro Probe eingesetzt. Die Zellen werden nach Ende der Behandlung in Zentrifugationsröhrchen (15ml) überführt und abzentrifugiert (200g, 10 min, 4°C). Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 300µl 1xPBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert (200g, 10 min, 4°C). Das Pellet wird in 80µl HCl (10mM) aufgenommen und resuspendiert. Diese Suspension wird zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut, um die Zellen zu lysieren. Zur Präzipitation

zytoplasmatischer Proteine werden 20µl SSA-Lösung (Sulfosalicylsäure 5%) hinzu pipettiert. Die Suspension wird gemischt und abzentrifugiert (10 min, 8000g, 4°C). Der Überstand enthält das zu analysierende Glutathion und wird in ein neues Reaktionsgefäß (1,5ml) überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis oder bei -20°C gelagert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der erhaltenen Proben wird ein Bradford-Test durchgeführt (siehe 3.4.).

### **b) Messung der Glutathion-Konzentration**

Vor dem Start des Versuchs werden folgende Lösungen hergestellt bzw. bereitgestellt:

100mM NaPO<sub>4</sub>-Puffer + 1mM EDTA pH 7,5

1mM DTNB in H<sub>2</sub>O (1ml Aliquots werden bei -20°C gelagert)

25µM GSSG in H<sub>2</sub>O

1mM NADPH in H<sub>2</sub>O (1ml Aliquots werden bei -20°C gelagert)

Glutathionreduktase aus Bäckerhefe, 200 U/mg

In eine 96-well-Zellkulturplatte werden je 50µl einer GSSG-Standardreihe (0, 2, 4, 6, 8, 10µM Endkonzentration) und 50µl von jeder Probe pipettiert. Dann werden mit einer Multikanalpipette 100µl Reaktionspuffer (315µM DTNB + 315µM NADPH + 1,26 U/ml Glutathionreduktase + 362µM EDTA in 36mM NaPO<sub>4</sub>-Puffer) zu jeder Probe pipettiert. Die Absorption der Proben bei 405nm wird mit einem ELISA-Reader für 5 min in 30 sek Intervallen gemessen (insgesamt 6 Messwerte). Von allen Proben und Standardwerten werden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Auswertung der Messungen erfolgt mit dem Computerprogramm MS Excel. Zur Berechnung der GSH-Konzentration in den eingesetzten Proben werden die Mittelwerte der Absorptionen jedes Standard- und Probenwertes in einem Koordinatensystem auf der y-Achse als Funktion der Zeit (x-Achse) aufgetragen. Dann wird die Steigung der erhaltenen Kurven (i) berechnet. Die Steigungswerte jedes Standards werden dann als Funktion der GSSG-Konzentration in einem Koordinatensystem dargestellt. Die Steigung dieser Standardkurve (f) wird berechnet und zur Ermittlung der GSH-Konzentration in den eingesetzten Proben nach folgender Formel verwendet:

GSH [ $\mu\text{M}$ ] =

$\{(i\text{-Wert der Probe}) - (y\text{-Achsenabschnitt der Standardkurve})\} / f\text{-Wert der Probe}$

\* Verd.Faktor

Die erhaltenen Werte werden auf die eingesetzte Proteinmenge jeder Probe normalisiert ( $\mu\text{M}$  GSH pro mg Protein) und als Prozentwerte in Bezug auf die Kontrolle (100% GSH) in Form von Säulendiagrammen dargestellt.

## 3.14. Enzyme-linked Immunosorbentassay (ELISA)

### 3.14.1. Prinzip

Bei einem ELISA wird ein Antikörper (Primärantikörper), der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist, auf einem festen Träger immobilisiert. Die Probe, die auf das genannte Protein untersucht werden soll (z.B. Zellkulturüberstand), wird unter Bedingungen, die eine Bindung zwischen Antikörper und Protein ermöglichen, auf die mit Primärantikörper beschichtete Platte aufgetragen. Nicht gebundene Proteinmoleküle werden dann von der Platte gewaschen. Der resultierende Komplex aus Protein und Primärantikörper wird mit einem zweiten, mit Biotin markierten Antikörper (Sekundärantikörper) gekoppelt, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Ungebundene Sekundärantikörper werden durch Waschen der Platte entfernt. Dann wird die Platte mit einem an Streptavidin gebundenen Enzym (hier HRP) inkubiert, welches an die Biotin-Gruppe des Sekundärantikörpers bindet. Durch anschließende Inkubation mit einer Substratlösung für die Peroxidase (hier TMB) kommt es zu einer Farbreaktion, welche die Menge des gesuchten Proteins in der Probe anzeigt.

### 3.14.2. Durchführung

Die jeweils verwendeten Zellen werden in Zellkulturplatten ausgesät (PBMC:  $5 \times 10^5$  Zellen/well; primäre T-Zellen:  $1 \times 10^6$  Zellen/well) und für verschiedene Zeiträume je nach Versuchsansatz im Brutschrank inkubiert. Bei Ende der Inkubationszeit werden die Zellsuspensionen in auf Eis vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt und abzentrifugiert (300g, 10min,  $4^\circ\text{C}$ ). Die Überstände werden in neue, vorgekühlte Reaktionsgefäße pipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Analyse verschiedener Zytokine in den Überständen erfolgt mit Hilfe kommerziell erhältlicher ELISA-Kits gemäß der Angaben des jeweiligen Herstellers (IL-2-ELISA: Fa.

eBioscience; IFN- $\gamma$ -ELISA: Fa. Biosource). Generell ist bei der Durchführung eines ELISA darauf zu achten, dass die wells der verwendeten ELISA-Platte nicht austrocknen.

Die untere Nachweisgrenze der verwendeten ELISA-Kits liegt bei 4 (IL-2-ELISA) bzw. 8 (IFN- $\gamma$ -ELISA) pg/ml.

### **3.15. FACS-Analyse (Durchflusszytometrie)**

#### **3.15.1. Prinzip**

Ein Durchflusszytometer besteht aus einer Lichtquelle, Kollektoren, Elektronik und einem Computer, der die gemessenen Signale in Daten umwandelt. Bei der Lichtquelle handelt es sich meistens um einen Laser, der kohärentes Licht einer bestimmten Wellenlänge aussendet. Durch das ausgestrahlte Licht werden Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. Propidiumjodid, FITC) angeregt, mit denen Zellen oder Partikel in einer Probe zuvor behandelt worden sind. Die Kollektoren sammeln das von diesen Probenbestandteilen daraufhin emittierte und gestreute Fluoreszenzlicht mit Hilfe zweier Linsen. Durch weitere optische Hilfsmittel und Filter ist es möglich, bestimmte Fluoreszenzbanden zu messen. Dadurch können mit der Durchflußzytometrie oder FACS-Analyse (fluorescence-activated cell sorting) bestimmte Zellcharakteristika wie z.B. Größe, Form und Expression bestimmter Membranrezeptoren untersucht werden. Allgemein formuliert ist es möglich, alle Zellkomponenten bzw. – funktionen zu analysieren, die mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes detektiert werden können. Die Durchflußzytometrie wird daher für unterschiedliche Anwendungen wie z.B. Zellsortierung, DNA-Analyse, funktionelle Studien und Phänotypanalysen genutzt.

#### **3.15.2. Durchführung**

##### **3.15.3. CD25/CD3- und CD69/CD3- Analyse primärer T-Zellen**

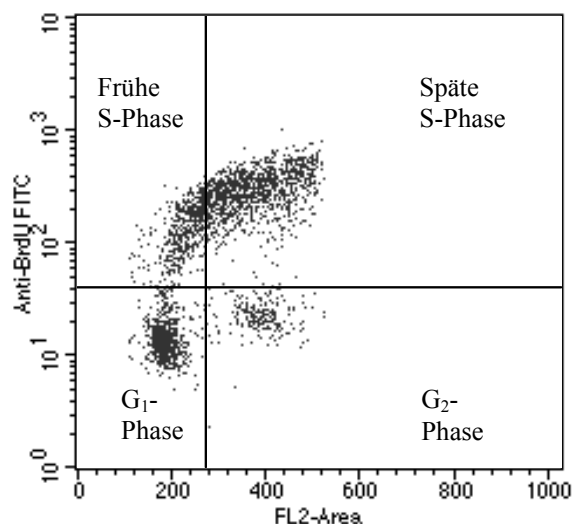
Nach Inkubation der verwendeten Zellen (etwa  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  Zellen pro Probe) für unterschiedliche Zeiträume, werden diese gesammelt und in 15ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zellsuspension wird abzentrifugiert (300g, 10 min, RT), der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 100 $\mu$ l 1xPBS resuspendiert. Zu jeder Probe werden 10 $\mu$ l des jeweiligen Antikörpers (z.B. CD25-PE, CD69-PE, CD3-FITC) pipettiert (1:10 Verdünnung der Antikörperlösung). Um das Ausmaß unspezifischer Bindungen der



eingesetzten Antikörper zu bestimmen, wird eine Kontrollprobe mit jeweils 10µl eines Isotypantikörpers (z.B. IgG2a-PE, IgG1-FITC) versetzt. Zur Bindung der Antikörper an die entsprechenden Antigene werden die Proben gemischt und für 30 min lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 880µl 1xPBS werden die Zellen gewaschen und dann abzentrifugiert (300g, 10 min, RT). Der Überstand wird vollständig entfernt und das Pellet in 500µl – 1ml 1xPBS (je nach Zellzahl der Probe) resuspendiert. Falls die Zellen bis zu FACS-Analyse für längere Zeit gelagert werden sollen, so werden sie vor der Antikörpermarkierung fixiert. Dazu wird das am Anfang erhaltene Zellpellet in 1ml 1xPBS + 2% (v/v) Formaldehyd resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Vor der Markierung mit den jeweiligen Antikörpern werden die Proben dann einmal mit 1xPBS gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen. Als Kontrollen zur Einstellung des FACS-Geräts werden unmarkierte Zellen und Zellen die nur mit jeweils einem der beiden Antikörper (FITC- oder PE-markiert) markiert wurden, verwendet. Die Analyse der Proben erfolgt an einem BD FACSCalibur-Gerät (Fa. BD Biosciences). Es werden von jeder Probe 10000 CD3-positive (T-Zellen) gemessen. Die Ergebnisse werden mit der Software Cell Quest 3.3 (Fa. BD Biosciences) ausgewertet.

### 3.15.4. BrdU/PI-Zellzyklusanalyse

#### 3.15.4.1. Prinzip



**Abb. 7:** Dot-Plot einer BrdU (y-Achse)/PI (x-Achse)-FACS-Analyse

Das Prinzip der BrdU/PI-Zellzyklusanalyse entspricht dem einer Proliferationsmessung durch  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation (siehe 3.2.6.1.). Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein Uridinderivat, welches anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen inkorporiert werden kann. Durch Verwendung eines gegen BrdU gerichteten z.B. fluoreszenzmarkierten Antikörpers (Anti-BrdU-FITC) kann daher BrdU z.B. in einzelsträngiger DNA detektiert werden (Gratzner 1982). Dazu werden Zellen

zunächst mit BrdU vorinkubiert. Die Zellen, die in dieser Vorinkubationsphase DNA

synthetisieren (in der S-Phase des Zellzyklus) werden BrdU in die DNA einbauen. Unter Verwendung eines Anti-BrdU Antikörpers (s. oben) können diese Zellen identifiziert und damit der Anteil der Zellen, der sich in der S-Phase des Zellzyklus befindet durch Fluoreszenzmikroskopie oder FACS Analyse bestimmt werden. Durch zusätzliche Inkubation der Zellen mit Propidiumjodid, wird deren DNA gefärbt. In der FACS-Analyse wird nun das Ausmaß der Inkorporation von BrdU auf der y-Achse gegen den DNA-Gehalt der Zellen (Propidiumjodidfärbung) aufgetragen (siehe Abb. 7). Zellen, die kein BrdU inkorporiert haben und wenig DNA enthalten (einfacher Chromosomensatz) befinden sich in der G<sub>1</sub>-Phase. Dagegen haben Zellen, die ebenfalls wenig BrdU inkorporiert haben, aber doppelt soviel DNA enthalten wie die G<sub>1</sub>-Zellen (doppelter Chromosomensatz) die S-Phase durchlaufen und befinden sich in der G<sub>2</sub>-Phase. Die Zellen, die während der Inkubation mit BrdU DNA synthetisiert haben, enthalten dementsprechend mehr BrdU als die G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Zellen und je nach Position in der S-Phase (früh oder spät), den einfachen (frühe S-Phase) oder doppelten (späte S-Phase) Chromosomensatz (siehe Abb. 7).

#### **3.15.4.2. Durchführung**

Für die Zellzyklusanalyse werden Zellen ( $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^8$  Zellen pro Probe) zunächst durch Inkubation in Medium mit 0,2% Serum gestarvt und dadurch größtenteils synchronisiert. Je nach Versuchsansatz werden die Zellen im Anschluss daran für unterschiedliche Zeiträume in Anwesenheit der üblichen Serummenge (10%) inkubiert. Für die letzten 30 min der Inkubation wird dem Kulturmedium 10µM BrdU zugesetzt. Die Zellen werden dann gesammelt, in Zentrifugationsröhrchen (15ml) überführt, abzentrifugiert und zweimal mit 1%BSA/PBS gewaschen (Zentrifugation: 500g, 15 min, RT). Das erhaltene Zellpellet wird in 200µl 1xPBS auf Eis resuspendiert. 3ml 70% Ethanol werden in 5ml-Röhrchen pipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Zellsuspension (siehe oben) wird nun langsam, tropfenweise unter ständigem Rühren (Vortex-Rührer) zur eiskalten Ethanollösung pipettiert. Die Zellen werden für 30 min auf Eis inkubiert und dadurch fixiert. Dann wird die Zellsuspension abzentrifugiert (500g, 10 min, 4°C), der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet durch Rühren (Vortex-Rührer) gelöst. Dann wird langsam, tropfenweise und unter Rühren (Vortex-Rührer) 1ml 2N HCl/Triton X-100-Lösung hinzugegeben. Die Zellsuspension wird im Anschluss für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diese Behandlung wird die DNA der Zellen zu Einzelstrangmolekülen denaturiert. Die Suspension wird abzentrifugiert (500g, 10 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in 1ml 0,1M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10 H<sub>2</sub>O pH 8,5 zur Neutralisation der Salzsäure resuspendiert. Nach Zentrifugation

(500g, 10 min, RT) werden die Zellen in 1ml 0,5% Tween-20/1%BSA/PBS resuspendiert und die Zellzahl per Zellzählung (siehe 3.2.3.) auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro Probe eingestellt. Zur Markierung des inkorporierten BrdU werden dann 20µl FITC-markierter BrdU Antikörper (Anti-BrdU-FITC) zur Suspension pipettiert und diese für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend werden die Zellen einmal mit 1ml Tween-20/BSA/PBS-Lösung (siehe oben) gewaschen (Zentrifugation: 500g, 10 min, RT) und dann zur Färbung der DNA in 1ml 1xPBS mit 0,5µg/ml Propidiumjodid resuspendiert. Als Kontrollen für die Einstellung der Parameter des FACS-Gerätes werden unmarkierte Zellen und Zellen die nur mit Anti-BrdU-FITC oder nur mit Propidiumjodid behandelt wurden, eingesetzt. Von jeder Probe werden 10000 Zellen gemessen. Die Analyse der Proben erfolgt mit einem Durchflusszytometer (BD FACSCalibur, s. oben) bei einer Excitationswellenlänge von 488nm. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit der Software CellQuest 3.3 (siehe oben).

### **3.15.5. Annexin/PI-Messung (Apoptose-Messung)**

#### **3.15.5.1. Prinzip**

Unter Apoptose versteht man den programmierten Tod also eine Art des Absterbens einer Zelle. Bei diesem Vorgang kommt es zu intra- aber auch extrazellulären Veränderungen der Zelle. Die letzteren können per FACS-Analyse detektiert werden, da eine apoptotische Zelle Phosphatidylserinreste auf ihrer extrazellulären Oberfläche exprimiert. Das Molekül Annexin V ist ein Protein, welches  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an Phospholipide bindet und eine hohe Affinität für Phosphatidylserin hat. Bei Inkubation von Zellen mit Annexin V in Kombination mit einem Marker, der die Lebensfähigkeit der Zellen detektiert (z.B. Propidium-Jodid), können in der FACS-Analyse lebendige, tote und apoptotische Zellen voneinander unterschieden werden.

Annexin V positive und gleichzeitig Propidiumjodid negative Zellen sind apoptotisch. Zellen die sowohl Annexin V als auch Propidiumjodid positiv sind, durchlaufen entweder die Endphase der Apoptose, sind nekrotisch oder bereits tot. Zellen, die weder mit Annexin V noch mit Propidiumjodid gefärbt sind, sind demnach lebendig und durchlaufen keine Apoptose (Vermees et al 1995).

#### **3.15.5.2. Durchführung**

Die je nach Versuchsansatz behandelten Zellen (ca.  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  Zellen pro Probe) werden in Zentrifugationsröhrchen (15ml) überführt, abzentrifugiert (300g, 10 min, RT) und das Pellet

wird einmal mit 1ml eiskaltem 1xPBS gewaschen (Zentrifugation: 300g, 10 min RT). Das Pellet wird in 500µl – 1ml (je nach eingesetzter Zellzahl) Annexin-Bindungspuffer (10mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140mM NaCl, 2,5mM CaCl<sub>2</sub>) resuspendiert. Zu 500µl Zellsuspension werden 5µl Annexin V-FITC pipettiert. Die Suspension wird gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dann wird Propidiumjodidlösung (5µl auf 500µl Zellsuspension) hinzugegeben, die Probe wird gemischt, für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit einem FACS-Gerät analysiert. Zur Einstellung der FACS-Geräts werden unmarkierte Zellen und Zellen die nur mit Propidiumjodid bzw. Annexin V-FITC gefärbt wurden, eingesetzt. Von jeder Probe werden 10000 Zellen gemessen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software CellQuest 3.3. Bei der Durchführung dieser Methode ist es wichtig, dass die Markierung der Zellen mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid im Dunkeln und bei Raumtemperatur stattfindet. Da die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche ein Ca-abhängiger Prozess ist, muss der verwendete Bindungspuffer Ca<sup>2+</sup> enthalten.

## **3.16. Säulenchromatographie**

### **3.16.1. Prinzip**

#### **a) Gelfiltrationschromatographie**

Bei der Gelfiltrations- oder auch Größenausschluss-, Molekularsiebchromatographie, werden Moleküle aufgrund ihrer Größe und Form voneinander getrennt. Die stationäre Phase besteht bei dieser Technik aus kleinen Kugeln (beads) eines hydratisierten, schwammähnlichen Materials (Gel), welches Poren enthält, deren Größe einen relativ engen Bereich überdeckt. Wird eine Lösung, die verschieden große Moleküle enthält, durch eine Gelfiltrationschromatographie-Säule geleitet, so werden die Moleküle, die größer sind als diese Poren, außen an den Kugeln vorbei geleitet. Daher werden diese Moleküle schneller durch die Säule fließen, also in einem kleineren Volumen eluiert werden, als kleine Moleküle, welche die Poren passieren können. Das Molekulargewicht des kleinsten Moleküls, das die Poren der Säulenmatrix nicht passieren kann, wird als Ausschlussgrenze des Gels bezeichnet. Diese Größe hängt in gewissen Maß von der Form des Moleküls ab, da gestreckte Moleküle aufgrund ihres größeren Hydrationsradius die Poren des Gels schlechter durchdringen können als globuläre Proteine des gleichen Molekulargewichts. Das Verhalten eines bestimmten

Moleküls auf einem vorgegebenen Gel wird durch das Verhältnis  $V_e/V_0$ , dem relativen Elutionsvolumen bestimmt. Dabei ist  $V_0$  das Hohlraumvolumen (void volume) der Säule, also das Volumen des Lösungsmittels, welches die Gelbeads der Säule umgibt.  $V_e$  ist das Elutionsvolumen einer gegebenen Substanz, also das Lösungsmittelvolumen, das benötigt wird, um die Substanz von der Säule zu eluieren. Das relative Elutionsvolumen ist unabhängig von der Größe der verwendeten Säule. Moleküle deren Molekulargewicht unterhalb der Ausschlussgrenze des verwendeten Gels liegt, werden in der Reihenfolge ihrer Molekulargewichte vom Gel eluiert, wobei das größte Molekül zuerst eluiert wird. Das liegt daran, dass die Poren eines Gels über einen begrenzten Größenbereich variieren, so dass größere Moleküle weniger Zugang zum Inneren des Gels haben als kleinere. Man spricht daher bei der Gelfiltration auch von einem „umgekehrten Siebeffekt“. Da ein lineares Verhältnis zwischen dem relativen Elutionsvolumen einer Substanz und dem Logarithmus ihres Molekulargewichts besteht, wird die Gelfiltrationschromatographie häufig zur Bestimmung des Molekulargewichtes einer Substanz eingesetzt. Durch Trennung von Molekülen bekannter Molekularmasse auf dem gleichen Gel kann das Molekulargewicht einer unbekanntes Verbindung aus ihrem relativen Elutionsvolumen berechnet werden. Streng genommen gilt die gemachte Angabe jedoch nur dann, wenn die miteinander verglichenen Moleküle die gleiche Form haben. Die am häufigsten zur Herstellung von Chromatographiegelen eingesetzten Materialien sind Dextran (hochmolekulares Glukosepolymer produziert vom Bakterium *Leuconostoc mesenteroides*), Agarose (lineares Polymer aus abwechselnden D-Galaktose- und 3,6-Anhydro-Galaktose-Einheiten aus Rotalgen) und Polyacrylamid.

## **b) Dialyse**

Unter Dialyse versteht man den Prozess der Trennung von Molekülen aufgrund ihrer Größe mit Hilfe einer semipermeablen Membran. Diese Membran enthält Poren, durch die Moleküle, die kleiner als diese Poren sind (z.B. Lösungsmittelmoleküle, Salze, kleine Metabolite) diffundieren können, große hingegen nicht. Dialysemembranen werden häufig aus Zellophan (Zelluloseacetat) oder Nitrozellulose hergestellt. Die Dialyse, die keine Form der Chromatographie darstellt, wird routinemäßig zum Wechsel des Lösungsmittels von Makromolekülen verwendet. Dabei wird eine makromolekulare Lösung in einen Dialyseschlauch eingeschlossen, welcher dann in ein relativ großes Volumen des neuen Lösungsmittels überführt wird. Nach mehreren Stunden Inkubation unter Rühren haben sich die Lösungen äquilibriert, wohingegen die Makromoleküle innerhalb des Dialyseschlauches

verblieben sind. Durch mehrmaliges Wiederholen dieser Prozedur kann ein Lösungsmittel vollständig gegen das andere ausgetauscht werden.

### **c) Affinitätschromatographie**

Bei der Affinitätschromatographie wird die Fähigkeit vieler Proteine ausgenutzt, an spezifische Moleküle fest aber nicht kovalent zu binden. Bei dieser Technik wird ein so genannter Ligand, der spezifisch an das zu isolierende Protein bindet, kovalent an eine inerte, poröse Matrix gekoppelt. Wird nun ein Proteingemisch über eine so beschaffene Chromatographiesäule geleitet, dann bindet das aufzureinigende Protein an den immobilisierten Liganden, wohingegen die anderen Proteine der Lösung mit dem Puffer von der Säule gewaschen werden. Durch Veränderung der Elutionsbedingungen kann dann das gesuchte Protein von der Matrix der Säule in sehr reiner Form freigesetzt werden. Im Unterschied zu anderen Chromatographietechniken werden bei der Affinitätschromatographie also bestimmte Eigenschaften eines speziellen Proteins ausgenutzt und nicht geringe Unterschiede in physikochemischen Eigenschaften verschiedener Proteine. Die Säulenmatrix der Affinitätschromatographie muss chemisch inert und hoch porös sein und viele funktionelle Gruppen tragen, mit denen der Ligand kovalent gebunden werden kann. Das am häufigsten für diese Chromatographietechnik verwendete Material ist Agarose, aufgrund seiner vielen freien Hydroxylgruppen. Um sterische Interferenzen des zu reinigenden Proteins mit der Säulenmatrix bei der Bindung des Liganden zu verhindern bzw. zu minimieren, werden so genannte „Spacer-Gruppen“ verwendet, die den Liganden mit der Säulenmatrix verbinden. Die Affinität des bei der Affinitätschromatographie verwendeten Liganden muss hoch genug sein, um das gesuchte Protein auf der Säulenmatrix zu immobilisieren, darf aber nicht so hoch sein, dass die Elution dieses Proteins von der Säule nicht mehr möglich ist. Zur Elution des Proteins werden häufig Lösungen von Substanzen verwendet, die eine höhere Affinität zum Liganden haben als das zu reinigende Protein. Bei der Reinigung von HisTaq Proteinen mit einer Nickelchelatsäule wird zum Beispiel zur Elution ein imidazolhaltiger Puffer verwendet, da Imidazol eine hohe Affinität gegenüber Nickel hat. Darüber hinaus kann eine Elution auch durch Veränderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke des Elutionspuffers erreicht werden, wodurch es zu einer Aufhebung der Ligand-Protein-Bindung kommt.

### 3.16.2. Durchführung

#### 3.16.2.1. Auftrennung sezernierter *H. pylori* Proteine durch

##### Gelfiltration

Die Gelfiltrationschromatographie wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Arbeitsgruppe von Dr. Ludger Hengst durchgeführt.

Für die Aufreinigung sezernierter Proteine aus *H. pylori* werden Kulturüberstände der Bakterien hergestellt (siehe 3.1.4.). 500µg Gesamtprotein eines solchen Kulturüberstandes werden mit Hilfe eines Chromatographiesystems (Äktaexplorer 100, Fa. Amersham Biosciences) auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex 200 10/300, Fa. Amersham Biosciences) aufgetragen. Laut den Angaben des Herstellers können mit dieser Säule globuläre Proteine mit einer Größe ( $M_r$ ) von 10000 bis 600000 aufgetrennt werden. Das Bettvolumen der verwendeten Säule beträgt 24ml (Zahl theoretischer Böden: 30000). Zur Elution der Proteine von der Säule wird PBS-Puffer (1x) bei einer Flussrate von 1ml/min verwendet. Von jeder aufgetragenen Probe werden 50 Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 500µl gesammelt. Die Gelfiltration wird bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt, um proteolytischen Abbau der Proteine in der Probe während der Aufreinigung möglichst zu verhindern. Der Ablauf und die Analyse der Gelfiltration verlaufen computergesteuert unter Verwendung des UNICORN Control Systems (Fa. Amersham Biosciences). Die erhaltenen Fraktionen werden mit Hilfe eines im Chromatographiesystem enthaltenen automatischen Fraktionssammlers gesammelt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der von der Säule eluierten Peaks werden die folgenden Standardproteine mit bekannter Größe verwendet:  $\beta$ -Amylase (200kDa), Alkoholdehydrogenase (150kDa), Rinderserumalbumin (BSA, 66kDa) und carbonische Anhydrase (29kDa). Die Detektion der von der Säule eluierten Proteine erfolgt mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 280nm.

Die gesammelten Fraktionen werden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Untersuchung der Eigenschaften und Proteinzusammensetzung der einzelnen Proben werden <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporationstests (siehe 3.2.6.) und SDS-PAGE (siehe 3.7.) durchgeführt.

#### 3.16.2.2. Aufreinigung rekombinanter Proteine mit HisTaq

Zur Aufreinigung von *H. pylori* GGT (HisTag GGT), die rekombinant in *E. coli* exprimiert wurden (siehe 3.22.), werden zwei säulenchromatographische Schritte durchgeführt. Zum einen die Nickelchelate-Affinitätschromatographie und zum anderen die Bluegel-

Chromatographie (siehe 3.16.1.). Für den ersten Schritt, die Nickelchelatchromatographie, werden kommerziell verfügbare Nickelchelate-Affinitätschromatographiesäulen (HisTrapHP, Fa. Amersham Biosciences) mit einem Säulenvolumen (SV) von 5ml in Kombination mit dem Chromatographiesystem Äkta Prime (Fa. Amersham Biosciences) verwendet. Pro Milliliter der Säulenmatrix (quervernetzte Agarose) sind  $15\mu\text{mol Ni}^{2+}$  gebunden. Die Zusammensetzung der für die im Folgenden beschriebene Aufreinigung benötigten Puffer ist in Tabelle 4 angegeben. Die Aufreinigung erfolgt bei Raumtemperatur, wobei die Proben für die Dauer des Experiments auf Eis gelagert werden. Das jeweilige Lysat der *E. coli* Expressionskultur (siehe 3.22.j) wird auf eine HisTrapHP Säule (siehe oben) mit einer Flußrate von 1ml/min aufgetragen, die zuvor mit 10 SV Bindungspuffer äquilibriert wurde. Der Durchfluss (flow-through) der Säule wird in einer Fraktion gesammelt. Die weiteren Schritte der Aufreinigung werden ebenfalls bei einer Flussrate der Säule von 1ml/min durchgeführt. Das Volumen der gesammelten Fraktionen beträgt 5ml. Nach dem Probenauftrag wird die Säule zunächst mit 10 SV Waschpuffer 1, gefolgt von 10 SV Waschpuffer 2 und erneut 10 SV Waschpuffer 1 gewaschen. An die Säulematrix gebundenes (HisTaq-) Protein wird mit Elutionspuffer unter Verwendung eines stufenweisen Imidazolgradienten eluiert (1 SV pro Stufe). Pro Stufe des Gradienten wird eine Fraktion gesammelt. Im Anschluss an die Säulechromatographie werden alle Fraktionen auf GGT-Enzymaktivität (siehe 3.12.) und mittels SDS-PAGE (siehe 3.7.) und Anti-Penta His sowie Anti-GGT Western-Blot (siehe 3.8.) auf ihre Zusammensetzung und das Vorhandensein der rekombinanten GGT untersucht. Die weitere Aufreinigung der rekombinanten HisTaq GGT erfolgt durch BlueGel-Affinitätschromatographie (siehe 3.16.2.4.).



Puffer	Zusammensetzung
Binding/Lysis buffer	20mM Tris/HCl, 500mM NaCl, 20mM Imidazol, pH 7.4
Waschpuffer1	wie Bindungspuffer
Waschpuffer2 (Hochsalzpuffer)	20mM Tris/HCl, 900mM NaCl, 20mM Imidazol, pH 7.4
Elutionspuffer	20mM Tris/HCl, 500mM NaCl, 100-1000mM Imidazol, pH 7.4
Regenerationspuffer	20mM Tris/HCl, 500mM NaCl, 1M Imidazol pH 7,4

Tabelle 4: Pufferlösungen für die Aufreinigung rekombinanter HisTag GGT durch Nickelchelate-Affinitätschromatographie

Zur Regeneration wird die verwendete Säule zunächst mit 8 SV Regenerationspuffer gespült, um möglicherweise noch an die Säulenmatrix gebundene Proteine zu entfernen. Dann wird die Säule mit 3 SV H<sub>2</sub>O bidest gewaschen, um das Imidazol des Regenerationspuffers von der Säule zu waschen. Zum Abschluss wird die Säule mit 2 SV NiSO<sub>4</sub> (100mM) gespült, um die bei der Reinigung von der Säule entfernten Ni<sup>2+</sup>-Ionen zu ersetzen. Die Säule wird erneut mit 3 SV H<sub>2</sub>O bidest und im Anschluss mit 2 SV Ethanol (20%; zum Schutz vor mikrobieller Kontamination der Säule) gespült. Die Nickelchelatsäule kann in diesem Zustand verschlossen bei 4°C bis zur nächsten Verwendung gelagert werden.

### 3.16.2.3. Dialyse

Bevor die enzymatisch aktiven Eluate der Nickelchelate-Affinitätschromatographie durch Bluegel-Affinitätschromatographie weiter aufgereinigt werden können, müssen sie dialysiert werden. Dazu werden die Proben vereinigt und in einen, zuvor in Dialysepuffer (20mM Tris/HCl pH 7,5) eingeweichten Dialyseschlauch (aus regenerierter Zellulose) gefüllt. Die

Ausschlussgrenze der verwendeten Dialysemembran CellSep<sup>®</sup> T2 (Fa. Membrane Filtration Products) beträgt 6-8 kDa. Der Dialyseschlauch wird mit zwei Dialyseklammern möglichst luftblasenfrei verschlossen. Die Dialyse erfolgt unter Rühren bei 4°C gegen 1 Liter Dialysepuffer (siehe oben).

#### **3.16.2.4. Affinitätschromatographie (BlueGel)**

Zur weiteren Aufreinigung der enzymatisch aktiven und dialysierten (siehe oben) Eluate der Nickelchelate-Chromatographie wird eine Bluegel-Affinitätschromatographiesäule (Affi-Gel<sup>®</sup> Blue, Fa. Amersham Biosciences) verwendet. Diese Säule besteht aus einer Matrix aus quervernetzter Agarose, an die der Farbstoff Cibacron<sup>™</sup> Blue F3GA als Ligand kovalent über einen Triazinrest gebunden ist. Die Bindung von Proteinen an diesen Farbstoff kann auf einer biospezifischen Wechselwirkung mit dem zu reinigenden Protein beruhen, da der Ligand eine ähnliche Struktur wie Nukleotidkofaktoren aufweist. Andere Proteine binden aufgrund weniger spezifischer Wechselwirkungen (z.B. elektrostatische, hydrophobe Wechselwirkungen) an die aromatische, anionische Struktur des Liganden. Pro Milliliter Säulenmatrix sind bei der verwendeten Säule 1,9mg des Farbstoffes gebunden. Das Volumen der verwendeten Säule beträgt 12,3 ml. Es werden Fraktionen mit einem Volumen von 12,3 ml gesammelt. Die Zusammensetzung der im Verlauf dieser Chromatographie verwendeten Pufferlösungen ist aus Tabelle 5 zu entnehmen. Zur Durchführung der Chromatographie wird das Chromatographiesystem ÄktaPrime verwendet (siehe 3.16.2.2.). Vor dem Auftrag der Probe wird die Säule mit 5 SV Bindungspuffer aquilibriert. Dann wird die dialysierte Probe (siehe oben) bei einer Flussrate von 1ml/min auf die Säule geladen. Der Durchfluss wird in einer Fraktion gesammelt. Im Anschluss daran wird die Säule mit 6 SV des Waschpuffers gewaschen. An die Säulenmatrix gebundenes Protein wird mit Elutionspuffer unter Verwendung eines stufenweisen NaCl-Gradienten (50mM-Schritte) eluiert. Dabei wird pro Stufe des Gradienten eine Fraktion gesammelt. Alle gesammelten Fraktionen werden am Ende der Chromatographie durch Western-Blot (mit Anti-GGT Antikörper; siehe 3.8.) und GGT-Enzymtest (siehe 3.12.) auf die Anwesenheit rekombinanter HisTaq GGT untersucht. Die enzymatisch aktiven Fraktionen werden vereinigt, gegen 20mM Tris/HCl pH 7,4 für 90 min bei 4°C dialysiert (siehe 3.16.2.3.) und bis zur weiteren Verwendung aliquotiert (500µl pro Aliquot) und bei -80°C gelagert.

Zur Regeneration der Säulenmatrix wird die verwendete Säule zunächst mit 5 SV 1,5M NaCl in H<sub>2</sub>O gefolgt von 10 SV H<sub>2</sub>O gewaschen, um noch auf der Säule verbliebene Proteine zu entfernen. Zur Regeneration der Säulenmatrix wird die Säule im Anschluss daran mit 3 SV

2M Guanidiniumhydrochlorid (in H<sub>2</sub>O) gespült. Nach gründlichem Waschen der Säulenmatrix (4 SV H<sub>2</sub>O) wird die Säule bis zur weiteren Verwendung mit 20% (v/v) Ethanol gefüllt und bei 4°C gelagert.

Puffer	Zusammensetzung
Bindungspuffer	20mM Tris/HCl pH 7.5
Waschpuffer	wie Bindungspuffer
Elutionspuffer	20mM Tris/HCl, 50-1000mM NaCl, pH 7.5

Tabelle 5: Pufferlösungen zur Aufreinigung rekombinanter HisTaq GGT-Proteine durch Affi-

Gel® Blue Affinitätschromatographie

## 3.17. RNA-Isolierung aus Säugerzellen

### 3.17.1. Prinzip

Zur Isolierung von RNA aus den verwendeten Zellkulturen wird in der vorliegenden Arbeit der kommerziell verfügbare RNeasy Mini Kit (Fa. Qiagen) verwendet. Mit diesem Kit werden biologische Proben (z.B. Zellkulturen, Gewebe) zunächst in Anwesenheit des stark Protein-denaturierenden Guanidiniumisothiocyanats lysiert und homogenisiert. Dabei werden in der Probe vorhandene RNasen inaktiviert. Die RNA der Probe wird dann an eine Membran auf Silica-Gel-Basis gebunden, wobei die Bindungsfähigkeit der RNA durch Zugabe von Ethanol erhöht wird. Durch mehrmaliges Waschen der Säule werden Kontaminationen der RNA entfernt und diese am Schluss mit RNase freiem H<sub>2</sub>O von der Siliziummatrix eluiert. Mit dieser Methode kann RNA mit einer Größe von mindestens 200bp aus mehreren Proben gleichzeitig in kurzer Zeit aufgereinigt werden.

### 3.17.2. Durchführung

Zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen werden im Verlauf der RNA-Isolierung ausschließlich sterile, RNase freie Plastikwaren (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße) verwendet. Bei Hantierung der Proben werden Latexhandschuhe getragen, die zwischendurch mehrmals gewechselt werden. Darüber hinaus werden nur die RNase-freien Puffer verwendet, die im verwendeten RNeasy Kit enthalten sind.

Nach Beendigung der Inkubation werden die verwendeten Zellen gesammelt, in Zentrifugationsröhrchen überführt und abzentrifugiert (300g, 5 min, RT). Der Überstand (Zellkulturmedium) wird mit einer Pasteurpipette vollständig abgesaugt. Das Zellpellet wird entweder direkt für die RNA-Isolierung verwendet oder in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Durchführung der anschließenden RNA-Isolierung erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers.

Die Konzentration der aufgereinigten RNA wird unter Verwendung eines UV-Photometers bestimmt (siehe unten). Bis zur weiteren Verwendung wird die RNA auf Eis oder für längere Zeiträume bei -80°C gelagert.

### 3.17.3. Quantifizierung der RNA

Zur Messung von RNA-Proben werden RNase-freie UV-Einmalküvetten (1ml) verwendet. Zum Nullabgleich des zur Messung verwendeten Spektrophotometers wird H<sub>2</sub>O verwendet.

Die Konzentration der aufgereinigten RNA wird durch Messung der Absorption bei 260nm (A<sub>260</sub>) mit einem Spektrophotometer ermittelt. Dabei werden nur Messwerte größer als 0,15 als signifikant angesehen. Bei Absorptionswerten von über 1,0 wird die Probe entsprechend in H<sub>2</sub>O verdünnt. Basierend auf dem Extinktionskoeffizienten von RNA in Wasser entspricht ein Absorptionswert von 1 bei einer Wellenlänge von 260nm bei der Messung in Wasser einer Konzentration von 40µg RNA pro Milliliter. Die Konzentration der aufgereinigten RNA errechnet sich demnach nach folgender Formel:

$$c[\mu\text{g} / \text{ml}] = 40 * A_{260} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Durch Multiplikation dieses Wertes mit dem Gesamtvolumen der Probe (in ml) ergibt sich die Gesamtmenge der RNA in der Probe. Zur Beurteilung der Reinheit der isolierten RNA in Bezug auf Kontaminationen der Probe mit UV-absorbierenden Komponenten (z.B. Protein) wird der Quotient aus der Absorption der Probe bei 260nm und 280nm (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>) berechnet. Da der pH-Wert der Probenlösung diesen Quotienten beeinflusst (niedrigerer pH-Wert führt zum Absinken des Quotienten) und H<sub>2</sub>O nicht gepuffert ist, wird die Bestimmung der

Reinheit der RNA durch Verdünnung der Probe in 10mM Tris/HCl pH 7,5 durchgeführt (Wilfinger et al 1997). Reine RNA zeigt in diesem Puffer ein Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  von 1,9-2,1.

### **3.18. Plasmid-DNA-Aufreinigung**

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterienkulturen erfolgt in dieser Doktorarbeit mit dem Qiafilter Plasmid Maxi Kit (Fa. Qiagen).

#### **3.18.1. Prinzip**

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA durch den verwendeten Kit basiert auf alkalischer Lyse der Bakterien und der anschließenden Bindung negativer geladener Gruppen der DNA an positiv geladene DEAE (Diethylaminoethanol)-Gruppen auf der Oberfläche von Silica-Gel-Trennsäulen. Die nach der Plasmidamplifikation erhaltenen Bakterienzellen werden zunächst in einem NaOH-SDS-Puffer in Anwesenheit von RNase lysiert. Dabei wird durch das SDS die Zellmembran solubilisiert und dadurch werden die Zellen lysiert. Durch NaOH werden die freigesetzte chromosomale DNA, Plasmid DNA sowie Proteine denaturiert. Nach Zugabe von azidem Kaliumacetatpuffer kommt es zur Präzipitation der Proteine und chromosomaler DNA, wohingegen die Plasmid-DNA, aufgrund ihrer geringeren Größe und dadurch dass sie kovalent geschlossen ist, gelöst bleibt. Im nächsten Schritt wird die Plasmid-DNA über einen Filter vom Präzipitat getrennt und dann an die Matrix einer Anionenaustauscher-Säule (DEAE-Säule, siehe oben) gebunden. Durch anschließende Waschschrte werden Kontaminationen (DNA-bindende Proteine, RNA-Reste, Kohlenhydrate etc.) der Plasmid DNA entfernt. Am Schluss wird die DNA mit einem Hochsalzpuffer von der Säule eluiert und mit Isopropanol präzipitiert. Durch Waschen des Pellets mit dem leichter flüchtigen Ethanol wird dessen anschließende Trocknung erleichtert.

#### **3.18.2. Durchführung**

Zunächst wird LB-Medium, welches das jeweilige Selektionsantibiotikum (z.B. 100µg/ml Ampicillin, 25µg/ml Kanamycin) enthält mit 50-100µl eines *E. coli*-Glyzerinstocks oder einer einzelnen *E. coli* Kolonie angeimpft. Die Bakterienkultur wird dann für 16h in einem Schüttler (200rpm, 37°C) inkubiert. Die Bakteriensuspension wird am Ende der Inkubation in 50ml Zentrifugationsröhrchen abzentrifugiert (6000g, 10 min, 4°C). Der erhaltene Überstand wird vollständig entfernt. Das Bakterienpellet wird direkt weiterverwendet oder zur Lagerung

bei -80°C eingefroren. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers. Die Quantifizierung der aufgereinigten Plasmid-DNA erfolgt wie nachfolgend beschrieben.

### 3.18.3. Quantifizierung der DNA

Die Bestimmung der Konzentration aufgereinigter Plasmid-DNA oder chromosomaler DNA erfolgt unter Verwendung eines UV-Spektrophotometers. Dabei wird die Absorption der DNA in der Probe durch Messung der Absorption bei 260nm und 280nm in einer UV-Einmalküvette (1ml) im Vergleich zum Nullwert (H<sub>2</sub>O) bestimmt. Bei einer Konzentration der DNA von 50µg/ml ergibt sich aufgrund des Extinktionskoeffizienten von DNA in H<sub>2</sub>O ein Absorptionswert bei 260nm ( $A_{260}$ ) von 1. Die Konzentration der aufgereinigten DNA errechnet sich daher aus folgender Formel:

$$c[\mu\text{g} / \text{ml}] = A_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Dabei sollte (gegebenenfalls durch entsprechende Verdünnung der Probe mit H<sub>2</sub>O) gewährleistet sein, dass der Absorptionswert  $A_{260}$  der Probe zwischen 0,1 und 1,0 liegt, da nur in diesem Bereich ein lineares Verhältnis zwischen UV-Absorption und DNA-Konzentration besteht. Durch Berechnung des Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  kann die Reinheit der DNA beurteilt werden. Bei reiner DNA liegt dieser Quotient zwischen 1,7 und 2,0.

### 3.19. Herstellung von *E. coli* Glyzerinstocks

Nach Vermehrung der entsprechenden Plasmid-DNA (siehe 3.18.) wird ein Aliquot der Bakteriensuspension (je nach Zelldichte der Suspension: 1-5ml) abgenommen und abzentrifugiert (800g, 8 min, 4°C). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 500µl sterilfiltriertem Einfriermedium (LB-Medium + 50% Glyzerin) resuspendiert. Diese Suspension wird in 1,5ml Reaktionsgefäßen bei -80°C gelagert. Zur erneuten Kultivierung der auf diese Weise eingefrorenen Bakterien, wird mit einer 100µl-Pipettenspitze eine kleine Menge des, noch gefrorenen, Glyzerinstocks abgekratzt und damit eine Flüssigkultur angeimpft. Es muss darauf geachtet werden, dass bei diesem Vorgang der Glyzerinstock nicht vollständig auftaut, da die Bakterien ansonsten durch erneutes Einfrieren zerstört werden.

## 3.20. Polymerasekettenreaktion (PCR)

### 3.20.1. Prinzip

Für eine PCR werden folgende Komponenten benötigt: eine gewisse Menge DNA (Template) aus der eine bestimmte Gensequenz amplifiziert werden soll, eine thermostabile DNA-Polymerase, zwei Oligonukleotide (Primer), Pufferlösung und Nukleotide. Diese Komponenten werden gemischt und in einem Thermocycler für bestimmte Zeiträume bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert (Saiki et al 1988). Eine typische PCR besteht aus mehreren einzelnen Schritten. Zunächst wird in einem Denaturierungsschritt die Template-DNA auf 94°C erhitzt. Dabei trennen sich die beiden Stränge des DNA-Moleküls. Dann wird die Temperatur gesenkt, um den Primern die Hybridisierung an das Template zu ermöglichen (Annealing). Die Temperatur in diesem Schritt (Annealingtemperatur) hängt hauptsächlich von der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der verwendeten Primer ab, also der Temperatur bei der 50% des Primers nicht mehr an das Template binden. Die  $T_m$  eines Primers mit einer Länge von bis zu 20 Basen errechnet sich näherungsweise nach der folgenden Gleichung:

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G bzw. C}) + 2 \times (\text{Anzahl A bzw. T})$$

Von den meisten Computerprogrammen zur Analyse von Primersequenzen wird jedoch die genauere „nearest neighbour“ Methode (Breslauer et al 1986) verwendet, da die Schmelztemperatur eines Primers nicht nur von der Basenzusammensetzung sondern auch von der Primersequenz abhängig ist, da sich benachbarte Basen gegenseitig beeinflussen. Die Annealingtemperatur wird meist zu Anfang 5-10°C niedriger als die Schmelztemperatur des Primers angesetzt. Zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur wird ein Temperaturgradient der Annealingtemperatur mit einer speziellen Gradienten-PCR-Maschine eingesetzt. Im nächsten Schritt der PCR wird die Temperatur auf das Optimum der eingesetzten DNA-Polymerase erhöht (72°C bei Taq-Polymerase), wodurch die Zweitstrangsynthese unter Verwendung der Primer und Nukleotide ermöglicht wird, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die dem eingesetzten Template entspricht. Da diese Reaktion an beiden Strängen der Template-DNA abläuft, liegt das Template am Ende in doppelter Menge vor. Dieser dreistufige Zyklus wird so häufig wiederholt, bis genügend Reaktionsprodukt vorliegt (normalerweise 30-35 Zyklen). Der durchschnittliche Multiplikationsfaktor des Produkts liegt bei etwa 1,6-1,7 je Zyklus.

### 3.20.2. Durchführung

Zur Amplifikation bestimmter Gensequenzen in genomischer DNA oder cDNA aus Säuger- und Bakterienzellen werden für das Amplifikationsprodukt möglichst spezifische Primerpaare verwendet. Die Primersequenzen werden unter Verwendung des Computerprogramms Primer Select (Fa. DNAStar.Inc) ermittelt. Dabei werden die Primersequenzen so gestaltet, dass der GC-Gehalt der Primer bei etwa 50-60% liegt und die Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) der Primer eines Paares möglichst nahe beieinander liegen. Des Weiteren werden die Primersequenzen so berechnet, dass sich keine internen Sekundärstrukturen (hair pins) bilden und die beiden Primer eines Paares nicht miteinander hybridisieren. Durch diese Maßnahmen wird die Wahrscheinlichkeit der Hybridisierung der Primer mit dem Template erhöht. Darüber hinaus enthalten die verwendeten Primer nicht mehr als 17-25 Nukleotide. Die Synthese der HPSF (high purity salt free)-gereinigten Primer erfolgt durch die Firma MWG Biotech.

Die lyophilisierten Primer werden in  $H_2O$  gelöst (Konzentration 100pmol/ $\mu$ l) und für die Verwendung bei der PCR 1:5 mit  $H_2O$  verdünnt (20pmol/ $\mu$ l). In eine PCR-Reaktion werden 10 pmol (0,5 $\mu$ l) der jeweils verwendeten beiden Primer eingesetzt.

Die Tabelle 6 zeigt die Sequenzen der innerhalb dieser Doktorarbeit verwendeten Primer.

Name	Primersequenz	An-nealing-temperatur	Zyklenzahl
VacA	Sense 5'-ATG GAA ATA CAA CAA ACA CA-3' A.-sense 5'-CTC CAG AAC CCA CAC GAT T-3'	50	30
GGTko	Sense 5'-AAA CGA TTG GCT TGG GTG TGA TAG-3' A.-sense 5'-GAC CGG CTT AGT AAC GAT TTG ATA G-3'	58	35
GGT Screen	Sense 5'-ACG CCA AGC TCT CAA ATC AAA CCA-3' A.-sense 5'-ATT CGC ATC GCC CCC TAC TAA ACC-3'	58	30
GGT rek	Sense 5'-CCC TTT GAC CAT GGC GAG TTA CCC CC-3' A.-sense 5'-CAA AGG TAC CAA ATT CTT TCC TTG G-3'	54,4	35
pQETri	Sense 5'-CGA CCA CCG GGA CCT TTA ATT C-3' A.-sense 5'-TCG ATC TCA GTG GTA TTT GTG-3'	55	35

**Tabelle 6:** Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer. A.-sense, antisense.



### 3.20.3. DNA-PCR

Die Amplifikation genomischer DNA-Sequenzen erfolgt unter Verwendung eines kommerziell verfügbaren Master-Mix (*Taq*PCR MasterMix, Fa. Qiagen). Dieser Master Mix enthält die *Taq* DNA Polymerase in einem Puffer zusammen mit 1,5mM MgCl<sub>2</sub> und 200µM von jedem Nukleotid (dNTP). Zur Verwendung wird dieser Master Mix 1:2 im Reaktionsansatz verdünnt. Für eine DNA-PCR (25µl Reaktionsansatz) wird innerhalb dieser Doktorarbeit zunächst folgende Stammlösung hergestellt:

12,5µl *Taq*PCR Master Mix

0,5µl sense Primer

0,5µl antisense Primer

11,5µl H<sub>2</sub>O

Zu 24µl dieser Stammlösung wird 1µl des DNA-Templates oder der cDNA pipettiert und die PCR-Reaktion in einem Thermocycler gestartet. Die für das jeweilige Primerpaar gewählte Annealingtemperatur und Zyklenzahl des zugehörigen PCR-Programms sind in Tabelle 6 angegeben. Das Standardprogramm für die durchgeführten DNA-PCR-Reaktionen hat den folgenden Ablauf:

Initiale Denaturierung:	2 min 94°C
XX Zyklen:	
Denaturierung:	15 sek 94°C
Annealing:	30 sek T <sub>x</sub>
Elongation:	2 min 72°C
Finale Elongation:	7 min 72°C
Abkühlung:	4°C (unbegrenzt)

### 3.20.4. Long-Distance PCR

Für die Amplifikation von DNA Fragmenten mit einer Größe von mehr als 3kb wird in der vorliegenden Arbeit das Expand High Fidelity PCR System (Fa. Roche) verwendet, welches für die Generierung größerer PCR Fragmente (bis zu 5kb) optimiert wurde. Dieses PCR System besteht aus einem Gemisch von zwei thermostabilen DNA Polymerasen (*Taq*- und *Tgo*-Polymerase). Die *Tgo* Polymerase zeigt Korrekturaktivität (proofreading activity), also

3'-5' Exonukleaseaktivität. Dadurch wird die Fehlerrate der PCR und damit die Auflösung der DNA Amplifikation im Vergleich zu anderen PCR Systemen (z.B. nur *Taq* Polymerase) etwa um den Faktor 3 erhöht (Barnes 1994).

### 3.20.4.1. Durchführung

Zur Amplifikation von DNA Fragmenten (25µl pro Reaktionsansatz) mit dem Expand System (siehe oben) werden zunächst zwei Stammlösungen hergestellt (siehe unten; Angaben für eine Reaktion). Dadurch wird verhindert, dass bei der Herstellung der Stammlösung Primer- und DNA-Templatemoleküle durch die Exonukleaseaktivität der *Tgo* Polymerase teilweise abgebaut werden. Alle Bestandteile dieser Stammlösung sind in dem oben erwähnten Kit enthalten. Während der Herstellung der Stammlösungen wird auf Eis gearbeitet.

Stammlösung 1:

- 10µl H<sub>2</sub>O
- 0,5µl dNTPs
- 0,5µl sense primer
- 0,5µl antisense primer
- 1µl DNA-Template

Stammlösung 2 (MgCl<sub>2</sub> Endkonzentration: 2mM):

- 9,5µl H<sub>2</sub>O
- 2,5µl Expand High Fidelity Puffer (10X; enthält 15mM MgCl<sub>2</sub>)
- 0,5µl MgCl<sub>2</sub> (25mM)
- 0,3µl Expand High Fidelity Enzyme Mix (2,6U pro Reaktion)

Die beiden Lösungen werden auf Eis in einem PCR-Reaktionsgefäß vereinigt, gemischt und kurz abzentrifugiert. Im Anschluss daran wird die PCR in einem Thermocycler gestartet. Die Auftrennung und Analyse der Reaktionsprodukte erfolgt nach Beendigung der PCR durch Agarosegelelektrophorese (siehe 3.21.). Innerhalb dieser Doktorarbeit wird das Expand-PCR System für die Klonierung der rekombinanten HP GGT verwendet.

### 3.20.5. RT-PCR (cDNA-Synthese)

Bei der RT-PCR wird unter Verwendung des Enzyms Reverse Transkriptase aus einer RNA-Probe cDNA synthetisiert, bevor diese cDNA anschließend als Template für eine PCR

eingesetzt wird (siehe 3.20.). Mit Hilfe dieser Technik kann zum Beispiel die Transkription eines bestimmten Gens in Zellen oder Geweben nachgewiesen werden. Als Primer für die RT-PCR werden Oligo-dT-Primer, Hexamere oder spezifische Primer verwendet.

### **3.20.5.1. Durchführung**

Zur Synthese von cDNA aus RNA wird die Reverse Transkriptase SuperScript II (Fa. Invitrogen) verwendet. Die für die Reaktion nötigen Puffer und Reagenzien werden von derselben Firma in einem Kit zusammen geliefert. Zunächst werden 10µl des RNA-Templates mit 1µl Random Hexamers (Endkonzentration: 25ng/µl) für 10 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Dabei wird eine Bindung der Primer an die homologen RNA-Sequenzen ermöglicht. In der Zwischenzeit wird die folgende Stammlösung (Angaben für eine Reaktion) hergestellt:

- 4µl First Strand Puffer (5x)
- 2µl DTT (0,1M)
- 1µl dNTPs (je 10mM)
- 1µl RNase Inhibitor
- 1µl SuperScript II (Reverse Transkriptase)

Nach der Vorinkubation der eingesetzten RNA wird die Stammlösung (9µl) zum vorinkubierten Gemisch pipettiert (Endvolumen des Reaktionsansatzes: 20µl). Im Anschluss daran wird die Reaktionslösung wie folgt in einem Thermocycler inkubiert:

- 60 min 42°C
- 5 min 95°C

Die fertige cDNA wird bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Amplifikation von speziellen Sequenzen der cDNA erfolgt mit speziellen Primerpaaren (siehe Tabelle 6) wie bereits beschrieben (siehe 3.20.).

## **3.21. Agarose-Gelelektrophorese**

### **3.21.1. Prinzip**

Mit der Agarosegelelektrophorese können auf einfache und effektive Weise DNA-Fragmente mit einer Länge bis zu 25kb voneinander getrennt werden. Die Trennung beruht darauf, dass Agarose nach Lösen in einem Puffer (durch Aufkochen) bei Abkühlung zu einem Gel erstarrt,

welches aus einem Netz von Poren bestimmter Größe (je nach Agarosekonzentration, siehe Tabelle 7) besteht. DNA-haltige Proben können, nach Mischen mit einem Probenpuffer, durch Anlegen einer elektrischen Spannung in diesem Gel der Größe nach aufgetrennt werden (siehe 3.7.). Aufgrund der Siebstruktur des Agarosegels durchlaufen größere DNA-Moleküle das Gel langsamer als kleine, da die Poren des Gels kleineren Molekülen weniger Widerstand bieten. Um den Verlauf der Auftrennung verfolgen zu können, wird dem Probenpuffer ein Farbstoff zugefügt (z.B. Bromphenolblau, Orange G). Die am häufigsten verwendete Methode, um die im Agarosegel aufgetrennte DNA sichtbar zu machen ist die Färbung mit Ethidiumbromid (EtBr). Dabei wird in die geschmolzene Agarose (s. oben) EtBr gegeben. Dadurch werden die DNA-Moleküle der Probe im Gel angefärbt und die Auftrennung der Proben kann jederzeit mit Hilfe einer UV-Lampe (260nm) überprüft werden. Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente werden Größenmarker (DNA-Leitern) verwendet, die DNA-Fragmente in einem regelmäßigen Abstand (100, 500 oder 1000bp) enthalten und für verschiedene Größenbereiche erhältlich sind.

### 3.21.2. Durchführung

Bei der Herstellung von und dem Hantieren mit Agarosegelen werden spezielle Schutzhandschuhe aus Nitril getragen, um eine Inkorporation des kanzerogenen Ethidiumbromids zu vermeiden.

Zur Auftrennung von PCR-Produkten oder Plasmid-DNA mittels Agarosegelelektrophorese werden je nach Größe des jeweiligen PCR-Produktes verschiedene Agarosekonzentrationen verwendet:

Größe des linearen DNA-Fragments (in kb)	Agarosekonzentration (in %; w/v)
1,0-70	0,3
0,7-45	0,5
0,4-20	0,8
0,3-10	1,0
0,2-8	1,2
0,2-6	1,5
0,1-5	2

**Tabelle 7:** Trennbereiche verschiedener Agarosegelkonzentrationen

Die jeweils für das Gel benötigte Agarosemenge (siehe oben) wird in einem 500ml-Erlenmeyerkolben in TAE-Puffer (1x) suspendiert. Die Suspension wird dann in einem Mikrowellenherd unter zwischenzeitlichem Mischen so lange gekocht, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Dabei ist darauf zu achten, dass die Lösung nicht überkocht.

Die geschmolzene Agarose wird unter Rühren (Magnetrührer) abgekühlt, bis der Kolben etwa handwarm ist. Nach Zugabe von Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration: 0,5µg/ml) wird die noch flüssige Agaroselösung in einen Gelträger, in den zuvor ein Gelkamm eingepasst wurde, gegossen. Nach etwa 20 min ist die Agaroselösung vollständig polymerisiert. Dann wird der Gelkamm vorsichtig entfernt und der Gelträger in eine horizontale Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Die Apparatur wird mit Lauffpuffer (1xTAE) gefüllt, bis das Gel vollständig mit dem Puffer bedeckt ist. Ein Aliquot der Probe wird mit 1/6 seines Volumens an Probenpuffer (6x; Fa. MBI-Fermentas) vermischt und dann mit einer 100µl-Pipette in die durch den Gelkamm geformten Taschen des Agarosegels pipettiert. Zur Bestimmung der Größe des/der aufgetrennten Fragments(e) wird auf jedes Gel ein Größenmarker (DNA-Leiter; Fa. MBI-Fermentas) pipettiert, der aus einer Mischung von DNA-Fragmenten definierter Größe besteht. Durch Anlegen einer Spannung an die Elektrophoreseapparatur wird die Auftrennung gestartet. Je nach Größe und Agarosekonzentration des Gels wird eine Spannung von 80-120V angelegt. Sobald die Lauffront der Proben etwa die Mitte des Agarosegels erreicht hat, wird die Spannung abgeschaltet und das Agarosegel zur Dokumentation entnommen. Die Detektion der aufgetrennten Proben erfolgt unter Verwendung einer UV-Lampe. Das Gel wird mit Hilfe einer Kamera in einen Computer eingelesen (Software: Photo Finish, Fa. Gator Data Inc.) und archiviert.

## **3.22. Klonierung und rekombinante Expression der GGT aus**

### ***H. pylori***

#### **3.22.1. Prinzip**

Unter einer Klonierung versteht man die Einführung eines DNA-Fragments in einen Vektor, der die massenhafte Vervielfältigung dieses Fragments oder die Produktion des kodierten Proteins z.B. in *E. coli* Bakterien, Insekten- oder Säugerzellen (rekombinante Expression) ermöglicht. Falls, wie innerhalb der vorliegenden Doktorarbeit, ein PCR-Produkt kloniert werden soll, so müssen die zur Amplifikation des DNA-Fragments verwendeten Primer so

gestaltet werden, dass sie die gewünschte Zahl und Art von Restriktionsstellen enthalten, mit deren Hilfe das PCR-Produkt dann in den Expressionsvektor eingebaut wird. Zur rekombinanten Expression in *E. coli* wird in dieser Arbeit der pQETriSystem Vektor (Fa. Qiagen; Vektorkarte siehe 2.5.) verwendet. Dieser Vektor enthält ein Promoter-Operator Element, welches aus dem T5 Promoter (wird durch *E. coli* RNA-Polymerase erkannt) und dem *lac* Operator, der durch Bindung des *lac* Repressors zur Unterdrückung des T5 Promoters in *E. coli* führt, besteht. Durch eine für ein 6xHisTaq kodierende Sequenz in 3' Position der Klonierungsregion wird das gewünschte Protein mit einem C-terminalen HisTaq verknüpft und exprimiert. Dieses 6x-HisTaq dient der selektiven Isolierung des rekombinant exprimierten Proteins. Aufgrund dieses HisTaq kann dieses Protein an Ni-NTA- oder Ni-Sepharose-Affinitätssäulen binden und chromatographisch aufgereinigt werden (siehe 3.16.). Zur Detektion des rekombinanten Proteins können daher z.B. Anti-His Antikörper eingesetzt werden. Zusätzlich enthält der Vektor ein  $\beta$ -Lactamase Gen, wodurch eine Selektion transformierter Bakterien über Ampicillinresistenz ermöglicht wird. Zum Einbau des PCR-Fragments (Insert) in den Expressionsvektor werden sowohl Vektor als auch Fragment mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut. Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, welche doppelsträngige DNA an spezifischen palindromischen Sequenzen spalten, wobei einzelsträngige Enden entstehen, die komplementär zueinander sind (kohäsive Enden; sticky ends). Im nächsten Schritt wird das Insert aufgrund der kompatiblen Schnittstellen in den Vektor eingebaut (ligiert). Für diese Reaktion wird ein Enzym, die Ligase eingesetzt. Im nächsten Schritt wird das Ligationsprodukt aus Vektor und Insert z.B. in transformationskompetente *E. coli* Bakterien transformiert. Bei erfolgreicher Klonierung wird das Klonierungsprodukt in einen expressionskompetenten *E. coli* Stamm transformiert. In dieser Doktorarbeit wird zur Expression der Stamm M15[pREP4] (Fa. Qiagen) verwendet. Dieser enthält ein pREP4 Repressorplasmid, welches den Bakterien eine Resistenz gegenüber Kanamycin verleiht und unter normalen Kulturbedingungen der Bakterien konstitutiv den *lac* Repressor exprimiert, welcher an den *lac* Operator bindet und dadurch die Proteinexpression inhibiert (siehe oben). Durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid), welches das Lac Repressorprotein bindet und inaktiviert, wird die Produktion des rekombinanten Proteins ermöglicht. Nach der Expression des rekombinanten Proteins wird dieses z.B. durch Affinitätschromatographie (siehe 3.16.1.) aus den Bakterien aufgereinigt.

### 3.22.2. Durchführung

Das GGT Protein aus *H. pylori* wird im Verlauf dieser Doktorarbeit als rekombinantes Protein mit 6xHisTaq in *E. coli* exprimiert. Diese rekombinante Expression der GGT verläuft in mehreren Schritten, die im Folgenden beschrieben werden.

#### a) Amplifikation der *H. pylori ggt* Gensequenz

Zunächst wird die kodierende Sequenz der HP *ggt* ohne Signalpeptid durch PCR aus chromosomaler DNA des *H. pylori* Stammes 26695 Wildtyp amplifiziert. Die Größe des zu erwartenden PCR-Produkts liegt bei 1,5 kb. Aufgrund dieser Größe des PCR-Produktes wird die PCR mit dem Expand System durchgeführt (siehe 3.20.4.). Die Sequenzen der für diese PCR verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 6 (siehe 3.20.2.) angegeben. Für die Amplifikation des *ggt* Gens wird folgendes PCR-Programm verwendet:

Initiale Denaturierung:	2 min 94°C
35 Zyklen:	
Denaturierung:	15 sek 94°C
Annealing:	30 sek 54,4°C
Elongation:	2 min 72°C
Finale Elongation:	7 min 72°C
Abkühlung:	4°C (unbegrenzt)

#### b) Aufreinigung des PCR-Produkts

Das PCR Produkt wird im nächsten Schritt auf einem 1%-Agarosegel aufgetrennt (siehe 3.21.). Die Bande mit der Größe 1,5kb wird mit einem Skalpell ausgeschnitten und unter Verwendung des NucleoTrap Kits (Fa. Macherey-Nagel) aufgereinigt. Dieser Kit basiert auf einer Säulematrix aus aktiviertem Silizium, welche DNA-Moleküle in Anwesenheit großer Mengen chaotroper Ionen reversibel binden kann. Durch diese Ionen wird die Hydrathülle der DNA in wässrigen Lösungen abgebaut und die DNA kann an die Säulenmatrix binden.

Nach Durchführung der Agarosegelelektrophorese wird das gewünschte PCR-Produkt mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten, in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Auf 100mg Agarose werden 200µl NT1 Puffer pipettiert. Die weitere Durchführung erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers (siehe oben).

Das Produkt der PCR ist durch diese Aufreinigung frei von Salzen, Farbstoffen, Primer- und Enzymresten und Agarosegelresten, die den folgenden Restriktionsverdau stören könnten. Die DNA-Konzentration des aufgereinigten PCR-Produktes wird, wie unter 3.18.3. beschrieben bestimmt.

### **c) Restriktionsverdau**

Im Anschluss an die Aufreinigung wird das PCR-Produkt (Insert) zur Ligation in den Expressionsvektor pQETri (Fa. Qiagen) mit den Restriktionsenzymen NcoI und KpnI verdaut. Um den Einbau des Inserts in den Vektor zu ermöglichen, wird auch dieser mit denselben Restriktionsenzymen verdaut. Da die für den Verdau mit den Restriktionsenzymen KpnI und NcoI benötigten Puffer nicht kompatibel sind, wird der Verdau in 2 Schritten nacheinander durchgeführt.

Für den ersten Verdau mit dem Enzym KpnI werden 5µg Vektor-DNA und 1µg des Inserts eingesetzt. Zu diesen Proben werden folgende Lösungen pipettiert (20µl Gesamtvolumen pro Ansatz):

2µl 10x Puffer (Y<sup>+</sup>/Tango; Fa. MBI Fermentas)  
2µl KpnI-Enzym (Fa. MBI-Fermentas)  
H<sub>2</sub>O ad 20µl

Zum Restriktionsverdau werden die Proben für 2h bei 37°C inkubiert.

Die Produkte werden dann mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem NucleoTrap Kit aufgereinigt (siehe b)).

Für den zweiten Verdau mit dem Enzym NcoI werden 25µl des aufgereinigten Vektors und Inserts eingesetzt und mit folgenden Komponenten gemischt (20µl Gesamtvolumen pro Ansatz):

2,5µl 10x Puffer (NEB4; Fa. New England Biolabs)  
2,5µl NcoI-Enzym (Fa. New England Biolabs)

Der Verdau verläuft wie oben beschrieben für 2h bei 37°C. Im Anschluss daran werden die Verdauprodukte wie oben beschrieben aufgereinigt und für die folgende Ligation verwendet.



#### **d) Ligation**

Zur Ligation des verdauten Vektors mit dem in der gleichen Weise verdauten Insert wird das Enzym T4 DNA-Ligase (Fa. MBI Fermentas) verwendet. Zunächst werden Gemische aus unterschiedlichen Verhältnissen von Vektor und Insert hergestellt (2:8, 3:7 und 4:6). Als Religationskontrolle wird der Vektor 1:1 mit H<sub>2</sub>O gemischt. Bei sauberer Aufreinigung des Vektors nach den Restriktionsverdau (s. oben) sollte eine Religation, in Abwesenheit eines Inserts nicht möglich sein. Zu dem hergestellten Gemisch aus verdautem Vektor und Insert wird folgendes pipettiert (Angaben für 20µl Ansatz):

2µl 10x Ligationspuffer (Fa. MBI-Fermentas)

H<sub>2</sub>O ad 20µl

1µl T4 DNA-Ligase (Fa. MBI-Fermentas; Enzymmenge in 20µl: 5U)

Der Ansatz wird gemischt (Vortex-Rührer), kurz abzentrifugiert und für 1h bei 22°C im Heizblock inkubiert. Abschließend wird das Gemisch zur Inaktivierung der Ligase für 10 min bei 65°C im Heizblock inkubiert.

#### **e) Transformation in *E. coli* XL1**

Zur Kontrolle der bisherigen Schritte der Klonierung der *ggt* aus *H. pylori* werden die erhaltenen Ligationsprodukte (siehe oben) in transformationskompetente *E. coli* Bakterien (XL1-Blue; Fa. Stratagene) transformiert. Zur Vorbereitung der Transformation wird LB-Medium und die benötigten Selektionsagarplatten (LB-Agar + 100µg/ml Ampicillin) auf Raumtemperatur und ein Heizblock auf 42°C vorgewärmt. Die benötigten 1,5ml Reaktionsgefäße werden beschriftet und auf Eis vorgekühlt.

Zu jeweils 70µl Suspension der kompetenten Bakterien (siehe oben) werden etwa 5% (also 3,5µl) der einzelnen Ligationsprodukte pipettiert. Der Ansatz wird kurz durch Schütteln gemischt und dann für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgt eine Inkubation bei 42°C (Heizblock, s. oben) für exakt 45 sek, gefolgt von einer 2 min Inkubation auf Eis. Dann wird zu jedem Ansatz 1ml LB-Medium (ohne Ampicillin) pipettiert und die Ansätze werden für 1h bei 37°C im Heizblock geschüttelt (800rpm). Von jedem Ansatz werden am Ende mit einem sterilen Spatel verschiedene Mengen (z.B. 150 und 300µl) auf LB-Ampicillin-Agarplatten (s. oben) ausplattiert. Die Platten werden bis zum Eintrocknen der Bakteriensuspension im Trockenschrank (37°C) inkubiert. Im Anschluss werden die Platten umgedreht und über Nacht weiter (nicht länger als 20h) bei 37°C inkubiert.

Zur Kontrolle wird eine Transformation mit der Plasmid-DNA des verwendeten Vektors (Positivkontrolle) und mit H<sub>2</sub>O (Negativkontrolle) durchgeführt. Am nächsten Tag werden die Selektionsagarplatten auf vorhandene Kolonien überprüft. Der Erfolg der Transformation des gewünschten Ligationsproduktes wird durch PCR-Screening einzelner Bakterienkolonien überprüft (siehe f).

### **f) Colony-Screening PCR**

Von jeder Agarplatte der Transformation (siehe e) werden zur Überprüfung der erfolgreichen Ligation von Vektor und Insert zunächst 5-10 Kolonien (Klone) nummeriert und mit einer 10µl-Pipettenspitze angekratzt („angepickt“) und das erhaltene Bakterienmaterial jeweils in eine PCR mit dem Expand PCR System (siehe a) eingesetzt. Bei dieser PCR werden die Primerpaare verwendet, die auch für die Amplifikation der *ggt* Sequenz zu Beginn der Klonierung (siehe a)) eingesetzt wurden. Die erhaltenen PCR-Produkte werden auf einem Agarosegel (1%) aufgetrennt und fotografiert (siehe 3.21.). Die Klonierung der *ggt* ist bei denjenigen Bakterienklonen erfolgreich verlaufen, die in der PCR ein Produkt mit der Größe von 1,5kb, nämlich das *ggt* Insert, liefern. Die erfolgreich transformierten Klone werden zur Aufreinigung der Plasmid-DNA, also des klonierten Vektors (mit *ggt* Insert), verwendet (siehe g).

### **g) Plasmid-DNA Präparation**

Siehe 3.18.

### **h) Sequenzierung des Expressionsplasmids**

Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung der *ggt* Sequenz aus *H. pylori* in den Expressionsvektor pQETri wird die erhaltene Plasmid-DNA (siehe oben) sequenziert (Fa. Eurofins Medigenomix GmbH). Dazu werden 20µl der Plasmid-DNA (Konzentration: 368 ng/µl) zusammen mit dem Primerpaar pQETri (siehe Tabelle 6) zur Amplifikation des pQETri-Vektors an die genannte Firma geschickt. Die Genauigkeit der durchgeführten Sequenzierung liegt laut Firmenangaben bei > 99%.

### **i) Transformation in *E. coli* M15**

Die aufgereinigte DNA des GGT-Expressionsplasmids wird als nächstes zur Expression der rekombinanten GGT in einen Expressionsstamm von *E. coli* transformiert. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wird dazu der Stamm M15[pREP4] (Fa. Qiagen) verwendet.

Die Transformation der Plasmid-DNA erfolgt wie unter e) beschrieben. Dabei werden die Bakterien mit 500ng der Plasmid-DNA transformiert.

### **j) Proteinexpression**

Zur Expression der rekombinanten HP GGT (HisTaq GGT) in *E. coli* M15 werden 4,5 Liter LB-Flüssigmedium mit den Selektionsantibiotika Ampicillin (Endkonzentration 100µg/ml) und Kanamycin (Endkonzentration: 25µg/ml) versetzt und mit 100ml einer Übernachtskultur der transformierten *E. coli* M15 Bakterien (siehe i) angeimpft. Die Kultur wird bei 37°C solange im Bakterienrührer (200rpm) inkubiert, bis die OD einen Wert von 0,6 erreicht hat. Dann wird die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1mM) induziert und der Ansatz für weitere 4h bei 25°C geschüttelt. Durch die Absenkung der Temperatur wird die Entstehung von inclusion bodies unterdrückt. Der Verlauf der Proteinexpression wird durch stündliche Entnahme von 1ml-Aliquots der Kultur überprüft. Diese Aliquots werden durch SDS-PAGE (10%; siehe 3.7.) aufgetrennt und die erhaltenen Gele zur Visualisierung der Proteine mit Coomassie-Blau gefärbt (siehe 3.7.4.). Nach 4h wird die gesamte Expressionskultur abzentrifugiert (5000g, 10min, 4°C). Der Überstand wird verworfen und das Pelletgesamtwicht bestimmt. Die erhaltenen Bakterienpellets werden bis zur Lyse bei -80°C eingefroren.

### **k) Lyse der *E. coli* Bakterien unter nativen Bedingungen**

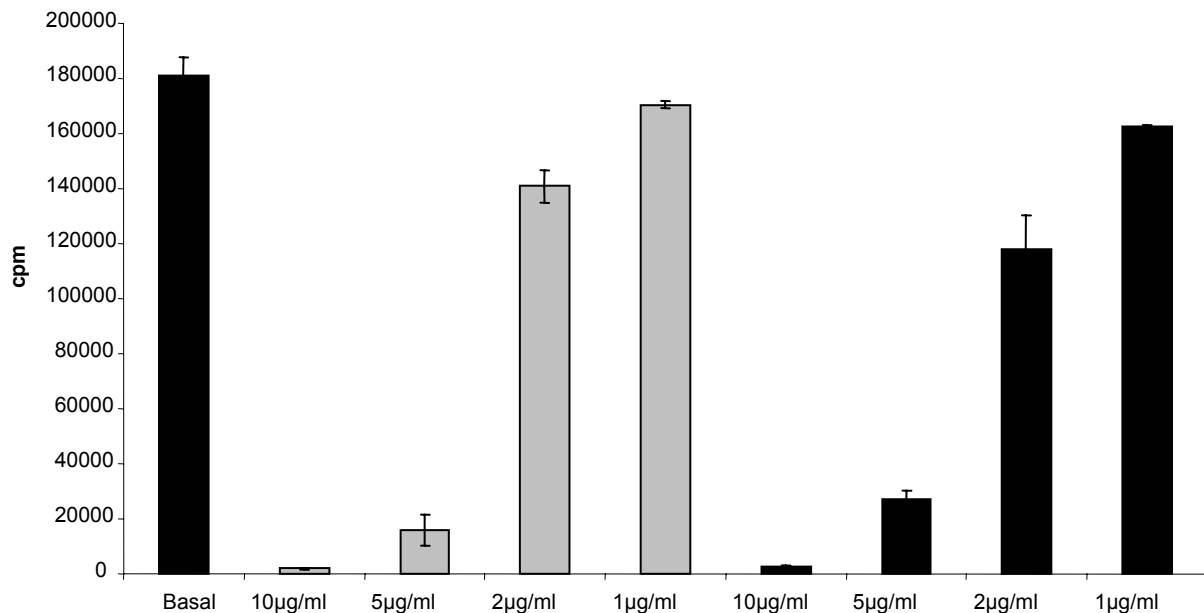
Nach der Expression der rekombinanten HP GGT werden die Bakterien unter nativen Bedingungen lysiert, um ein enzymatisch aktives rekombinantes Protein zu erhalten. Die Bakterienpellets (siehe j) werden auf Eis aufgetaut und in eiskaltem Lysispuffer (20mM Tris/HCl, 500mM NaCl, 20mM Imidazol pH 7,4; 4ml pro g Pellet), dem eine Mischung von Protease-Inhibitoren (Protease Inhibitor Cocktail for His-tagged proteins, Fa. Sigma) zugesetzt wurde, resuspendiert. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgt zunächst durch zweimaliges Einfrieren in flüssigem N<sub>2</sub> und Auftauen der Suspension bei RT sowie nachfolgende Inkubation mit Lysozym (Endkonzentration: 1mg/ml). Darüber hinaus werden die Zellen durch Ultraschallbehandlung (6x30 sek mit jeweils 1 min Pause auf Eis) auf Eis

weiter lysiert. Nach Zentrifugation (17500g, 10 min, 4°C) wird der Überstand gesammelt und darin enthaltene DNA und RNA durch Zugabe von je 0,2U/ml DNase und RNase verdaut. Nach einer weiteren Zentrifugation (22000g, 10 min, 4°C) wird der erhaltene Überstand für die weitere Aufreinigung per Säulenchromatographie (siehe 3.16.) verwendet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. *H. pylori* hemmt die Proliferation von T-Lymphozyten

Innerhalb von Vorversuchen zu dieser Doktorarbeit zeigte sich, dass *H. pylori* die Proliferation von T-Lymphozyten hemmt. Dabei führten sowohl lebende Bakterien in Cokultur mit den T-Zellen als auch Kulturüberstände, welche die sezernierten Proteine der Bakterien enthalten, bei Inkubation mit diesen Zellen zu diesem Effekt (Gerhard et al 2005). Diese Ergebnisse konnten innerhalb der vorliegenden Doktorarbeit in Versuchen mit T-Lymphozyten, die mit Kulturüberständen von *H. pylori* (HP) inkubiert wurden, reproduziert werden (siehe Abb. 8). Die Kulturüberstände verschiedener *H. pylori* Wildtyp (WT)-Stämme führten zu einer deutlichen, dosisabhängigen Inhibition der Zellproliferation. Für die Inhibition der T-Zell-Proliferation durch *H. pylori* reicht somit die Anwesenheit der sezernierten Proteine des Bakteriums aus. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass ein oder mehrere sezernierte Molekül(e) von *H. pylori* für die Inhibition der Proliferation von T-Zellen verantwortlich ist/sind. Um diesen Faktor/diese Faktoren näher zu charakterisieren, wurden im weiteren Verlauf dieser Doktorarbeit Kulturüberstände von *H. pylori* Bakterien verwendet.

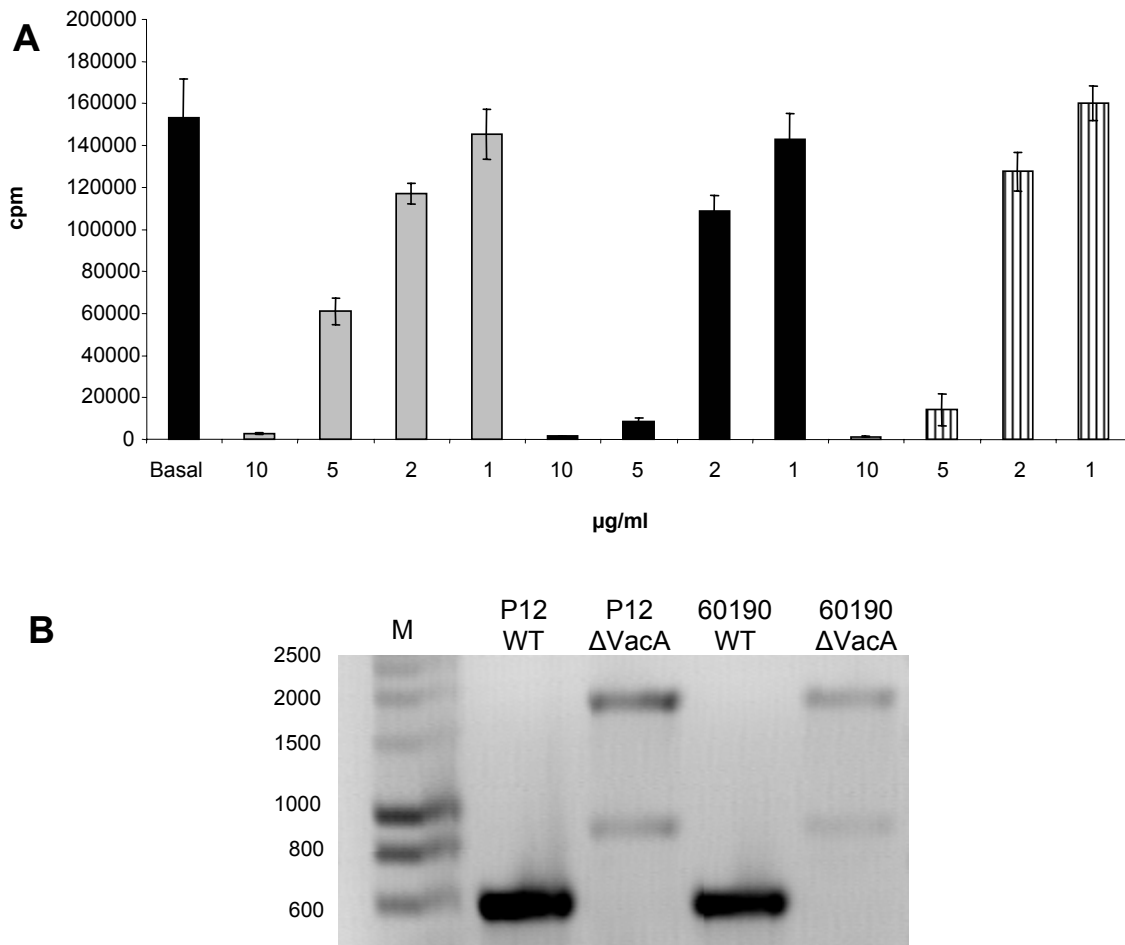


**Abb. 8: Einfluss von *H. pylori* Kulturüberständen auf die Proliferation von T-Zellen.** EL-4 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Kulturüberständen der *H. pylori* WT-Stämme 84183 (graue Balken) und 60190 (schwarze Balken) behandelt. Gezeigt ist das Ausmaß der Inkorporation von <sup>3</sup>H-Thymidin nach 48h (Mittelwerte +- Stabw.; n=3). Basal, unbehandelte Kontrolle; cpm, counts per minute; Stabw., Standardabweichung.

#### 4.1.1. Inhibition der T-Zell-Proliferation ist unabhängig von VacA und CagA

Als nächstes wurde untersucht, ob die Inhibition der T-Lymphozyten-Proliferation von der Anwesenheit verschiedener bereits bekannter Virulenzfaktoren von *H. pylori* abhängig war. Dazu wurden knock-out Mutanten unterschiedlicher Bakterienstämme verwendet, welche die Virulenzfaktoren VacA und CagA nicht exprimierten.

Murine EL-4 T-Zellen wurden dann mit verschiedenen Konzentrationen von Überständen aus unterschiedlichen *Helicobacter* WT und *vacA* ko Stämmen, sowie CagA-defizienten Stämmen (Tx30) inkubiert. Das Ausmaß der Zellproliferation wurde mit Hilfe des Tritium-Thymidin-Inkorporationsassays bestimmt. Die Herstellung der VacA-defizienten Mutanten erfolgte durch natürliche Transformation eines Kanamycin-Resistenzplasmids. Dies führte zu einer Aufhebung der VacA Expression. Sowohl die Überstände der WT (Abb. 8) als auch der *vacA*ko (Abb. 9A) Bakterien bewirkten eine dosisabhängige Inhibition der Zellproliferation. Der *vacA* Status der verwendeten *Helicobacter*-Stämme wurde mit Hilfe einer PCR-Reaktion bestimmt. Die dabei verwendeten Primerpaare sind im Material und Methoden Teil dieser Arbeit beschrieben (siehe 3.20.2.). Das Agarosegel der RT-PCR-Produkte (Abb. 9B) zeigt für die Wildtyp-Stämme das zu erwartende *vacA* PCR-Fragment von 600bp. Bei den *vacA* ko Stämmen wird hingegen ein ca. 1,9kbp großes Fragment erhalten, welches dem amplifizierten *vacA* Fragment inklusive der eingebauten Kanamycin-Resistenzkassette (Größe 1,3kbp) entspricht. Darüber hinaus zeigten auch Überstände des Tx30-Stammes, der über keine funktionelle *cag* Pathogenitätsinsel verfügt, diesen proliferationshemmenden Effekt (Abb. 9A). In weiteren bereits veröffentlichten Versuchen unserer Arbeitsgruppe zeigten auch *Helicobacter* Stämme, die andere Virulenzfaktoren wie z.B. die Adhärenzfaktoren SabA und BabA nicht exprimierten, diesen Hemmeffekt gegenüber T-Lymphozyten (Gerhard et al 2005). Das lässt darauf schließen, dass die erwähnten Virulenzfaktoren nicht für die Inhibition der T-Zell-Proliferation durch *H. pylori* verantwortlich sind.



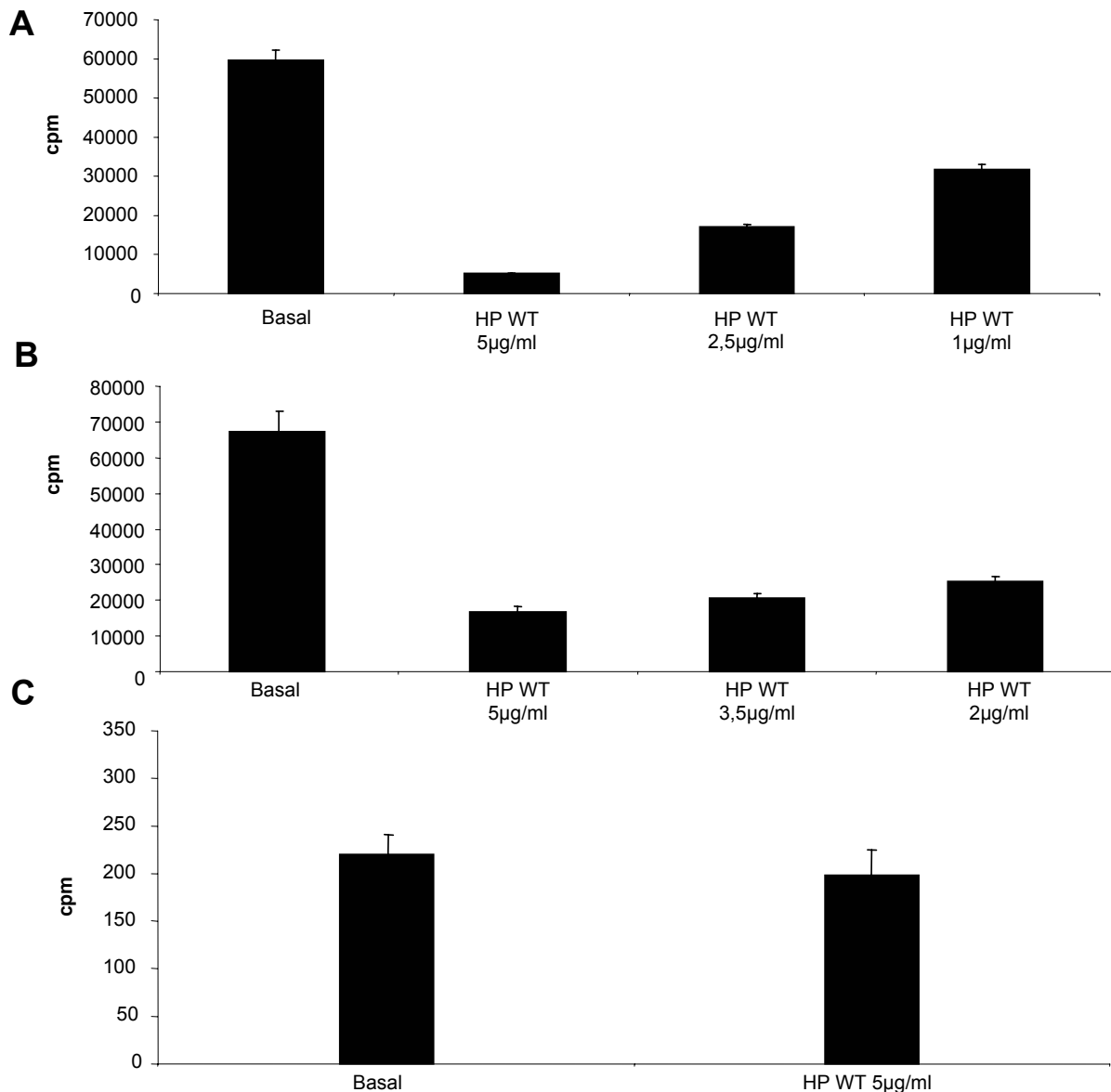
**Abb. 9: Effekt von *H. pylori* Mutanten auf die T-Zell-Proliferation.** Das Diagramm zeigt das Ausmaß der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation (Mittelwerte  $\pm$  Stabw.;  $n=3$ ) von EL-4 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Kulturüberständen der *H. pylori* Stämme 84183ΔVacA (graue Balken), 60190ΔVacA (schwarze Balken) und Tx30 (gestreifte Balken) für 48h. Der *vacA* Status der verwendeten Bakterienstämme wurde mittels PCR bestimmt (B). Basal, unbehandelte Kontrolle; cpm = counts per minute; WT = Wildtyp; M = Marker (angegeben in bp).

## 4.2. Proliferation verschiedener Zelltypen wird durch *H. pylori* Überstände gehemmt

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der Hemmeffekt von *Helicobacter* Überständen auf bestimmte Zelltypen beschränkt war. Dazu wurden verschiedene T-Zelllinien, primäre humane T-Lymphozyten, humane PBMC sowie die Epithelzelllinie KatoIII wie unter 3.2.6.4. beschrieben mit Überständen von *Helicobacter* Wildtyp Stämmen inkubiert. Der Einfluss der verwendeten Überstände auf die Proliferation dieser Zellen wurde mit Hilfe des Tritium-Thymidin-Inkorporationsassays bestimmt.

### 4.2.1. Hemmeffekt gegenüber Zelllinien

Innerhalb der vorliegenden Doktorarbeit wurden die T-Zelllinien EL-4, CCRF und Jurkat verwendet. In bereits erwähnten Versuchen zeigte sich eine deutliche Hemmung der Proliferationsrate der murinen EL-4 T-Zellen bei Inkubationen mit Überständen verschiedener *H. pylori* Stämme (siehe Abb. 8). Darüber hinaus zeigte sich auch ein dosisabhängiger Hemmeffekt von *Helicobacter* Überständen auf die Proliferation der T-Zelllinien Jurkat und CCRF (Abb. 10A, B).



**Abb. 10: Proliferation verschiedener Zelllinien bei Inkubation mit *H. pylori* Kulturüberständen.** Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporationsraten der T-Zelllinien CCRF (A) und Jurkat (B) sowie der Magenepithelzelllinie Kato III (C) nach Behandlung mit *H. pylori* G27 WT Kulturüberständen für 48h. Basal, unbehandelte Kontrolle; WT, Wildtyp; cpm, counts per minute; n=3.

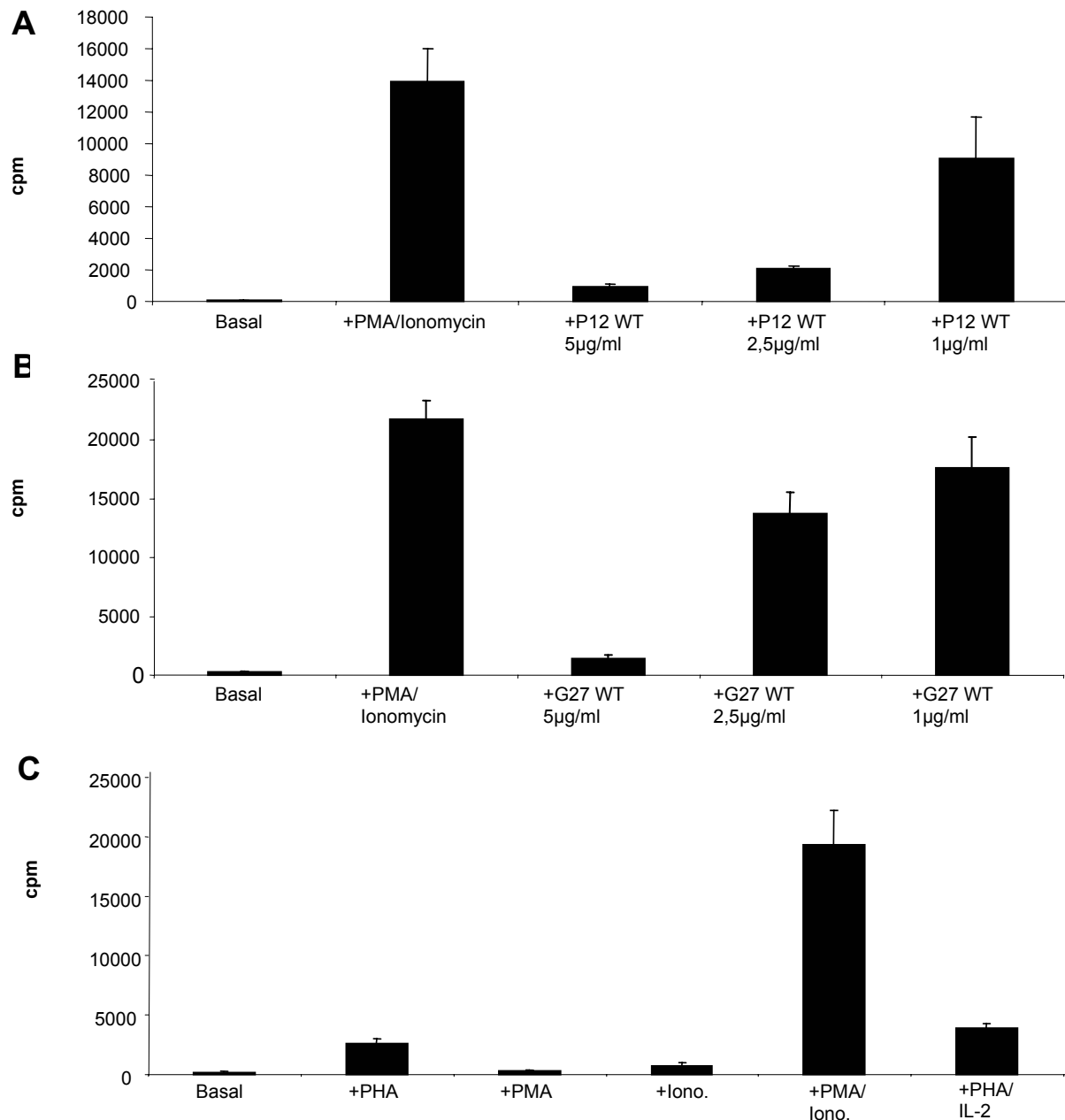


Es handelt sich bei dem beobachteten Hemmeffekt somit nicht um einen Zelllinien-, z.B. EL4-Zell-spezifischen Effekt.

Im Gegensatz zu den Auswirkungen auf die Proliferation von T-Zelllinien war der inhibierende Effekt der *Helicobacter* Überstände auf die Teilungsrate der Magenkarzinomzelllinie KatoIII deutlich reduziert (Abb. 10C). Diese Ergebnisse deuten auf eine erhöhte Empfindlichkeit von T-Zellen gegenüber dem proliferationshemmenden Effekt von *H. pylori* im Vergleich zu Epithelzellen des Magens hin.

#### **4.2.2. Hemmeffekt gegenüber primären Zellen**

Neben verschiedenen Zelllinien (siehe 4.2.1.) wurden innerhalb dieser Doktorarbeit auch primäre humane Zellen (PBMC, T-Zellen) für Coinkubationen mit Kulturüberständen von *H. pylori* verwendet. Diese Zellen wurden aus Vollblut freiwilliger, gesunder Spender isoliert. Die primären T-Zellen wurden durch Negativselektion der Nicht-T-Zellen mit Hilfe der MACS-Technik aus den PBMC aufgereinigt. Da primäre Lymphozyten in Abwesenheit eines antigenen Stimulus nur eine geringe Proliferationsrate zeigen, wurde die Teilungsrate dieser Zellen durch Zugabe von mitogenen Substanzen verstärkt. Dazu wurden verschiedene dieser Stimulantien getestet. Es zeigte sich, dass die Kombination aus PMA mit Ionomycin und in schwächerem Ausmaß jene mit PHA und IL-2 die Proliferation der Zellen am stärksten induzierten (Abb. 11C). Diese Stimulantienkombinationen wurden daher auch für die weiteren Versuche verwendet. Aus den Ergebnissen der durchgeführten Proliferationstests ist zu erkennen, dass die PMA/Ionomycin-aktivierte Proliferation von primären, humanen T-Lymphozyten und PBMC durch Überstände von *H. pylori* deutlich gehemmt wurde (Abb. 11 A, B). Durch Kulturüberstände von *H. pylori* sind also nicht nur immortalisierte Lymphomzelllinien sondern auch primäre, humane Lymphozyten hemmbar. Das lässt die Vermutung zu, dass es sich bei dem beobachteten Effekt um ein auch *in vivo* relevantes Phänomen handelt.



**Abb. 11: Einfluss von *H. pylori* Kulturüberständen auf Proliferation primärer Lymphozyten.** Die Diagramme zeigen die Wirkung von *H. pylori* Kulturüberständen auf die Proliferation primärer T-Zellen (A) und PBMC (B) nach 48h (MW +/- Stabw, n=3). Zur Induktion der Proliferation primärer Lymphozyten wurden verschiedene Stimulantien verwendet (C). Basal, unbehandelte Kontrolle; PMA/Iono., stimulierte Kontrolle; cpm, counts per minute.

### 4.3. Spezifische Signalwegsinhibitoren heben

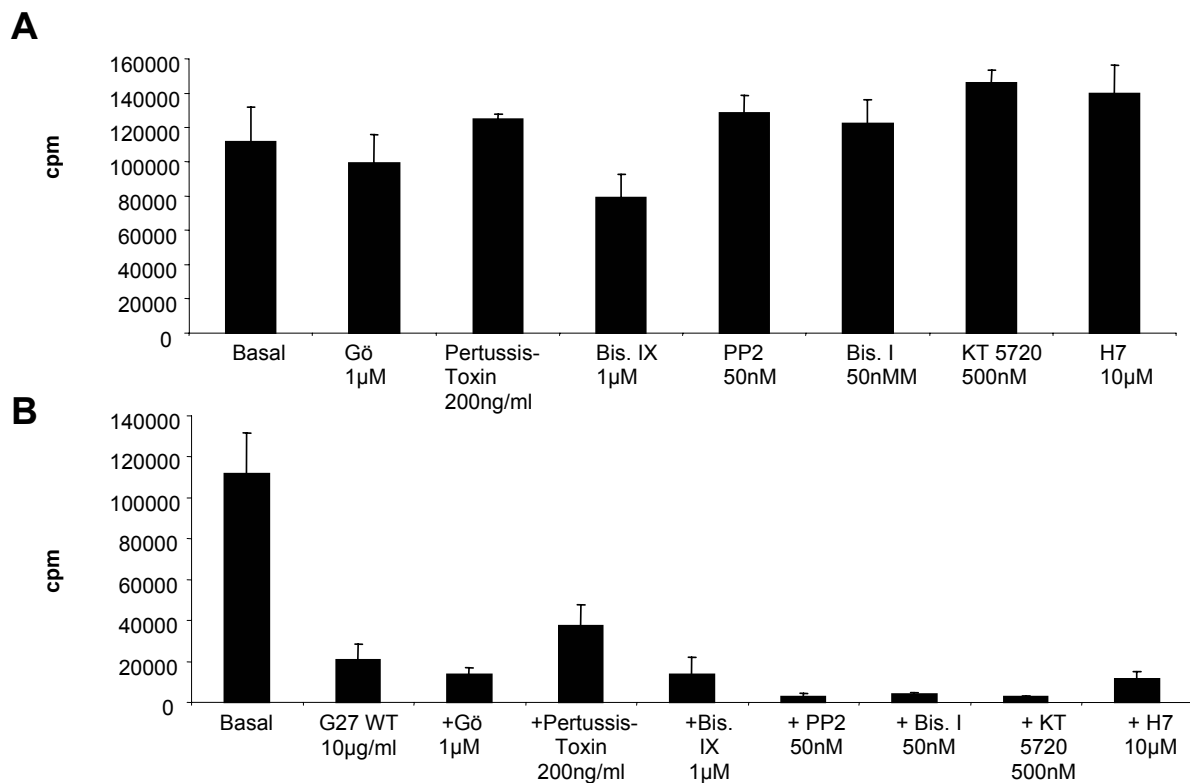
#### proliferationshemmenden Effekt von *H. pylori* nicht auf

Im Verlauf der Aktivierung von T-Zellen kommt es zur Stimulation verschiedener Signalmoleküle wie zum Beispiel der Proteinkinasen A, B und C sowie GTP-bindender Proteine (Miyamoto et al 2000). Um den Mechanismus des proliferationshemmenden Effekts

von *Helicobacter* Überständen auf T-Lymphozyten genauer zu charakterisieren und an der Vermittlung dieses Effekts beteiligte Signalwege zu identifizieren, wurden verschiedene Inhibitoren von Proteinkinasen und anderen Signalwegsmolekülen (siehe Tabelle 8) eingesetzt. Diese wurden zusammen mit Überständen von *H. pylori* mit EL-4 Zellen inkubiert. Nach 48h Inkubation wurde die Proliferationsrate der Zellen bestimmt. Wie aus Abb. 12A hervorgeht, hatte keiner der beschriebenen Inhibitoren selbst einen proliferationshemmenden oder zytotoxischen Effekt auf die verwendeten Zellen. Eine parallele Inkubation der Zellen mit Überständen des *Helicobacter* Wildtyp Stammes G27 und den einzelnen Inhibitoren zeigte ebenfalls keine relevante Reduzierung des Hemmeffektes (Abb. 12B). Daraus lässt sich schließen, dass die Inhibition der Proliferation von T-Zellen durch *H. pylori* nicht durch eine verstärkte Aktivierung von Proteinkinasen oder auch der Adenylatcyclase verursacht wird.

<b>Inhibitor</b>	<b>Angriffspunkt</b>	<b>Eingesetzte Konzentration</b>
<b>Bisindolyl-maleimid I (Bis I)</b>	PKC	50nM
<b>Bisindolyl-maleimid IX (Bis IX)</b>	PKC, MAPKAP 1 $\beta$ , p70S6 Kinase	1 $\mu$ M
<b>Gö 6983 (Gö)</b>	PKC $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \zeta$	1 $\mu$ M
<b>H7</b>	PKA, PKC	10 $\mu$ M
<b>KT 5720</b>	PKA	500nM
<b>Pertussis-Toxin</b>	Adenylatcyclase (G <sub>i</sub> -	200ng/ml

**Tabelle 8:** Zielproteine und Konzentrationen der verwendeten Signalwegsinhibitoren



**Abb. 12: Beeinflussung des proliferationshemmenden Effekts von *H. pylori* durch Kinaseinhibitoren.** Die Diagramme zeigen den Grad der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation von EL-4 Zellen bei Inkubation mit Kinaseinhibitoren für 48h in An-/Abwesenheit von *H. pylori* Kulturüberständen (Mittelwerte  $\pm$  Stabw, n=3). Basal, unbehandelte Kontrolle; WT, Wildtyp; cpm, counts per minute.

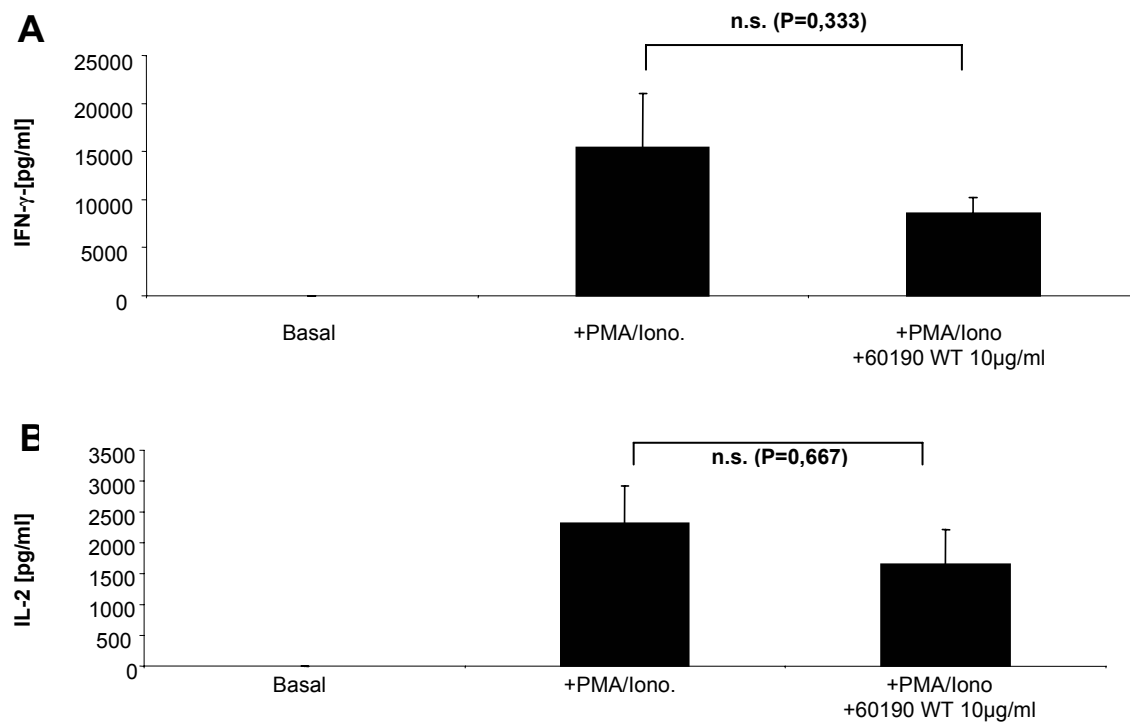
#### 4.4. *H. pylori* Überstände beeinträchtigen Zellzyklusregulation, aber nicht Aktivierung und Apoptose von T-Zellen

##### 4.4.1. Sezernierte *H. pylori* Proteine und T-Zell-Aktivierung

###### a) Einfluss auf IL-2- und IFN- $\gamma$ -Sekretion

Als nächstes wurde der Einfluss der *Helicobacter* Überstände auf die Aktivierung von Lymphozyten weiter untersucht. Dazu wurden humane PBMC mit PMA und Ionomycin stimuliert und mit *Helicobacter* WT Überständen für verschiedene Zeiträume behandelt. Der Einfluss der verwendeten Überstände auf die Zytokinsekretion der Zellen wurde mittels ELISA untersucht. Die Abb. 13A und B zeigen die Zytokinsekretion 24h nach Inkubation der Zellen mit oder ohne *Helicobacter* Überstände. Die Stimulation der PBMC mit PMA/Ionomycin führte - wie zu erwarten war - aufgrund der mitogenen Aktivierung der Zellen zu einer deutlichen Steigerung der Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 im Vergleich zu den

nicht stimulierten Zellen (Basal). Die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Überständen von *Helicobacter pylori* WT in einer Konzentration von 10µg/ml, welche die Proliferation von T-Zellen in bereits beschriebenen Versuchen deutlich gehemmt hatte (Abb. 8), bewirkte keine signifikante Verminderung der Sekretion von IFN-γ und IL-2 aus den verwendeten Zellen.

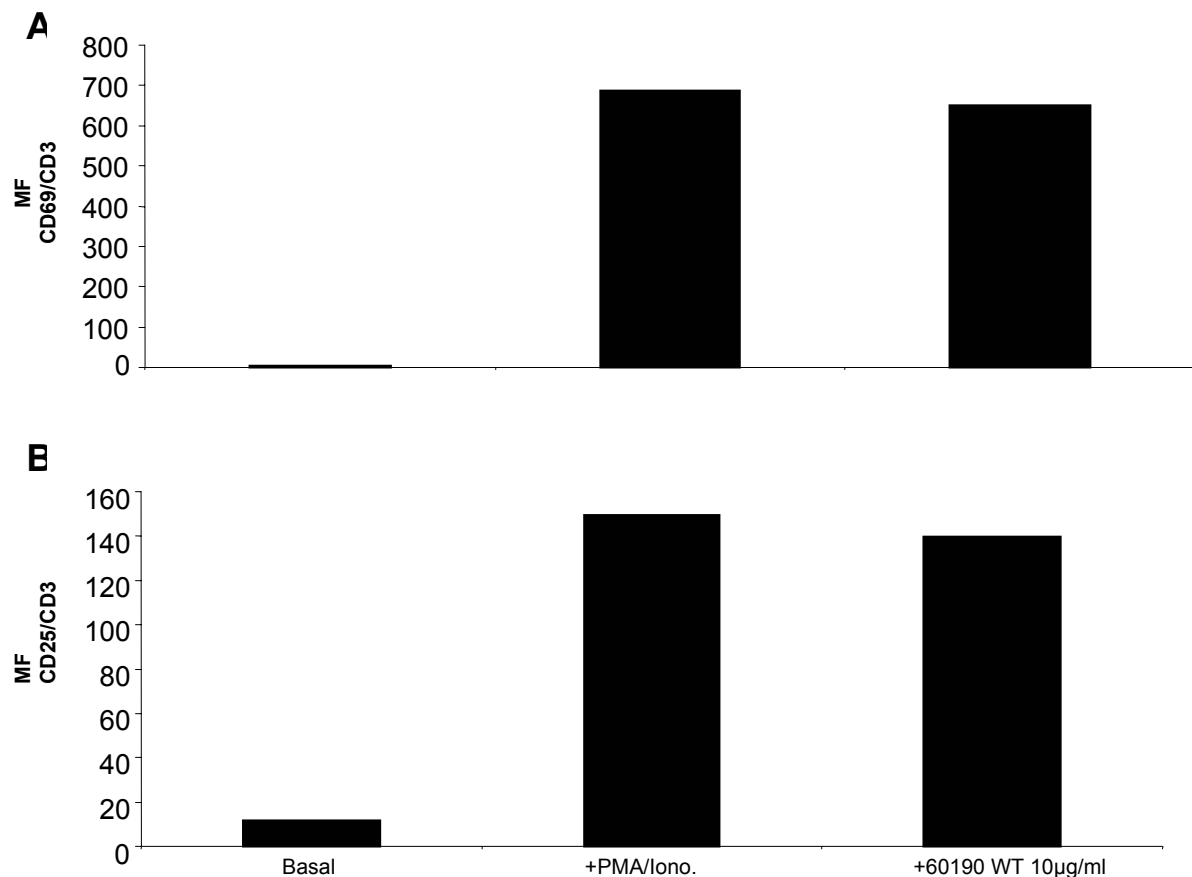


**Abb. 13. Einfluss von *H. pylori* Kulturüberständen auf die Zytokinsekretion.** Die Diagramme zeigen die Sekretion der Zytokine IFN-γ (A) und IL-2 (B) durch PBMC in An-/Abwesenheit von *H. pylori* Kulturüberständen in pg/ml (MW +- Stabw, n=3 Versuche). Die dargestellten p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test berechnet. Basal, unbehandelte Kontrolle; PMA/Iono., stimulierte Kontrolle; WT, Wildtyp.

### b) Einfluss auf CD69- und CD25-Expression

Ein weiterer Parameter der T-Zell-Aktivierung ist die Expression der Oberflächenantigene CD69 und CD25 (siehe 1.3.). Um einen möglichen Einfluss der verwendeten HP Überstände auf diese Aktivierungsparameter der T-Zellen zu bestimmen, wurden primäre, humane T-Zellen mittels MACS-Technik aufgereinigt, mit PMA und Ionomycin stimuliert und mit *H. pylori* Überständen in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Nach 24h wurde das Ausmaß der CD69- (Abb. 14A) und CD25-Expression (Abb. 14B) der CD3 positiven T-Zellen per FACS-Analyse bestimmt. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Aktivierung sowohl der CD69- als auch der CD25-Expression der verwendeten T-Zellen durch

Stimulation mit PMA und Ionomycin. Die Zugabe von *Helicobacter* Überständen in deutlich proliferationshemmenden Konzentrationen von 10µg/ml bewirkte jedoch keine Verminderung dieser Antigenexpression. Weitere Versuche innerhalb der Arbeitsgruppe bestätigten diese Ergebnisse und zeigten, dass auch Überstände VacA defizienter *Helicobacter* Stämme keinen Einfluss auf die Aktivierung humaner T-Zellen hatten (Gerhard et al 2005).



**Abb. 14: T-Zell-Antigenexpression in Anwesenheit sezernierter *H. pylori* Proteine.**

Die Diagramme zeigen die Ergebnisse von FACS-Analysen der CD69- (A) und CD25- (B) Expression CD3 positiver, primärer, humaner T-Zellen nach Inkubation mit *H. pylori* Kulturüberständen für 24h. MF, mittlere Fluoreszenz; Basal, unbehandelte Kontrolle; PMA/Iono., stimulierte Kontrolle; WT, Wildtyp.

### c) Einfluss auf Proteinexpression

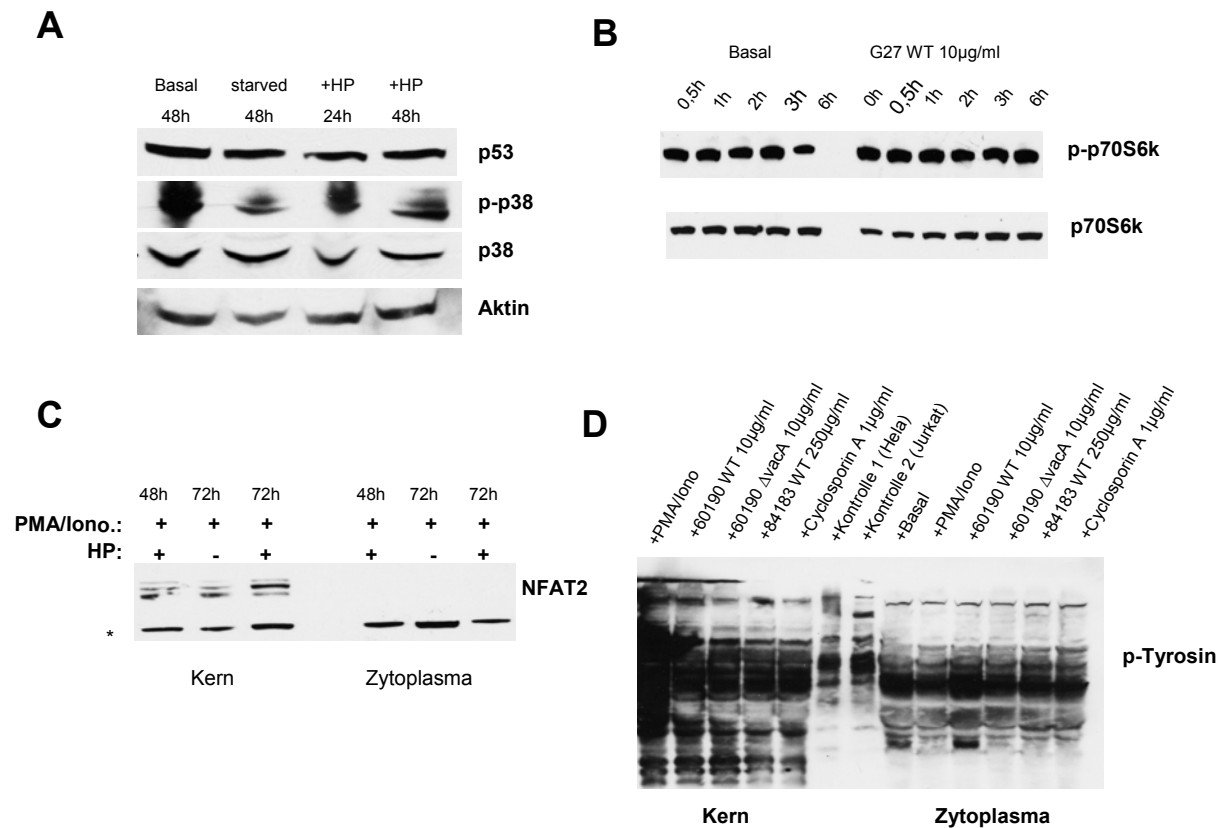
Darüber hinaus wurde der Einfluss von *Helicobacter* Überständen auf die Expression verschiedener Proteine mit wichtiger Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen und der Zellzyklusregulation untersucht. Ein wichtiger Parameter der Aktivierung von T-Zellen ist zum Beispiel die Tyrosin-Phosphorylierung von Adapterproteinen nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors (siehe 1.3.). In Folge dieser Phosphorylierungen kommt es zur Stimulation verschiedener Signalwegsmoleküle und Kinasen wie z.B. Ras, MAP-Kinasen, p38 und auch der p70S6 Kinase. Ferner wird auch die nukleäre Translokation von Transkriptionsfaktoren

wie z.B. NFAT (nuclear factor of activated T cells) aktiviert. Um festzustellen, ob die Inkubation von T-Zellen mit sezernierten Proteinen von *H. pylori* zu einer Störung dieser zentralen Signalwege der T-Zellaktivierung und dadurch zur verminderten Proliferation der Zellen führt, wurden verschiedene T-Zelllinien bzw. primäre T-Zellen mit *H. pylori* Überständen für unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Die Untersuchung der Proteinexpression der Zellen erfolgte per Western-Blot von Zelllysaten und zellulären Extrakten (siehe 3.8.). Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche zeigen, dass die Behandlung der T-Zellen mit *H. pylori* Überständen zu keiner Veränderung der p38 Proteinexpression und auch nicht zu einer veränderten Phosphorylierung, also Aktivierung dieses Proteins führte (Abb. 15A). Darüber hinaus kam es auch zu keiner Veränderung des Gehalts an p70s6K Protein. Auch die Aktivierung dieses Proteins veränderte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht (Abb. 15B).

Des Weiteren wurde eine Kernextraktion von humanen PBMC durchgeführt, die mit PMA/Ionomycin stimuliert und mit verschiedenen Konzentrationen an HP Überständen für 6h inkubiert worden waren. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers wurde das Ausmaß der Tyrosinphosphorylierung in den erhaltenen nukleären und zytoplasmatischen Zellextrakten untersucht. Dabei zeigte sich keine HP-abhängige Veränderung der Proteinphosphorylierung. (Abb. 15D). Die bisher beschriebenen Ergebnisse der Western-Blot Analysen zeigen also, dass wichtige Signalwege (p70S6k, p38) und Mechanismen der T-Zell-Aktivierung (Tyrosinphosphorylierung von Adapterproteinen) bei Inkubation dieser Zellen mit sezernierten Proteinen von *H. pylori* intakt sind. Eine Störung dieser Aktivierungsprozesse kann also nicht der Grund für die Inhibition der Zellproliferation sein.

Da im Verlauf der Arbeiten an dieser Doktorarbeit mehrere Veröffentlichungen erschienen, die eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors NFAT am proliferationshemmenden Effekt von *H. pylori* auf T-Zellen postulierten (Gebert et al 2003; Boncristiano et al. 2003), wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit auch Versuche in Zusammenhang mit diesem Protein durchgeführt. Dazu wurden PMA/Ionomycin-stimulierte primäre humane T-Zellen mit Überständen von *Helicobacter pylori* inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden aus den Zellen per Kernextraktion die nukleären und zytoplasmatischen Proteine isoliert und getrennt per Western-Blot auf die Anwesenheit des NFAT Proteins untersucht. Aus Abb. 12C geht hervor, dass sowohl bei den stimulierten Kontrollzelllysaten als auch bei den mit *H. pylori* Überständen behandelten Proben das NFAT Protein zu den untersuchten Zeitpunkten vollständig in den Zellkern transloziert war. Eine Inhibierung der nukleären NFAT

Translokation durch HP Überstände in primären T-Zellen kann also nicht die Erklärung für den beobachteten proliferationshemmenden Effekt von *H. pylori* gegenüber T-Zellen sein.



**Abb. 15: Einfluss sezernierter *H. pylori* Proteine auf zelluläre Proteinspiegel.**

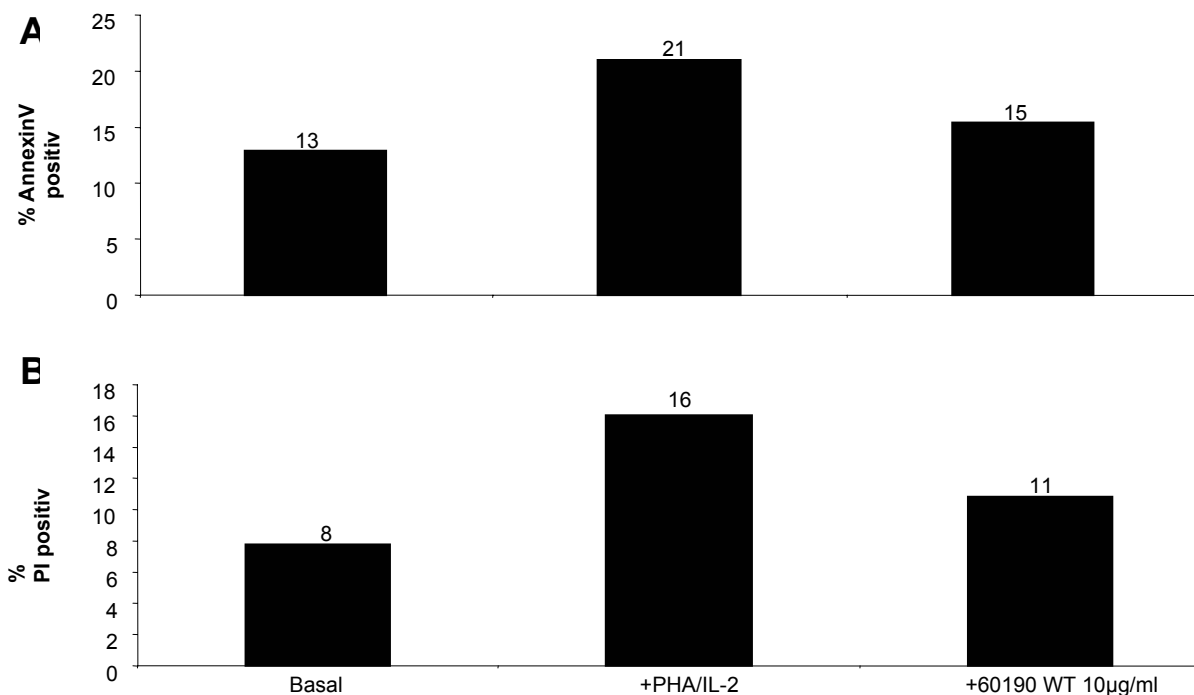
Dargestellt sind die Ergebnisse von Western-Blot Analysen von Gesamtzelllysaten (A, B) und Kern-/Zytoplasmaextrakten (C, D) aus CCRF (A), EL-4 (B), PBMC (D) und primären T-Zellen (C). Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume (6h bei D) mit Kulturüberständen von *H. pylori* G27 WT (10µg/ml) behandelt. Jeweils 30µg Protein der Gesamtzelllysate bzw. 10µg der Kernextrakte wurde per SDS-PAGE aufgereinigt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet, Die Detektion erfolgte unter Verwendung der angegebenen Antikörper per Chemilumineszenz. \*, unspezifische Bande; WT, Wildtyp; starved, ohne Serum inkubierte Kontrolle.

#### 4.4.2. Sezernierte *H. pylori* Proteine und Apoptose

Als nächstes wurde untersucht, ob der proliferationshemmende Effekt der verwendeten HP Überstände durch Induktion von zellulärer Apoptose oder Nekrose ausgelöst wurde. Dazu wurden primäre humane PBMC mit PHA und IL-2 stimuliert und mit Überständen von *Helicobacter pylori* WT in einer Konzentration von 10µg/ml behandelt. Das Ausmaß von Apoptose bzw. Nekrose in den unterschiedlich behandelten Zellen wurde nach 48h durch AnnexinV-FITC/PI-Färbung und anschließende FACS-Analyse bestimmt. Die Abb. 16A und



B zeigen eine Zunahme der zellulären Apoptose (AnnexinV-positive Zellen) und Nekrose (PI-positive Zellen) durch Stimulation der Zellen mit PHA/IL-2. Eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit den angegebenen WT Überständen bewirkte keine weitere Verstärkung sondern eine leichte Reduktion des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die verminderte Proliferation der verwendeten Zellen in Anwesenheit sezernierter *H. pylori* Proteine nicht durch Induktion von Apoptose ausgelöst wird.

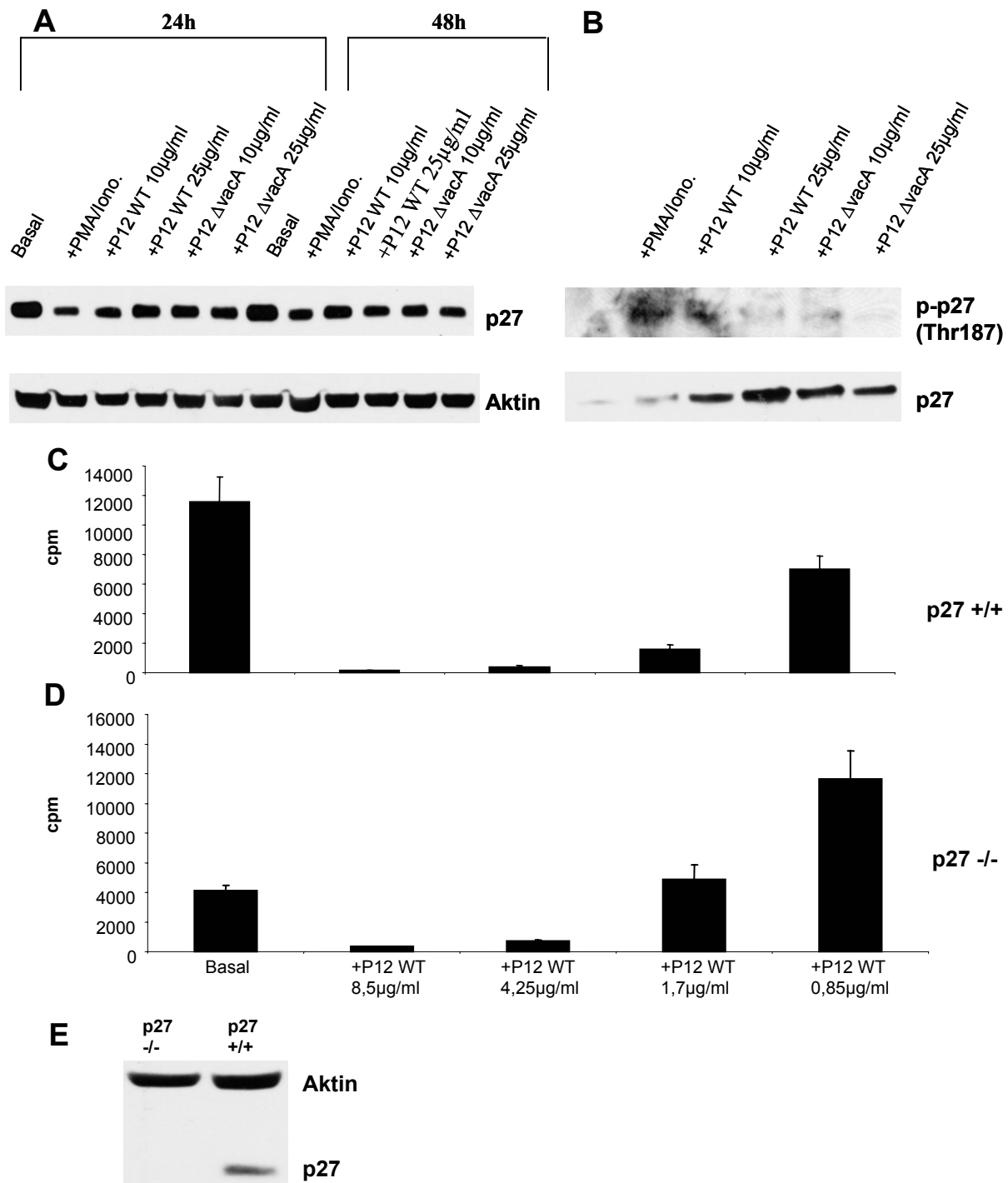


**Abb. 16: Beeinflussung zellulärer Apoptose und Nekrose durch sezernierte *H. pylori* Proteine.** Die Diagramme zeigen den prozentualen Anteil apoptotischer (A) und nekrotischer (B) Zellen an der Gesamtpopulation der unterschiedlich behandelten PBMC. Von jeder Probe wurden per FACS-Analyse 10000 Zellen untersucht.

#### 4.4.3. Sezernierte *H. pylori* Proteine und Zellzyklusregulation

Eine denkbare Ursache für die Inhibition der Proliferation von T-Zellen durch *H. pylori* wäre neben einer Störung der T-Zell-Aktivierung auch die Störung der Zellzyklusregulation der Lymphozyten. Die Induktion der Proteinexpression wichtiger zellzyklusinhibierender Proteine wie z.B. des Cdk-Inhibitors p27Kip1 oder des Checkpointproteins p53 durch sezernierte Proteine von *H. pylori* würde zur Auslösung eines Zellzyklusarrest und damit auch zu verminderter Zellproliferation führen (siehe 1.4.4.).

Daher wurde als wichtiger Parameter der Zellzyklusregulation die Proteinexpression und Phosphorylierung des Cdk-Inhibitors p27Kip1 in T-Lymphozyten per Western-Blot und Immunpräzipitation untersucht. Die Ergebnisse der Western-Blots (Abb. 17A) zeigen einen erhöhten Anteil an p27 Protein in den unstimulierten, unbehandelten Kontrollzellen (Basal). Die Zellen befinden sich aufgrund des fehlenden antigenen oder mitogenen Stimulus in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus, die unter anderem durch eine vermehrte p27 Proteinexpression und damit verbundene verminderte Proliferation der Zellen gekennzeichnet ist. Durch Stimulation mit PMA/Ionomycin kam es zu einer Abnahme der p27 Spiegel in den Zellen aufgrund des Eintritts in den Zellzyklus. Die gleichzeitige Zugabe verschiedener Konzentrationen an *H. pylori* Überständen führte hingegen wieder zu einer Erhöhung des p27-Gehalts in den Zellen etwa auf die in den Basalwerten vorhandenen Mengen. Dieser Effekt war dabei sowohl bei Überständen aus *H. pylori* WT als auch aus *vacA* ko Stämmen zu beobachten. Das erhaltene Ergebnis bestätigte sich bei Immunpräzipitation von T-Zell-Lysaten mit einem p27-spezifischen Antikörper und anschließendem p27-Western-Blot (Abb. 17B). Auch in diesem Versuch führte die Behandlung der stimulierten T-Zellen mit *Helicobacter* Überständen zu einer deutlichen Zunahme des Gehalts an p27. Bei Inkubation der gleichen Western-Blot Membran mit einem Antikörper, der spezifisch p27 Moleküle, die am Aminosäurerest Threonin 187 phosphoryliert sind, detektiert, zeigte sich verminderte p27 Phosphorylierung bei den Immunpräzipitaten der mit HP Überständen behandelten Zellen im Vergleich zur stimulierten Kontrolle. Da der erste Schritt zum proteasomalen Abbau des Cdk-Inhibitors p27 dessen Phosphorylierung am Threoninrest 187 darstellt (Vlach et al 1997), lässt dieses Ergebnis auf einen verminderten Abbau des p27 Proteins in T-Zellen bei Inkubation mit sezernierten Proteinen von *H. pylori* schließen. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung für die erhöhte Proteinkonzentration des p27 Proteins in den mit *H. pylori* Überständen behandelten Zellen im Vergleich zur stimulierten Kontrolle sein. Um die Abhängigkeit des proliferationshemmenden Effekts der HP Überstände von der Anwesenheit des Proteins p27kip1 weiter zu untersuchen, wurden Fibroblasten aus p27 WT (+/+) und p27 ko- (-/-) Mäusen verwendet. Die Produktion des p27 Proteins in den Zellen wurde per Western-Blot unter Verwendung von Gesamtzelllysaten untersucht. Wie Abb. 17E zeigt, exprimierten erwartungsgemäß nur die Zellen aus den WT-, aber nicht diejenigen aus den p27 ko-Mäusen das Protein p27Kip1. Die Fibroblasten wurden dann mit Verdünnungsreihen von HP WT Überständen für 48h im Brutschrank inkubiert.



**Abb. 17: Rolle von p27 bei der Proliferationshemmung durch *H. pylori*.**

Die Abb. A und B zeigen das Ergebnis von Western-Blot Analysen von Gesamtzelllysaten (A) und Immunpräzipitaten (B) primärer humaner T-Zellen., welche für die angegebenen Zeiträume (B, 48h) mit Kulturüberständen verschiedener *H. pylori* Stämme inkubiert wurden. Die Immunpräzipitation erfolgte unter Verwendung eines monoklonalen p27 Antikörpers (siehe 3.8.2.d, Tabelle 3). Die Diagramme C und D zeigen das Ergebnis von Proliferationstests mit embryonalen p27 WT- und p27ko-Fibroblasten, die mit *H. pylori* Kulturüberständen für 48h inkubiert wurden. Der p27 Status der verwendeten Fibroblasten wurde per Western-Blot kontrolliert (E). Basal, unbehandelte Kontrolle; PMA/Iono., stimulierte Kontrolle; WT, Wildtyp; cpm, counts per minute.

Die Bestimmung der Zellproliferation erfolgte per Tritium-Thymidin-Inkorporationsassay. Die Abb. 17C zeigt eine eindeutige und dosisabhängige Inhibition der Proliferation der Wildtypzellen durch Überstände von Wildtyp Bakterien. Die Zellen aus p27ko-Mäusen zeigten insgesamt eine geringere Proliferationsrate und waren nur in höheren Konzentrationen von 9 bzw. 5µg/ml durch die verwendeten Überstände in ihrer Proliferation hemmbar. In niedrigeren Konzentrationsbereichen von 2 und 1µg/ml war mit den Überständen der Bakterien kein Hemmeffekt mehr zu beobachten (Abb. 17D).

Im Gegensatz zu p27Kip1 zeigten Western-Blot Versuche mit T-Zellen keine Veränderung der Proteinexpression des Checkpointproteins p53 bei Inkubation mit sezernierten Proteinen von *Helicobacter pylori* (siehe Abb. 15A)..

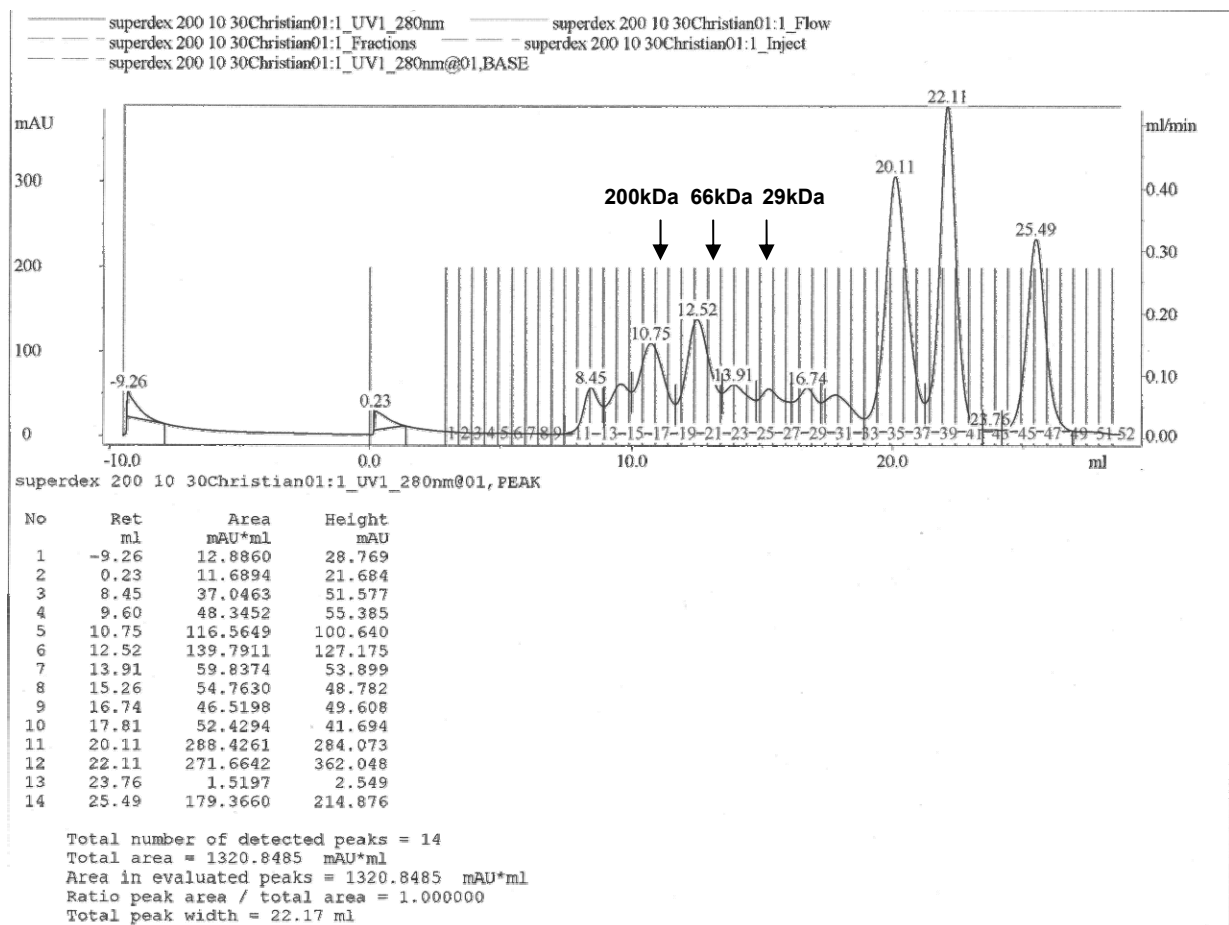
#### **4.5. Ein niedermolekulares Protein von *H. pylori* ist**

##### **verantwortlich für den proliferationshemmenden Effekt in T-Zellen**

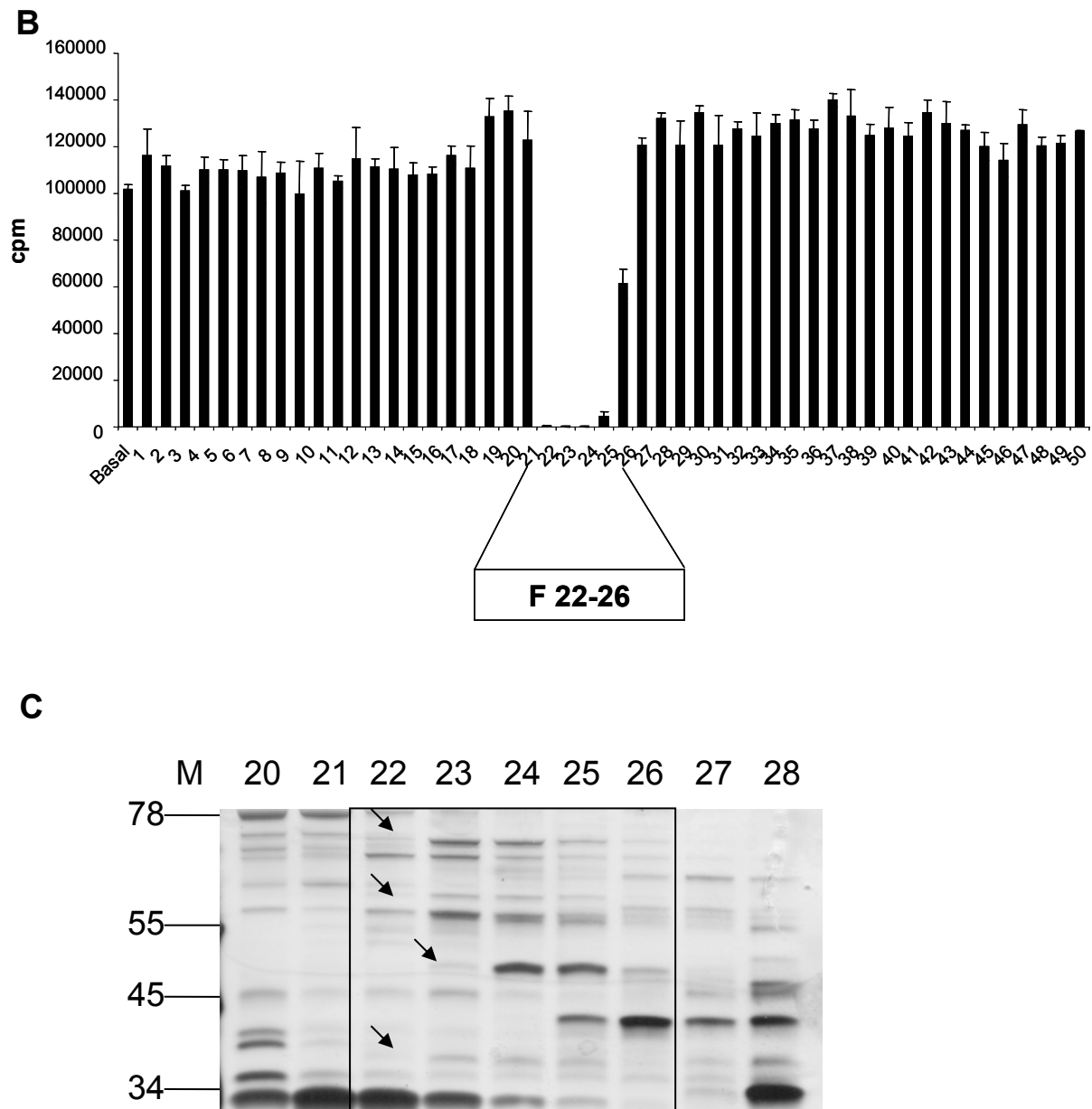
Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde(n) der/die für die beobachtete Proliferationshemmung von T-Zellen verantwortliche(n) Faktor(en) in Kulturüberständen von *Helicobacter pylori* charakterisiert. Dazu wurden 500µg Protein eines Überstandes des *Helicobacter pylori* Stammes G27 WT auf eine Gelfiltrationschromatographiesäule aufgetragen und wie unter 3.16.2.1. beschrieben aufgereinigt. Die Abb. 18A zeigt das Elutionsprofil der verwendeten Säule. Die y-Achse zeigt den photometrisch gemessenen Proteingehalt der von der Säule eluierten Peaks in mAU an. Je höher der einzelne Peak, desto höher war auch die innerhalb dieses Peaks eluierte Proteinmenge. Auf der x-Achse des Elutionsprofils ist das Elutionsvolumen dargestellt. Bei Position 0.0 erfolgte der Auftrag des HP Überstandes auf die Säule. Es wurden insgesamt 14 Peaks mit unterschiedlichen Höhen detektiert. Durch Verwendung von Markerproteinen, die auf dieselbe Säule aufgetragen wurden, war es möglich, den einzelnen Fraktionen bestimmte Proteingrößenbereiche zuzuordnen. Diese sind in der Abbildung entsprechend angegeben. Insgesamt wurden 50 Fraktionen gesammelt. Die gesammelten Proben wurden im Anschluss an die chromatographische Aufreinigung mit Hilfe des Tritium-Thymidin-Inkorporationstests auf proliferationshemmende Eigenschaften untersucht. Das Ergebnis dieses Tests (Abb. 18B) zeigt, dass die Fraktionen Nummer 22-26 die Proliferation der verwendeten T-Zellen deutlich inhibierten. Der Hemmeffekt durch Fraktion Nummer 26 war dabei etwas schwächer ausgeprägt als in den Fraktionen Nummer 22-25. Alle anderen von der Chromatographiesäule

eluierten Fraktionen zeigten keinen proliferationshemmenden Effekt. Anhand der verwendeten Markerproteine konnte der Größenbereich der in den Fraktionen Nr. 22-26 eluierten Proteine auf 29-66kDa eingegrenzt werden (siehe oben). Um die in den proliferationshemmenden Fraktionen eluierten Proteinmuster mit denen in den Fraktionen, welche die Zellproliferation nicht inhibiert hatten, zu vergleichen, wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Silberfärbung der aufgetrennten Proteine durchgeführt. Abbildung 18C zeigt das Ergebnis dieser Silberfärbung für die Fraktionen Nr. 20 bis 28. Es sind vier Proteinbanden zu erkennen, welche nur in den proliferationshemmenden Fraktionen vorhanden sind.

**A**



**Abb. 18A:** Elutionsprofil der verwendeten Gelfiltrationssäule nach Auftrennung von HP WT Kulturüberstand.



**Abb. 18: Aufreinigung des proliferationshemmenden Proteins aus *H. pylori* Kulturüberstand.** Abbildung A zeigt das Elutionsprofil der verwendeten Gelfiltrationssäule. Es wurden 500µg Protein eines Kulturüberstandes von *H. pylori* G27 WT auf die Säule aufgetragen (Pfeile: Elutionsverhalten von Markerproteinen auf derselben Säule); B zeigt die Proliferationsrate von EL-4 T-Zellen bei Inkubation mit den einzelnen Fraktionen der Gelfiltrationssäule. Von jeder Fraktion wurden 10µl im Proliferationstest eingesetzt. Die Fraktionen mit proliferationshemmendem Effekt sind hervorgehoben (F 22-26). Die Proteinzusammensetzung der proliferationshemmenden Fraktionen wurde per SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung der Proteine untersucht (C). Pfeile markieren in den proliferationshemmenden Fraktionen auftauchende Proteinbanden. Basal, unbehandelte Kontrolle; cpm, counts per minute; M, Größenmarker.

## 4.6. Identifikation des proliferationshemmenden Proteins als

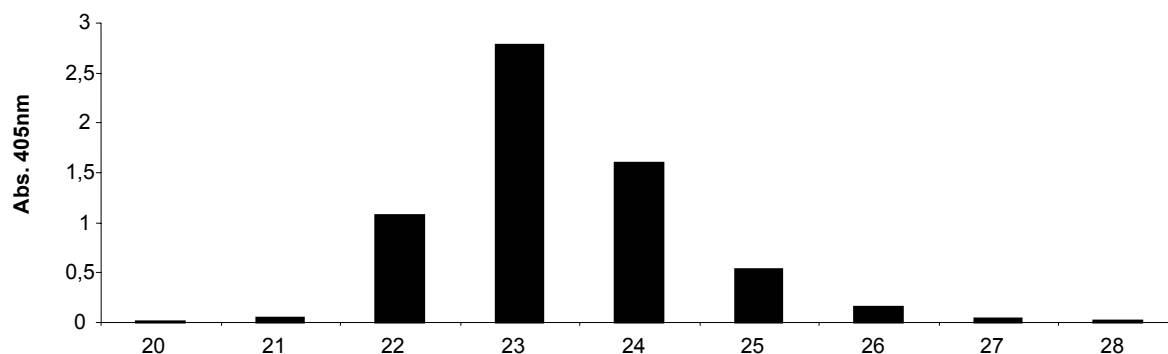
### *H. pylori* $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase (GGT)

Im Verlaufe der Doktorarbeit veröffentlichten verschiedene Arbeitsgruppen unabhängig voneinander Arbeiten über die Art und Größe sezernierter Proteine von *Helicobacter pylori* (Bumann et al 2002; Kim et al 2002). Anhand dieser Arbeiten und den Daten aus der im Internet verfügbaren *Helicobacter pylori* Genomsequenz (Tomb et al 1997; www.tigr.org) wurde für die vorliegende Doktorarbeit eine Tabelle erstellt, die alle sezernierten Proteine des Bakteriums darstellt, welche eine Größe zwischen 29 und 66kDa aufweisen und damit für den beschriebenen proliferationshemmenden Effekt verantwortlich sein könnten (s. Tabelle 9).

Aus der Silberfärbung des Proteingels (Abb. 18C) ist zu erkennen, dass 4 Proteinbanden entsprechend des Hemmeffekts in den Fraktionen der Gelfiltration (siehe Abb. 18B) auftauchten. Von diesen zwei Proteinen entsprechen zwei der Größe von GGT-Fragmenten (38kDa, 56kDa). Für die GGT ist eine photometrische Nachweisreaktion etabliert (Meister et al 1981). Um festzustellen, ob dieses Protein für den beobachteten proliferationshemmenden Effekt in T-Zellen verantwortlich war, wurden die Fraktionen Nr. 20-28 aus der Gelfiltrationschromatographie (siehe 4.5.) auf vorhandene Aktivität der GGT untersucht. Aus Abb. 19 geht hervor, dass nur die Fraktionen Nummer 22-26, die auch die Proliferation der EL-4 Zellen (siehe Abb. 18B) gehemmt hatten, GGT-Enzymaktivität zeigten. Dies war ein erster deutlicher Hinweis darauf, dass die von *H. pylori* sezernierte GGT (HP GGT) für die beobachtete Inhibition der Proliferation von T-Zellen durch den Keim verantwortlich sein könnte.

Bezeichnung	Name	MG
HP 0072	Urease $\beta$ -subunit UreB	64,7
HP 1118	GGT fragment	59,3
HP 0913	Outer membrane protein omp21	57,1
HP 0912	Outer membrane protein omp20	55,9
HP 1019	Serin Protease HtrA	54,1
HP 0973	Hypothetical protein	39,8
HP 1118	GGT fragment	38,3
HP 1454	Hypothetical protein	35,7
HP 0907	Hook assembly protein (flagella) FlgD	34
HP 0175	Cell binding factor 2	33,2
HP 1098	Conserved hypothetical secreted protein	30,2
HP 0231	Hypothetical protein	29,9
HP 1186	Carbonic anhydrase	29,2

**Tabelle 9:** Zelluläre und sezernierte Proteine von *H. pylori*



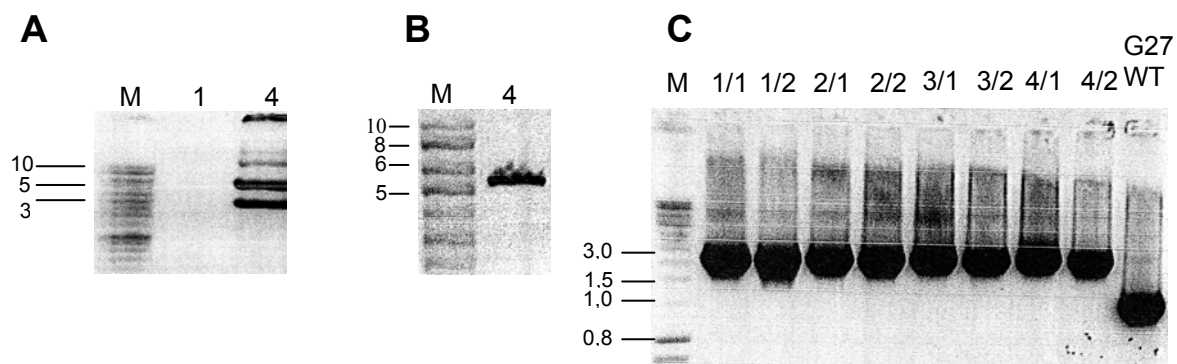
**Abb. 19: GGT-Enzymaktivität der proliferationshemmenden Fraktionen.** Das Diagramm zeigt das Ergebnis eines GGT-Enzymtests mit Fraktionen der Gelfiltrationschromatographie von *H. pylori* G27 WT Kulturüberstand. Gezeigt sind die Absorptionswerte der analysierten Proben bei 405nm in relativen Einheiten.

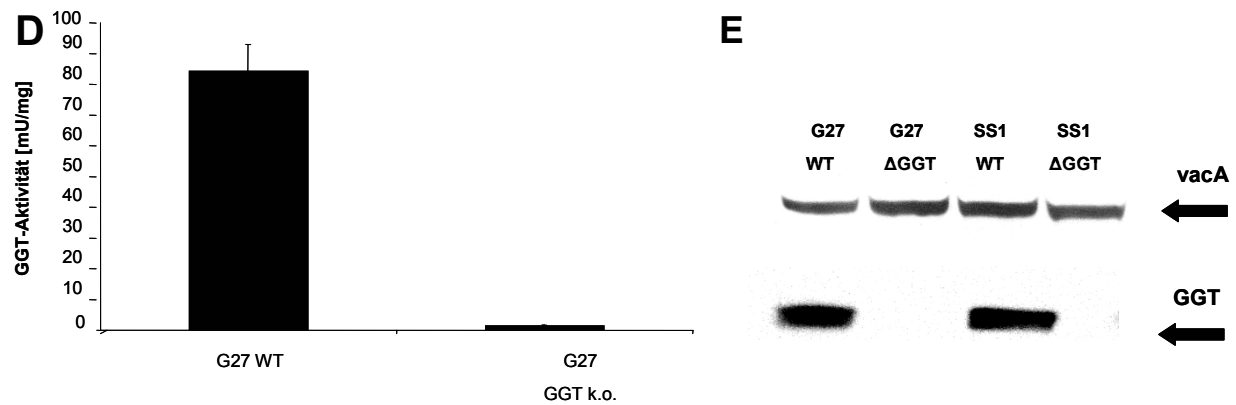
#### 4.6.1. Herstellung GGT defizienter *H. pylori* Mutanten

Um zufällige Coelution der HP GGT mit dem eigentlich proliferationshemmenden Faktor von der Chromatographiesäule auszuschließen und sicherzustellen, dass die GGT wirklich für die Inhibition der Zellproliferation durch *H. pylori* verantwortlich war, wurden GGT defiziente knock-out Mutanten des HP Stammes G27 und des mausadaptierten HP Stammes SS1 durch natürliche Transformation hergestellt. Das hierfür verwendete Plasmid wurde freundlicherweise von K. Shibayama zur Verfügung gestellt (siehe 3.1.7.1.) und in einer Publikation bereits beschrieben (Shibayama et al 2003). Die Abb. 20A zeigt das Ergebnis der



Präparation der *ggt* ko-Plasmid-DNA aus *E. coli*. Durch Verdau der erhaltenen Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym SphI wurde linearisierte DNA mit einer Größe von ca. 5,5kbp erhalten (Abb. 20B). Dies entspricht der rechnerisch zu erwartenden Größe des Plasmids, welches aus dem puC-Vektor (2686bp), HP *ggt* Insert (1422bp) und einer Kanamycin-Resistenzkassette (1300bp) besteht (siehe auch Vektorkarte des Plasmids, 2.5.). Die erfolgreiche Transformation der HP Stämme mit dem *ggt* ko-Konstrukt wurde durch PCR-Reaktion (siehe Abb. 20C) nachgewiesen. Darüber hinaus wurde im Verlauf dieser Doktorarbeit ein polyklonaler Antikörper, der gegen die große Untereinheit des GGT-Enzyms aus *H. pylori* gerichtet war, synthetisiert (siehe 3.9.). Ein Western-Blot von Kulturüberständen von *Helicobacter* WT und GGT defizienten Stämmen (SS1 und G27, siehe Abb. 20E) zeigte bei Verwendung dieses GGT Antikörpers, dass nur die jeweiligen Wildtypstämme, jedoch nicht die isogenen ko-Stämme das GGT Protein exprimierten. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung des Western-Blots mit Protein wurde die in den Lysaten vorhandene Menge an VacA Protein mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Antikörpers untersucht. Wie aus der Abbildung zu erkennen ist, enthielten alle eingesetzten Proben gleiche Mengen des Proteins VacA. Darüber hinaus erfolgte der Nachweis der erfolgreichen Transformation des *ggt* ko-Plasmids durch einen GGT-Enzymtest (Abb. 20D). Die Ergebnisse der einzelnen Versuche zeigen, dass die Konstruktion der GGT defizienten *Helicobacter pylori* Stämme G27 und SS1 erfolgreich war.



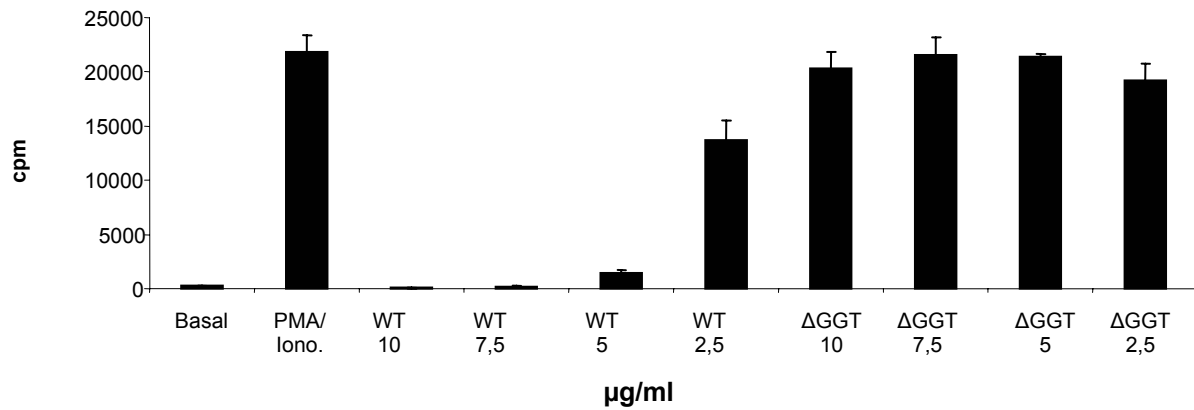


**Abb. 20: Herstellung GGT defizienter *H. pylori* Mutanten.** A, B, Analyse der aus *E. coli* aufgereinigten (A) und mit dem Restriktionsenzym SphI linearisierten (B) Plasmid-DNA des *ggt* ko-Plasmids per Agarosegelelektrophorese. Der Erfolg der Transformation wurde per *ggt* ko-PCR (C), GGT-Enzymtest (D) und Anti-GGT Western-Blot (E) kontrolliert.

#### 4.6.2. Keine Hemmung der T-Zell-Proliferation durch GGT defiziente

##### *H. pylori* Mutanten

Als nächstes wurde der Effekt von Überständen der *ggt* ko-Mutanten auf die Proliferation von PBMC im Vergleich zum jeweiligen Wildtypstamm untersucht. Die *Helicobacter* Überstände wurden wie beschrieben (siehe 3.1.4.) hergestellt. Dabei zeigte sich ein im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypstämmen unverändertes Wachstum der GGT defizienten Bakterien sowohl auf den jeweiligen Nährböden als auch in Flüssigkultur. Dies deutet darauf hin, dass das Fehlen der GGT Expression keinen Nachteil für die Bakterien im Bezug auf ihr Wachstum bedeutet. Die Überstände der GGT defizienten Bakterien wurden dann im Vergleich zum isogenen Wildtypstamm auf proliferationshemmende Eigenschaften gegenüber T-Zellen untersucht. Das Ergebnis des Tritium-Inkorporationstests (Abb. 21) zeigt einen deutlichen konzentrationsabhängigen Hemmeffekt des *H. pylori* WT Überstandes auf die Proliferation der PMA/Ionmycin-stimulierten PBMC. Dagegen bewirkte der Überstand der GGT defizienten Mutante auch in einer Konzentration von 10µg/ml keine Hemmung der T-Zell-Proliferation. Dieses Ergebnis war eine Bestätigung der Vermutung, dass die von *H. pylori* sezernierte GGT für die Inhibition der Proliferation von T-Zellen durch den Keim verantwortlich war.

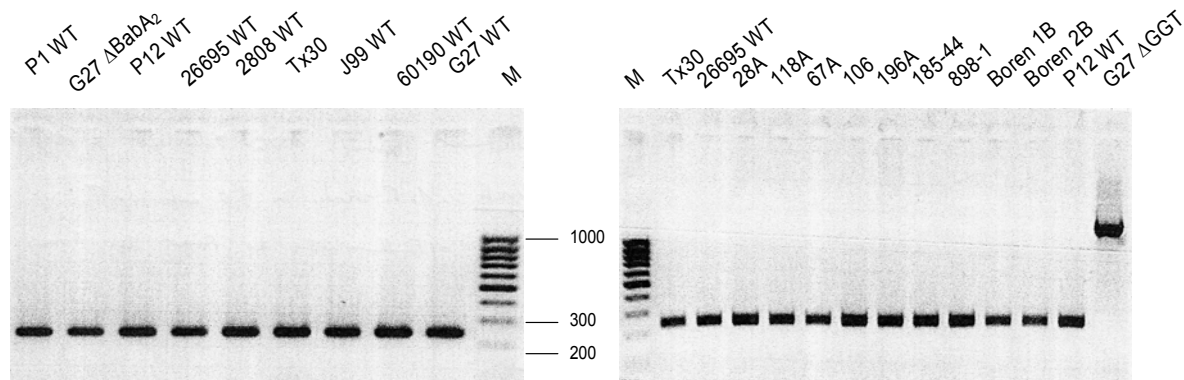


**Abb. 21: Einfluss von Kulturüberständen GGT defizienter *H. pylori* auf T-Zell-Proliferation.** Das Diagramm zeigt die Proliferationsrate humaner PBMC nach Inkubation mit Kulturüberständen von *H. pylori* G27 WT und G27  $\Delta$ GGT für 48h. Basal, unbehandelte Kontrolle; PMA/Iono., stimulierte Kontrolle; WT, Wildtyp.

#### 4.6.3. *ggt* Gen ist bei allen *H. pylori* Stämmen vorhanden

In den bisher durchgeführten Proliferationstests mit T-Zellen hatten alle verwendeten *H. pylori* Wildtypstämme zu einer Inhibition der Zellproliferation geführt. Es gibt einige Virulenzfaktoren bei *H. pylori*, deren Gene nicht bei allen Stämmen oder in Form von allelischen Variationen vorhanden sind (z.B. *cagA*, *vacA*). Daher wurde nun untersucht, ob das Gen für die *ggt* bei allen *H. pylori* Stämmen vorhanden ist.

Mit Hilfe einer PCR-Reaktion (verwendetes Primerpaar: GGT-screen; Größe des PCR-Produkts 240bp) wurden verschiedene *Helicobacter* Stämme auf das Vorhandensein des *ggt* Gens untersucht. Die als Kontrolle eingesetzte DNA einer GGT defizienten Mutante (G27  $\Delta$ GGT) lieferte in der PCR-Reaktion dagegen ein deutlich größeres Produkt als die Wildtypstämme (Abb. 22). Dies weist auf die erfolgreiche Mutation der *ggt* in diesem HP Stamm hin. Das Ergebnis dieses Versuchs ist ein Hinweis darauf, dass das *ggt* Gen in allen *H. pylori* Stämmen in gleicher Form vorhanden ist.



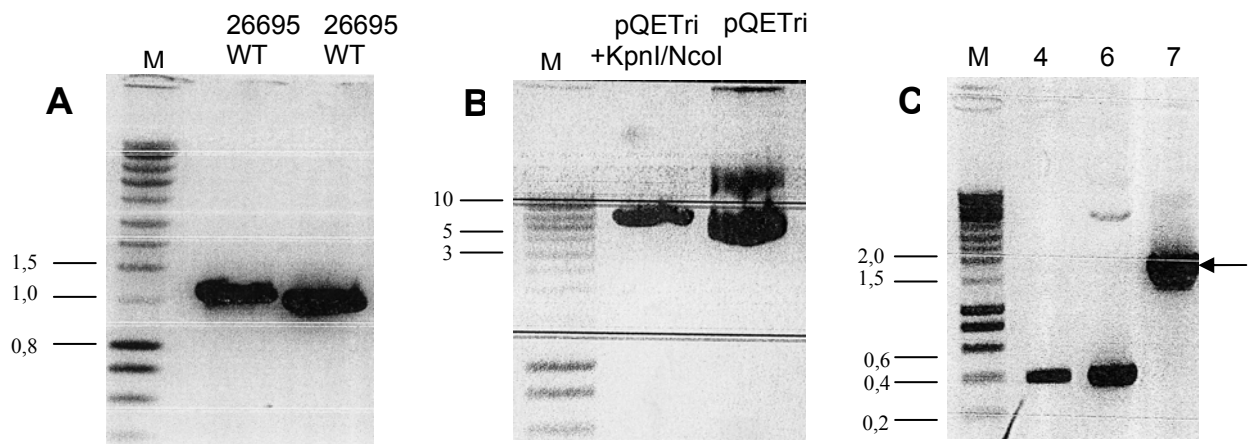
**Abb. 22: *ggt* Status verschiedener *H. pylori* Stämme.** Die Abbildung zeigt das Ergebnis der PCR von DNA der angegebenen *H. pylori* Stämme unter Verwendung der GGT-Screen-Primer (siehe 3.20.2., Tabelle 6). M, Größenmarker (angegeben in bp); WT, Wildtyp.

## 4.7. Rekombinante *H. pylori* GGT aus *E. coli* zeigt proliferationshemmenden Effekt

### a) Klonierung des Vektorkonstrukts zur Expression der HP GGT in *E. coli*

Um auszuschließen, dass durch den Einbau des *ggt* ko-Konstrukts in die genomische DNA der Bakterien die Expression weiterer Gene außer des *ggt* Gens beeinträchtigt wurde, erfolgte als nächstes die Expression der HP GGT als rekombinantes Protein im Bakterium *E. coli*. Die Abbildungen 23A bis C zeigen den Verlauf der Klonierung der rekombinanten HP GGT. Zunächst wurde der gewünschte *ggt* Genabschnitt aus der DNA des HP Stammes 26695 durch Long-Distance-PCR amplifiziert (siehe 3.20.4.; Abb. 23A). Im Anschluss daran erfolgte der Restriktionsverdau des PCR-Produkts (Insert) sowie des Zielvektors pQETri mit den Enzymen KpnI und NcoI. Der erfolgreiche Verdau des Vektors wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung des Verdauprodukts visualisiert (Abb. 23B). Nach Ligation der Verdauprodukte des Vektors und des Inserts und Transformation des erhaltenen Ligationsproduktes in den *E. coli* Stamm XL1 wurden die erhaltenen Klone mit Hilfe einer vektorspezifischen PCR auf erfolgreiche Aufnahme des Ligationsproduktes getestet (siehe 3.20.2.; Abb. 23C). Wie aus der Abbildung zu erkennen ist, enthielt Klon Nummer 7 das gewünschte Konstrukt (durch Pfeil markiert). Alle anderen Klone enthielten den leeren pQETri-Vektor ohne das HP *ggt* Insert. Der Erfolg der durchgeführten Klonierung wurde durch Sequenzierung des Klonierungsproduktes bestätigt (siehe 3.22.h). Die Sequenz des Klonierungsproduktes stimmte zu 100% mit der amplifizierten Sequenz der *ggt* aus *H. pylori*

26695 WT überein. Für die anschließende Expression der rekombinanten HP GGT in *E. coli* wurde daher Klon Nummer 7 verwendet.



**Abb. 23: Klonierungen zur rekombinanten Expression der HP GGT.** Die Bilder A-C zeigen jeweils das Ergebnis von Agarosegelelektrophoresen der folgenden Klonierungsschritte: A, Amplifikation des *ggt* Inserts mit GGTrek-PCR-Primern; B, Restriktionsverdau des Zielvektors pQETri mit KpnI und NcoI; C, Kolonie-Screening nach Transformation von *E. coli* XL1 per PCR mit pQETri-Primern (Pfeil markiert korrekte Größe des klonierten Vektors). WT, Wildtyp; M, Größenmarker (angegeben in kbp).

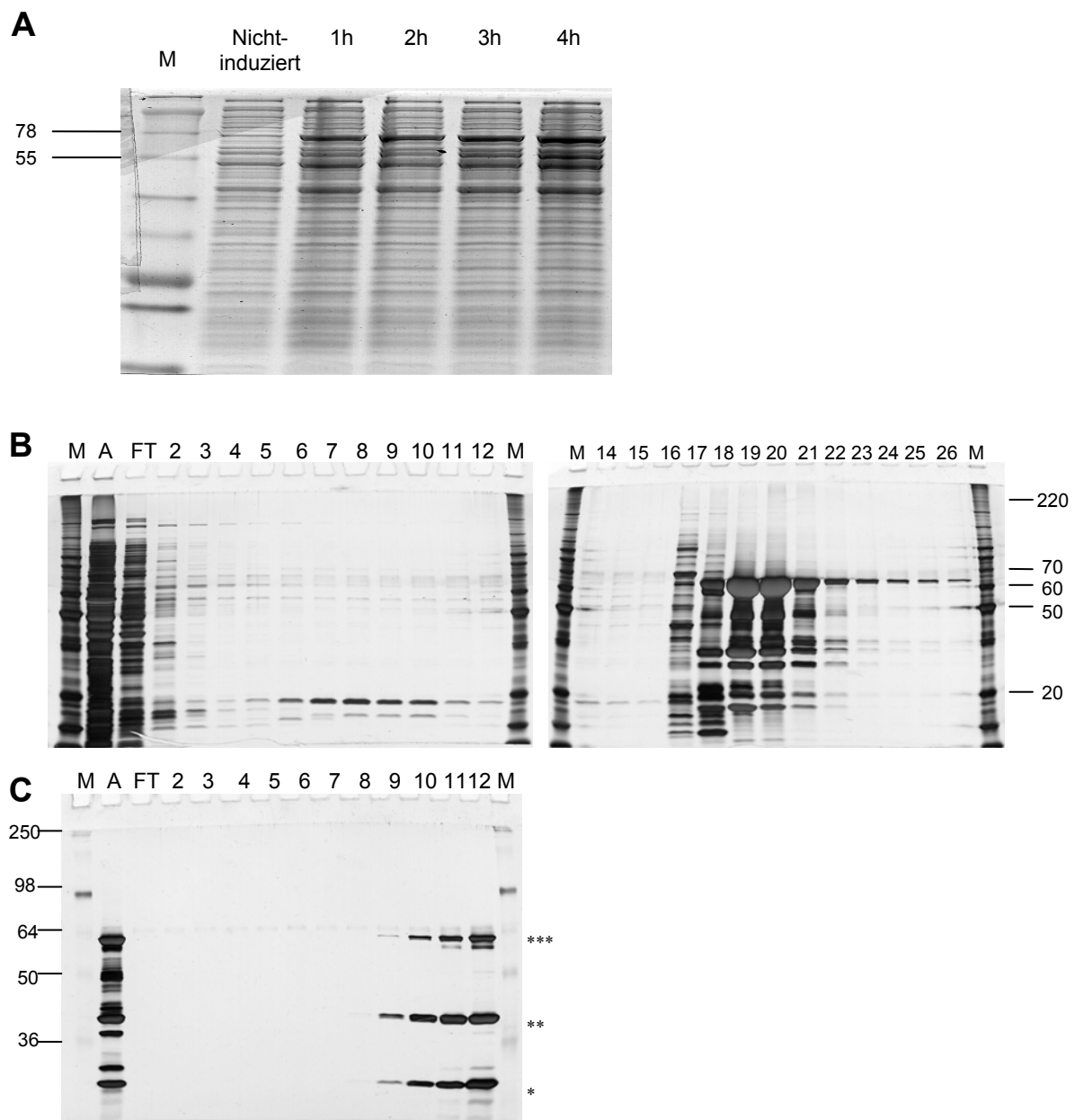
### b) Rekombinante Expression der GGT aus *H. pylori* in *E. coli*

Die Durchführung der Expression des *H. pylori* GGT Proteins in *E. coli* erfolgte wie unter 3.22. beschrieben. Zur Kontrolle des zeitlichen Verlaufs der Expression der rekombinanten HP GGT in *E. coli* wurden vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion der Expression durch IPTG-Zugabe, Proben der *E. coli* Kultur genommen und die Proteine in den erhaltenen Gesamtllysaten per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Abb. 24A zeigt das Ergebnis der Coomassie-Blau-Proteinfärbung eines solchen Gels. Es ist zu erkennen, dass die größte Proteinmenge 4h nach Zugabe von IPTG von den Bakterien gebildet wird, und zwar auch im Größenbereich von ca. 60kDa. Diese Größe entspricht rechnerisch der Gesamtgröße des rekombinanten HP GGT Proteins inklusive HisTaq (rekombinante HP GGT 61,15kDa – Signalpeptid 2,43kDa = 58,72kDa + 6xHisTaq 0,84kDa = 59,56kDa (HisTaq GGT)). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde im weiteren Verlauf der Versuche die Expression der rekombinanten HP GGT jeweils für 4h mit IPTG induziert.

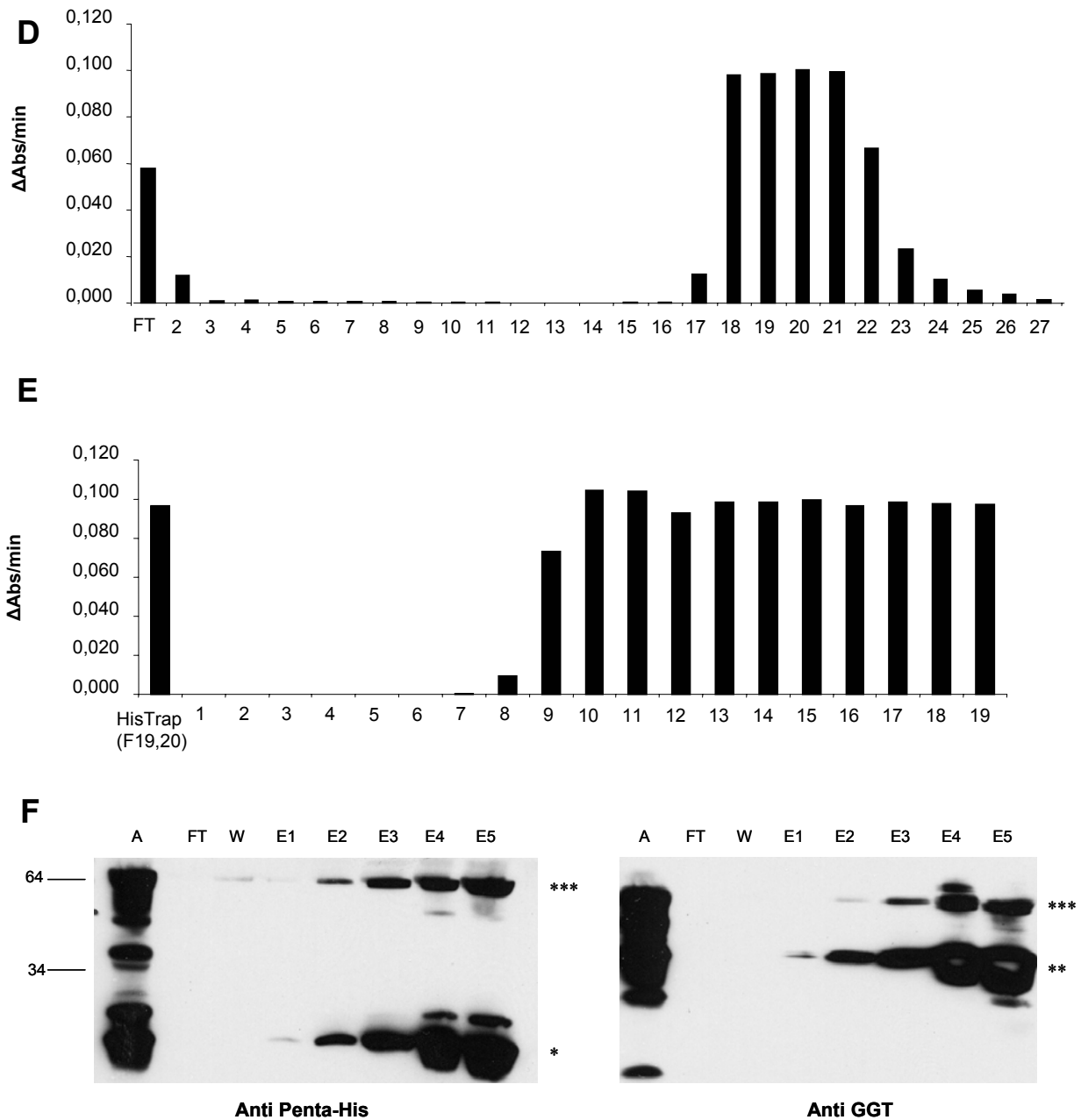
Die native Aufreinigung des rekombinanten Proteins mit HisTaq (siehe oben) erfolgte zunächst mittels einer Nickelchelate-Affinitätschromatographie. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert. Die aufgetrennten Proteine wurden dann durch Silberfärbung (siehe 3.7.5.) im Gel visualisiert (siehe Abb. 24B). Vor allem in den Fraktionen 19 und 20 ist eine deutliche Bande im Bereich von 60kDa, also im Größenbereich der

rekombinanten HP GGT, zu erkennen. Um die Fraktionen, welche das rekombinante Protein enthielten, eindeutig zu identifizieren, wurde ein GGT-Enzymtest mit allen Fraktionen durchgeführt (siehe Abb. 24D). Es ist zu erkennen, dass auch im Durchfluss („Flow-through“, FT) der verwendeten Nickelchelate-Säule, also dem Proteinanteil der nach dem Auftrag der Probe nicht an die Matrix der Säule gebunden hatte, GGT-Enzymaktivität vorhanden war. Darüber hinaus zeigten auch die Fraktionen Nummer 18 bis 22 deutliche GGT-Aktivität. Da die Analyse der durchgeführten SDS-PAGE (siehe oben) neben der Bande bei ca. 60kDa (rekombinante HP GGT) noch viele andere Proteinbanden in den Fraktionen mit GGT-Enzymaktivität zeigte, wurden die Fraktionen Nummer 19 und 20 vereinigt und unter Verwendung einer BlueGel-Affinitätschromatographiesäule (siehe 3.16.2.4.) weiter aufgereinigt. Die erhaltenen Fraktionen wurden erneut per SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung der Proteine im Gel analysiert (siehe Abb. 24C). Aus dem gefärbten Gel ist zunächst ein deutlicher Reinigungseffekt der Nickelchelate-Fraktionen durch die verwendete BlueGel-Säule zu erkennen. Die Eluate 19 und 20 der Nickelchelate-Säule enthielten vor Auftrag auf die BlueGel-Säule noch mehr als 15 Proteine unterschiedlicher Größe (siehe Abb. 24C). Nach Aufreinigung über die BlueGel-Säule hatte sich die Zahl der Proteinbanden in den erhaltenen Eluaten auf drei mit einer Größe von etwa 60, 40 und 20kDa reduziert. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die GGT aus *H. pylori* in einer „Proform“ mit einer Größe von etwa 60kDa synthetisiert und dann autokatalytisch in zwei Untereinheiten von etwa 38 und 22kDa gespalten wird (Chevalier et al 1999). Das Ergebnis der hier durchgeführten Aufreinigung der rekombinanten HP GGT lässt daher darauf schließen, dass dieses Protein auch im Bakterium *E. coli* aus einem Vorläuferprotein in die beiden Untereinheiten prozessiert wird. Um zu bestätigen, dass die drei bei der SDS-PAGE in den Eluaten detektierten Proteine der rekombinanten HP GGT entsprachen, wurden die eluierten Fraktionen der BlueGel-Säule auf vorhandene enzymatische GGT-Aktivität getestet (Abb. 24E). Aus dem Ergebnis des GGT-Tests ist zu erkennen, dass der Durchfluss (1) der Säule im Unterschied zum Probenauftrag praktisch keine GGT-Aktivität enthielt. Dies deutet darauf hin, dass praktisch das gesamte rekombinante GGT Protein des Auftrags an die Matrix der verwendeten Chromatographiesäule gebunden hatte. Die Eluate der Säule (9-19) zeigten dagegen hohe GGT-Aktivität. Der Nachweis rekombinanter HP GGT in den Eluaten der BlueGel-Chromatographiesäule erfolgte zusätzlich zum GGT-Test durch Western-Blot der Fraktionen und Inkubation mit Antikörpern, die gegen das der rekombinanten GGT angefügte HisTaq (Abb. 24F, Anti-Penta His) bzw. gegen die große Untereinheit der HP GGT (Abb. 24F, Anti-GGT) selbst gerichtet waren. Da der Anti-Penta His Antikörper das C-terminale

HisTaq der rekombinanten HP GGT detektierte, zeigten sich im Western-Blot bei Verwendung dieses Antikörpers bei den Eluaten zwei Banden im Bereich der Proform der GGT (im Bereich von 60kDa) und im Bereich der kleinen GGT-Untereinheit (im Bereich von 22kDa), welche das C-terminale HisTaq trug. Der Anti-HP GGT Antikörper, der gegen die große Untereinheit des GGT Proteins gerichtet war, detektierte - wie zu erwarten war - die Proform der GGT (bestehend aus großer und kleiner GGT-Untereinheit) und die große Untereinheit der HP GGT. Diese Ergebnisse zeigten, dass es sich bei dem aufgereinigtem Protein um die rekombinant exprimierte GGT aus *H. pylori* handelte.



**Abb. 24 A-C:** Aufreinigung der HP GGT als rekombinantes Protein aus *E. coli*.



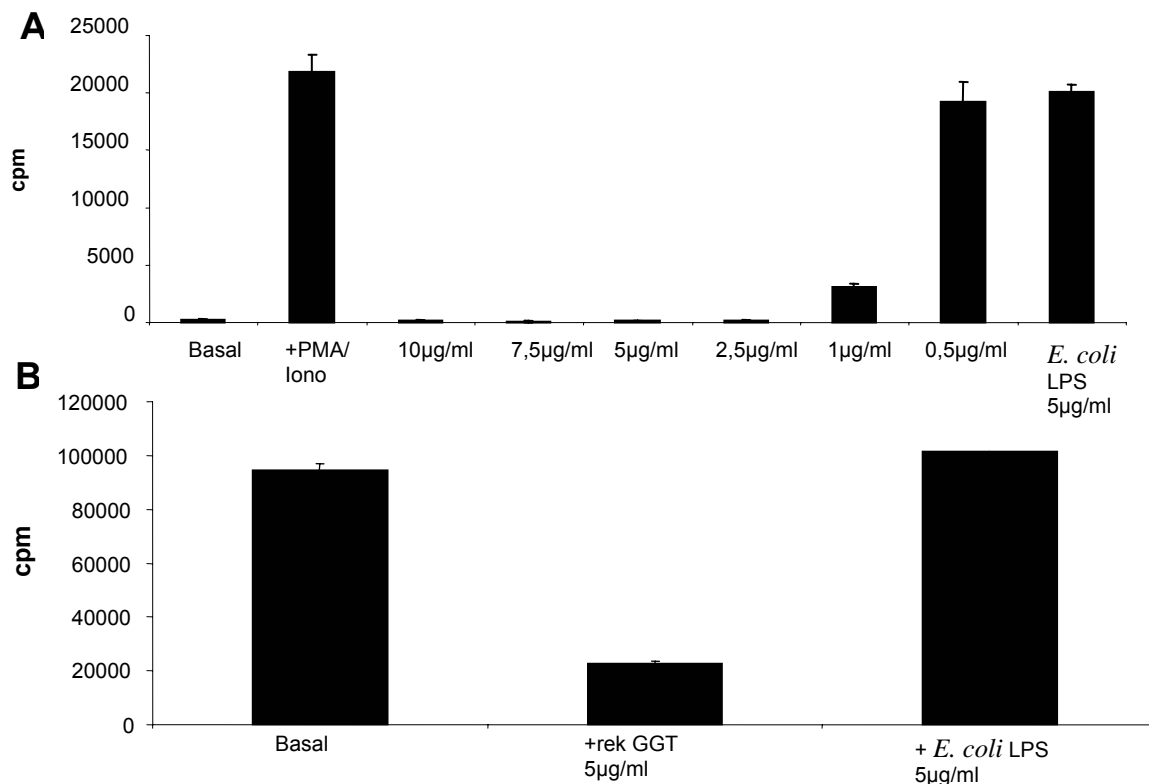
**Abb. 24: Rekombinante Expression der HP GGT in *E. coli*.** A, Coomassie-Blau-Proteinfärbung von 10% SDS-PAGE der *E. coli* Expressionskulturen 1-4h nach IPTG-Zugabe; B und C, SDS-PAGE und Silberfärbung der Proteine aus Fraktionen der Nickelchelate-/HisTrap- (B) und BlueGel (C)-Affinitätschromatographie; D und E, GGT-Enzymtests der Fraktionen aus Nickelchelate- (D) und BlueGel (E)-Chromatographie (Veränderung der Absorption bei 405nm pro min); F, Western-Blot von BlueGel-Chromatographieeluat mit Anti-HP GGT- und Anti-Penta His Antikörper. \*\*\*, Proform der HP GGT; \*\*, große Untereinheit der HP GGT; \*, kleine Untereinheit der HP GGT; M, Größenmarker (A, C: SeeBlue Plus 2 (Fa. Invitrogen); B: Benchmark Proteinladder (Fa. Invitrogen); A, Säulenauftrag; FT, Durchfluss der Säule.



### c) Rekombinante HP GGT und Lymphozytenproliferation

Die gemäß der Silberfärbung des Proteingels (Abb. 24C) ohne kontaminierende Proteine aufgereinigte rekombinante HP GGT wurde im nächsten Schritt auf proliferationshemmende Eigenschaften getestet. Dazu wurden humane PBMC mit PMA und Ionomycin stimuliert und mit verschiedenen Konzentrationen des rekombinanten Proteins inkubiert. Die Bestimmung der Zellproliferation erfolgte per Tritium-Inkorporationsassay. Wie aus der Abb. 25A hervorgeht, zeigte die rekombinante HP GGT in Konzentrationen bis 1 µg/ml einen deutlichen proliferationshemmenden Effekt gegenüber den verwendeten PBMC. Auch die Proliferation von Jurkat T-Zellen wurde bei Inkubation mit der rekombinanten HP GGT inhibiert (siehe Abb. 25B). Dagegen bewirkte eine Behandlung der Zellen mit LPS aus *E. coli* keine Inhibition der Zellproliferation.

Die Tatsache, dass auch eine als rekombinantes Protein in *E. coli* exprimierte HP GGT die Proliferation von Lymphozyten inhibierte, war ein weiterer deutlicher Hinweis darauf, dass dieses Protein für den proliferationshemmenden Effekt von *H. pylori* gegenüber diesen Zellen verantwortlich war.



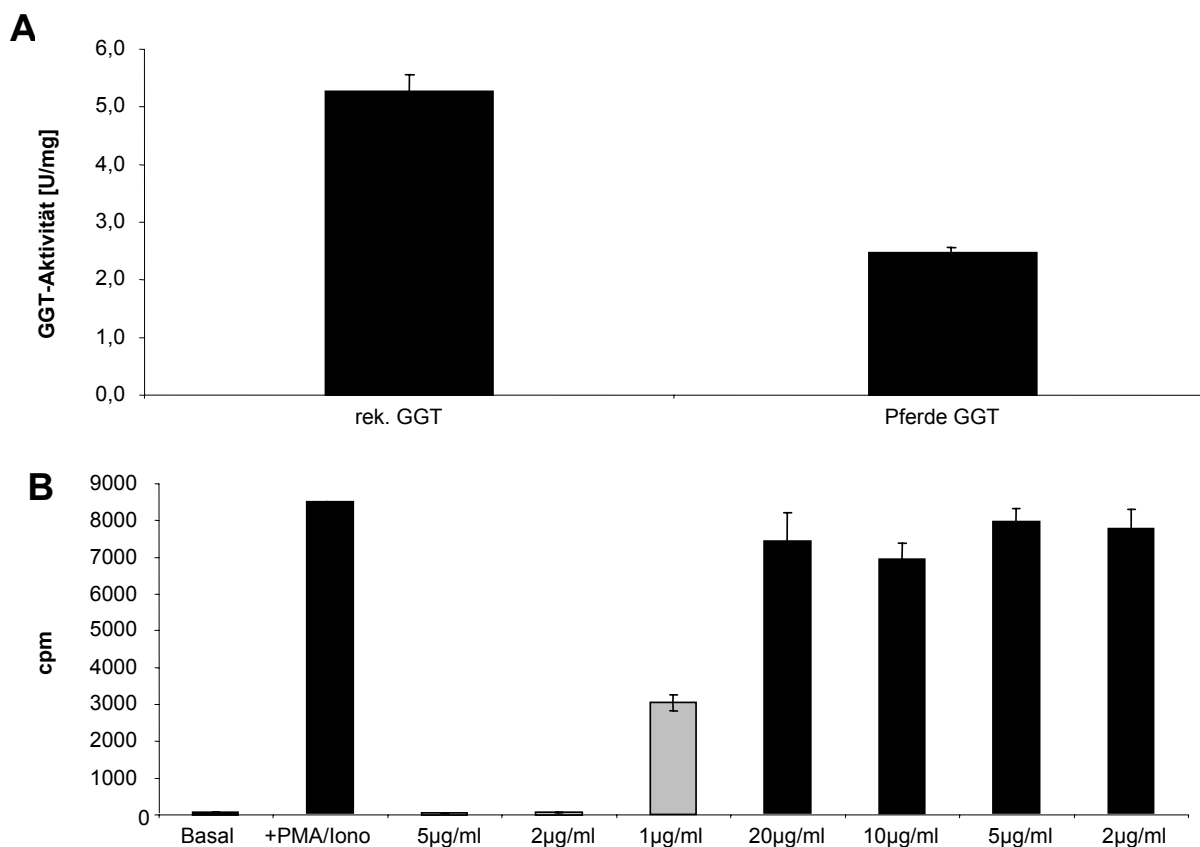
**Abb. 25: Einfluss der rekombinanten HP GGT auf T-Zell-Proliferation.** Die Diagramme zeigen die Proliferationsrate humaner PBMC (A) und Jurkat T-Zellen (B) nach Inkubation mit rekombinanter HP GGT und *E. coli* LPS für 48h. Basal, unbehandelte Kontrolle; PMA/Iono., stimulierte Kontrolle; cpm, counts per minute.

#### d) Keine Proliferationshemmung durch Pferde GGT

Das Enzym  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase wird von vielen Bakterien-, Pflanzen- und Tierarten gebildet (Hanigan et al 1998). Es wurde nun untersucht, ob auch andere Spezies des Enzyms neben der HP GGT einen inhibierenden Effekt auf die Proliferation von Lymphozyten zeigten. Dazu wurde eine kommerziell erhältliche GGT aus Pferdeniere eingesetzt. Aus einem durchgeführten GGT-Enzymtest ging hervor, dass die spezifische Aktivität der GGT aus Pferdeniere etwa halb so hoch war wie die der rekombinanten HP GGT (Abb. 26A).

Im Proliferationsassay mit humanen PBMC zeigte die GGT aus Pferdeniere auch in 10fach höheren Konzentrationen (20 $\mu$ g/ml) als die rekombinante HP GGT keinen Hemmeffekt auf die verwendeten Zellen (Abb. 26B).

Dieses Ergebnis zeigt, dass der proliferationshemmende Effekt der HP GGT gegenüber Lymphozyten möglicherweise ein *H. pylori* spezifischer Effekt ist, der eine Anpassung an den Wirtsorganismus darstellt.



**Abb. 26: Katalytische Aktivität und Einfluss auf Lymphozytenproliferation bei HP GGT und Pferde GGT.** Das Diagramm A zeigt das Ergebnis der Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität (in U/mg) der rekombinanten HP GGT und der GGT aus Pferdeniere per GGT-Enzymtest. In B ist das Ausmaß der PBMC-Proliferation nach Behandlung mit rekombinanter HP GGT (graue Balken) sowie GGT aus Pferdeniere (schwarze Balken) nach 48h dargestellt. Basal, unbehandelte Kontrolle; PMA/Iono., stimulierte Kontrolle; cpm, counts per minute.

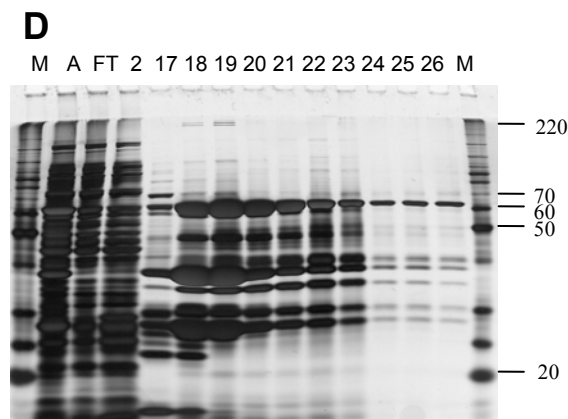
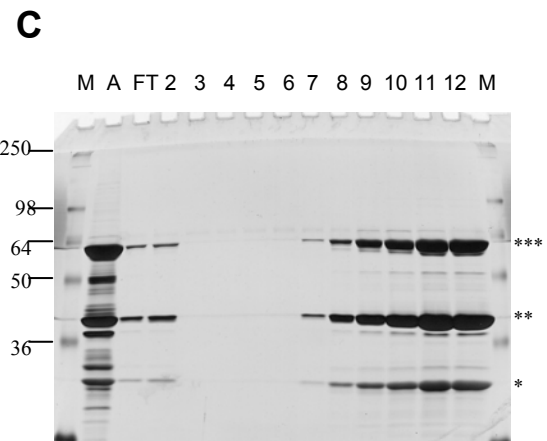
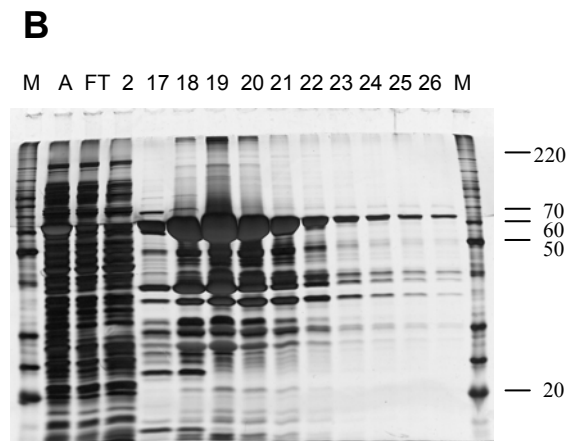
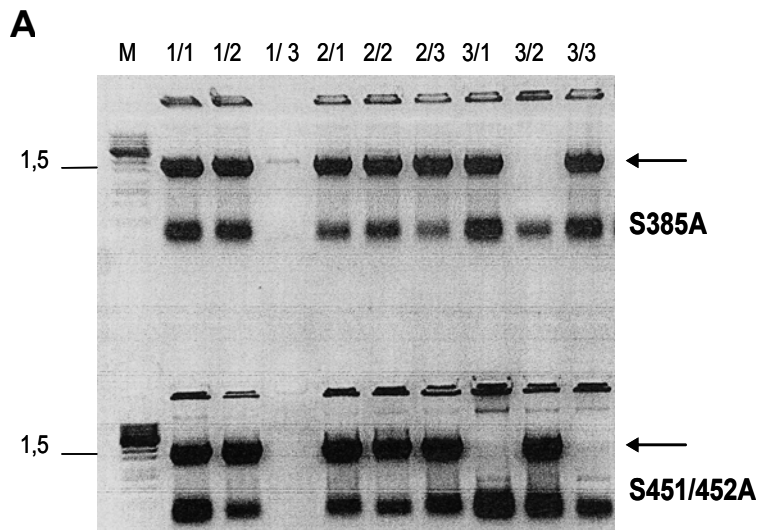
#### 4.7.1. Inhibition der GGT-Aktivität hebt die Proliferationshemmung auf

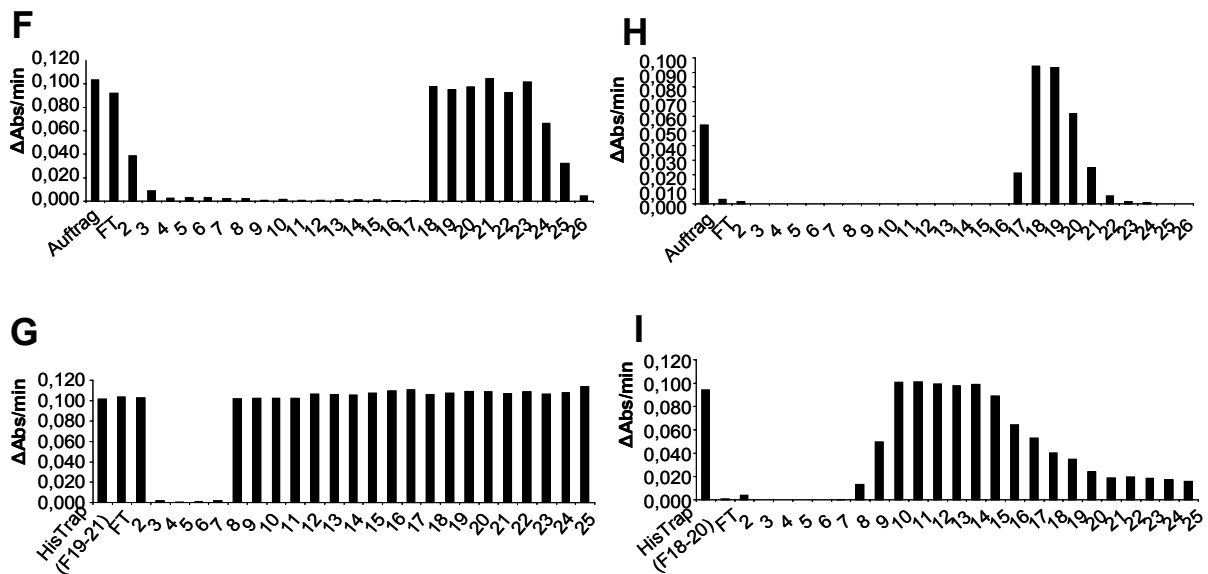
Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde die Frage bearbeitet, ob die proliferationshemmende Eigenschaft der HP GGT von der katalytischen Aktivität dieses Enzyms abhängig ist.

##### a) Ortsgerichtete Mutagenese der rekombinanten HP GGT

Von GGT Proteinen aus anderen Spezies wie z.B. von der humanen GGT war bereits bekannt, dass die enzymatische Aktivität dieses Proteins von der Anwesenheit einzelner Aminosäurereste im aktiven Zentrum des Enzyms (z.B. Ser 451, Ser 452) abhängig ist (Ikeda et al 1995). Um den Einfluss einer Mutation dieser Aminosäurereste im aktiven Zentrum der HP GGT auf deren Aktivität zu untersuchen, wurden zwei Mutanten der rekombinanten HP GGT mit Hilfe von ortsgerechter Mutagenese („Site-directed Mutagenesis“) hergestellt. Die dazu nötigen Arbeiten wurden von Dr. Gerhard am niederländischen Institut für Entwicklungsbiologie in Utrecht durchgeführt. Bei der ersten Mutante S385A wurde die Aminosäure Serin in Position Nummer 385 der Aminosäuresequenz der HP GGT gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht. Bei der zweiten Mutante S451/452A erfolgte der Aminosäureaustausch von Serin zu Alanin an Position Nummer 451 und 452. Die aus der ortsgerechten Mutagenese erhaltenen mutierten Plasmid-DNA-Moleküle wurden dann von mir in den *E. coli* Stamm M15 transformiert und als rekombinante Proteine exprimiert (siehe 3.22.2.). Der Erfolg der Transformation der Plasmid-DNA-Moleküle in den *E. coli* Stamm M15 wurde mit Hilfe einer PCR für den pQE-Tri-Vektor überprüft. Die Abb. 27A zeigt das Ergebnis der Kolonie-PCR. Es ist zu erkennen, dass bei der Mutante S385A alle Klone bis auf 1/3 und 3/2 die Plasmid-DNA aufgenommen hatten. Bei der Mutante S451/452A war die Transformation mit Ausnahme der Klone 1/3, 3/1 und 3/3 ebenfalls erfolgreich (Abb. 27A unten). Die Expression und Aufreinigung der mutierten HP GGT Proteine S385A und S451/452A erfolgte dann analog zur Aufreinigung der nicht mutierten rekombinanten HP GGT (siehe oben). Mit Hilfe von SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung der Proteingele wurde die Zusammensetzung der Fraktionen aus den einzelnen Aufreinigungsschritten der rekombinanten HP GGT Mutanten untersucht (siehe Abb. 27B bis E). Nach der Aufreinigung mittels Nickelchelate-Affinitätschromatographie wurden die Fraktionen mit GGT-Enzymaktivität vereinigt und wie bei der rekombinanten HP GGT per BlueGel-Affinitätschromatographie weiter aufgereinigt (siehe oben 4.7.b). Die erhaltenen Chromatographiefraktionen wurden mit Hilfe des GGT-Tests auf vorhandene Enzymaktivität untersucht (siehe Abb. 27 F bis I). Am Ende der Aufreinigung wurden die Fraktionen der

mutierten HP GGT Proteine, welche keine Kontaminationen mit anderen Proteinen enthielten, dialysiert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.





**Abb. 27: Rekombinante Expression von Mutanten der HP GGT.** A, Screening-PCR (pQE-Tri-Primer, siehe 3.20.2., Tabelle 6) von *E. coli* XL1-Klonen nach Transformation mit Expressionskonstrukten der Mutanten S385A und S451/452A (Pfeil markiert korrekte Größe des PCR-Produkts); B-E, 10%-SDS-PAGE und Silberfärbung der Proteine in Fraktionen von Nickelchelate/HisTrap- (B, D) und BlueGel-(C, E) Affinitätschromatographie der GGT Mutanten S385A (B, C) und S451/452A (D, E); F-I, GGT-Enzymtest (Änderung der Absorption bei 405nm pro min) der Nickelchelate-(F, G) und BlueGel-(H, I) Chromatographiefraktionen von S385A (F, H) und S451/452A (G, I). M, Größenmarker (A, DNA-Leiter in kb; B u. D, Proteinmarker SeeBlue Plus2 (Fa. Invitrogen); C u. E, Proteinmarker Benchmark Proteinladder (Fa. Invitrogen); A, Säulenauftrag; FT, Durchfluss der Säule.

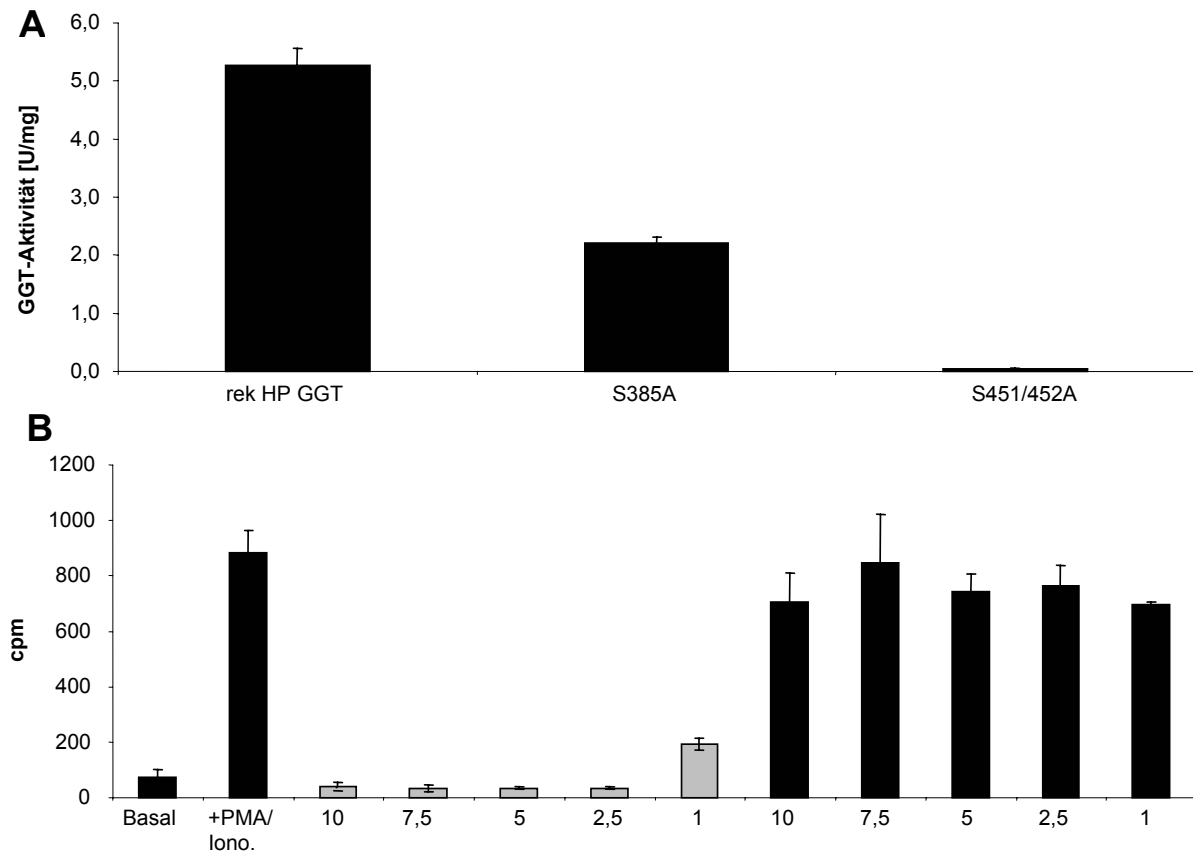
### b) HP GGT Mutante S451/452A ist enzymatisch inaktiv und zeigt keinen proliferationshemmenden Effekt

Mit Hilfe des GGT-Tests wurde die spezifische Aktivität der aufgereinigten HP GGT Mutanten S385A und S451/452A bestimmt (siehe Abb. 28A). Die spezifische Aktivität der Mutante S385A war dabei etwa halb so hoch wie die der nicht mutierten rekombinanten HP GGT (rek. GGT). Die Mutante S451/452A zeigte im Gegensatz dazu praktisch keine katalytische Aktivität. Eine Mutation der Serinreste 451 und 452 im aktiven Zentrum der GGT von *H. pylori* führt also im Gegensatz zur Mutation des Serinrests 385 zur einer deutlichen Reduktion der katalytischen Aktivität des Enzyms.

Dann wurde der Einfluss der Mutagenese der rekombinanten HP GGT auf deren proliferationshemmende Eigenschaft auf Lymphozyten untersucht. Das Ergebnis des dazu durchgeführten Tritium-Thymidin-Inkorporations-Tests zeigt, dass die GGT Mutante S385A eine konzentrationsabhängige Inhibition der PBMC-Proliferation bewirkte (Abb. 28B, graue Balken), welche in ihrem Ausmaß etwa dem der unveränderten rekombinanten HP GGT

(siehe Abb. 26B) entsprach. Dagegen war bei der GGT Mutante S451/452A keine Inhibition der Zellproliferation zu beobachten (Abb. 28B, schwarze Balken).

Dieses Ergebnis legt nahe, dass die enzymatische Aktivität der GGT aus *H. pylori* bei der Ausübung des proliferationshemmenden Effekts des Enzyms gegenüber Lymphozyten eine entscheidende Rolle spielt.

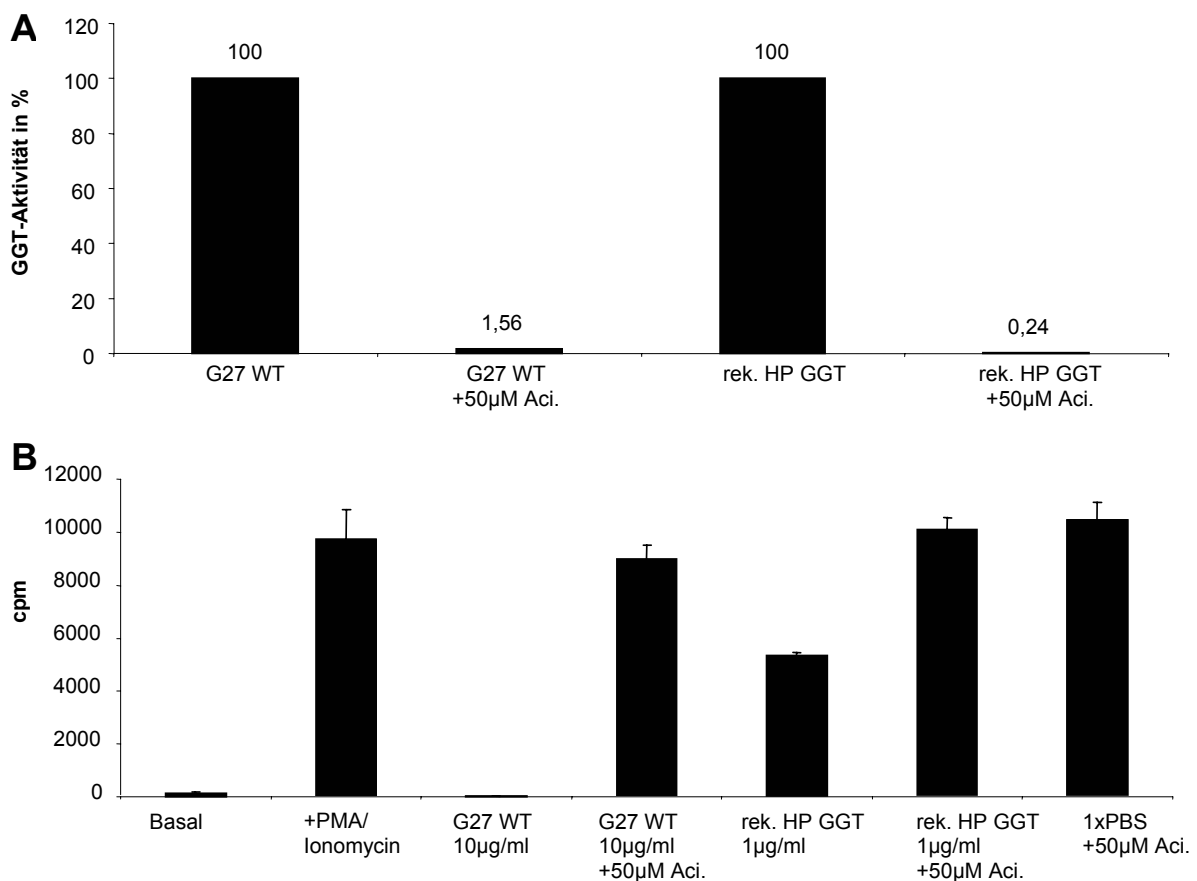


**Abb. 28: Katalytische Aktivität und Einfluss auf die Proliferation von Lymphozyten durch HP GGT Mutanten S385A und S451/452A.** Das Diagramm A zeigt die spezifische Enzymaktivität der GGT Mutanten S385A und S451/452A im Vergleich zur nicht mutierten rekombinanten HP GGT in Units pro Milligramm Protein. In Diagramm B ist das Ausmaß der Proliferation humaner PBMC bei Inkubation mit den GGT Mutanten S385A (graue Balken) und S451/452A (schwarze Balken) für 48h dargestellt. Basal, unbehandelte Kontrolle; PMA/Iono., stimulierte Kontrolle; cpm, counts per minute.

### c) GGT Inhibitor Acivicin hebt proliferationshemmenden Effekt der *H. pylori* GGT auf

Um weitere Informationen darüber zu bekommen, in wie weit die Inhibition der Zellproliferation durch die GGT aus *Helicobacter pylori* von deren enzymatischer Aktivität abhängig war, wurden Überstände des *Helicobacter* Stammes G27 WT und die rekombinante HP GGT mit dem irreversiblen GGT Inhibitor Acivicin vorbehandelt (siehe 3.3.1.). Im Anschluss wurden die vorbehandelten Proben auf vorhandene GGT-Aktivität mit Hilfe des GGT-Tests untersucht. Die Abb. 29A zeigt, dass die enzymatische Aktivität der GGT sowohl

im *Helicobacter* Überstand als auch bei der rekombinanten HP GGT nach Vorinkubation mit 50 $\mu$ M Acivicin im Vergleich zu nicht Acivicin-behandelten Proben vollständig antagonisiert war. Die vorbehandelten Proben wurden dann auf ihre Fähigkeit, die Proliferation von Lymphozyten zu hemmen, untersucht. Das Ergebnis des Tritium-Thymidin-Tests zeigte, dass die unbehandelten Proben (G27 WT; rek GGT) zu einer deutlichen Inhibition der Proliferation der verwendeten Zellen führten (Abb. 29B). Bei den mit Acivicin vorbehandelten Proben war dieser Effekt jedoch nicht mehr vorhanden. Das Acivicin selber hatte dabei keinen inhibierenden Einfluss auf die Zellproliferation (Abb. 29B). Die beschriebenen Ergebnisse bestätigen die aufgestellte Behauptung, dass der proliferationshemmende Effekt von *H. pylori* Überständen und der HP GGT selbst gegenüber Lymphozyten entscheidend von der enzymatischen Aktivität dieses Enzyms abhängig ist.



**Abb. 29: Inhibition der HP GGT durch Acivicin.** *H. pylori* G27 WT Kulturüberstand und rekombinante HP GGT wurden für 2h bei 37°C mit 50 $\mu$ M Acivicin (Aci.) vorbehandelt. Die Diagramme zeigen die Ergebnisse von GGT-Enzymtests (A) und Proliferationstests (B) mit den vorbehandelten Proben. Für den Proliferationstest wurde das Ausmaß der  $^3$ H-Thymidin-Inkorporation humaner PBMC nach Inkubation mit den vorbehandelten Proben für 48h bestimmt. WT, Wildtyp; Basal, unbehandelte Kontrolle; PMA/Iono, stimulierte Kontrolle; cpm, counts per minute.

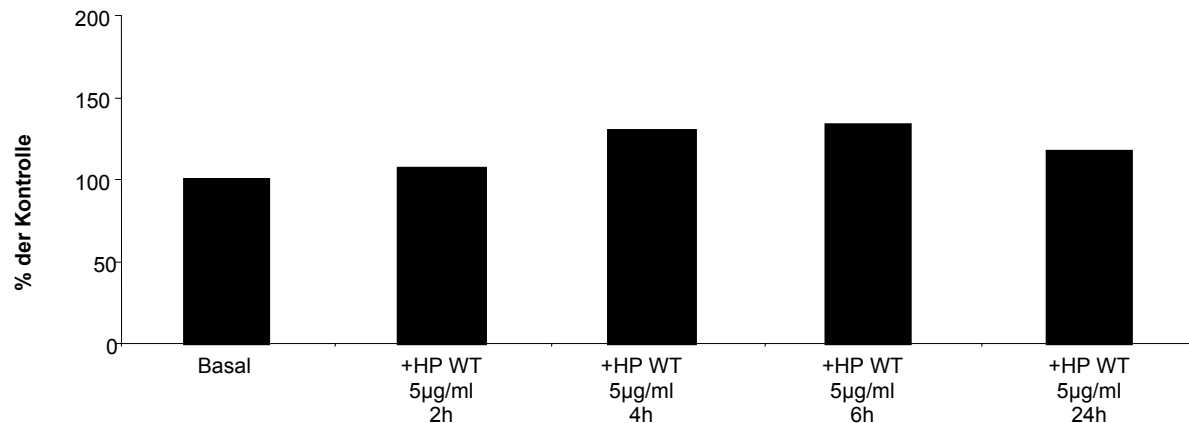
## **4.8. Vermittlung des inhibitorischen Effekts der *H. pylori* GGT auf die T-Zell-Proliferation**

In einem nächsten Arbeitsschritt wurde untersucht, wie es zur Inhibition der Proliferation von Lymphozyten durch die GGT aus *H. pylori* kam und welche Verbindungen im Zellkulturmedium für die Auslösung und Vermittlung dieses Hemmeffekts verantwortlich waren.

### **4.8.1. Einfluss der *H. pylori* GGT auf intrazelluläre Glutathion-Spiegel in T-Zellen**

Da das Tripeptid Glutathion ein wichtiges physiologisches Substrat der humanen GGT darstellt (Hanes et al 1950), wurde zunächst untersucht, ob es durch die GGT aus *H. pylori* zu einer Reduktion der intrazellulären Glutathionspiegel in T-Zellen kommt. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Inhibition der T-Zell-Proliferation durch die HP GGT, denn es wurde beschrieben, dass eine Abnahme des intrazellulären Glutathionspiegels in T-Zellen eine reduzierte Proliferationsrate der Zellen zur Folge hat (Lombardi et al 2004). EL-4 T-Zellen wurden mit Überständen von *Helicobacter* WT Bakterien inkubiert. Nach 24h wurde der intrazelluläre Gehalt an Glutathion in den verschiedenen Proben bestimmt (siehe 3.13.). Das Ergebnis eines solchen Glutathion-Tests zeigt keine Reduktion sondern eine Steigerung der intrazellulären Glutathion-Spiegel bei Inkubation der Zellen mit *H. pylori* Wildtyp Überständen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 30). Der enzymatische Abbau von Glutathion und eine dadurch mögliche Reduktion der intrazellulären Glutathionspiegel in T-Zellen ist somit nicht die Ursache für die Inhibition der T-Zell-Proliferation durch die GGT von *H. pylori*.

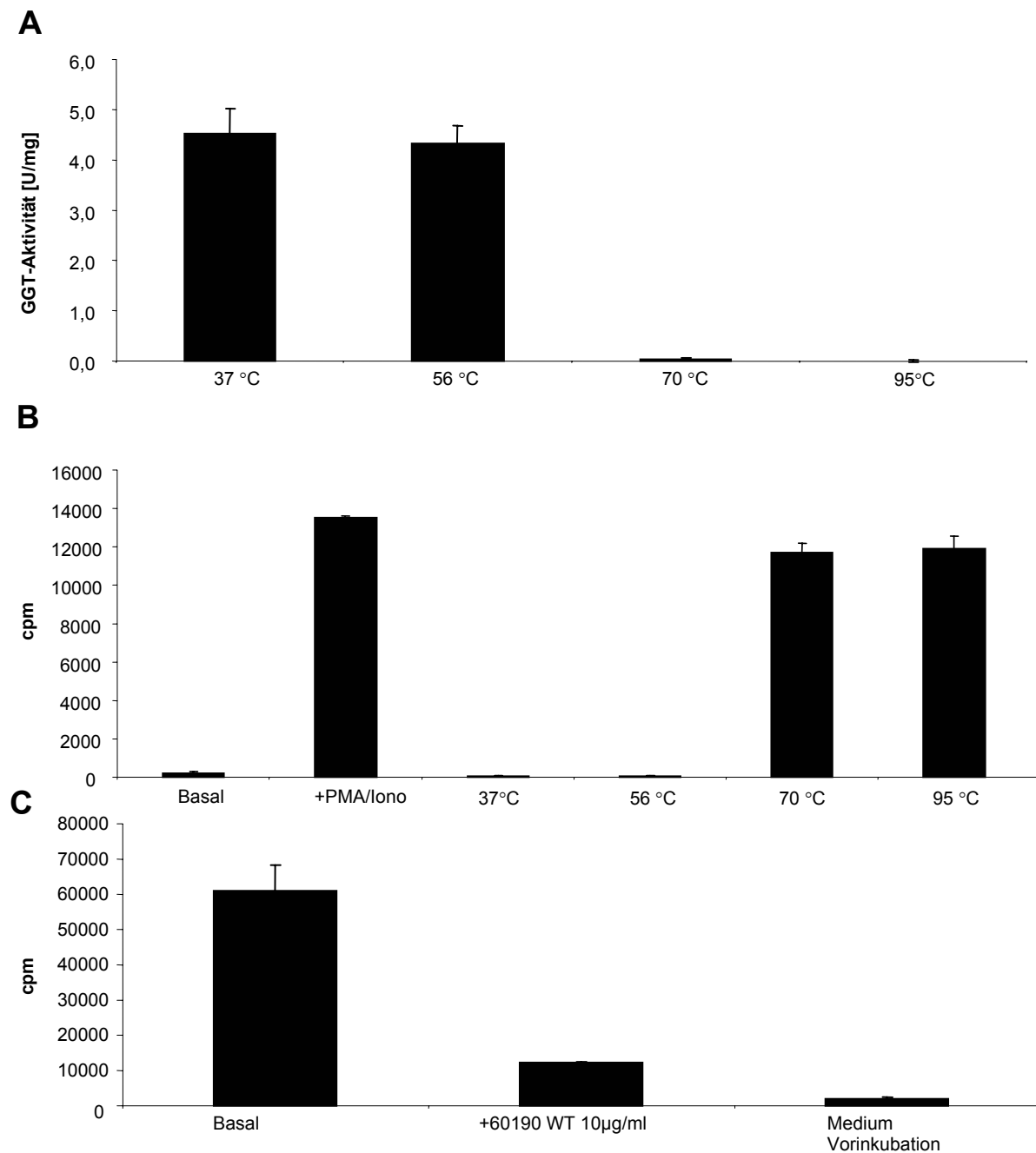




**Abb. 30: Einfluss der HP GGT auf intrazelluläre GSH-Konzentration in T-Zellen.** Das Diagramm zeigt die intrazelluläre GSH-Konzentration von EL-4 Zellen nach Inkubation mit Kulturüberstand von *H. pylori* G27 WT für die angegebenen Zeiträume in Prozent der unbehandelten Kontrolle (Basal = 100%). WT, Wildtyp.

#### **4.8.2. Vorinkubation von Zellkulturmedium mit *H. pylori* GGT hemmt T-Zell-Proliferation**

Um festzustellen, welche Verbindungen im Zellkulturmedium für den Hemmeffekt der HP GGT auf die Vermehrung von T-Zellen außer Glutathion verantwortlich sein könnten, wurde Zellkulturmedium mit Überständen von *Helicobacter* Wildtypstämmen vorbehandelt (siehe 3.3.). Die HP GGT wurde im Anschluss daran durch Inkubation bei 95°C für 10 min hitzeinaktiviert, um einen direkten Einfluss des Enzyms auf die Vermehrung der T-Zellen im folgenden Proliferationstest auszuschließen. Wie aus den Abbildungen 31 A und B hervorgeht, war die HP GGT nach zehnminütiger Inkubation bei 70 bzw. 95°C weder enzymatisch aktiv noch zeigte das Protein den beschriebenen proliferationshemmenden Effekt auf T-Lymphozyten. Eine Inkubation des Enzyms für den gleichen Zeitraum bei 37 bzw. 56°C hatte dagegen keinen Effekt auf diese Eigenschaften der rekombinanten HP GGT. Eine Behandlung von T-Zell-Kulturen mit dem in oben beschriebener Weise vorinkubierten Medium bewirkte eine Inhibition der Zellproliferation, die stärker ausgeprägt war als nach Inkubation mit *Helicobacter* Wildtyp Überständen (Abb. 31C). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass es durch die katalytische Aktivität der HP GGT zu Veränderungen der Zusammensetzung des Zellkulturmediums kam, die schließlich eine Reduktion der T-Zell-Proliferation verursachten.



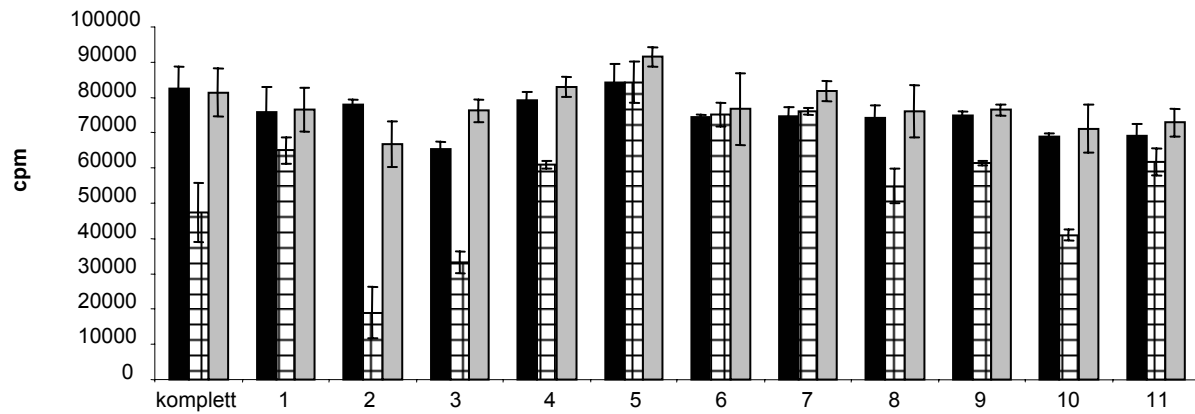
**Abb. 31: Vorbehandlung von Kulturmedium mit *H. pylori* WT Kulturüberstand.** Die Diagramme zeigen die spezifische Enzymaktivität rekombinanter HP GGT nach 10 min Inkubation bei den angegebenen Temperaturen (A) sowie das Ausmaß der Proliferation humaner PBMC, die mit der hitzebehandelten GGT für 48h inkubiert wurden (B). Darüber hinaus ist die Proliferationsrate von EL-4 Zellen nach 48stündiger Inkubation mit *H. pylori* Kulturüberstand bzw. mit Kulturmedium, welches für 24h mit diesem Kulturüberstand (Endkonzentration 10µg/ml) vorbehandelt wurde, dargestellt (C). WT, Wildtyp; Basal, unbehandelte Kontrolle; PMA/Iono., stimulierte Kontrolle; cpm, counts per minute.

### 4.8.3. Proliferationshemmender Effekt der *H. pylori* GGT ist abhängig von L-Glutamin

Nun wurde analysiert, welche Komponenten des verwendeten Zellkulturmediums für die Vermittlung des inhibitorischen Effekts der HP GGT verantwortlich waren bzw. für eine Hemmung der Proliferation durch dieses Enzym benötigt wurden. Dazu wurden verschiedene Gemische aus Aminosäuren, welche im Zellkulturmedium DMEM enthalten sind, für 18h mit Kulturüberständen aus *Helicobacter* WT und GGT defizienten Stämmen vorinkubiert (siehe 3.3.). Die Tabelle 10 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Aminosäuregemische. Nach Hitzeinaktivierung der GGT und Verdünnung (1:5) der Aminosäuregemische in Zellkulturmedium (siehe 3.3.) wurden EL-4 T-Zellen für 24h mit diesen Proben inkubiert. Das Ausmaß der Proliferation der verwendeten Zellen wurde durch Anwendung des Tritium-Thymidin-Tests bestimmt. Die Abb. 32 zeigt, dass eine Vorinkubation des kompletten Aminosäuregemisches sowie der Gemische 2, 3, 4, 8, 9 und 10 mit Überständen des *Helicobacter* WT Stammes zu einer mehr oder weniger starken Inhibition der Zellproliferation führte. Wie aus Tabelle 10 hervorgeht, enthielten alle genannten Aminosäuregemische die Aminosäure L-Glutamin. Eine Vorinkubation der Gemische 5, 6 und 7 bewirkte jedoch keine Hemmung der Proliferation. Keines dieser drei Gemische enthielt die Aminosäure L-Glutamin. Darüber hinaus zeigte sich, dass eine Vorinkubation der Aminosäuregemische mit Überständen der GGT defizienten *Helicobacter* Bakterien (G27  $\Delta$ GGT) in keinem Fall zu einer Hemmung der Zellproliferation führte (Abb. 32). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Aminosäure L-Glutamin eine wichtige Rolle bei der Vermittlung des proliferationshemmenden Effekts der HP GGT gegenüber T-Zellen spielt.

AS-Mix Komplett	AS-Mix 1	AS-Mix 2	AS-Mix 3	AS-Mix 4	AS-Mix 5	AS-Mix 6	AS-Mix 7	AS-Mix 8	AS-Mix 9	AS-Mix 10	AS-Mix 11
Arg, Cys, Gly, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Val	Arg, Cys, Gly, Ile, Lys, Ser, Thr, Trp, Val	Gln, His, Leu, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Val	Arg, Cys, Gly, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe,	Gln	His	Leu	Phe	Gln, His	Gln, Met	Gln, Leu	Gln, Phe

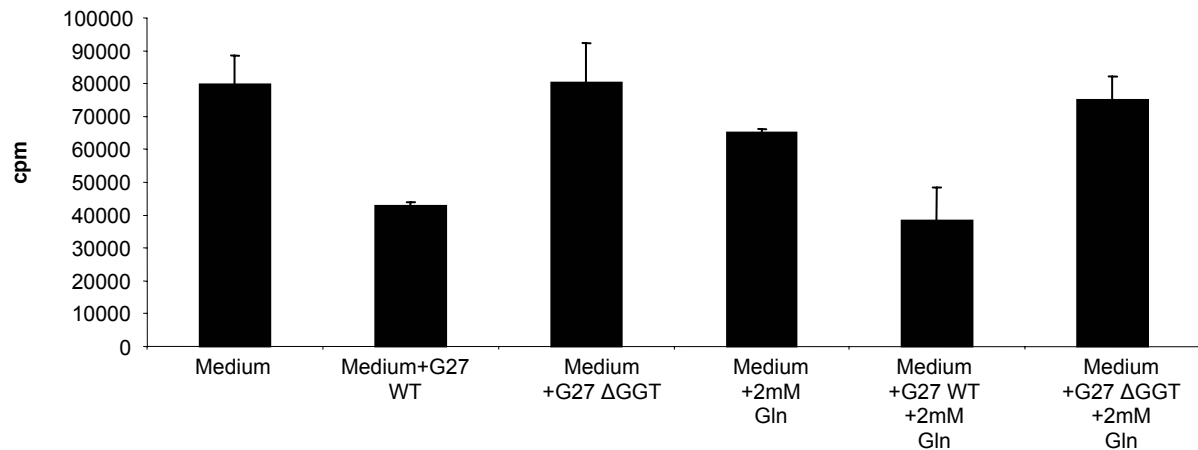
**Tabelle 10:** Zusammensetzung der verwendeten Aminosäuregemische



**Abb. 32: Vorbehandlung von Aminosäuregemische mit *H. pylori* WT Kulturüberstand.** Das Diagramm zeigt die Proliferationsrate von EL-4 Zellen, die für 48h mit den Aminosäuregemischen (AS-Mixe) 1-11 (siehe Tabelle 10) behandelt wurden. Diese AS-Mixe wurden nicht behandelt (Basal, schwarze Balken) oder zuvor für 24h mit *H. pylori* G27 WT (karierte Balken) oder G27  $\Delta$ GGT Kulturüberstand (graue Balken) bei 37°C vorinkubiert (siehe 3.3.). Cpm, counts per minute.

### a) Depletion von L-Glutamin ist nicht der Grund für Hemmung der T-Zell-Proliferation durch *H. pylori* GGT

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass der proliferationshemmende Effekt der HP GGT allein durch eine enzymatische Depletion der Aminosäure L-Glutamin aus dem Medium hervorgerufen wurde, wurde einem kompletten Aminosäuregemisch nach beendeter Vorinkubation und Hitzeinaktivierung der HP GGT die Aminosäure L-Glutamin in einer Konzentration von 2mM zugesetzt, also der gleichen Konzentration, in der diese Aminosäure auch im Kulturmedium DMEM enthalten ist. Das Ergebnis des anschließenden Proliferationstests zeigte, dass die nachträgliche Zugabe von L-Glutamin nicht zu einer Aufhebung des proliferationshemmenden Effektes führte. Eine Zugabe von L-Glutamin in der gleichen Menge zu unbehandelten Zellen führte alleine zu einer geringfügigen Verminderung der Zellproliferation (Abb.33). Das bedeutet, dass die Inhibition der T-Zell-Proliferation durch die HP GGT nicht auf einer Depletion der Aminosäure L-Glutamin aus dem Medium beruht.

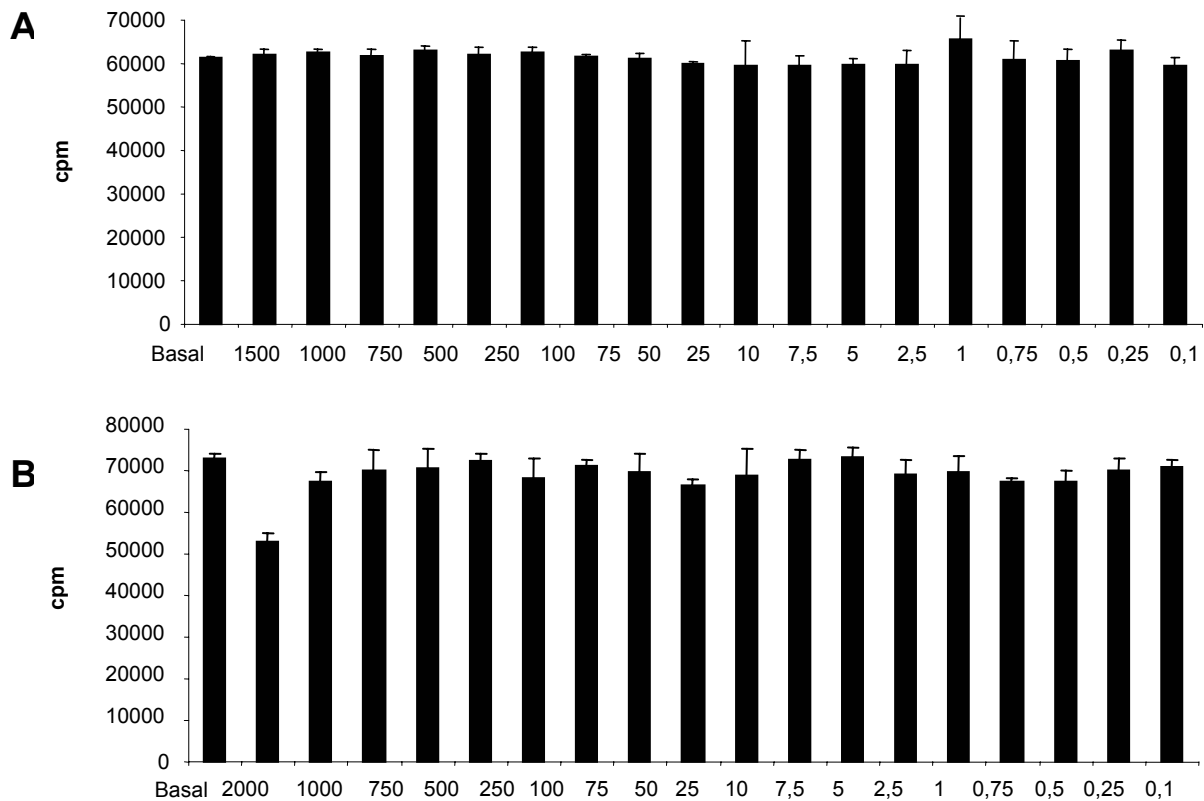


**Abb. 33: Effekt von Glutaminzugabe auf proliferationshemmenden Effekt von *H. pylori* Kulturüberstand.** Das Diagramm zeigt das Ausmaß der Proliferation von EL-4 T-Zellen nach Inkubation mit wie angegeben vorbehandeltem Kulturmedium (Endkonzentration der HP Überstände: 10µg/ml) für 48h. +2mM Gln, diesen Proben wurde nach Beendigung der Vorbehandlung 2mM L-Glutamin zugesetzt. WT, Wildtyp; Gln, L-Glutamin.

#### **b) Effekt von Produkten aus der Reaktion der *H. pylori* GGT mit L-Glutamin auf die T-Zell-Proliferation**

Aufgrund des bekannten Mechanismus der Transpeptidierungsreaktion der GGT (siehe 5.4.) sind mögliche Verbindungen, die im Verlaufe der Reaktion der HP GGT mit Glutamin entstanden sein könnten,  $\gamma$ -Glutamyl-Glutamin ( $\gamma$ -Glu-Gln) und L-Glutamat. Diese kommerziell erhältlichen Verbindungen wurden in Abwesenheit der HP GGT auf proliferationshemmende Eigenschaften getestet. Die Ergebnisse der durchgeführten Proliferationstests mit EL-4 Zellen zeigten weder für  $\gamma$ -Glu-Gln (Abb. 34A) noch für L-Glutamat (Abb. 34 B) eine konzentrationsabhängige Inhibition der Zellproliferation.

Es zeigt sich, dass die durch Transpeptidierungsreaktion der GGT mit L-Glutamin entstehenden Verbindungen  $\gamma$ -Glu-Gln und L-Glutamat nicht für die Reduktion der Wachstumsrate von Lymphozyten durch die HP GGT verantwortlich sind.



**Abb. 34: Effekt von  $\gamma$ -Glutamyl-Glutamin ( $\gamma$ -Glu-Gln) und L-Glutamat auf die Proliferation von T-Zellen.** A u. B, Proliferationsrate von EL-4 T-Zellen nach Behandlung mit angegebenen Konzentrationen (in  $\mu\text{g/ml}$ ) von  $\gamma$ -Glu-Gln (A) und L-Glutamat (B) für 48h. Basal, unbehandelte Kontrolle; PMA/Iono., stimulierte Kontrolle; cpm, counts per minute.

#### 4.9. *H. pylori* induziert Zellzyklusarrest in T-Lymphozyten

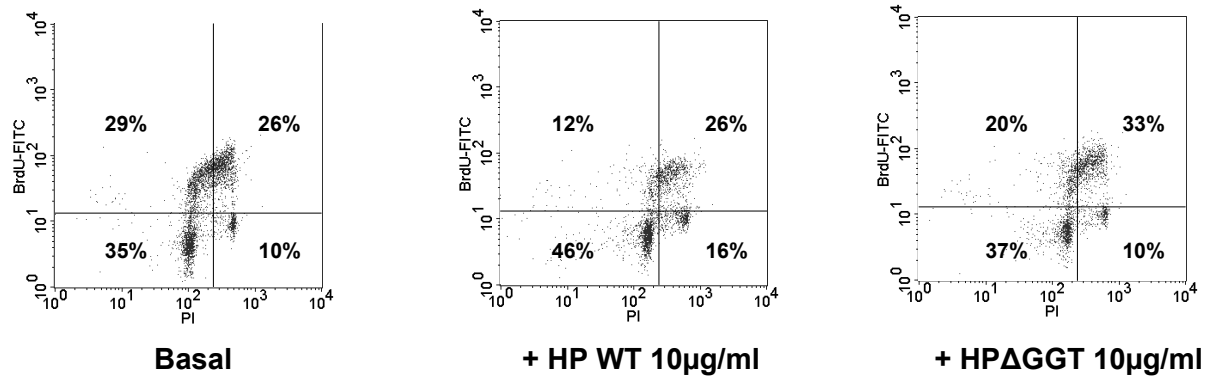
In einer aus Teilen dieser Doktorarbeit bestehenden Publikation konnte gezeigt werden, dass der Hemmeffekt von *H. pylori* Kulturüberständen gegenüber T-Zellen durch die Induktion eines Zellzyklusarrests in diesen Zellen charakterisiert war, bei dem es zu einer deutlich verminderten Bildung der zellzyklusregulierenden Proteine Cyclin A, D3, E1 und zu verstärkter Produktion des Cdk-Inhibitors p27Kip1 kam (siehe Abb. 17A und Gerhard et al 2005).

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Doktorarbeit wurde nun untersucht, inwieweit diese Induktion des Zellzyklusarrests von der Präsenz der GGT bei *Helicobacter pylori* abhängig war.

#### **4.9.1. Induktion von Zellzyklusarrest in T-Zellen durch *H. pylori* ist abhängig von GGT**

Zunächst wurde untersucht, ob der durch *H. pylori* in T-Zellen induzierte Zellzyklusarrest durch die GGT verursacht wurde. Jurkat T-Zellen wurden zunächst für 17h in Kulturmedium mit reduzierter Serumkonzentration (0,2%) inkubiert, um die Zellen im Zellzyklus zu synchronisieren. Dann wurde die Serumkonzentration im Medium wieder normalisiert (10%) und die Zellen wurden mit Überständen der *H. pylori* Stämme G27 WT und G27  $\Delta$ GGT für 24h inkubiert. Für die letzten 30 min wurde dem Medium 10 $\mu$ M BrdU zugesetzt, welches in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wurde. Die weitere Aufarbeitung und Analyse der Zellen per FACS-Messung erfolgte wie unter 3.15.4.2. beschrieben. Abbildung 35 zeigt das Ergebnis einer solchen Zellzyklusanalyse. Es ist zu erkennen, dass die Inkubation der Zellen mit Kulturüberstand der WT Bakterien, aber nicht der GGT defizienten Bakterien zu einer Erhöhung des Anteils der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase (46%) sowie zu einer Erniedrigung des Anteils in der S-Phase des Zellzyklus (12+26=38%) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führte (Basal: G<sub>1</sub> = 35%; S=29+26=55%). Die mit dem Überstand der GGT defizienten Bakterien behandelten Zellen zeigten im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderung des proliferierenden Anteils der Zellen, also des Anteils in der S-Phase des Zellzyklus (20+33=53%).

Zum einen bestätigt dieses Ergebnis die bereits publizierten Daten über die Induktion eines G<sub>1</sub>-Zellzyklusarrests durch *H. pylori* in T-Zellen (Gerhard et al 2005). Zum anderen zeigen diese Daten, dass dieser Zellzyklusarrest durch die GGT von *H. pylori* induziert wird.



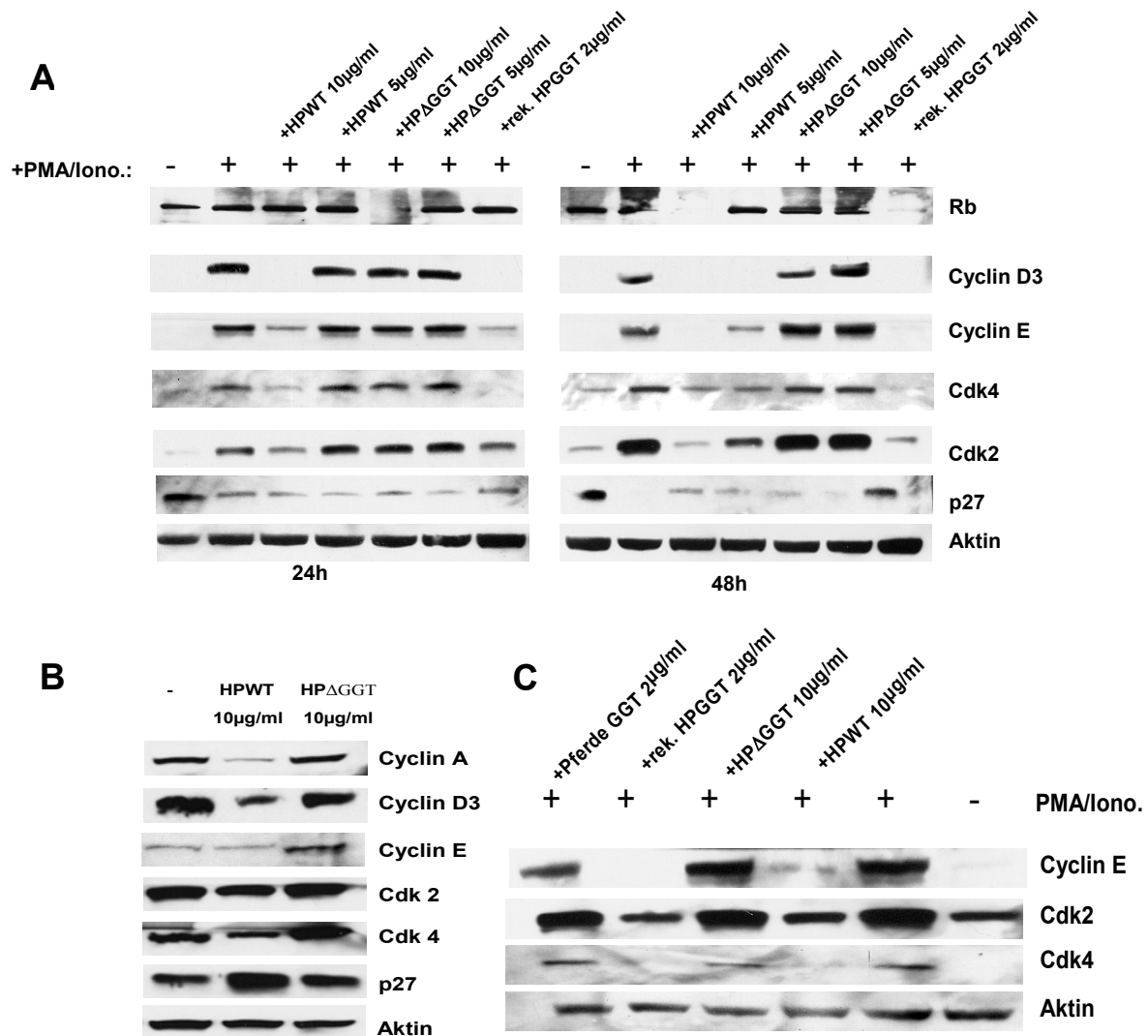
**Abb. 35: HP GGT induziert G<sub>1</sub>-Arrest in T-Zellen.** Die Abb. zeigt das Ergebnis von BrdU/PI-Zellzyklusanalysen unterschiedlich behandelter Jurkat T-Zellen nach 24h (Y-Achse: BrdU/FITC; X-Achse: PI;  $5 \times 10^6$  Zellen/Ansatz). Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen: unten links G<sub>1</sub>-, oben links frühe S-, oben rechts späte S-, unten rechts G<sub>2</sub>-Phase (siehe 3.15.4.1.). Von jeder Probe wurden 10000 Zellen per FACS-Analyse untersucht. PI, Propidiumjodid; BrdU, Bromdesoxyuridin; WT, Wildtyp.

#### 4.9.2. Effekt von *H. pylori* GGT auf Produktion zellzyklusregulatorischer Proteine

Im Folgenden wurde der Mechanismus der Induktion des Zellzyklusarrests durch die HP GGT genauer charakterisiert. Dazu wurde die Bildung von Proteinen mit entscheidender Bedeutung bei der Regulation des Zellzyklus in Abhängigkeit von der Inkubation mit der GGT aus *H. pylori* untersucht. Es wurden Western-Blot Experimente mit Lysaten aus unterschiedlich behandelten PBMC und Jurkat T-Zellen durchgeführt (Abb.36A, B). Die Ergebnisse der Versuche mit PBMC-Lysaten (Abb. 36A) zeigen, dass es durch Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin mit Ausnahme des Cdk-Inhibitors p27 zu einer deutlichen Steigerung der Expression der zellzyklusregulatorischen Proteine im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Basal) kam. Durch mitogene Stimulation der Zellen treten diese aus der G<sub>0</sub>-Phase in den Zellzyklus ein. Dies führt zu einer verstärkten Bildung von Cyclinen und cyclinabhängigen Kinasen (Cdk) sowie zu einer Reduktion der zellulären Spiegel von Proteinen, welche den Zellzyklus inhibieren, wie z.B. p27Kip1. Eine Behandlung der stimulierten PBMC mit Überständen eines *H. pylori* Wildtypstammes (HP WT) führte im Falle der Proteine CyclinD3, Cyclin E, Cdk4 und Cdk2 zu einer deutlichen Reduktion der Expression. Darüber hinaus zeigte sich bei diesen Proben eine verstärkte Bildung des zellzyklusinhibitorischen Proteins p27 sowie eine verminderte Phosphorylierung des Retinoblastoma Proteins Rb. Die beschriebenen Effekte waren bei einer Inkubationszeit der Zellen von 48h mit dem HP Wildtyp Überstand in einer Konzentration von 10µg/ml am



stärksten ausgeprägt. Die Behandlung der Zellen mit rekombinanter HP GGT (rek. HP GGT) in einer Konzentration von 2µg/ml führte bereits nach 24h zu den gleichen Effekten. Dagegen zeigte sich bei einer Behandlung der PBMC mit verschiedenen Konzentrationen des Überstandes eines GGT defizienten Stammes (HP ΔGGT) keine Veränderung der Expression dieser Proteine im Vergleich zur stimulierten Kontrolle. Die Verwendung eines Antikörpers gegen das Protein Aktin zeigte eine gleichmäßige Bande dieses Proteins in allen untersuchten Proben und damit einen gleichmäßigen Einsatz von Protein der einzelnen Proben im Western-Blot. Die Abb. 36B zeigt die Ergebnisse von Western-Blots aus Lysaten von Jurkat T-Zellen, die mit Überständen eines *Helicobacter* WT- und des isogenen GGT ko-Stammes in einer Konzentration von 10µg/ml für 48h inkubiert wurden. Es ist zu erkennen, dass die Expression der Proteine Cyclin A, Cyclin D3 und Cyclin E nach Inkubation mit dem *Helicobacter* WT Überstand reduziert war. Eine Inkubation der Jurkat Zellen mit dem Überstand aus GGT ko Bakterien bewirkte keine Veränderung der untersuchten Proteine im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Basal). Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen eine GGT-abhängige Inhibition der Produktion von Proteinen, die für den Fortlauf des Zellzyklus von entscheidender Bedeutung sind. Darüber hinaus zeigte sich eine erhöhte Produktion des Cdk-Inhibitors p27Kip1. Die von *H. pylori* produzierte GGT führt durch die beschriebenen Effekte auf die Zellzyklusregulation der Lymphozyten zur Inhibition der Proliferation dieser Zellen.

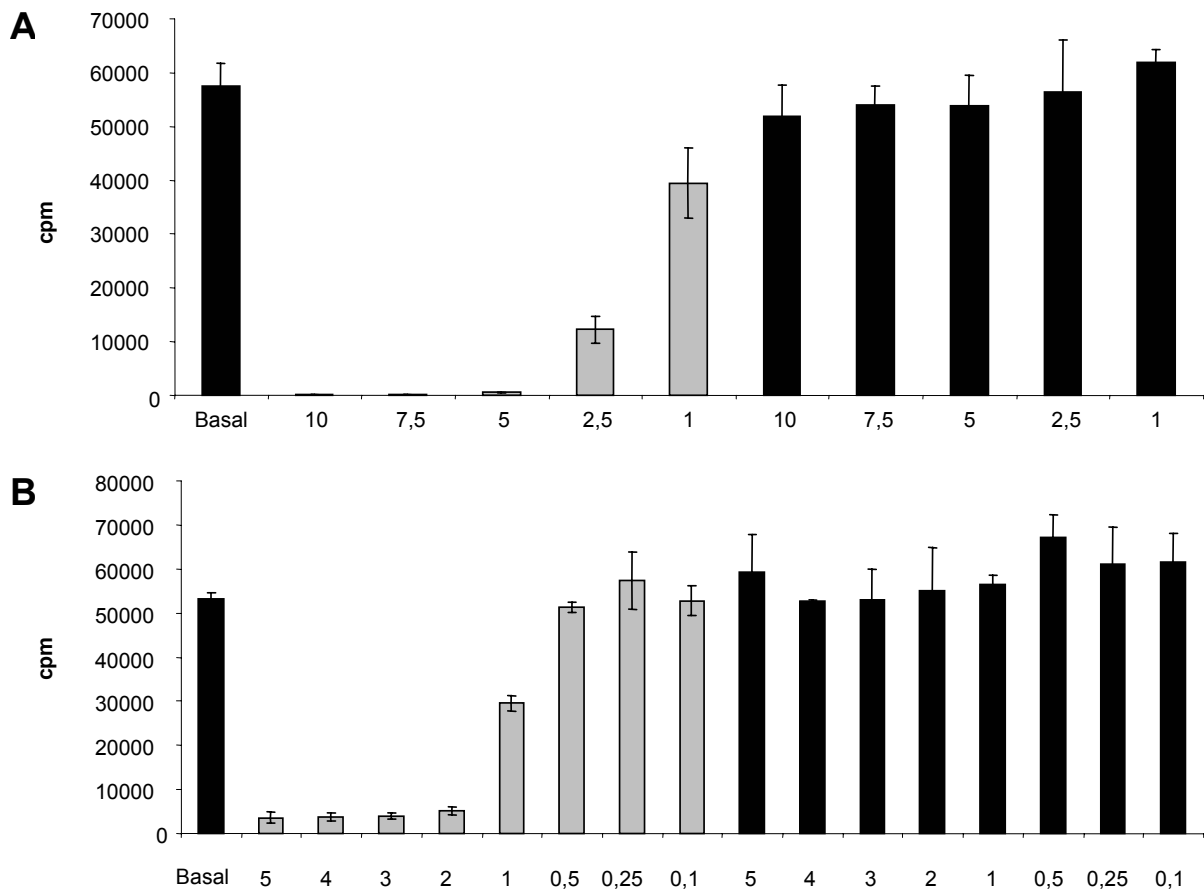


**Abb. 36: Einfluss von HP GGT und Pferde-GGT auf Expression zellzyklusregulatorischer Proteine in Lymphozyten.** Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse von Western-Blots mit Gesamtlysaten aus unterschiedlich behandelten PBMC (A, C) und Jurkat T-Zellen (B). Die Zellen wurden für 48h mit den dargestellten *H. pylori* Überständen (G27 WT und G27 ΔGGT) bzw. mit GGT Proteinen (HP GGT und Pferde GGT) behandelt. WT, Wildtyp.

Bereits erwähnte Ergebnisse aus Proliferationstests (siehe Abb. 26B) hatten gezeigt, dass eine GGT aus Pferdeniere im Gegensatz zur GGT aus *H. pylori* die Proliferation von PBMC nicht inhibierte. Auch in Western-Blot Experimenten mit PBMC zeigten sich Unterschiede zwischen den beiden Enzymen. Die GGT aus Pferdeniere bewirkte im Gegensatz zur rekombinanten HP GGT in diesen Zellen keine Reduktion der zellulären Konzentrationen der zellzyklusregulatorischen Proteine Cyclin E, Cdk2 und Cdk4 (Abb. 36C).

### 4.9.3. Rolle von Cyclin D3 bei der Vermittlung des Effekts der *H. pylori* GGT

Die Inkubation von PBMC mit der GGT aus *H. pylori* führte zu einer deutlichen Reduktion des Proteins CyclinD3, welches eine entscheidende Rolle im Ablauf des Zellzyklus spielt (siehe 1.4.). Als nächstes wurde untersucht, ob die Inhibition der T-Zell-Proliferation durch die HP GGT von der Präsenz des Cyclin D3 Proteins abhängig war. Dazu wurden stabile Jurkat T-Zellklone verwendet, die das Protein CyclinD3 überexprimierten (siehe 2.4.). Diese Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von *Helicobacter* WT- und GGT ko-Überständen und rekombinanter HP GGT inkubiert. Der im Anschluss durchgeführte Proliferationsassay zeigte, dass diese Zellen trotz Überexpression von Cyclin D3 im gleichen Verhältnis wie die unveränderten Jurkat Zellen (Abb. 10B, 25B) sowohl durch Überstände der WT Bakterien als auch durch die rekombinante HP GGT in ihrer Proliferation gehemmt wurden. Die Überstände der GGT ko Bakterien und die GGT aus Pferdeniere bewirkten bei diesen Zellen keine signifikante Hemmung der Proliferation (Abb.37A, B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anwesenheit des Proteins Cyclin D3 für die Vermittlung des proliferationshemmenden Effekts der HP GGT auf T-Zellen nicht entscheidend ist. Möglicherweise sind Eingriffe der HP GGT in zeitlich früher ablaufende Signalprozesse der T-Zell-Aktivierung, die z.B. bei der Cyclin D3 Proteinexpression eine Rolle spielen, bei der Inhibition der Proliferation dieser Zellen von wichtigerer Bedeutung.



**Abb. 37: Einfluss der Überexpression von Cyclin D3 auf den proliferationshemmenden Effekt der HP GGT.** Die Diagramme zeigen das Ausmaß der Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Thymidin von Cyclin D3-überexprimierenden Jurkat T-Zellen nach Inkubation mit *H. pylori* Kulturüberständen (A; graue Balken: G27 WT; schwarze Balken: G27  $\Delta$ GGT) und rekombinanter HP GGT (B; graue Balken: rek. HP GGT; schwarze Balken: Pferde GGT) nach 48h. Basal, unbehandelte Kontrolle; cpm, counts per minute.

#### 4.9.4. Effekt von *H. pylori* GGT auf T-Zell-Aktivierung

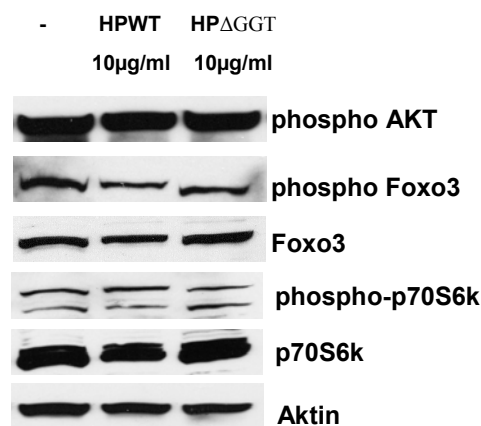
##### 4.9.4.1. Einfluss auf Proteinexpression

Ein möglicher Einfluss der HP GGT auf Signalprozesse der T-Zell-Aktivierung, welche für die Expression des Proteins Cyclin D3 wichtig sind, wurde zunächst in Western-Blot Experimenten untersucht. Dazu wurden die bereits oben beschriebenen Lysate von PBMC und Jurkat T-Zellen verwendet (siehe 4.9.2.).

##### a) PI3Kinase-abhängige Signalprozesse

Im Verlauf der T-Zell-Aktivierung kommt es unter anderem zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K). Die Aktivierung dieses Proteins führt dann zur Phosphorylierung und damit Aktivierung weiterer Kinasen wie z.B. der Proteinkinase B

(AKT). Eine Folge der Aktivierung des AKT Proteins ist die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. FOXO3 und weiterer Kinasen wie der p70S6 Kinase (p70S6K). Um zu untersuchen, ob diese PI3K-abhängigen Signalwege bei der Induktion des Zellzyklusarrests durch die HP GGT eine Rolle spielen, wurden die zellulären Spiegel dieser Proteine bzw. deren Phosphorylierungsgrad untersucht. Die Ergebnisse der entsprechenden Western-Blot Versuche sind in Abb. 38 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass weder die Behandlung der eingesetzten Jurkat T-Zellen mit Überständen aus *Helicobacter* Wildtypstämmen noch aus GGT defizienten Bakterien die Aktivierung bzw. Expression dieser Proteine beeinflusst. Dies lässt darauf schließen, dass es bei der Hemmung der T-Zell-Proliferation durch die HP GGT nicht zu einer Beeinflussung des PI3K- und AKT-Signalweges kommt.

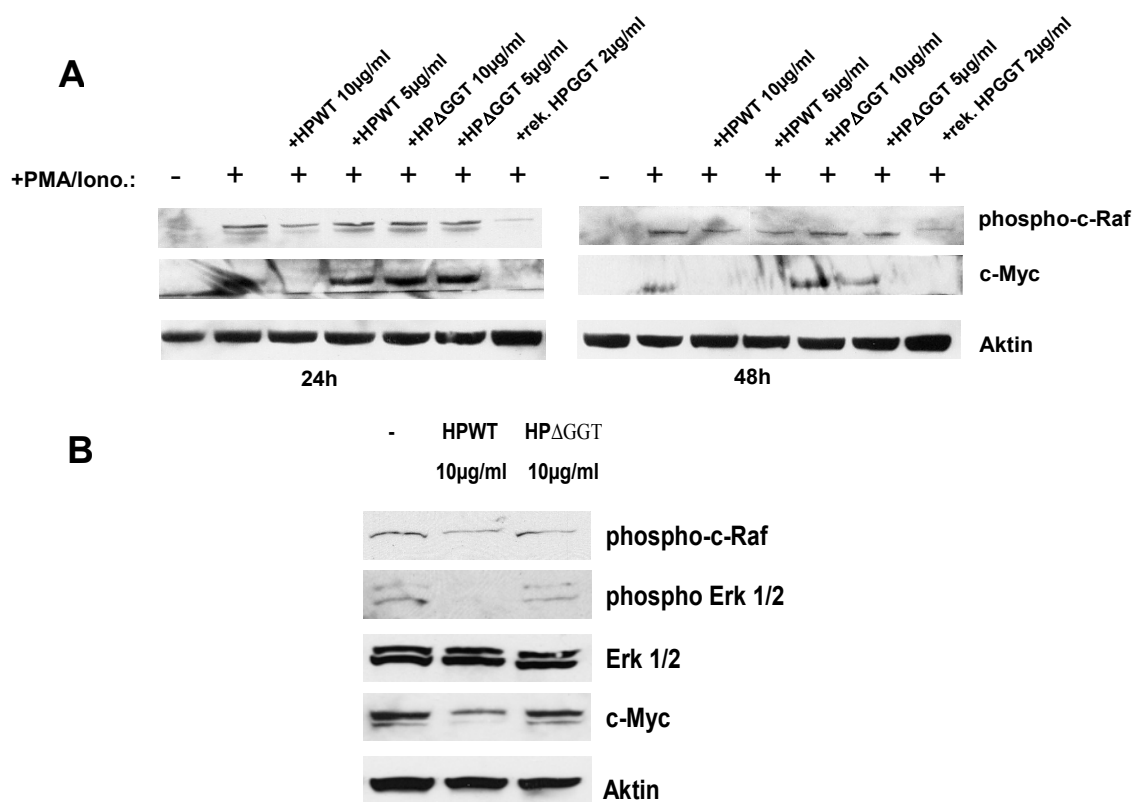


**Abb. 38: Einfluss der HP GGT auf Proteine des PI3Kinase-Signalwegs.** Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse von Western-Blots mit Gesamtllysaten aus Jurkat T-Zellen. Die Zellen wurden für 48h mit den dargestellten *H. pylori* Überständen (G27 WT und G27 ΔGGT) behandelt. WT, Wildtyp.

### b) Raf/MEK/Erk Signalkaskade

Ein weiterer wichtiger Signalweg der T-Zell-Aktivierung, der auch für die Produktion des Proteins Cyclin D eine wichtige Rolle spielt, ist der Ras-Signalweg (Peeper et al 1997). Ein wichtiges Substrat des GTP-bindenden Proteins Ras ist das Protein c-Raf, welches bei Aktivierung von Ras phosphoryliert wird. In Western-Blot Experimenten mit PBMC und Jurkat Zelllysaten zeigte sich eine deutlich verminderte Phosphorylierung des Proteins c-Raf bei Inkubation der Zellen mit Überständen des *H. pylori* Wildtypstammes und der rekombinanten HP GGT, aber nicht bei Inkubation mit Überständen GGT defizienter Bakterien (siehe Abb. 39A, B). Im Verlauf des Ras-Signalweges kommt es neben der

Aktivierung des c-Raf Proteins auch zur Aktivierung weiterer Kinasen wie der p44/42-MAP-Kinase (Erk 1/2). Auch die Aktivierung bzw. Phosphorylierung des Erk 1/2 Proteins war bei Inkubation von Jurkat T-Zellen in GGT-abhängiger Weise reduziert (Abb. 39B). Darüber hinaus waren auch die zellulären Spiegel des c-Myc Proteins in Anwesenheit der HP GGT reduziert (Abb. 39 A, B). Auch für c-Myc wurde eine Aktivierung der Proteinexpression durch Stimulation des Ras-Signalweges gezeigt (Kerkoff et al 1998). Diese Ergebnisse sind Hinweise auf eine Störung der Aktivierung des Ras-Signalweges in T-Zellen durch die HP GGT. Die Inhibition könnte die Ursache für die HP GGT abhängige Reduktion der zellulären Spiegel an Cyclin Proteinen (siehe 4.9.2.) sein.



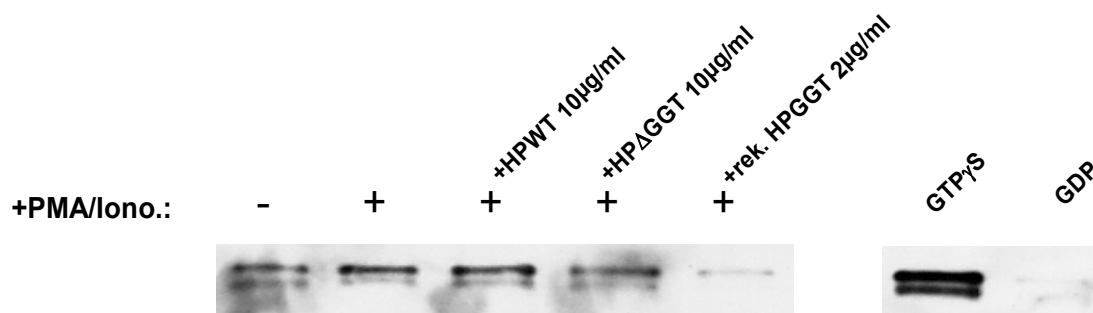
**Abb. 39: Einfluss der HP GGT auf Proteine der Raf/MEK/Erk-Signalkaskade.** Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse von Western-Blots mit Gesamtlisaten aus PBMC (A) und Jurkat T-Zellen. Die Zellen wurden für 48h mit den dargestellten *H. pylori* Überständen (G27 WT und G27 ΔGGT) sowie rekombinanter HP GGT (rek. HP GGT) behandelt. WT, Wildtyp.

### c) Einfluss der *H. pylori* GGT auf Aktivierung von Ras

Die aufgestellte Behauptung einer Störung des Ras-Signalweges durch die HP GGT als Ursache für die Inhibition der T-Zell-Proliferation durch *H. pylori* wurde durch Ergebnisse von Ras-Aktivierungstests teilweise bestätigt. In diesen Tests wurde der Anteil von aktiviertem (also GTP-bindendem) Ras Protein in PBMC bestimmt, die in An- oder

Abwesenheit der HP GGT inkubiert worden waren. Das Ergebnis zeigt wie erwartet eine Zunahme des Signals für aktiviertes Ras bei den mit PMA und Ionomycin stimulierten PBMC im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Inkubation der Zellen mit der rekombinanten HP GGT führte zu einer deutlichen Reduktion des aktivierten Ras Proteins im Vergleich zur stimulierten Kontrolle. Zellen, die mit Überständen von *H. pylori* inkubiert wurden, zeigten jedoch weder in Anwesenheit (HP WT) noch in Abwesenheit (HP  $\Delta$ GGT) der GGT eine Veränderung der Menge an aktiviertem Ras Protein (siehe Abb. 40).

Als Positivkontrolle für den verwendeten Assay wurden die Proben mit GTP $\gamma$ S behandelt. Dies führte zu einer starken Aktivierung des Ras Proteins. Wie erwartet bewirkte eine Inkubation mit GDP eine vollständige Inhibition der Ras-Aktivierung.

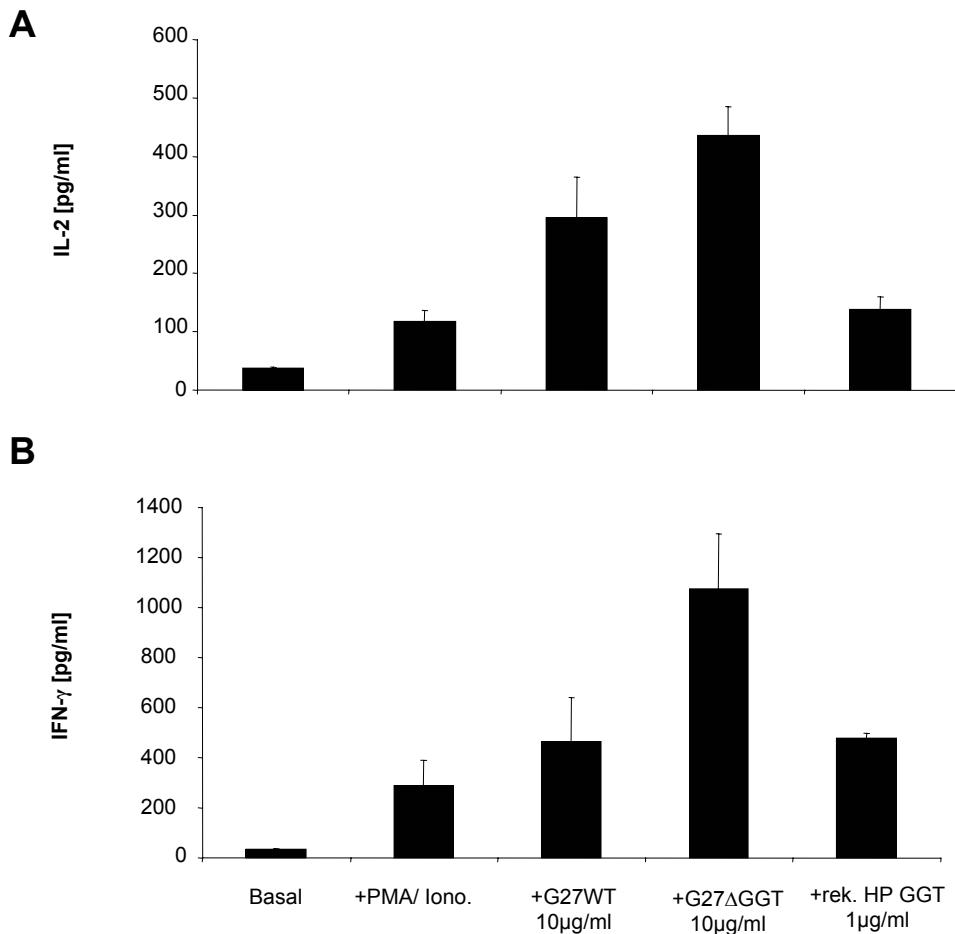


**Abb. 40: Einfluss der HP GGT auf Aktivierung von Ras.** Humane PBMC wurden wie angegeben mit Kulturüberständen von *H. pylori* G27 WT und G27  $\Delta$ GGT bzw. mit rekombinanter HP GGT für 30 min behandelt. Das Ausmaß der Aktivierung des Ras Proteins wurde unter Verwendung des Ras activation assay (siehe 3.11.) per Anti-Ras Western-Blot bestimmt. WT, Wildtyp.

#### 4.9.4.2. Einfluss der *H. pylori* GGT auf die Zytokinsekretion

Ein weiterer Parameter der T-Zell-Aktivierung ist die Sekretion von Zytokinen. Die Inkubation von PBMC, die mit PMA und Ionomycin stimuliert worden waren, mit Überständen aus *Helicobacter* WT- und GGT ko-Stämmen sowie mit rekombinanter HP GGT in Konzentrationen, die eine deutliche Inhibition der Proliferation dieser Zellen bewirkten (siehe Abb.11B und 26B), führte nicht zu einer verminderten Sekretion der Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 aus diesen Zellen. Im Vergleich zur stimulierten Kontrolle (+PMA/Iono) kam es dagegen durch Zugabe der *Helicobacter* Überstände noch zu einer verstärkten Freisetzung dieser Zytokine (Abb.41A, B).

Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen der Vorversuche für diese Doktorarbeit, die keine Antagonisierung der Zytokinsekretion durch Kulturüberstände von *H. pylori* gezeigt hatten (siehe Abb. 13A, B).



**Abb. 41: Effekt der HP GGT auf Zytokinsekretion aus PBMC.** Die Diagramme zeigen das Ausmaß der Sekretion von IL-2 (A) und IFN- $\gamma$  (B) aus humanen PBMC in Picogramm pro Milliliter nach Inkubation mit den angegebenen *H. pylori* Kulturüberständen bzw. der rekombinanten HP GGT für 24h im Vergleich zur unbehandelten (Basal) und stimulierten (PMA/Iono.) Kontrolle. WT, Wildtyp.

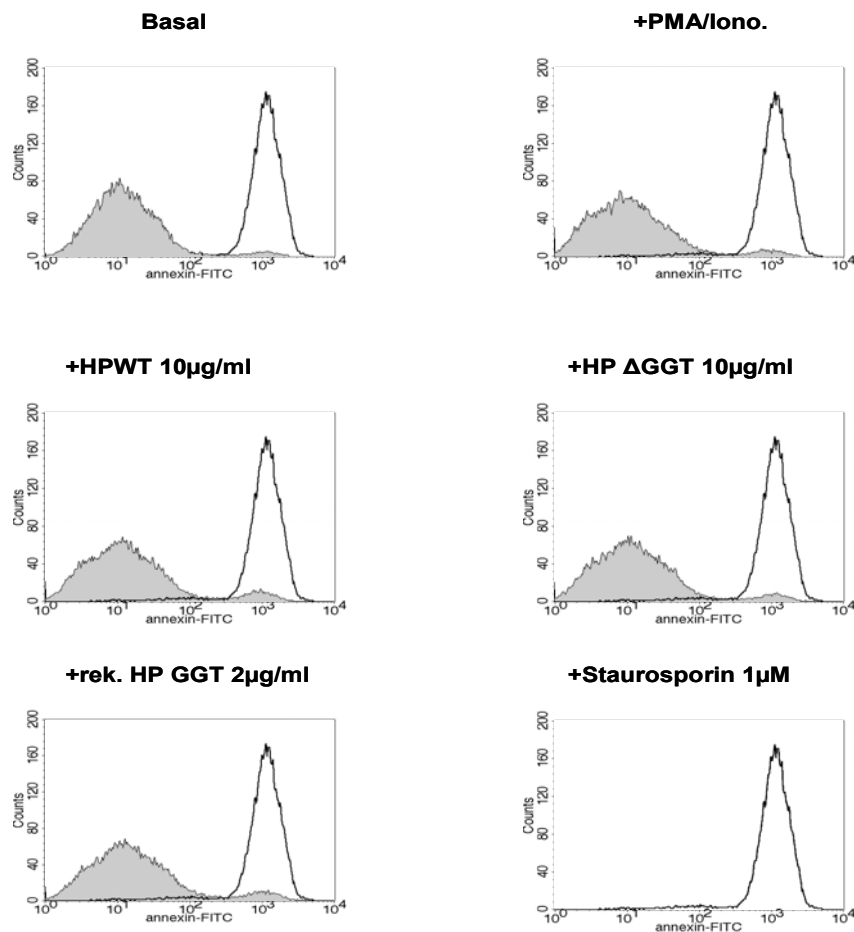
#### 4.9.5. *H. pylori* GGT und Apoptose

In früheren Versuchen mit Überständen von *Helicobacter pylori* wurde gezeigt, dass es bei Inkubation dieser Überstände mit PBMC nicht zur Induktion von zellulärer Apoptose kam (siehe Abb. 16). Es wurden nun Versuche zur Apoptoseinduktion in Jurkat T-Zellen (siehe 3.15.5.) durchgeführt, um zu klären, ob die proliferationshemmende Wirkung der HP GGT auf T-Zellen ebenfalls nicht durch Induktion von Apoptose ausgelöst wurde. Dazu wurden Jurkat T-Zellen für 24h mit Überständen aus WT- und GGT ko-Überständen von *Helicobacter pylori* sowie mit rekombinanter HP GGT inkubiert. Die Messung zellulärer Apoptose in den erhaltenen Proben erfolgte per FACS-Analyse. Die Ergebnisse der Messungen zeigten bei den mit dem Zytostatikum Staurosporin inkubierten Zellen eine starke Anfärbung mit dem verwendeten AnnexinV-FITC-Antikörper und somit eine deutliche Induktion von Apoptose (Abb. 42). Bei allen anderen Inkubationen der Zellen kam es nur in



geringem Ausmaß zur Apoptoseinduktion. Der Anteil apoptotischer Zellen bei den wie angegeben behandelten Zellen unterschied sich dabei nicht wesentlich.

Die Ursache der Inhibition der Proliferation von T-Zellen ist also weder bei *H. pylori* Überständen noch bei der rekombinanten HP GGT die Induktion von Apoptose.



**Abb. 42: Einfluss der HP GGT auf zelluläre Apoptose in PBMC.** Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer FACS-Analyse AnnexinV-FITC gefärbter PBMC. Die Zellen wurden für 24h mit Kulturüberständen von *H. pylori* G27 WT und G27  $\Delta$ GGT sowie mit der rekombinanten HP GGT behandelt. In den einzelnen Graphen der wie angegeben behandelten Zellen (graue Kurven) ist zum Vergleich das Ergebnis der Behandlung der Zellen mit Staurosporin (Positivkontrolle für Apoptose) dargestellt (weiße Kurve). Basal, unbehandelte Kontrolle; PMA/Iono, stimulierte Kontrolle; WT, Wildtyp.

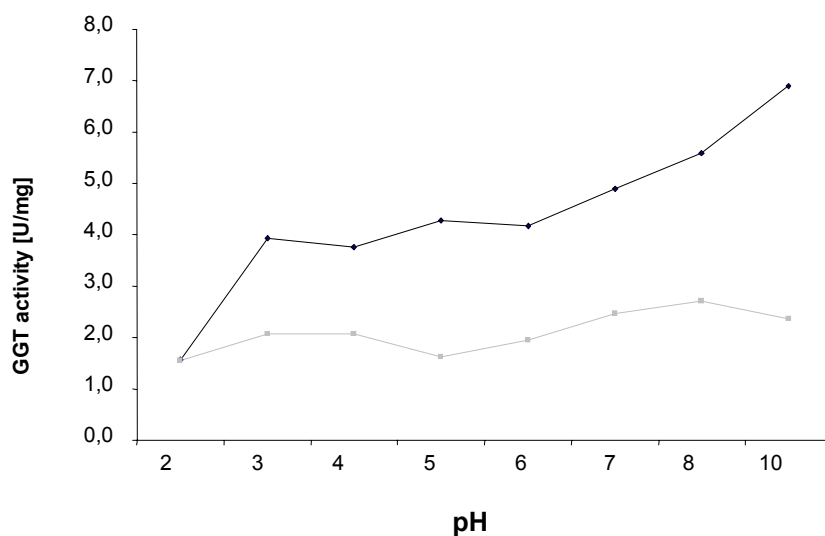
#### 4.10. Bedeutung der *H. pylori* GGT als Virulenzfaktor *in vivo*

Im letzten Abschnitt der vorliegenden Doktorarbeit wurde bestimmt, inwieweit die GGT aus *H. pylori in vivo* als Virulenzfaktor des humanpathogenen Keims eine Rolle spielt.

#### 4.10.1. Aktivität der *H. pylori* GGT bei verschiedenen pH-Werten

Zunächst stellte sich die Frage, ob das GGT Enzym unter den aziden Bedingungen der Magenschleimhaut des Menschen katalytisch aktiv ist. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Enzymaktivität der rekombinanten HP GGT und zum Vergleich die der GGT aus Pferdeniere bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt (siehe Abb. 43). Aus den Ergebnissen ist zu erkennen, dass die GGT aus *H. pylori* in einem weiten pH-Bereich von 2-10 noch deutliche katalytische Aktivität zeigte. In einem Bereich von pH 3 bis pH 6 blieb die GGT-Aktivität nahezu gleich und nahm bei pH-Werten > 6 noch weiter zu. Im Gegensatz dazu blieb die katalytische Aktivität der GGT aus Pferdeniere (Pferde GGT) nahezu über den gesamten untersuchten pH-Bereich (2-10) konstant.

Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass es auch unter den aziden Bedingungen des menschlichen Magens nicht zu einer Inaktivierung der GGT aus *H. pylori* kommt.



**Abb. 43: pH-Abhängigkeit der HP GGT.** Die Abbildung zeigt die spezifische Aktivität der rekombinanten HP GGT (schwarze Kurve) und der Pferde GGT (graue Kurve) bei verschiedenen pH-Werten.

#### 4.10.2. Produktion von GGT spezifischen Antikörpern bei *H. pylori* infizierten Patienten

Zur Inhibition der Proliferation von T-Lymphozyten *in vivo* muss die GGT aus *H. pylori* mit Immunzellen des Menschen in Kontakt kommen. Es ist bekannt, dass es im Verlauf der Infektion der menschlichen Magens mit *H. pylori* zur Infiltration von T-Lymphozyten in die Magenmukosa kommt (siehe 1.2.5.). Es wurde dann untersucht, ob die GGT von *H. pylori* in Mengen produziert wird, die vom Immunsystem des Menschen erkannt werden. Dazu wurde in Western-Blot Experimenten das rekombinante HP GGT Protein mit Seren von jeweils drei

*Helicobacter*-infizierten (Abb. 44, 1-3) und nicht infizierten Patienten inkubiert (Abb. 44, 4-6). Abbildung 41 zeigt, dass nur die Seren der mit *H. pylori* infizierten Patienten Antikörper, welche gegen die HP GGT gerichtet waren, enthielten. Die Seren der nicht mit *H. pylori* infizierten Patienten zeigten hingegen keine Antikörperreaktion mit diesem Protein. Dieses Ergebnis deutet auf eine Erkennung der HP GGT durch das menschliche Immunsystem hin. Eine Wechselwirkung der HP GGT mit antigenpräsentierenden Zellen in der Magenschleimhaut ist daher wahrscheinlich.



**Abb. 44: Produktion HP GGT spezifischer Antikörper in *H. pylori* Patienten.** Die rekombinante HP GGT wurde per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Diese Membran wurde mit Anti- Penta His Antikörper (Penta His) und mit Seren *H. pylori*-infizierter (1-3) bzw. nicht infizierter Patienten (4-6) inkubiert. Die Abb. zeigt das Ergebnis der anschließenden Chemilumineszenzfärbung.

## 5. Diskussion

Seit mehr als 20 Jahren wird die Rolle des Bakteriums *Helicobacter pylori* im menschlichen Magen intensiv untersucht. Die Entdeckung, dass der Keim die Hauptursache für die Entstehung von gastroduodenalen Erkrankungen ist, wurde im Jahr 2005 mit dem Nobelpreis für Medizin gewürdigt. Die *H. pylori* Infektion ist insbesondere verantwortlich für das Auftreten gastroduodenaler Ulcera und distaler Adenokarzinome des Magens und wurde daher von der WHO als ein Typ I Karzinogen klassifiziert. Man schätzt, dass weltweit pro Jahr etwa 600000 Patienten an distalen Magenkarzinomen sterben (Quelle: [www.who.int](http://www.who.int)), wobei diese Bakterieninfektion zugrunde liegt. Ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge ist daher von enormer klinischer wie auch wirtschaftlicher Bedeutung.

Von besonderem Interesse sind die Mechanismen der Infektion und der Persistenz von *H. pylori* im menschlichen Magen. Die Prävalenz der Infektion ist stark vom sozioökonomischen Status der jeweiligen Bevölkerung abhängig. So sind in vielen Entwicklungsländern durchschnittlich 80% und in den Industrienationen etwa 30% der Menschen mit *H. pylori* infiziert (Parsonnet 1998). Die Infektion führt unbehandelt bei praktisch allen Patienten zur Ausbildung einer chronisch aktiven Gastritis, welche in 10-20% der Fälle zur Entstehung von Magen-, Zwölffingerdarmgeschwüren, Magenkrebs und/oder MALT Lymphomen führt (Suerbaum et al 2002). Obwohl der Organismus als Reaktion auf die bakterielle Infektion eine Entzündungsantwort im Magenepithel induziert, die durch Infiltration mit Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen sowie die Produktion *H. pylori* spezifischer Antikörper gekennzeichnet ist, werden die Bakterien nicht eliminiert (Blaser et al 2004).

In Bezug auf die adaptive Immunantwort konnten verschiedene Studien zeigen, dass T-Lymphozyten bei der Bekämpfung der Infektion mit *H. pylori* eine entscheidende Rolle spielen (Ermak et al 1998; Pappo et al 1999; Akhiani et al 2002). Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass der Keim Mechanismen entwickelt hat, um der Immun- und im speziellen der T-Zell-Antwort des Wirts zu entgehen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese zeigten *in vivo* Untersuchungen an *H. pylori* infizierten Patienten eine reduzierte Proliferationsrate der T-Zellen in der Magenmukosa (Karrtunen 1991; Fan et al 1994). Verschiedene Arbeitsgruppen haben daher in den letzten Jahren immunsupprimierende Effekte verschiedener *H. pylori* Proteine postuliert. So wurde beispielsweise ein so genanntes proliferationshemmendes Protein (PIP) beschrieben, welches die Proliferation von

Lymphozyten unabhängig von den bis dahin in anderem Zusammenhang bekannten Virulenzfaktoren VacA und CagA inhibierte (Knipp et al 1993, 1994, 1996).

Die Identität des/der für die *in vivo* und *in vitro* beobachtete Hemmung der T-Zellproliferation verantwortlichen Faktors(en) konnte bislang noch nicht geklärt werden. Das Verständnis der Interaktion des Keims mit dem humanen Immunsystem ist jedoch von fundamentaler Bedeutung für die zukünftige Entwicklung neuer und alternativer Behandlungsstrategien für die Infektion mit *H. pylori*. Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war daher die Charakterisierung des/der immunsupprimierenden Faktors(en) von *H. pylori* und die Aufklärung der dieser Immunevasion zugrunde liegenden Mechanismen.

## **5.1 Ein sezerniertes, niedermolekulares Protein von**

### ***H. pylori* hemmt die Proliferation von T-Lymphozyten.**

Die initialen Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen, dass Kulturüberstände von *Helicobacter pylori*, welche die sezernierten Proteine des Bakteriums enthalten, die Proliferation von verschiedenen T-Zelllinien und primären humanen T-Zellen hemmen. Bei dem für die Hemmung der T-Zell-Proliferation durch *H. pylori* verantwortlichen Faktor handelt es sich offensichtlich um ein vom Bakterium sezerniertes Protein, da der Hemmeffekt durch Behandlung des Kulturüberstandes mit Proteinase K aufgehoben wurde (Gerhard et al 2005). Die Möglichkeit, dass durch spontane Lyse der Bakterien bei der Herstellung der Überstände neben den sezernierten auch zytoplasmatische Proteine in diese Überstände gelangt sein könnten, kann nicht völlig ausgeschlossen werden. Jedoch dürfte der Anteil dieser zytoplasmatischen im Vergleich zu den sezernierten Proteinen sehr gering sein. In diesem Zusammenhang zeigten Transwell-Experimente, dass es auch bei räumlicher Trennung der *H. pylori* Bakterien von T-Zellen zur Inhibition der T-Zell-Proliferation kommt. Dies deutet auf ein sezerniertes Produkt der Bakterien als Ursache des immunsuppressiven Effekts hin (Gerhard et al 2005). Das zytoplasmatische Protein Urease von *H. pylori* wird nur bei Auflösung der Bakterienzelle in das extrazelluläre Medium freigesetzt und dient daher häufig als Marker für bakterielle Lyse (Kim et al 2002). Mengenmäßig kann die Urease einen Anteil von 10% am Gesamtproteingehalt von *H. pylori* erreichen (Bauerfeind et al 1997). Die innerhalb der vorliegenden Arbeit per Gelfiltrationschromatographie aufgereinigten Überstände von *H. pylori* zeigten in der Proteinfärbung nur sehr wenige Banden im Bereich von 60kDa (Urease B: MW 61,1kDa) und keine Banden im Bereich unter 30kDa (Urease A: MW 23,5kDa). Dies deutet darauf hin, dass die innerhalb der vorliegenden Arbeit

hergestellten Kulturüberstände von *H. pylori* zum größten Teil aus sezernierten Proteinen der Bakterien bestehen.

Im Gegensatz zu T-Zellen wurde die Proliferation der Magenkarzinomzelllinie KatoIII durch Kulturüberstände von *H. pylori* in deutlich geringerem Ausmaß inhibiert. Dies verweist auf eine besondere Spezifität des Hemmeffekts in Bezug auf T-Zellen. In der Literatur wurde ein ähnlicher proliferationshemmender Effekt eines PIP („Proliferation-inhibiting-protein“) genannten Faktors aus *Helicobacter pylori* beschrieben, der auch besonders stark gegenüber T-Zelllinien und weniger stark gegenüber Magenkarzinomzellen ausgeprägt war (Knipp et al 1996). Diese Studie zeigte, dass die IC<sub>50</sub>-Werte des PIP für T-Zellen im Bereich von 30µg/ml, für Kato III-Zellen hingegen bei ca. 130µg/ml lagen, was im Einklang mit der vorliegenden Arbeit auf eine erhöhte Empfindlichkeit von T-Lymphozyten gegenüber dem proliferationshemmenden Effekt von *H. pylori* hinweist. In dieser Doktorarbeit lagen die IC<sub>50</sub> Werte für Kulturüberstände von *H. pylori* gegenüber T-Zellen jedoch deutlich unter den von Knipp et al berichteten Werten, und zwar im Bereich von 5µg/ml. In der Arbeit von Knipp et al wird der für die Proliferationshemmung verantwortliche Faktor nicht eindeutig charakterisiert. Obwohl die Größe von PIP mit „ca. 100kDa“ nur ungenau angegeben wird, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei PIP um den innerhalb dieser Doktorarbeit identifizierten Faktor handelt.

In einer im Zusammenhang mit dieser Doktorarbeit erschienenen Publikation wurde in Versuchen mit Überständen entsprechender knock out Mutanten von *H. pylori* ferner gezeigt, dass der beobachtete Hemmeffekt auch unabhängig von der Anwesenheit bereits bekannter Virulenzfaktoren wie CagA sowie des Adhäsionsproteins BabA und des Proteins OipA war (Gerhard et al 2005). Bezüglich dem Protein CagA und der Proliferation von T-Zellen wurden bisher verschiedene, äußerst widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht, bei denen zum einen eine Inhibition, aber zum anderen auch eine Aktivierung der Proliferation von T-Zellen durch dieses Protein beschrieben wurden (Paziak-Domanska et al 2000; Chmiela et al 1996). Die innerhalb dieser Doktorarbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen jedoch, dass das Protein CagA für die beobachtete Inhibition der T-Zell-Proliferation durch *H. pylori* keine Rolle spielt.

Bezüglich der Rolle des VacA Proteins als immunsuppressiver Faktor gibt es Arbeiten, die eine VacA-unabhängige Inhibition der T-Zell-Proliferation beschreiben (Knipp et al 1996, Chen et al 2000). Darüber hinaus wurden aber auch Arbeiten veröffentlicht, welche das Gegenteil, nämlich eine VacA-abhängige Inhibition der T-Zell-Proliferation postulieren

(Gebert et al 2003; Sundrud et al 2004). In der Arbeit von Gebert et al zeigen die Autoren überraschenderweise in einem Versuch mit *Helicobacter* Bakterien (60 Bakterien pro Zelle), dass sowohl WT als auch VacA defiziente Stämme die Proliferation von T-Zellen inhibierten. Das bedeutet, dass in diesem Zusammenhang die Anwesenheit des sezernierten Proteins VacA keine Rolle bei der Inhibition der Proliferation spielt, obwohl in dieser Arbeit das Gegenteil behauptet wird. Für diesen widersprüchlichen Effekt machten die Autoren einen zusätzlich zu VacA vorhandenen „bakterienassoziierten Faktor“ verantwortlich, der jedoch nicht weiter charakterisiert wurde. In ihrer Arbeit verwenden Gebert et al konzentrierte Überstände von *Helicobacter pylori* Kulturen in 25fach höheren Konzentrationen (250µg/ml) als in der vorliegenden Doktorarbeit (maximal 10µg/ml). Im Zusammenhang mit dieser Doktorarbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass Konzentrationen von 250µg/ml der verwendeten HP Überstände zu einer deutlichen Induktion von Apoptose in T-Zellen führten (Gerhard et al 2005). Im Gegensatz dazu wurde durch die innerhalb dieser Arbeit verwendeten Überstände in deutlich proliferationshemmenden Konzentrationen keine Apoptose in T-Zellen ausgelöst. Als Mechanismus der VacA-induzierten Inhibition der T-Zell-Proliferation postulierten Gebert et al die Induktion eines G<sub>1</sub>-Zellzyklusarrests in Lymphozyten. Dieser Zellzyklusarrest sollte dabei durch VacA-abhängig verminderte Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT (nuclear-factor of activated T cells) in den Zellkern ausgelöst werden, was wiederum eine verminderte Transkription des *IL-2*-Gens und damit eine Reduktion der IL-2-Sekretion und Proliferation von Lymphozyten zur Folge hätte. Im Gegensatz dazu zeigten Ergebnisse von Kernextraktionen und Translokationsexperimenten in dieser Doktorarbeit bei Konzentrationen der Überstände von 10µg/ml keine Reduktion der nukleären Translokation von NFAT in T-Zellen (Gerhard et al 2005). Dies deutet auf einen konzentrationsabhängigen Effekt von VacA auf die nukleäre Translokation von NFAT hin, der bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen der *H. pylori* Überstände keine Rolle spielt.

In einer weiteren Publikation wurden keine *Helicobacter* Überstände, sondern aus diesen Überständen aufgereinigtes VacA Protein in Konzentrationen von 10µg/ml (Sundrud et al 2004) verwendet. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine Inhibition der Proliferation von T-Zellen durch VacA. Da in den Gesamtüberständen von *Helicobacter pylori* außer VacA noch etwa 33 andere Proteine enthalten sind (Bumann et al 2002; Kim et al 2002), liegen die von Sundrud et al eingesetzten VacA Konzentrationen deutlich über denen der in dieser Doktorarbeit verwendeten Überstände (10µg/ml Gesamtprotein). *In vivo* Untersuchungen

zeigten hingegen ein erhöhtes Ausmaß an Infiltration der Magenschleimhaut mit Lymphozyten bei Patienten, die mit VacA positiven Stämmen infiziert waren (Rad et al 2002, Atherton et al 1997). Eine verstärkte Inflammation und lymphozytäre Infiltration der Magenmukosa deutet jedoch auf erhöhte und nicht verminderte Proliferation der Lymphozyten in Anwesenheit von VacA hin, wie von Gebert et al und Sundrud et al postuliert wurde (siehe oben). *In vivo* ist daher offensichtlich ein anderer von *H. pylori* produzierter Faktor für die beschriebene Suppression der T-Zell-Proliferation durch den Keim verantwortlich.

Zusammengefasst zeigen die bereits veröffentlichten Vorarbeiten zur vorliegenden Doktorarbeit, dass ein sezerniertes, niederermolekulares Protein von *H. pylori* die Proliferation von T-Zellen unabhängig von bisher bekannten Virulenzfaktoren inhibiert.

## **5.2. Die $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase (GGT) ist der proliferationshemmende Faktor in *H. pylori* Überständen.**

Mit Hilfe von Gelfiltrationschromatographie gelang es in der vorliegenden Arbeit, den für die Hemmung der T-Zell-Proliferation verantwortlichen Faktor zu identifizieren. Anhand des Elutionsprofils der verwendeten Säule konnte die Größe dieses Faktors zunächst auf einen Bereich von 29-66kDa eingegrenzt werden, da nur Fraktionen, welche diesem Größenbereich entsprachen, die Proliferation von T-Zellen inhibierten. Das Protein VacA wurde hingegen aufgrund seines größeren Molekulargewichts von ca. 95kDa (Telford et al 1994) in anderen Fraktionen von der verwendeten Säule eluiert, welche keinen proliferationshemmenden Effekt gegenüber T-Zellen zeigten. Dies bestätigt nochmals, dass VacA nicht für die beobachtete Inhibition der T-Zell-Proliferation durch HP Überstände verantwortlich ist.

Im erwähnten Größenbereich von 29-66kDa wurden bei *H. pylori* bisher 33 verschiedene Proteine anhand von 2D-Gel- und massenspektrometrischen Analysen identifiziert (siehe 4.6., Tabelle 9; Bumann et al 2002; Kim et al 2002; Backert et al 2005). Für 13 dieser Proteine wurde beschrieben, dass sie durch *H. pylori* in das extrazelluläre Medium sezerniert werden (Bumann et al 2002; Kim et al 2002). Innerhalb der vorliegenden Doktorarbeit wurden Kulturüberstände von *H. pylori* Bakterien verwendet, so dass die Inhibition der T-Zell-Proliferation wahrscheinlich durch ein oder mehrere sezernierte Protein(e) des Keims ausgelöst wurde. Es lag daher nahe, den oder die gesuchten Faktor(en) unter den sezernierten



Proteinen von *H. pylori* zu suchen. Es zeigte sich, dass nur 4 Proteine im Größenbereich von 29-66kDa aufgrund ihres Elutionsverhaltens von der Gelfiltrationssäule mit dem proliferationshemmenden Effekt der Fraktionen übereinstimmten. Der Größe nach handelte es sich bei zwei dieser 4 Proteine um Fragmente der  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase (GGT). Ferner zeigten nur die Fraktionen, welche die Proliferation der T-Zellen inhibiert hatten, auch enzymatische GGT-Aktivität. Die Tatsache, dass Überstände von hergestellten GGT defizienten Mutanten von *H. pylori* die Proliferation von T-Zellen praktisch nicht mehr inhibierten, bestätigte, dass die GGT aus *H. pylori* der für die Inhibition der T-Zell-Proliferation verantwortliche und gesuchte Faktor war. Diese Proliferationshemmung durch die HP GGT ist dabei unabhängig von der Anwesenheit anderer Proteine von *H. pylori*, da auch eine rekombinant in *E. coli* exprimierte HP GGT die Proliferation von T-Zellen in dosisabhängiger Weise inhibierte.

Das Enzym GGT (EC 2.3.2.2;  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase) kommt sowohl in Tieren als auch in Pflanzen und Bakterien vor. In Säugetieren ist die GGT ein membranständiges Protein, welches hauptsächlich auf der luminalen Seite von Drüsen und Kanälen des gesamten Körpers exprimiert wird (Hanigan et al 1996). Als wichtigste physiologische Substrate der GGT in Säugetieren fungieren Glutathion und dessen Konjugate. Im Verlauf der Transpeptidierungsreaktion katalysiert die GGT die Hydrolyse der  $\gamma$ -Glutamyl-Bindung zwischen Glutamat und Cystein und den anschließenden Transfer der  $\gamma$ -Glutamyl-Gruppe des Glutathions auf Akzeptoren wie z.B. Aminosäuren und Wasser (Hanes et al 1950). Beim Menschen spielt die GGT dadurch eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von extrazellulärem Glutathion in die Zellen (Hanigan et al 1993). Das humane Enzym wurde unter anderem in Hepatozyten, biliären Epithelzellen, renalen Tubuli, sowie im Pankreas und Dünndarm nachgewiesen (Giannini et al 2005). Erhöhte GGT-Spiegel im Serum wurden sowohl im Verlauf verschiedener nicht-hepatischer (z.B. chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen) als auch bei allen Formen von Lebererkrankungen, unabhängig von ihrer Ursache, beobachtet. Aufgrund der hohen Sensitivität für Lebererkrankungen wird die GGT als zusätzlicher Marker bei Veränderungen der Serumspiegel anderer Enzyme wie z.B. alkalischer Phosphatase unter anderem bei der Diagnose alkoholbedingter Lebererkrankungen verwendet (Giannini et al 2005; Conigrave et al 2003).

Enzymatische GGT-Aktivität konnte auch in vielen, aber nicht in allen Bakterien wie z.B. in *Neisseria meningitidis*, aber nicht in *Neisseria gonorrhoea* nachgewiesen werden (Riou et al 1982). Die zelluläre Lokalisation der GGT in Bakterien unterscheidet sich in einigen Fällen

von der in Säugetieren. Bei *Proteus mirabilis* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ist die GGT wie bei Säugetieren ein membranständiges Enzym (Nakayama et al 1984; Mineyama et al 1995), wohingegen die GGT bei *E. coli* in den periplasmatischen Raum sezerniert wird (Suzuki et al 1986). Von der GGT bei *Bacillus subtilis* und auch *Helicobacter pylori* wurde berichtet, dass sie in das extrazelluläre Medium sezerniert wird (Xu et al 1996; Bumann et al 2002). In Übereinstimmung damit wurde die GGT im Verlauf der vorliegenden Doktorarbeit in Kulturüberständen von *H. pylori* nachgewiesen.

Darüber hinaus zeigten PCR-Experimente die Anwesenheit des *ggt* Gens in 18 verschiedenen HP Stämmen. Dies steht im Einklang mit der Studie einer anderen Arbeitsgruppe, die in Microarray-Experimenten mit genomischer DNA dieses Gen in 15 verschiedenen HP Stämmen nachweisen konnte (Salama et al 2000).

Über die physiologische Funktion bakterieller GGT Proteine ist bisher wenig bekannt. Einige Arbeiten zeigten eine Rolle bei der Aufnahme von Peptiden aus dem extrazellulären Milieu sowie bei der Verwendung von poly- $\gamma$ -Glutamat als Stickstoffquelle (Takahashi et al 2004; Kimura et al 2004). Eine proliferationshemmende Wirkung der GGT gegenüber T-Lymphozyten wurde bisher in keiner Spezies beschrieben. Die GGT stellt ein heterodimeres Protein dar, welches als einzelne Polypeptidkette translatiert und daraufhin posttranslational in zwei Untereinheiten mit unterschiedlichem Molekulargewicht gespalten wird (Hanigan 1998). Auch für *Helicobacter pylori* wurde eine solche Prozessierung der GGT aus einer Polypeptidkette mit einer Größe von 61kDa in zwei Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 38 und 22kDa gezeigt (Chevalier et al 1999; Shibayama et al 2003; Busiello et al 2004). Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigten im Unterschied zu einer anderen Publikation (Chevalier et al 1999) auch für die rekombinant in *E. coli* exprimierte HP GGT eine solche Prozessierung. Diese Unterschiede hängen möglicherweise mit der Art des verwendeten Expressionsvektors zusammen. Darüber hinaus wurde das rekombinante Protein von dieser Arbeitsgruppe denaturierend aufgereinigt, wohingegen innerhalb der vorliegenden Doktorarbeit die Aufreinigung der nativen und enzymatisch aktiven Form der rekombinanten HP GGT gelang.

Bislang befassten sich zwei Studien mit der Funktion der GGT aus *H. pylori*. Dabei postulierten die Autoren in Versuchen mit Magenepithelzellen eine Induktion von oxidativem Stress und Apoptose bzw. eine Aktivierung der Cox-2 Expression durch die HP GGT (Shibayama et al 2003; Busiello et al 2004).

### **5.3. Katalytische Aktivität der HP GGT ist notwendig für die T-Zell-Proliferationshemmung.**

Beim Menschen spielt die GGT eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von extrazellulärem Glutathion in die Zellen (Hanigan et al 1993). Wie bereits erwähnt stellt Glutathion ein wichtiges Substrat der GGT aus Säugetieren *in vivo* dar. Als Antioxidanz ist dieses Tripeptid ferner für den Schutz von Zellen vor oxidativer Schädigung z.B. durch Sauerstoffradikale wichtig (Davis et al 2001). Es wurde gezeigt, dass der Abbau von Glutathion durch die humane GGT unter Beteiligung von Fe(III)-Komplexen zu Lipidperoxidation führt. Als Mechanismus dieser GGT Reaktion wurde postuliert, dass der Abbau von Glutathion durch dieses Enzym zur Reduktion von Fe(III)- zu Fe(II)-Komplexen führt und dadurch Redoxprozesse in Gang setzt, welche zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und damit zu oxidativer Schädigung von Lipidmolekülen führen (Stark et al 1993). Eine Möglichkeit, wie es zur beobachteten Inhibition der Zellproliferation durch die HP GGT bei T-Zellen kommen könnte, wäre also eine Reduktion des intrazellulären Glutathionspiegels durch GGT-abhängigen enzymatischen Abbau dieses Tripeptids. Dadurch kann es zu vermehrter oxidativer Schädigung der Zellen und damit zur Induktion von Apoptose kommen, was eine verminderte Proliferation zur Folge hätte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch keine Verminderung der intrazellulären Glutathion-Konzentration in T-Zellen in Anwesenheit sezernierter Proteine von *H. pylori*. Darüber hinaus zeigte sich auch keine Induktion von vermehrter Apoptose durch die GGT aus *H. pylori* in T-Zellen. Ein möglicher enzymatischer Abbau von Glutathion durch die HP GGT ist daher nicht die Ursache des proliferationshemmenden Effekts dieses Proteins in T-Zellen.

Die Vergleiche der Aminosäuresequenz der humanen GGT mit der GGT aus *H. pylori* zeigten eine Homologie der beiden Sequenzen von nur 22% (Chevalier et al 1999). Einzelne Aminosäurereste sind dagegen sowohl bei den GGT Proteinen aus Säugetieren als auch bei den entsprechenden bakteriellen Formen stark konserviert. Dazu gehören unter anderem die Serinreste in Position 451/452 und in Position 385 der GGT Aminosäuresequenz (Chevalier et al 1999). In Studien mit humaner GGT zeigte sich, dass die Serinreste in Position 451 und 452 eine entscheidende Bedeutung für die katalytische Aktivität dieser GGT haben. Eine in gleicher Weise erstellte Mutation an Position 385 hatte dagegen nahezu keine Auswirkungen auf die Enzymaktivität der humanen GGT (Ikeda et al 1995). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden erstmalig zwei Mutanten einer rekombinanten HP GGT an Position 451/452

(S451/452A) und 385 (S385A) der GGT Sequenz hergestellt. Die Mutante S385A zeigte im Vergleich zur nicht mutierten rekombinanten HP GGT eine etwa halb so große spezifische Aktivität. Bei der Mutante S451/452A dagegen war nahezu keine spezifische GGT-Aktivität vorhanden. Die Serinreste in Position 451 und 452 sind also nicht nur bei der humanen, sondern auch bei der GGT aus *H. pylori* essentiell für die katalytische Aktivität des Enzyms. Die Ergebnisse von Proliferationstests mit T-Zellen zeigten ferner einen im Vergleich zur nicht-mutierten GGT unveränderten inhibitorischen Effekt der GGT-Mutante S385A. Interessanterweise bewirkte eine Inkubation der T-Lymphozyten mit der katalytisch inaktiven Mutante S451/452A im Gegensatz dazu keine Reduktion der Zellproliferation.

Eine weitere Möglichkeit zur Aufhebung der GGT-Aktivität ist der Einsatz von GGT Inhibitoren. In der Literatur wurden bislang verschiedene Inhibitoren mit unterschiedlichen Wirkmechanismen und Spezifitäten beschrieben wie z.B. Acivicin (AT-125; L-( $\alpha$ S,5S)- $\alpha$ -Amino-3-Chloro-4,5-Dihydro-5-Isoxazol-Essigsäure), ein Fermentationsprodukt aus *Streptomyces sviveus* sowie DON (6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucin) und der Serin-Borat-Komplex (Catane et al 1979; Tate et al 1978; Revel et al 1959). Acivicin wird häufig als Inhibitor der GGT verwendet. Es stellt einen irreversiblen, kompetitiven Inhibitor dieses Enzyms dar, der in der Nähe der  $\gamma$ -Glutamylierungsstelle des Enzyms bindet (Stole et al 1994; Smith et al, 1995). Eine Vorbehandlung der HP GGT bzw. der Kulturüberstände von *H. pylori* Wildtyp Stämmen mit Acivicin bewirkte eine Aufhebung des beschriebenen proliferationshemmenden Effekts gegenüber T-Zellen.

Die Fähigkeit der GGT aus *H. pylori* zur Inhibition der T-Zell-Proliferation hängt also entscheidend von der katalytischen Aktivität dieses Enzyms ab.

In Übereinstimmung damit zeigten weitere Studien, dass der Effekt der HP GGT auf Magenepithel- und Magenmukosazellen von der katalytischen Aktivität abhängig ist. Dabei wurde beschrieben, dass die GGT aus *H. pylori* in Epithelzellen Apoptose auslöst und dadurch *in vivo* zu einer verstärkten Schädigung des Magenepithels führen könnte (Shibayama et al 2003). In der zweiten Studie wurde postuliert, dass es im Verlauf der Schädigung der Magenmukosa durch *H. pylori* zu einer HP GGT-abhängigen Hochregulation der Cyclooxygenase 2 (Cox-2) und EGF-bezogener Peptide kommt (Busiello et al 2004). In beiden Fällen waren die beschriebenen Effekte durch GGT Inhibitoren antagonisierbar. Die vorliegende Doktorarbeit zeigt dagegen keine Induktion von Apoptose in T-Lymphozyten

durch die GGT aus *H. pylori*. Wie eingangs der Diskussion erwähnt wurde die Proliferation von Magenepithelzellen (Kato III) innerhalb dieser Doktorarbeit nicht durch Kulturüberstände von *H. pylori* gehemmt. Bei den von Shibayama et al und Busiello et al beschriebenen Effekten handelt es sich daher offenbar um epithelzellspezifische Effekte, die für die Inhibition der T-Zell-Proliferation durch die HP GGT keine Bedeutung haben.

In der Literatur gibt es bislang keine Hinweise auf proliferationshemmende Eigenschaften einer GGT gegenüber humanen T-Zellen. Es bestand die Möglichkeit, dass die bislang hier beschriebenen Ergebnisse der Doktorarbeit zwar einen Effekt der GGT aus *H. pylori* beschreiben, der jedoch nicht auf das Enzym dieser Spezies beschränkt ist, sondern auch durch GGT aus anderen Spezies ausgelöst wird. Innerhalb dieser Doktorarbeit durchgeführte Experimente mit einer kommerziell erhältlichen, katalytisch aktiven GGT aus Pferdeniere zeigten keine Inhibition der T-Zell-Proliferation durch dieses Enzym, auch dann nicht, wenn gleiche und sogar höhere Aktivitäten als von der HP GGT in den Versuchen eingesetzt wurden. Bei der Inhibition der Proliferation von T-Zellen handelt es sich daher möglicherweise um einen *H. pylori* spezifischen Effekt der GGT. Durch Verwendung weiterer GGT Formen aus anderen Spezies könnte diese Theorie bestätigt werden.

#### **5.4. Die Aminosäure Glutamin ist entscheidend bei der Vermittlung des inhibitorischen Effekts von *H. pylori* auf T-Zellen.**

Die Vorinkubation von Zellkulturmedium mit Überständen von *H. pylori* Wildtyp-, aber nicht GGT defizienten Stämmen führte zu einer Inhibition der Proliferation von T-Zellen, auch wenn die GGT vor Zugabe der Zellen durch Hitzedenaturierung inaktiviert wurde. Dies deutet daraufhin, dass die GGT-abhängige Inhibition der T-Zell-Proliferation durch den Abbau einer Mediumkomponente oder durch die Bildung einer Verbindung ausgelöst wird, welche im Verlauf der enzymatischen Reaktion der GGT im Medium entsteht. In der Literatur sind Versuche mit GGT aus Rattenniere beschrieben, in denen verschiedene Dipeptide und Aminosäuren als Akzeptoren der innerhalb der GGT Reaktion übertragenen  $\gamma$ -Glutamyl-Gruppe eingesetzt wurden. Es zeigte sich, dass vor allem die Aminosäure Glutamin und auch Dipeptide dieser Aminosäure sehr gute Akzeptoren bei der GGT Reaktion darstellen (Tate et al 1974b). Die Beobachtung in der vorliegenden Arbeit, dass die alleinige Vorbehandlung von Glutamin mit der HP GGT ebenfalls zu einer Inhibition der T-Zell-Proliferation führte, legt

zwei mögliche Erklärungen für den Mechanismus der GGT-abhängigen Proliferationshemmung nahe:

1.) den enzymatischen Abbau des Glutamins im Medium. Durch Abnahme der Glutaminskonzentration könnte es zu einer verminderten Proliferation der T-Zellen kommen. In der Literatur wurde beschrieben, dass die GGT in HEK293 Zellen im Zellkulturmedium vorhandenes Glutamin zu Glutamat und Ammoniumionen abbauen kann (Wong et al 2005). Darüber hinaus ist bekannt, dass ein Mangel an Glutamin zu verminderter Proliferation von T-Lymphozyten führt, begleitet durch verringerte Produktion der Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$ . Es wurde auch gezeigt, dass T-Lymphozyten selber nicht in der Lage sind, die Aminosäure Glutamin zu produzieren (Rohde et al 1996). Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen jedoch, dass die GGT-abhängige Inhibition der T-Zell-Proliferation nicht durch eine Depletion des Glutamins aus dem Medium verursacht wurde, da eine Zugabe von Glutamin zur vorbehandelten Probe nach Hitzeinaktivierung der GGT und vor Zugabe zu den T-Zellen den proliferationshemmenden Effekt nicht aufhob.

2.) die Entstehung proliferationshemmender Verbindungen durch Reaktion der HP GGT mit Glutamin. Die GGT Reaktion stellt eine Transpeptidierung dar, bei der in Folge einer 2-Schritt-Reaktion („Ping-Pong-Mechanismus“) die  $\gamma$ -Glutamyl-Gruppe eines Donors wie Glutathion oder anderer  $\gamma$ -Glutamyl-Verbindungen, z.B. Glutamin (Tate et al 1974a; Allison et al 1981) auf einen Akzeptor, z.B. Aminosäuren, Dipeptide und Wasser (Tate et al 1974b; Hanes et al 1950), übertragen wird (siehe Abb. 42). Dieser Akzeptor beschleunigt die GGT Reaktion dadurch, dass das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite verschoben wird. Die Abb. 42 zeigt den Ablauf einer solchen Reaktion der GGT mit Glutamin als Substrat.

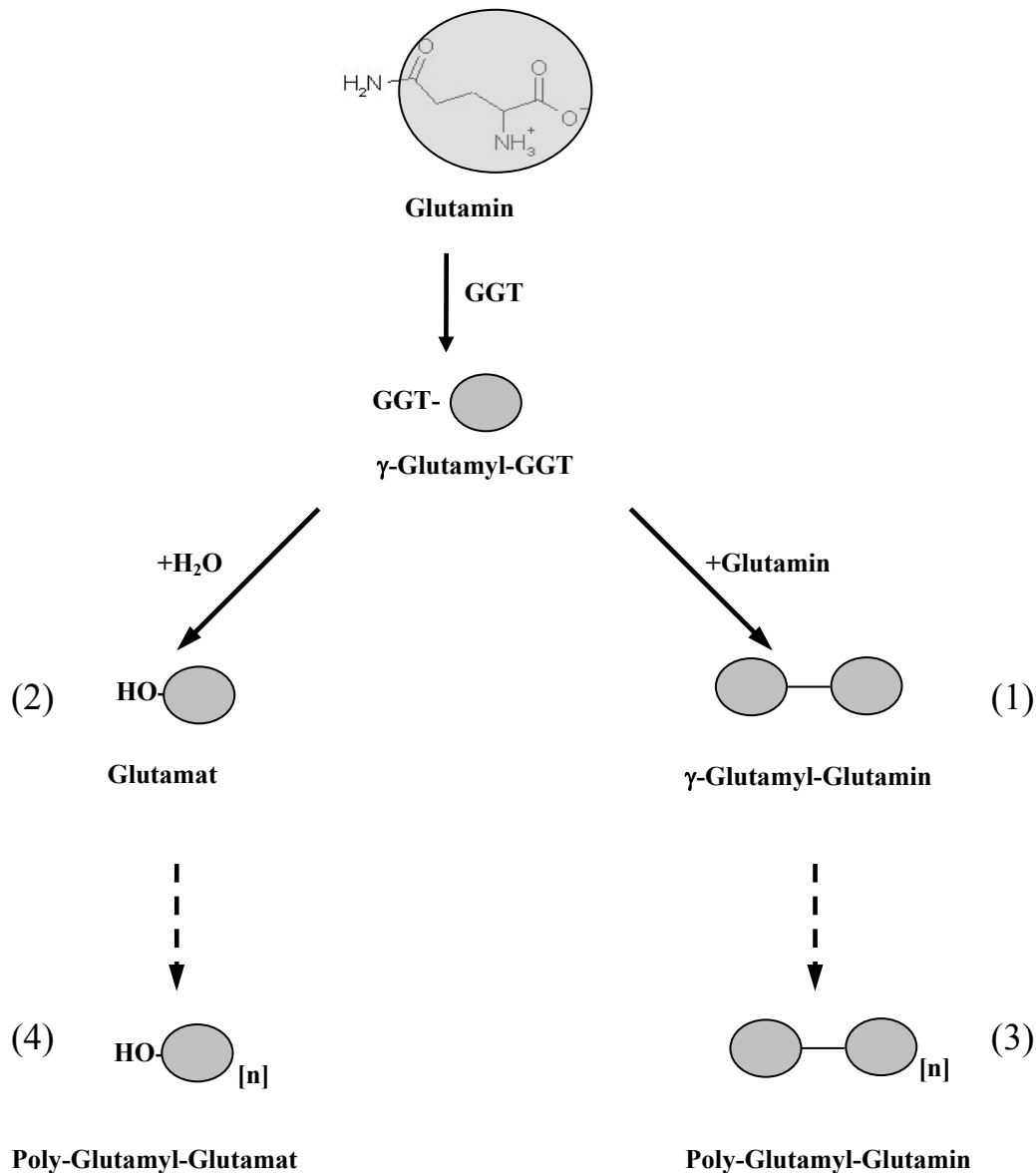


Abb. 45: Reaktion der  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase mit Glutamin; grau markiert,  $\gamma$ -Glutamyl-Rest des Glutamins.

Aufgrund des Reaktionsschemas (siehe Abb. 42) sind verschiedene Produkte einer Reaktion der HP GGT mit Glutamin in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O denkbar:

**a) Glutamin ist gleichzeitig  $\gamma$ -Glutamyl-Donor und -Akzeptor:**

Bei dieser Konstellation wäre die Entstehung von  $\gamma$ -Glutamyl-Glutamin zu erwarten (siehe Abb. 42; (1)). Dies wurde in Versuchen mit GGT aus Rattenniere bereits bestätigt (Tate et al 1974a). Darüber hinaus kann es jedoch bei der Funktion von  $\gamma$ -Glutamyl-Glutamin als Akzeptor auch zur Entstehung von Tri- und in gleicher Weise auch zur Bildung höherer Oligo- und Poly-Glutamyl-Peptide kommen (Abb. 42, (3)).

In Versuchen mit T-Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen von  $\gamma$ -Glutamyl-Glutamin behandelt wurden, zeigte sich keine Inhibition der Zellproliferation. Dieses zu erwartende Produkt der GGT Reaktion mit Glutamin ist für die Inhibition der T-Zell-Proliferation also nicht verantwortlich.

#### **b) Glutamin ist $\gamma$ -Glutamyl-Donor und $H_2O$ ist $\gamma$ -Glutamyl-Akzeptor**

Aus dieser Konstellation wäre zum einen die Entstehung von Glutamat durch Übertragung der  $\gamma$ -Glutamyl-Gruppe von Glutamin auf Wasser denkbar (siehe Abb. 42, (2)) und zum anderen auch die Entstehung weiterer Peptide bei der Funktion von Glutamat als Akzeptor (siehe Abb. 42, (4)). In Versuchen mit EL-4 T-Zellen und humanen PBMC, die mit verschiedenen Konzentrationen von Glutamat behandelt wurden, war die Proliferationsrate jedoch nicht vermindert.

Es wären weitere Versuche nötig, um die für den Hemmeffekt der *H. pylori* GGT verantwortliche(n), im Medium entstehende(n) Komponente(n) weiter aufzureinigen und zu identifizieren. Hierbei wären massenspektrometrische Analysen von mit der HP GGT vorbehandelten Glutamin-Proben eine viel versprechende Möglichkeit. Es ist denkbar, dass innerhalb der GGT Reaktion mit Glutamin entstehende Oligo- und/oder Polypeptide (siehe oben a, b) oder auch ein Gemisch dieser Verbindungen für die Inhibition der T-Zell-Proliferation verantwortlich sind.

### **5.5. GGT aus *H. pylori* induziert $G_1$ -Zellzyklusarrest in T-Lymphozyten.**

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen, dass wichtige Aktivierungsmechanismen der T-Zellen bei Inkubation mit den verwendeten HP Überständen und auch der GGT aus *H. pylori* intakt sind, da sowohl die Expression der Oberflächenantigene CD69 und CD25 (IL-2-Rezeptor  $\alpha$ -Kette) als auch die sezernierten Mengen der Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  nicht vermindert sind (Gerhard et al 2005). Im Einklang damit zeigten *in vivo* Untersuchungen eine verstärkte Aktivierung (z.B. Expression von CD69) von T-Zellen bei Infektion mit *H. pylori* im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle (Terres et al 1998; Strömberg et al 2003).

Durch Stimulation von T-Zellen mit Phorbolestern wie z.B. PMA werden bestimmte Signalwege und -moleküle aktiviert. Dazu gehören z.B. die Proteinkinasen PKC, PKA und PKB, die Phosphatidylinositol-Kinase (PI3K) oder auch das kleine G-Protein Ras (Miyamoto



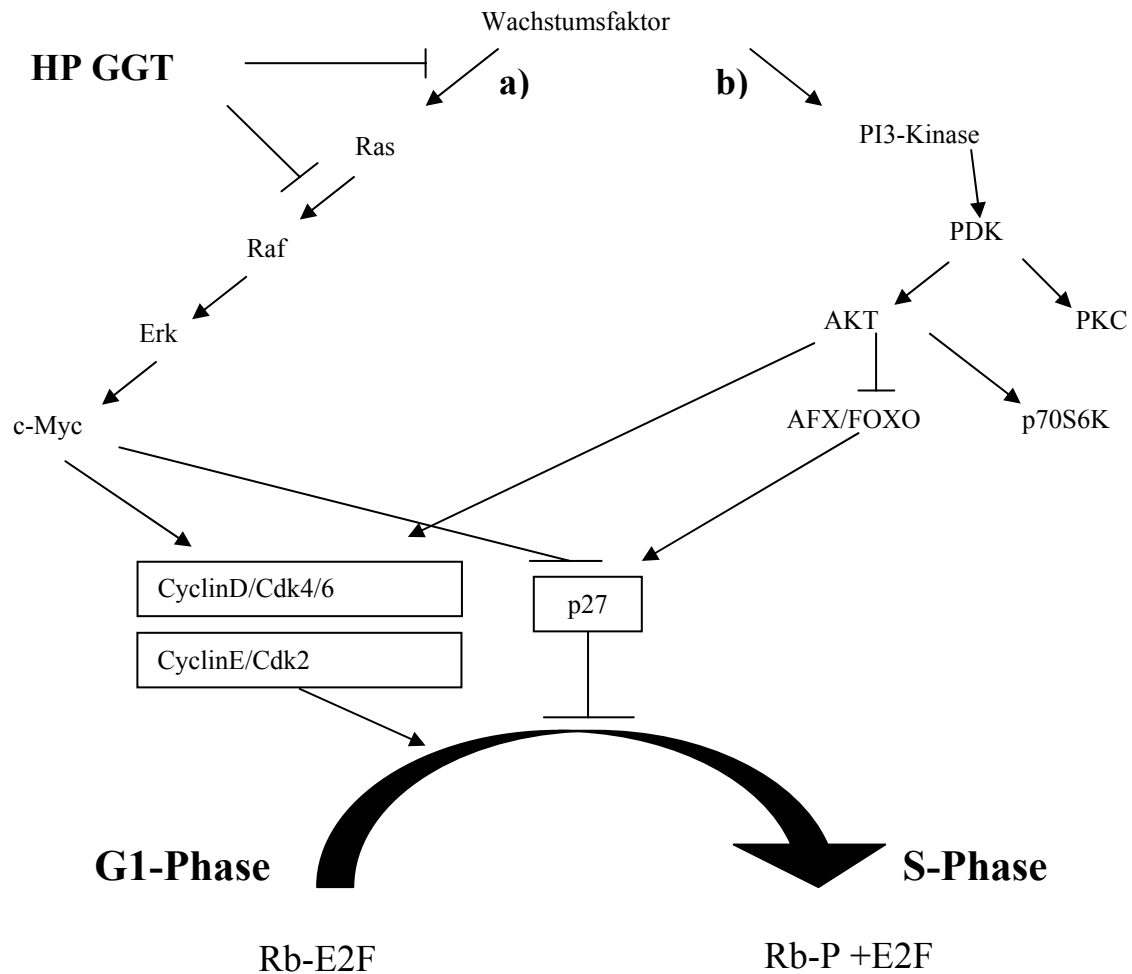
et al 2000). Versuche mit spezifischen Inhibitoren verschiedener Signalmoleküle wie z.B. der p70S6 Kinase zeigten keine Veränderung des proliferationshemmenden Effekts der HP Kulturüberstände gegenüber T-Zellen. Die Inhibierung der T-Zell-Proliferation durch HP Überstände beruht folglich nicht auf einer Aktivierung sondern einer Hemmung von Signalwegen.

In dieser Doktorarbeit zeigte sich die Induktion eines Arrests in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus von T-Lymphozyten als Ursache der beschriebenen Inhibition der T-Zell-Proliferation durch die GGT aus *H. pylori*. Dieser G<sub>1</sub>-Arrest war charakterisiert durch verstärkte Bildung des Cdk-Inhibitors p27 sowie verminderte Bildung von Cyclinen und cyclinabhängigen Kinasen und eine reduzierte Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (Rb). Bei Immunpräzipitation des p27 Proteins aus T-Zellen, die mit HP Überständen inkubiert wurden, zeigte sich darüber hinaus ein geringeres Ausmaß der Phosphorylierung dieses Proteins am Aminosäurerest Threonin (Thr) 187 in Anwesenheit von szernierten Proteinen aus *H. pylori*. Aus Untersuchungen mit verschiedenen Mutanten des p27 Proteins ist bekannt, dass der Abbau dieses Proteins von dessen Phosphorylierung am Aminosäurerest Thr187 abhängig war (Vlach et al 1997). Eine verminderte Phosphorylierung des Thr187-Rests von p27 bei Inkubation von T-Zellen mit *H. pylori* Überständen deutet daher auf ein geringeres Ausmaß an p27-Abbau als Ursache für die erhöhten Mengen dieses Cdk-Inhibitors in T-Zellen hin. Die wichtige Rolle des Proteins p27 bei der Vermittlung der Proliferationshemmung wurde in Versuchen mit murinen p27 defizienten embryonalen Fibroblasten bestätigt, deren Proliferation im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp Zellen in geringerem Ausmaß gehemmt wurde. Der Hemmeffekt von *H. pylori* Überständen war in den p27 defizienten Zellen jedoch nicht völlig aufgehoben. Eine Erklärung dafür könnte die Anwesenheit weiterer Cdk-Inhibitoren wie z.B. p21 sein, welche in p27 defizienten Zellen vermehrt gebildet werden und p27 funktionell ersetzen können (Kwon et al 2002). Auch eine verminderte Produktion von Cyclin D3 in Anwesenheit höherer Konzentrationen des *H. pylori* Überstandes könnte für die Proliferationshemmung in Abwesenheit von p27 verantwortlich sein. Da es neben der *H. pylori*-abhängig vermehrten Produktion von p27 in T-Zellen auch zu einer Reduktion der zellulären Cyclin D3-Spiegel kam, wurde innerhalb dieser Doktorarbeit untersucht, inwieweit die Induktion des Zellzyklusarrests durch *H. pylori* von diesem Cyclin Protein abhängig war. Dazu wurden stabile T-Zellklone verwendet, welche Cyclin D3 überexprimierten (Hleb et al 2004). Es zeigte sich jedoch keine Veränderung der Hemmbarkeit dieser Zellen im Vergleich zu den unveränderten Wildtyp Zellen. Durch verstärkte Produktion von Cyclin D3 ließ sich also die Proliferationshemmung nicht aufheben. Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin,

dass die Ursache für die Inhibition der Zellproliferation durch die HP GGT zeitlich *vor* der Expression des *cyclinD3* Gens in der Zelle, also im Bereich der Transduktion von zellulären Wachstumssignalen von der Zellmembran in Richtung Zellkern liegt.

Verschiedene Signalwege beeinflussen die zellulären Spiegel von p27 sowie der Cycline A, D und E und spielen dadurch eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus. Im Vergleich zu cyclinabhängigen Kinasen (Cdk) sind Cycline relativ instabile und kurzlebige Proteine. Die Induktion, Synthese und Assemblierung dieser Cycline mit ihren katalytischen Partnern hängt entscheidend von der Anwesenheit eines mitogenen oder wachstumsfaktorabhängigen Stimulus ab (Sherr 1994). Von zentraler Bedeutung bei diesen Prozessen ist der Ras-abhängige Signalweg. Eine Stimulation quiescenter Zellen mit mitogenen Liganden wie z.B. Wachstumsfaktoren oder Interleukinen führt zu schneller Aktivierung von Ras (Takuwa et al 2001). Darüber hinaus kommt es bei Stimulation von PBMC mit Phorbolestern wie z.B. PMA zur Hemmung der Aktivität des Ras-GAP (GTPase activating protein) Proteins. Dies hat wiederum die Aktivierung von Ras zur Folge (Downward et al 1990). Ein weiterer wichtiger Effektorsignalweg wird über die Lipidkinase PI3-Kinase vermittelt. Im Unterschied zu Fibroblasten wurde für T-Zellen gezeigt, dass die Aktivierung von AKT über die PI3-Kinase unabhängig vom Ras-Signalweg verläuft (Genot et al 1998; Genot et al 1996; siehe Abb. 43). Eine Aktivierung des PI3-Kinase Signalweges führt zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung verschiedener Proteine wie z.B. des AKT/Proteinkinase B Proteins (Burgering et al 1995; Abb. 43 b) und der p70s6 Kinase (Cheatham et al 1994; siehe Abb. 43). Das AKT Protein phosphoryliert selbst mehrere Substrate wie z.B. die Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), das proapoptotische Protein Bcl-2 (Takuwa et al 2001) und Mitglieder der Forkhead Transkriptionsfaktorfamilie wie z.B. AFX/FKHR (FOXO) (Brunet et al 1999; Rena et al 1999; Kops et al 1999). Die Phosphorylierung dieser Transkriptionsfaktoren durch AKT führt dazu, dass diese aus dem Zellkern transloziert werden, so dass es zur Aufhebung der Transkription des *p27* Gens kommt (Medema et al 2000, siehe Abb. 43). Bezüglich der Regulation von Cyclin D durch den PI3Kinase/AKT-Signalweg wurde gezeigt, dass die bei Inhibition von AKT nicht-phosphorylierte und damit aktivierte GSK-3 $\beta$  das Protein Cyclin D1 am Aminosäurerest Thr286 phosphoryliert und dadurch dessen Abbau einleitet (Diehl et al 1998).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch keine Veränderung der Aktivierung der Mitglieder des PI3Kinase-Signalweges AKT, FOXO3 und p70S6 Kinase. Dies deutet darauf hin, dass eine Störung dieses Signalweges nicht die Ursache für die Induktion des Zellzyklusarrests durch die HP GGT ist.



**Abb. 46: Einfluss der HP GGT auf Ras- und PI3-Kinase-Signalwege in T-Zellen.**

Die HP GGT induziert einen Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus von T-Lymphozyten. Diese Abb. stellt den Ansatzpunkt dieses Effekts dar. Für die Zellteilung ist unter anderem die Hyperphosphorylierung des Retinoblastoma (Rb) Proteins durch Komplexe aus Cyclinen und Cdk Proteinen wichtig. Dadurch kommt es zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F, welcher die Expression von Genen, die für den Ablauf der S-Phase des Zellzyklus wichtig sind, induziert. Das Fortschreiten des Zellzyklus wird durch Cdk-Inhibitoren (u. a. p27) antagonisiert. Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen eine Interaktion der HP GGT mit Signalwegen upstream von diesen Prozessen. Mögliche Ziele des HP GGT Effekts sind der Ras-abhängige- sowie auch der PI3Kinase-Signalweg zellulärer Wachstumsfaktoren. Die Komponenten des PI3K-Signalweges wie z.B. die p70S6 Kinase wurden durch die GGT nicht antagonisiert. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine GGT-abhängig verminderte Aktivierung der Komponenten des Ras-Signalweges cRaf, Erk1/2 und c-Myc. Rb, Retinoblastoma Protein.

Eine Aktivierung der Proteine Raf und Erk durch Ras führt zur Akkumulierung des Cyclin D Proteins (Peeper et al 1997; siehe Abb. 43 a) und darüber hinaus zur Abnahme der zellulären Spiegel des p27 Proteins (Aktas et al 1997). In Zellen, die eine dominant negative Ras Mutante exprimierten, zeigte sich auch eine vollständig blockierte Phosphorylierung des Rb Proteins, was darauf hindeutete, dass Ras eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung des Rb Proteins im Verlauf des Zellzyklus spielt (Takuwa et al 1997). In Übereinstimmung mit einer

Beteiligung des Ras-Signalweges an der Vermittlung des proliferationshemmenden Effekts durch die GGT aus *H. pylori* zeigte sich innerhalb dieser Doktorarbeit, dass die HP GGT-abhängige Reduktion der Proteinspiegel der Cycline A, D3 und E1 sowie die vermehrte Bildung des p27 Proteins begleitet waren von reduzierter Phosphorylierung der Mitglieder des Ras-Signalweges c-Raf und Erk (siehe Abb. 43). Ferner war die Aktivität des kleinen G-Proteins Ras bei Inkubation von PBMC mit der rekombinanten HP GGT im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Diese Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung des Ras/Raf/MAPK-Signalweges bei der Vermittlung des Zellzyklusarrests durch die GGT von *H. pylori* auf T-Zellen schließen. Darüber hinaus zeigte sich, dass auch die zellulären Spiegel des c-Myc Proteins und der Cyclin-abhängigen Kinasen Cdk2 und Cdk4 bei Inkubation mit der GGT aus *H. pylori* reduziert waren, was ebenfalls durch Störung des Ras-Signalweges durch die HP GGT erklärt werden kann. Wie bereits erwähnt zeigte sich bei Inkubation von T-Zellen mit dem Sekretionsprodukt von *H. pylori* eine verminderte Phosphorylierung des p27 Proteins. Die Phosphorylierung von p27 an Position Thr187 wird durch den Cyclin E-Cdk2-Komplex katalysiert und bewirkt den verstärkten proteasomalen Abbau von p27. Eine Erklärung für die verminderte p27-Phosphorylierung wäre daher die beobachtete GGT-abhängige Reduktion der zellulären Spiegel an Cyclin E und Cdk 2. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen darüber hinaus eine GGT-abhängige Reduktion des c-Myc Proteins in T-Zellen. Es ist bekannt, dass die Induktion des Ras-Signalweges auch zur verstärkten Synthese des c-Myc Proteins führt (Kerkhoff et al 1998); siehe Abb. 43). Eine Antagonisierung des Ras-Signalweges durch die HP GGT wäre also eine Erklärung für die beobachtete Abnahme der zellulären c-Myc-Spiegel. c-Myc ist ein nukleäres Phosphoprotein, welches transkriptionell Gene mit wichtigen Funktionen u.a. bei Zellzyklus, Zellwachstum, Transformation und Apoptose reguliert (Oster et al 2002). Es wurde gezeigt, dass c-Myc die Expression des *p27*-Gens durch direkte Bindung in der *p27* Promoterregion unterdrückt (Yang et al 2001). Aufgrund dessen kann es zur Aufhebung eines durch p27 induzierten Zellzyklusarrests durch c-Myc kommen (Vlach et al 1996). Darüber hinaus wurde auch das *cdk4* Gen als transkriptionelles Target von c-Myc identifiziert (Hermeking et al 2000). Innerhalb der vorliegenden Doktorarbeit zeigte sich im Einklang damit neben der Reduktion der zellulären c-Myc-Spiegel auch eine HP GGT-abhängige Abnahme des Gehalts der Zellen am Protein Cdk 4. Eine weitere Studie an c-Myc<sup>-/-</sup>-Zellen lieferte Hinweise, dass auch *in vivo* p27 und die Cyclin D-Cdk4-Aktivität durch c-Myc unterdrückt werden und c-Myc eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielt (Mateyak et al 1999).

Die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit deuten daher auf eine Inhibition des Ras-Signalweges in T-Zellen durch die GGT aus *H. pylori* als Ursache für die beobachtete Inhibition der T-Zell-Proliferation durch dieses Protein hin. Die Antagonisierung eines frühen Ereignisses des Ras-Signalweges (u.a. c-Raf-Phosphorylierung, siehe Abb. 43) durch die HP GGT führt zur verminderten Produktion der Proteine Cyclin D und c-Myc. In Folge dessen kommt es zur verminderten Phosphorylierung des Rb und p27 Proteins durch Cyclin-Cdk-Komplexe. Dieser Prozess bewirkt schließlich die Auslösung des in dieser Doktorarbeit beschriebenen Arrests in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus von T-Lymphozyten durch die GGT von *H. pylori*.

Im Unterschied zur GGT aus *H. pylori* bewirkte eine in dieser Arbeit verwendete GGT aus Pferdeniere keine Reduktion der Phosphorylierung von cRaf oder des zellulären Spiegels an Cyclin E. Dies bestätigt Ergebnisse von Proliferationsmessungen, die zeigten, dass es sich bei der Induktion des Zellzyklusarrests um einen *H. pylori*-spezifischen Effekt der GGT handelt.

### **5.6. *In vivo* Relevanz des Effekts der *H. pylori* GGT.**

Diese Doktorarbeit liefert deutliche Hinweise für die Abhängigkeit des durch *H. pylori* induzierten G<sub>1</sub>-Arrests in T-Zellen von der GGT-Aktivität der Bakterien. Diese Ergebnisse wurden jedoch durch *in vitro* Versuche an verschiedenen T-Zelllinien und primären Lymphozyten erhalten. Ein Problem bei der Anwendung von *in vitro* Systemen ist deren eingeschränkte Übertragbarkeit auf die Situation *in vivo*. *In vitro* werden die Zellen z.B. in definierten Nährmedien gezüchtet. Darüber hinaus werden einzelne Zelltypen, wie hier T-Lymphozyten, getrennt von anderen Zelltypen inkubiert, welche *in vivo* dagegen ständig vorhanden sind wie z.B. weitere Bestandteile des Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen, B-Zellen usw., aber auch Erythrozyten, Thrombozyten u.a. Mögliche Interaktionen zwischen diesen Zellen und deren Rolle bei den untersuchten Mechanismen können mit *in vitro* Systemen nur eingeschränkt berücksichtigt werden. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit und von im Zusammenhang mit dieser Arbeit durchgeführten Versuchen lassen jedoch auch auf eine *in vivo* Relevanz der beschriebenen Effekte der *H. pylori* GGT schließen. Zunächst zeigten Western-Blot Versuche mit Seren von *H. pylori* infizierten und nicht-infizierten Patienten nur bei ersteren eine Antikörperreaktion gegen die GGT aus *H. pylori*. Es muss daher zu einem Kontakt der von *H. pylori* sezernierten GGT mit antigenpräsentierenden Zellen sowie B- und T-Zellen in der Magenmukosa HP-infizierter Patienten kommen. Trotz dieser Antikörperproduktion ist das Immunsystem des Menschen jedoch nicht in der Lage, die Infektion mit *H. pylori* erfolgreich zu bekämpfen (Blaser et al

2004). Ein Grund dafür könnte die in der vorliegenden Arbeit gezeigte GGT-abhängige Inhibition der T-Zell-Proliferation durch *H. pylori* sein, durch die eine effiziente T-Zellantwort auf *H. pylori* verhindert wird. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass T-Zellen bei der Bekämpfung der Infektion mit *H. pylori* eine entscheidende Rolle spielen (Ermak et al 1998).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen immunsuppressiven Effekt der GGT aus *H. pylori*. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Inhibition von T-Zell-Funktionen werden u.a. die Substanzen Cyclosporin A (CsA) und Rapamycin bei der Organtransplantation eingesetzt (Bierer et al 1993; Dumont et al 1996). Bezüglich der Funktion dieser beiden Immunsuppressiva wurde gezeigt, dass Cyclosporin A an ein Rezeptormolekül (Cyclophilin A) bindet, wodurch es zur Inhibition der Phosphatase Calcineurin kommt. In Folge dessen wird die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT (nuclear factor of activated T cells) vom Zytoplasma in den Zellkern gehemmt. Dieser Prozess hat eine verminderte Aktivierung der T-Zellen sowie reduzierte Transkription von Zytokingenen (u.a. IL-2) durch NFAT und konsequenterweise einen Wachstumsarrest von T-Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus zur Folge (Liu et al 1991; Flanagan et al 1991; Crabtree 1999; Schreiber et al 1992). Im Gegensatz zu Cyclosporin A induziert die GGT aus *H. pylori* keine Hemmung der nukleären Translokation von NFAT. Es kommt daher auch nicht zu der bei CsA beobachteten Inhibition der Zytokinsekretion durch die GGT in T-Zellen.

Für Rapamycin wurde unter anderem die Inhibition der p70S6Kinase durch Bindung an den zytosolischen Rezeptor FKBP12 gezeigt (Kuo et al 1992). Ein weiteres Kennzeichen der Inhibition der T-Zell-Proliferation durch diese Substanz ist die Induktion eines G<sub>1</sub>-Zellzyklusarrests, der durch eine Reduktion der Cyclin D3-Spiegel und verminderte Cdk-Aktivität sowie auch erhöhte Mengen des Cdk-Inhibitors p27Kip1 gekennzeichnet ist (Luo et al 1996; Nourse et al 1994). Durch Überexpression des Cyclin D3 Proteins konnte der Rapamycin-induzierte Zellzyklusarrest in T-Zellen antagonisiert werden (Hleb et al 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen übereinstimmend mit einem anderen Mechanismus der Immunsuppression der HP GGT keine Inhibition der p70S6 Kinaseaktivität. Darüber hinaus war der GGT-induzierte G<sub>1</sub>-Arrest in T-Zellen nicht durch Überexpression von Cyclin D3 antagonisierbar. Die Suppression der T-Zell-Antwort durch die GGT aus *H. pylori* beruht daher auf einem neuartigen Mechanismus, der nicht dem Mechanismus bisher häufig angewendeter Immunsuppressiva entspricht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ferner, dass die katalytische Aktivität des GGT Enzyms für die Hemmung der Lymphozytenproliferation durch *H. pylori* essentiell ist. Aktivitätstests mit der GGT aus *H. pylori* zeigten bei verschiedenen pH-Werten deutlich vorhandene Enzymaktivität in einem Bereich von pH 2-10. Es ist bekannt, dass der pH-Wert im Bereich der Magenschleimhaut, wo *H. pylori* persistiert, in einem Bereich von 7 liegt (Sachs et al 2003; Machen et al 1987). Es ist daher davon auszugehen, dass die von *H. pylori* sezernierte GGT auch *in vivo*, am Ort der Infektion, katalytisch und damit auch potentiell proliferationshemmend aktiv ist.

Hinsichtlich der klinischen Relevanz liefert diese Doktorarbeit damit eine neue Perspektive bei der Behandlung von *H. pylori* assoziierten Erkrankungen wie z.B. Magengeschwüren und distalen Adenokarzinomen des Magens. In der Vergangenheit ist die Resistenz von *H. pylori* gegenüber der Therapie mit Antibiotika zu einem stetig wachsenden Problem geworden. Die Resistenz der Bakterien gegenüber allgemein verwendeten Antibiotika wie Metronidazol und Clarithromycin hat in vielen Gegenden einen Prozentsatz zwischen 20 und 40% erreicht (Glupczynski et al 2001). Die Entwicklung eines synthetischen Inhibitors der GGT aus *H. pylori* wäre daher ein großer Durchbruch im Rahmen der modernen Therapie *H. pylori* induzierter Erkrankungen. Die glutaminanaloge Verbindung Acivicin ist als Inhibitor dieses Enzyms bekannt und bewirkte auch innerhalb dieser Doktorarbeit eine Aufhebung der GGT-Aktivität sowie der GGT-vermittelten Inhibition der T-Zell-Proliferation. Der Hemmeffekt von Acivicin ist jedoch nicht spezifisch gegenüber der GGT, sondern wurde auch bei anderen Enzymen wie glutaminabhängigen Aminotransferasen und Carbamoylphosphatsynthetasen gezeigt (Neil et al 1979; Casey et al 1983). Daher wären weiterführende Untersuchungen auf der Grundlage der Bindung synthetischer Verbindungen an das katalytische Zentrum der HP GGT sinnvoll, um selektive Inhibitoren dieses Enzyms zu identifizieren. Darüber hinaus wäre auch die Vakkzinierung gegen die GGT ein alternativer Therapieansatz. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mit dem hier verwendeten Epitop der HP GGT in Kaninchen eine starke Antikörperreaktion induziert wurde. Die Untersuchung ähnlicher Mechanismen beim Menschen wäre daher eine weitere Möglichkeit. Bei weitergehender Identifizierung der für die T-Zell-Inhibition entscheidenden und an der GGT Reaktion beteiligten Substanzen könnte eine Substitution dieser Verbindungen schließlich bei der Überwindung der Infektion mit *H. pylori* von Nutzen sein.

## 6. Zusammenfassung

Weltweit sind 50% der Bevölkerung mit dem Bakterium *H. pylori* infiziert, wobei die Infektionsrate in Entwicklungsländern noch deutlich höher (> 80%) liegt. Die chronische Persistenz dieses Keims in der Magenschleimhaut kann unbehandelt zur Ausbildung von Magenschleimhautentzündungen, Magengeschwüren und Magenkrebs führen. Grundlage dieser Persistenz ist die Produktion des Enzyms Urease, mit der sich *H. pylori* vor der toxischen Magensäure schützt. Im Verlauf einer mehr als 10000 jährigen Koexistenz hat das Bakterium offensichtlich aber auch Mechanismen entwickelt, um den immunologischen Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus (u.a. Antikörperproduktion, Entzündungsreaktion) zu entgehen.

Die vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Frage, warum das Immunsystem des Menschen nicht in der Lage ist, die Infektion mit *H. pylori* zu eliminieren, obwohl bei infizierten Patienten die Einwanderung von Immunzellen in die Magenschleimhaut sowie auch die Produktion von *H. pylori* spezifischen Antikörpern nachweisbar ist. In bisherigen Studien wurde *in vivo* eine reduzierte Proliferation von T-Lymphozyten in der Magenschleimhaut von *H. pylori* infizierten Patienten nachgewiesen. Darüber hinaus wurde *in vitro* eine Inhibition der Proliferation von T-Lymphozyten durch *H. pylori* Bakterien beschrieben.

Pilotversuche zu Beginn dieser Arbeit konnten zeigen, dass nicht nur intakte *H. pylori* Bakterien sondern auch Kulturüberstände, welche die sezernierten Produkte der Bakterien enthalten, die Vermehrung von T-Zellen hemmen. Weitere Versuche ergaben auch bei räumlicher Trennung der Bakterien von den T-Zellen eine Inhibition der Proliferation und zeigten, dass eine Behandlung der bakteriellen Kulturüberstände mit Proteinasen zur Aufhebung des inhibitorischen Effekts führte. Folglich handelte es sich bei dem für die Inhibition der Lymphozytenproliferation verantwortlichen Faktor aus *H. pylori* um ein sezerniertes Protein. Durch proteinbiochemische Auftrennung des Sekretionsprodukts der Bakterien wurde eine Eingrenzung der in Frage kommenden Proteine auf einen Größenbereich von 29-66 kDa erreicht.

Der inhibitorische Faktor wurde schließlich als  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase (GGT) identifiziert. Dies gelang zum einen durch Herstellung von GGT defizienten *H. pylori*



Stämmen, deren Kulturüberstände den proliferationshemmenden Effekt gegenüber T-Zellen nicht zeigten. Zum anderen wurde die Proliferation der T-Lymphozyten auch durch eine rekombinant in *E. coli* exprimierte *H. pylori* GGT in dosisabhängiger Weise antagonisiert. Die vorliegende Arbeit liefert eindeutige Hinweise darauf, dass die katalytische Aktivität der GGT aus *H. pylori* für die Inhibition der T-Zell-Proliferation von entscheidender Bedeutung ist, denn eine enzymatisch inaktive Mutante dieses Proteins zeigte diesen Effekt nicht. Die Inkubation der GGT mit einem synthetischen Inhibitor bewirkte ebenfalls die Aufhebung der proliferationshemmenden Aktivität. Zusätzliche Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der *H. pylori* GGT führten zur Identifizierung der Aminosäure Glutamin als das für die Inhibition der Lymphozytenproliferation entscheidende Substrat.

Als Ursache der reduzierten Proliferation zeigte sich die Induktion eines Arrests in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus von T-Zellen. Dieser Arrest war gekennzeichnet durch verstärkte Produktion des Cdk-Inhibitors p27Kip1 sowie durch reduzierte zelluläre Spiegel verschiedener Cycline und des Rb Proteins, die für den Ablauf des Zellzyklus von entscheidender Bedeutung sind. Weitergehende Untersuchungen demonstrierten eine Störung der Ras-abhängigen Übertragung von Wachstumsfaktorsignalen durch die *H. pylori* GGT als Ausgangspunkt für das Auftreten des Zellzyklusarrests.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen die besondere Relevanz der GGT-abhängigen Inhibition der T-Zell-Proliferation durch *H. pylori*. So ist dieses Enzym auch im Bereich niedriger pH-Werte der Magenschleimhaut (pH 2-10) aktiv. Ferner konnte eine Interaktion der GGT mit dem Immunsystem des Menschen gezeigt werden. Nur bei *H. pylori* infizierten Patienten wurden Antikörper gegen dieses Protein nachgewiesen.

Angesichts der zunehmenden Resistenz dieses Bakteriums gegenüber der konventionellen Therapie mit Antibiotika liefert die Entdeckung der GGT als immunsupprimierender Faktor Ansatzpunkte für alternative Strategien bei der Behandlung der *H. pylori* Infektion. Viel versprechende Möglichkeiten wären dabei die Entwicklung eines für die GGT aus *H. pylori* spezifischen Inhibitors sowie die Herstellung eines Vakkzins auf Basis dieses Enzyms. Aufgrund des im Vergleich zu etablierten Substanzen (z.B. Rapamycin, Cyclosporin A) unterschiedlichen Mechanismus der GGT-vermittelten Unterdrückung der Immunantwort liefert die GGT darüber hinaus interessante Ansatzpunkte für die Entwicklung neuartiger Immunsuppressiva.

## 7. Literaturverzeichnis

**Agarwal ML**, William R. Taylor, Michail V. Chernov, Olga B. Chernova, and George R. Stark The p53 Network. *J. Biol. Chem.*, Jan 1998; 273: 1 – 4

**Aghazadeh B**, Lowry WE, Huang XY, Rosen MK Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell*. 2000 Sep 1; 102(5):625-33.

**Akhiani AA**, Pappo J, Kabok Z, Schon K, Gao W, Franzen LE, Lycke N. Protection against *Helicobacter pylori* infection following immunization is IL-12-dependent and mediated by Th1 cells. *J Immunol*. 2002 Dec 15;169(12):6977-84.

**Akira S**, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jul;4(7):499-511.

**Aktas H**, Cai H, Cooper GM Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol*. 1997 Jul; 17(7):3850-7.

**Alegre ML**, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol*. 2001 Dec; 1(3):220-8.

**Algarte M**, Lecine P, Costello R, Plet A, Olive D, Imbert J. *In vivo* regulation of interleukin-2 receptor alpha gene transcription by the coordinated binding of constitutive and inducible factors in human primary T cells. *EMBO J*. 1995 Oct 16; 14(20):5060-72.

**Allen LA**. The role of the neutrophil and phagocytosis in infection caused by *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Infect Dis*. 2001 Jun;14(3):273-7.

**Allison RD**, Meister A. Evidence that transpeptidation is a significant function of gamma-glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem*. 1981 Mar 25; 256(6):2988-92.

**Amieva MR**, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S. Disruption of the epithelial apical junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science*. 2003 May 30; 300(5624):1430-4.

**Appelmelk BJ**, Martino MC, Veenhof E, Monteiro MA, Maaskant JJ, Negrini R, Lindh F, Perry M, Del Giudice G, Vandenbroucke-Grauls CM. Phase variation in H type I and Lewis a epitopes of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 2000 Oct; 68(10):5928-32.

**Aras RA**, Fischer W, Perez-Perez GI, Crosatti M, Ando T, Haas R, Blaser MJ. Plasticity of repetitive DNA sequences within a bacterial (Type IV) secretion system component. *J Exp Med*. 2003 Nov 3; 198(9):1349-60.

**Arellano M**, Moreno S. Regulation of Cdk/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997 Apr; 29(4):559-73.

**Aringer M**. T lymphocyte activation--an inside overview. *Acta Med Austriaca.* 2002; 29(1):7-13.

**Asahi M**, Azuma T, Ito S, Ito Y, Suto H, Nagai Y, Tsubokawa M, Tohyama Y, Maeda S, Omata M, Suzuki T, Sasakawa C. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Med.* 2000 Feb 21; 191(4):593-602.

**Assoian RK**, Zhu X. Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Feb; 9(1):93-8.

**Atherton JC**, Peek RM Jr, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 1997 Jan; 112(1):92-9.

**Atherton JC**, Tham KT, Peek RM Jr, Cover TL, Blaser MJ. Density of *Helicobacter pylori* infection *in vivo* as assessed by quantitative culture and histology. *J Infect Dis.* 1996 Sep; 174(3):552-6.

**Atherton JC**, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem.* 1995 Jul 28; 270(30):17771-7.

**Azuma T**, Suto H, Ito Y, Ohtani M, Dojo M, Kuriyama M, Kato T. Gastric leptin and *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 2001 Sep; 49(3):324-9.

**Bachmaier K**, Krawczyk C, Kozieradzki I, Kong YY, Sasaki T, Oliveira-dos-Santos A, Mariathasan S, Bouchard D, Wakeham A, Itie A, Le J, Ohashi PS, Sarosi I, Nishina H, Lipkowitz S, Penninger JM. Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature.* 2000 Jan 13; 403(6766):211-6.

**Backert S**, Kwok T, Schmid M, Selbach M, Moese S, Peek RM Jr, Konig W, Meyer TF, Jungblut PR. Subproteomes of soluble and structure-bound *Helicobacter pylori* proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics.* 2005 Apr; 5(5):1331-45.

**Backhed F**, Rokbi B, Torstensson E, Zhao Y, Nilsson C, Seguin D, Normark S, Buchan AM, Richter-Dahlfors A. Gastric mucosal recognition of *Helicobacter pylori* is independent of Toll-like receptor 4. *J Infect Dis.* 2003 Mar 1;187(5):829-36.

**Bamford** KB, Fan X, Crowe SE, Leary JF, Gourley WK, Luthra GK, Brooks EG, Graham DY, Reyes VE, Ernst PB. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology*. 1998 Mar; 114(3):482-92.

**Barnes** WM. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Mar 15; 91(6):2216-20.

**Bauerfeind** P, Garner R, Dunn BE, Mobley HL. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut*. 1997 Jan; 40(1):25-30.

**Betten** A, Bylund J, Cristophe T, Boulay F, Romero A, Hellstrand K, Dahlgren C. A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest*. 2001 Oct; 108(8):1221-8.

**Bhaskar** KR, Garik P, Turner BS, Bradley JD, Bansil R, Stanley HE, LaMont JT. Viscous fingering of HCl through gastric mucin. *Nature*. 1992 Dec 3; 360(6403):458-61.

**Bierer** BE, Hollander G, Fruman D, Burakoff SJ. Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology. *Curr Opin Immunol*. 1993 Oct;5(5):763-73.

**Blangy** A, Lane HA, d'Herin P, Harper M, Kress M, Nigg EA. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation *in vivo*. *Cell*. 1995 Dec 29; 83(7):1159-69.

**Blaser** MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest*. 2004 Feb; 113(3):321-33.

**Boncristiano** M, Paccani SR, Barone S, Ulivieri C, Patrussi L, Ilver D, Amedei A, D'Elios MM, Telford JL, Baldari CT. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1887-97.

**Boren** T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*. 1993 Dec 17; 262(5141):1892-5.

**Bradbury** EM, Inglis RJ, Matthews HR. Control of cell division by very lysine rich histone (F1) phosphorylation. *Nature*. 1974 Feb 1; 247(439):257-61.

**Bradford** MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7; 72:248-54.

- Brehm A**, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*. 1998 Feb 5; 391(6667):597-601.
- Breslauer KJ**, Frank R, Blocker H, Marky LA. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jun; 83(11):3746-50.
- Brooker S**, Whawell S, Kabatereine NB, Fenwick A, Anderson RM. Evaluating the epidemiological impact of national control programmes for helminths. *Trends Parasitol*. 2004 Nov; 20(11):537-45.
- Brunet A**, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999 Mar 19; 96(6):857-68.
- Buchkovich K**, Duffy LA, Harlow E. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell*. 1989 Sep 22; 58(6):1097-105.
- Bumann D**, Aksu S, Wendland M, Janek K, Zimny-Arndt U, Sabarth N, Meyer TF, Jungblut PR. Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 2002 Jul; 70(7):3396-403.
- Burgering BM**, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*. 1995 Aug 17; 376(6541):599-602.
- Busiello I**, Acquaviva R, Di Popolo A, Blanchard TG, Ricci V, Romano M, Zarrilli R. *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase upregulates COX-2 and EGF-related peptide expression in human gastric cells. *Cell Microbiol*. 2004 Mar; 6(3):255-67.
- Carnero A**, Hannon GJ. The INK4 family of Cdk inhibitors. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1998; 227:43-55.
- Casey C.A.**, Anderson P.M. Glutamine- and N-acetyl-L glutamate-dependent carbamoyl phosphate synthetase from *Micropterus salmoides*. Purification, properties, and inhibition by glutamine analogs. *J Biol Chem* 1983 Jul 25;258(14):8723-32.
- Catane R**, Von Hoff DD, Glaubiger DL, Muggia FM. Azaserine, DON, and azotomycin: three diazo analogs of L-glutamine with clinical antitumor activity. *Cancer Treat Rep*. 1979 Jun; 63(6):1033-8.
- Censini S**, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 10; 93(25):14648-53.

**Cheatham B**, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol.* 1994 Jul;14(7):4902-11.

**Chen W**, Shu D, Chadwick VS. Inhibition of mitogen-induced murine lymphocyte proliferation by *Helicobacter pylori* cell-free extract. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000 Sep; 15(9):1000-6.

**Chevalier C**, Thiberge JM, Ferrero RL, Labigne A. Essential role of *Helicobacter pylori* gamma glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. *Mol Microbiol.* 1999 Mar; 31(5):1359-72.

**Chmiela M**, Paziak-Domanska B, Ljungh A, Wadstrom T, Rudnicka W. The proliferation of human T lymphocytes stimulated by *Helicobacter pylori* antigens. *Immunobiology.* 1996 Jul; 195(2):199-208.

**Christie PJ**, Vogel JP. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* 2000 Aug; 8(8):354-60.

**Clyne M**, Labigne A, Drumm B. *Helicobacter pylori* requires an acidic environment to survive in the presence of urea. *Infect Immun.* 1995 May; 63(5):1669-73.

**Conigrave KM**, Davies P, Haber P, Whitfield JB. Traditional markers of excessive alcohol use. *Addiction.* 2003 Dec;98 Suppl 2:31-43.

**Costello PS**, Walters AE, Mee PJ, Turner M, Reynolds LF, Prisco A, Sarnar N, Zamoyska R, Tybulewicz VL. The Rho-family GTP exchange factor Vav is a critical transducer of T cell receptor signals to the calcium, ERK, and NF-kappaB pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 16; 96(6):3035-40.

**Courvalin JC**, Segil N, Blobel G, Worman HJ. The lamin B receptor of the inner nuclear membrane undergoes mitosis-specific phosphorylation and is a substrate for p34cdc2-type protein kinase. *J Biol Chem.* 1992 Sep 25; 267(27):19035-8.

**Covacci A**, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N, et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jun 15; 90(12):5791-5.

**Covacci A**, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science.* 1999 May 21; 284(5418):1328-33.

**Cover TL**, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.* 1992 May 25; 267(15):10570-5.

- Crabtree** JE, Xiang Z, Lindley IJ, Tompkins DS, Rappuoli R, Covacci A. Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a *cagA* negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol*. 1995 Oct; 48(10):967-9.
- Crabtree** GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell*. 1999 Mar 5;96(5):611-4.
- Cuoco** L, Cammarota G, Jorizzo RA, Santarelli L, Cianci R, Montalto M, Gasbarrini A, Gasbarrini G. Link between *Helicobacter pylori* infection and iron-deficiency anaemia in patients with coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*. 2001 Dec; 36(12):1284-8.
- D'Ellos** MM, Amedei A, Manghetti M, Costa F, Baldari CT, Quazi AS, Telford JL, Romagnani S, Del Prete G. Impaired T-cell regulation of B-cell growth in *Helicobacter pylori*-related gastric low-grade MALT lymphoma. *Gastroenterology*. 1999 Nov; 117(5):1105-12.
- Davis** W Jr, Ronai Z, Tew KD. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Jan; 296(1):1-6.
- Diehl** JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*. 1998 Nov 15; 12(22):3499-511.
- Domschke** S, Domschke W. Gastroduodenal damage due to drugs, alcohol and smoking. *Clin Gastroenterol*. 1984 May; 13(2):405-36.
- Downward** J, Graves JD, Warne PH, Rayter S, Cantrell DA. Stimulation of p21ras upon T-cell activation. *Nature*. 1990 Aug 23; 346(6286):719-23.
- Dumont** FJ, Su Q. Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Life Sci*. 1996;58(5):373-95.
- Eaton** KA, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun*. 1991 Jul;59(7):2470-5.
- Eaton** KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun*. 1996 Jul;64(7):2445-8.
- Eaton** KA, Cover TL, Tummuru MK, Blaser MJ, Krakowka S. Role of vacuolating cytotoxin in gastritis due to *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun*. 1997 Aug;65(8):3462-4.

- Eaton KA**, Mefford M, Thevenot T. The role of T cell subsets and cytokines in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* gastritis in mice. *J Immunol*. 2001 Jun 15;166(12):7456-61.
- el-Deiry WS**, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):817-25.
- El-Omar EM**, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*. 2000 Mar 23;404(6776):398-402.
- Enarsson K**, Brisslert M, Backert S, Quiding-Jarbrink M. *Helicobacter pylori* induces transendothelial migration of activated memory T cells. *Infect Immun*. 2005 Feb;73(2):761-9.
- Ermak TH**, Giannasca PJ, Nichols R, Myers GA, Nedrud J, Weltzin R, Lee CK, Kleanthous H, Monath TP. Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J Exp Med*. 1998 Dec 21;188(12):2277-88.
- Evans DG**, Karjalainen TK, Evans DJ Jr, Graham DY, Lee CH. Cloning, nucleotide sequence, and expression of a gene encoding an adhesin subunit protein of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*. 1993 Feb;175(3):674-83.
- Falush D**, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Megraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang X, Achtman M, Suerbaum S. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*. 2003 Mar 7;299(5612):1582-5.
- Fan XJ**, Chua A, Shahi CN, McDevitt J, Keeling PW, Kelleher D. Gastric T lymphocyte responses to *Helicobacter pylori* in patients with *H. pylori* colonisation. *Gut*. 1994 Oct;35(10):1379-84.
- Feldmeier H**, Krantz I. The 'African enigma' - another explanation. *Nat Med*. 2000 Dec;6(12):1297-8.
- Flanagan WM**, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR. Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature*. 1991 Aug 29;352(6338):803-7.
- Fox JG**, Beck P, Dangler CA, Whary MT, Wang TC, Shi HN, Nagler-Anderson C. Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy. *Nat Med*. 2000 May;6(5):536-42.
- Foyne S**, Dorrell N, Ward SJ, Zhang ZW, McColm AA, Farthing MJ, Wren BW. Functional analysis of the roles of FliQ and FlhB in flagellar expression in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett*. 1999 May 1;174(1):33-9.



- Franchini M**, Veneri D. *Helicobacter pylori* infection and immune thrombocytopenic purpura: an update. *Helicobacter*. 2004 Aug;9(4):342-6.
- Gebert B**, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*. 2003 Aug 22;301(5636):1099-102.
- Genot E**, Cleverley S, Henning S, Cantrell D. Multiple p21ras effector pathways regulate nuclear factor of activated T cells. *EMBO J*. 1996 Aug 1;15(15):3923-33.
- Genot E**, Reif K, Beach S, Kramer I, Cantrell D. p21ras initiates Rac-1 but not phosphatidyl inositol 3 kinase/PKB, mediated signaling pathways in T lymphocytes. *Oncogene*. 1998 Oct 1;17(13):1731-8.
- Gerhard M**, Schmees C, Voland P, Endres N, Sander M, Reindl W, Rad R, Oelsner M, Decker T, Mempel M, Hengst L, Prinz C. A secreted low-molecular-weight protein from *Helicobacter pylori* induces cell-cycle arrest of T cells. *Gastroenterology*. 2005 May;128(5):1327-39.
- Giannini EG**, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*. 2005 Feb 1;172(3):367-79.
- Girard F**, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJ. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*. 1991 Dec 20;67(6):1169-79.
- Glotzer M**, Murray AW, Kirschner MW. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. 1991 Jan 10;349(6305):132-8.
- Glupczynski Y**, Megraud F, Lopez-Brea M, Andersen LP. European multicentre survey of *in vitro* antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001 Nov;20(11):820-3.
- Gobert AP**, McGee DJ, Akhtar M, Mendz GL, Newton JC, Cheng Y, Mobley HL, Wilson KT. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):13844-9.
- Gottlieb TM**, Oren M. p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol*. 1998;8(5):359-68.
- Graham DY**. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implications for therapy. *Gastroenterology*. 1998 Nov;115(5):1272-7.
- Gratzner HG**. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*. 1982 Oct 29;218(4571):474-5.

**Hafsi N**, Volland P, Schwendy S, Rad R, Reindl W, Gerhard M, Prinz C. Human dendritic cells respond to *Helicobacter pylori*, promoting NK cell and Th1-effector responses *in vitro*.

J Immunol. 2004 Jul 15;173(2):1249-57.

**Hanes CS**, Hird FJ. Synthesis of peptides in enzymic reactions involving glutathione.

Nature. 1950 Aug 19;166(4216):288-92.

**Hanigan MH**, Ricketts WA. Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express gamma glutamyl transpeptidase. Biochemistry. 1993 Jun 22;32(24):6302-6.

**Hanigan MH**, Frierson HF Jr. Immunohistochemical detection of gamma-glutamyl transpeptidase in normal human tissue. J Histochem Cytochem. 1996 Oct;44(10):1101-8.

**Hanigan MH**. gamma-Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis.

Chem Biol Interact. 1998 Apr 24;111-112:333-42.

**Hannon GJ**, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest.

Nature. 1994 Sep 15;371(6494):257-61.

**Harper JW**, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21.

Mol Biol Cell. 1995 Apr;6(4):387-400.

**Hartwell LH**, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events.

Science. 1989 Nov 3;246(4930):629-34.

**Heald R**, McKeon F. Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. Cell. 1990 May 18;61(4):579-89.

**Heneghan MA**, McCarthy CF, Moran AP. Relationship of blood group determinants on *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide with host lewis phenotype and inflammatory response.

Infect Immun. 2000 Feb;68(2):937-41.

**Hengst L**, Reed SI. Inhibitors of the Cip/Kip family. Curr Top Microbiol Immunol. 1998;227:25-41.

**Hermeking H**, Rago C, Schuhmacher M, Li Q, Barrett JF, Obaya AJ, O'Connell BC, Mateyak MK, Tam W, Kohlhuber F, Dang CV, Sedivy JM, Eick D, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of Cdk4 as a target of c MYC. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Feb 29;97(5):2229-34.

**Heukeshoven J**, Dernick R. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. Electrophoresis. 1988 Jan;9(1):28-32.

- Higashi H**, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, Hatakeyama M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*. 2002 Jan 25;295(5555):683-6.
- Hinds PW**, Mittnacht S, Dulic V, Arnold A, Reed SI, Weinberg RA. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell*. 1992 Sep 18;70(6):993-1006.
- Hleb M**, Murphy S, Wagner EF, Hanna NN, Sharma N, Park J, Li XC, Strom TB, Padbury JF, Tseng YT, Sharma S. Evidence for cyclin D3 as a novel target of rapamycin in human T lymphocytes. *J Biol Chem*. 2004 Jul 23;279(30):31948-55.
- Hoffmann I**, Clarke PR, Marcote MJ, Karsenti E, Draetta G. Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J*. 1993 Jan;12(1):53-63.
- Holcombe C**. *Helicobacter pylori*: the African enigma. *Gut*. 1992 Apr;33(4):429-31.
- Hruby Z**, Myszka-Bijak K, Gosciniak G, Blaszczyk J, Czyz W, Kowalski P, Falkiewicz K, Szymanska G, Przondo-Mordarska A. *Helicobacter pylori* in kidney allograft recipients: high prevalence of colonization and low incidence of active inflammatory lesions. *Nephron*. 1997;75(1):25-9.
- Hu LT**, Mobley HL. Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 1990 Apr;58(4):992-8.
- Huang M**, Wang J, Lee P, Sharma S, Mao JT, Meissner H, Uyemura K, Modlin R, Wollman J, Dubinett SM. Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res*. 1995 Sep 1;55(17):3847-53.
- International Agency for Research on Cancers**. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Geneva, World Health Organization, 1994: 61.
- Ikeda Y**, Fujii J, Anderson ME, Taniguchi N, Meister A. Involvement of Ser-451 and Ser-452 in the catalysis of human gamma-glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem*. 1995 Sep 22;270(38):22223-8.
- Ilver D**, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L, Boren T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*. 1998 Jan 16;279(5349):373-7.
- Isaacson PG**, Du MQ. MALT lymphoma: from morphology to molecules. *Nat Rev Cancer*. 2004 Aug;4(8):644-53.

**Janeway CA**, Travers P. Immunologie; 5. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag 2002.

**Jeffrey PD**, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massague J, Pavletich NP. Mechanism of Cdk activation revealed by the structure of a cyclinA-Cdk2 complex. *Nature*. 1995 Jul 27;376(6538):313-20.

**John S**, Reeves RB, Lin JX, Child R, Leiden JM, Thompson CB, Leonard WJ. 106. Regulation of cell-type specific interleukin-2 receptor alpha-chain gene expression: potential role of physical interactions between Elf-1, HMG-I(Y), and NF-kappa B family proteins. *Mol Cell Biol*. 1995 Mar;15(3):1786-96.

**Jones SM**, Kazlauskas A. Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. *FEBS Lett*. 2001 Feb 16;490(3):110-6.

**Jones AC**, Logan RP, Foynes S, Cockayne A, Wren BW, Penn CW. A flagellar sheath protein of *Helicobacter pylori* is identical to HpaA, a putative N-acetylneuraminyllactose-binding hemagglutinin, but is not an adhesin for AGS cells. *J Bacteriol*. 1997 Sep;179(17):5643-7.

**Karttunen R**. Blood lymphocyte proliferation, cytokine secretion and appearance of T cells with activation surface markers in cultures with *Helicobacter pylori*. Comparison of the responses of subjects with and without antibodies to *H. pylori*. *Clin Exp Immunol*. 1991 Mar;83(3):396-400.

**Kato J**, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase Cdk4. *Genes Dev*. 1993 Mar;7(3):331-42.

**Kerkhoff E**, Houben R, Loffler S, Troppmair J, Lee JE, Rapp UR. Regulation of c-myc expression by Ras/Raf signalling. *Oncogene*. 1998 Jan 15;16(2):211-6.

**Kersh EN**, Shaw AS, Allen PM. Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation. *Science*. 1998 Jul 24;281(5376):572-5.

**Kersulyte D**, Chalkauskas H, Berg DE. Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Mol Microbiol*. 1999 Jan;31(1):31-43.

**Kidd M**, Lastovica AJ, Atherton JC, Louw JA. Heterogeneity in the *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes: association with gastroduodenal disease in South Africa? *Gut*. 1999 Oct;45(4):499-502.

**Kidd P**. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev*. 2003 Aug;8(3):223-46.

**Kim N**, Weeks DL, Shin JM, Scott DR, Young MK, Sachs G. Proteins released by *Helicobacter pylori* *in vitro*. J Bacteriol. 2002 Nov;184(22):6155-62.

**Kimura K**, Tran LS, Uchida I, Itoh Y. Characterization of Bacillus subtilis gamma-glutamyltransferase and its involvement in the degradation of capsule poly-gamma-glutamate. Microbiology. 2004 Dec;150(Pt 12):4115-23.

**King RW**, Jackson PK, Kirschner MW. Mitosis in transition. Cell. 1994 Nov 18;79(4):563-71.

**Knipp U**, Birkholz S, Kaup W, Mahnke K, Opferkuch W. Suppression of human mononuclear cell response by *Helicobacter pylori*: effects on isolated monocytes and lymphocytes. FEMS Immunol Med Microbiol. 1994 Feb;8(2):157-66.

**Knipp U**, Birkholz S, Kaup W, Opferkuch W. Immune suppressive effects of *Helicobacter pylori* on human peripheral blood mononuclear cells. Med Microbiol Immunol (Berl). 1993 May;182(2):63-76.

**Knipp U**, Birkholz S, Kaup W, Opferkuch W. Partial characterization of a cell proliferation-inhibiting protein produced by *Helicobacter pylori*. Infect Immun. 1996 Sep;64(9):3491-6.

**Kops GJ**, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. Nature. 1999 Apr 15;398(6728):630-4.

**Koretzky GA**, Myung PS. Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins. Nat Rev Immunol. 2001 Nov;1(2):95-107.

**Koyama S**. Apoptotic depletion of infiltrating mucosal lymphocytes associated with Fas ligand expression by *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosal epithelium: human glandular stomach as a site of immune privilege. Dig Dis Sci. 2000 Apr;45(4):773-80.

**Kranzer K**, Eckhardt A, Aigner M, Knoll G, Deml L, Speth C, Lehn N, Rehli M, Schneider-Brachert W. Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by *Helicobacter pylori*. Infect Immun. 2004 Aug;72(8):4416-23.

**Kuo CJ**, Chung J, Fiorentino DF, Flanagan WM, Blenis J, Crabtree GR. Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. Nature. 1992 Jul 2;358(6381):70-3.

**Kwon YH**, Jovanovic A, Serfas MS, Kiyokawa H, Tyner AL. P21 functions to maintain quiescence of p27 deficient hepatocytes. J Biol Chem. 2002 Nov 1;277(44):41417-22.

**Labigne A**, Cussac V, Courcoux P. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J Bacteriol.* 1991 Mar;173(6):1920-31.

**Lecine P**, Algarte M, Rameil P, Beadling C, Bucher P, Nabholz M, Imbert J. Elf-1 and Stat5 bind to a critical element in a new enhancer of the human interleukin-2 receptor alpha gene. *Mol Cell Biol.* 1996 Dec;16(12):6829-40.

**Lee MH**, Reynisdottir I, Massague J. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.* 1995 Mar 15;9(6):639-49.

**Levine AJ**. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997 Feb 7;88(3):323-31.

**Lew DJ**, Kornbluth S. Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol.* 1996 Dec;8(6):795-804.

**Lingwood CA**, Wasfy G, Han H, Huesca M. Receptor affinity purification of a lipid-binding adhesin from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 1993 Jun;61(6):2474-8.

**Liu J**, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell.* 1991 Aug 23;66(4):807-15.

**Lombardi G**, Miglio G, Dianzani C, Mesturini R, Varsaldi F, Chiocchetti A, Dianzani U, Fantozzi R. Glutamate modulation of human lymphocyte growth: *in vitro* studies. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 May 28;318(2):496-502.

**Luo Y**, Marx SO, Kiyokawa H, Koff A, Massague J, Marks AR. Rapamycin resistance tied to defective regulation of p27Kip1. *Mol Cell Biol.* 1996 Dec;16(12):6744-51.

**Macdonald TT**. The worm turns on *Helicobacter pylori*. *Gut.* 2001 Jan;48(1):10-1.

**Machen TE**, Paradiso AM. Regulation of intracellular pH in the stomach. *Annu Rev Physiol.* 1987;49:19-33.

**Mahdavi J**, Sonden B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Angstrom J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraja S, Wadstrom T, Kersulyte D, Berg DE, Dubois A, Petersson C, Magnusson KE, Norberg T, Lindh F, Lundskog BB, Arnqvist A, Hammarstrom L, Boren T. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science.* 2002 Jul 26;297(5581):573-8.

**Malfertheiner P**, Megraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, Graham DY, Tytgat G; European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPSG). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002 Feb;16(2):167-80.

**Mannick EE**, Bravo LE, Zarama G, Realpe JL, Zhang XJ, Ruiz B, Fontham ET, Mera R, Miller MJ, Correa P. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res.* 1996 Jul 15;56(14):3238-43.

**Marshall BJ**, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 1984 Jun 16;1(8390):1311-5.

**Marshall BJ**, Warren JR. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet.* 1983 Jun 4;1(8336):1273-5.

**Mateyak MK**, Obaya AJ, Sedivy JM. c-Myc regulates cyclin D-Cdk4 and -Cdk6 activity but affects cell cycle progression at multiple independent points. *Mol Cell Biol.* 1999 Jul;19(7):4672-83.

**Mattapallil JJ**, Dandekar S, Canfield DR, Solnick JV. A predominant Th1 type of immune response is induced early during acute *Helicobacter pylori* infection in rhesus macaques. *Gastroenterology.* 2000 Feb;118(2):307-15.

**Mattsson A**, Tinnert A, Hamlet A, Lonroth H, Bolin I, Svennerholm AM. Specific antibodies in sera and gastric aspirates of symptomatic and asymptomatic *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998a May;5(3):288-93.

**Mattsson A**, Quiding-Jarbrink M, Lonroth H, Hamlet A, Ahlstedt I, Svennerholm A. Antibody-secreting cells in the stomachs of symptomatic and asymptomatic *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect Immun.* 1998b Jun;66(6):2705-12.

**McGee DJ**, Mobley HL. Mechanisms of *Helicobacter pylori* infection: bacterial factors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999a ;241:155-80.

**McGee DJ**, Radcliff FJ, Mendz GL, Ferrero RL, Mobley HL. *Helicobacter pylori* rocF is required for arginase activity and acid protection *in vitro* but is not essential for colonization of mice or for urease activity. *J Bacteriol.* 1999b Dec;181(23):7314-22.

**McGuire KL**, Iacobelli M. Involvement of Rel, Fos, and Jun proteins in binding activity to the IL-2 promoter CD28 response element/AP-1 sequence in human T cells. *J Immunol.* 1997 Aug 1;159(3):1319-27.

- McGuirk P**, Mills KH. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol.* 2002 Sep;23(9):450-5.
- McLoughlin R**, Racz I, Buckley M, O'Connor HJ, O'Morain C. Therapy of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 2004;9 Suppl 1:42-8.
- Medema RH**, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature.* 2000 Apr 13;404(6779):782-7.
- Meister A**, Tate SS, Griffith OW. Gamma-glutamyl transpeptidase. *Methods Enzymol.* 1981;77:237-53.
- Merrell DS**, Falkow S. Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis. *Nature.* 2004 Jul 8;430(6996):250-6.
- Miehlke S**, Kirsch C, Agha-Amiri K, Gunther T, Lehn N, Malferttheiner P, Stolte M, Ehninger G, Bayerdorffer E. The *Helicobacter pylori* vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int J Cancer.* 2000 Aug 1;87(3):322-7.
- Mineyama R**, Mikami K, Saito K. Partial purification and some properties of gamma-glutamyl peptide hydrolysing enzyme from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbios.* 1995;82(330):7-19.
- Miyamoto S**, Kimball SR, Safer B. Signal transduction pathways that contribute to increased protein synthesis during T-cell activation. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Nov 15;1494(1-2):28-42.
- Mohammadi M**, Czinn S, Redline R, Nedrud J. Helicobacter-specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. *J Immunol.* 1996 Jun 15;156(12):4729-38.
- Molinari M**, Salio M, Galli C, Norais N, Rappuoli R, Lanzavecchia A, Montecucco C. Selective inhibition of Ii dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med.* 1998 Jan 5;187(1):135-40.
- Montagnoli A**, Fiore F, Eytan E, Carrano AC, Draetta GF, Hershko A, Pagano M. Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev.* 1999 May 1;13(9):1181-9.
- Montecucco C**, Rappuoli R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Jun;2(6):457-66.
- Moriggl R**, Sexl V, Piekorz R, Topham D, Ihle JN. Stat5 activation is uniquely associated with cytokine signalling in peripheral T cells. *Immunity.* 1999 Aug;11(2):225-30.



- Mosmann TR**, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986 Apr 1;136(7):2348-57.
- Nakayama R**, Kumagai H, Tochikura T. gamma-Glutamyltranspeptidase from *Proteus mirabilis*: localization and activation by phospholipids. *J Bacteriol.* 1984 Dec;160(3):1031-6.
- Namavar F**, Sparrius M, Veerman EC, Appelmelk BJ, Vandenbroucke-Grauls CM. Neutrophil-activating protein mediates adhesion of *Helicobacter pylori* to sulfated carbohydrates on high-molecular-weight salivary mucin. *Infect Immun.* 1998 Feb;66(2):444-7.
- Naumann M**, Wessler S, Bartsch C, Wieland B, Covacci A, Haas R, Meyer TF. Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the cag pathogenicity island. *J Biol Chem.* 1999 Oct 29;274(44):31655-62.
- Naumann M**, Crabtree JE. *Helicobacter pylori*-induced epithelial cell signalling in gastric carcinogenesis. *Trends Microbiol.* 2004 Jan;12(1):29-36.
- Neil GL**, Berger AE, McPartland RP, Grindey GB, Bloch A. Biochemical and pharmacological effects of the fermentation-derived antitumor agent, (alphaS,5S)-alpha-amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazoleacetic acid (AT125). *Cancer Res.* 1979 Mar;39(3):852-6.
- Nilsson C**, Sillen A, Eriksson L, Strand ML, Enroth H, Normark S, Falk P, Engstrand L. Correlation between cag pathogenicity island composition and *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease. *Infect Immun.* 2003 Nov;71(11):6573-81.
- Norbury C**, Nurse P. Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:441-70.
- Nourse J**, Firpo E, Flanagan WM, Coats S, Polyak K, Lee MH, Massague J, Crabtree GR, Roberts JM. Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature.* 1994 Dec 8;372(6506):570-3.
- Nwokolo CU**, Freshwater DA, O'Hare P, Randeva HS. Plasma ghrelin following cure of *Helicobacter pylori*. *Gut.* 2003 May;52(5):637-40.
- Odenbreit S**, Till M, Hofreuter D, Faller G, Haas R. Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol Microbiol.* 1999 Mar;31(5):1537-48.

**Ogura K**, Maeda S, Nakao M, Watanabe T, Tada M, Kyutoku T, Yoshida H, Shiratori Y, Omata M. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. J Exp Med. 2000 Dec 4;192(11):1601-10.

**Ohtsubo M**, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G<sub>1</sub>-to-S phase transition. Mol Cell Biol. 1995 May;15(5):2612-24.

**Okamoto K**, Beach D. Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. EMBO J. 1994 Oct 17;13(20):4816-22.

**Oster SK**, Ho CS, Soucie EL, Penn LZ. The myc oncogene: Marvelously Complex. Adv Cancer Res. 2002;84:81-154.

**Otte JM**, Cario E, Podolsky DK. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. Gastroenterology. 2004 Apr;126(4):1054-70.

**Owen-Schaub LB**, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Krugel E, et al. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. Mol Cell Biol. 1995 Jun;15(6):3032-40.

**Papini E**, Satin B, Norais N, de Bernard M, Telford JL, Rappuoli R, Montecucco C. Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. J Clin Invest. 1998 Aug 15;102(4):813-20.

**Pappo J**, Torrey D, Castriotta L, Savinainen A, Kabok Z, Ibraghimov A. Helicobacter pylori infection in immunized mice lacking major histocompatibility complex class I and class II functions. Infect Immun. 1999 Jan;67(1):337-41.

**Pardee AB**. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1974 Apr;71(4):1286-90.

**Parsonnet J**, Friedman GD, Orentreich N, Vogelmann H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. Gut. 1997 Mar;40(3):297-301.

**Parsonnet J**. *Helicobacter pylori*: the size of the problem. Gut. 1998 Jul;43 Suppl 1:S6-9.

**Paulovich AG**, Hartwell LH. A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. Cell. 1995 Sep 8;82(5):841-7.

**Paziak-Domanska B**, Chmiela M, Jarosinska A, Rudnicka W. Potential role of CagA in the inhibition of T cell reactivity in *Helicobacter pylori* infections. *Cell Immunol.* 2000 Jun 15;202(2):136-9.

**Peek RM Jr**, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jan;2(1):28-37.

**Peeper DS**, Upton TM, Ladha MH, Neuman E, Zalvide J, Bernards R, DeCaprio JA, Ewen ME. Ras signalling linked to the cell-cycle machinery by the retinoblastoma protein. *Nature.* 1997 Mar 13;386(6621):177-81.

**Pelicic V**, Reytrat JM, Sartori L, Pagliaccia C, Rappuoli R, Telford JL, Montecucco C, Papini E. *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin associated with the bacteria increases epithelial permeability independently of its vacuolating activity. *Microbiology.* 1999 Aug;145 ( Pt 8):2043-50.

**Peng J**, Marshall NF, Price DH. Identification of a cyclin subunit required for the function of Drosophila P-TEFb. *J Biol Chem.* 1998 May 29;273(22):13855-60.

**Perez-Perez GI**, Peek RM Jr, Atherton JC, Blaser MJ, Cover TL. Detection of anti-VacA antibody responses in serum and gastric juice samples using type s1/m1 and s2/m2 *Helicobacter pylori* VacA antigens. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999a Jul;6(4):489-93.

**Perez-Perez GI**, Peek RM, Legath AJ, Heine PR, Graff LB. The role of CagA status in gastric and extragastric complications of *Helicobacter pylori*. *J Physiol Pharmacol.* 1999b Dec;50(5):833-45.

**Pfeiffer CJ**. Experimental studies on the pathophysiology of peptic ulcer disease. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1982;72:19-25.

**Piccinni MP**, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S. Defective production of both leukaemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med.* 1998 Sep;4(9):1020-4.

**Pitcher LA**, van Oers NS. -cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends Immunol.* 2003 Oct;24(10):554-60.

**Polyak K**, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell.* 1994 Jul 15;78(1):59-66.

**Polyak K**, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature.* 1997 Sep 18;389(6648):300-5.

**Pomorski T**, Meyer TF, Naumann M. *Helicobacter pylori*-induced prostaglandin E(2) synthesis involves activation of cytosolic phospholipase A(2) in epithelial cells. *J Biol Chem*. 2001 Jan 5;276(1):804-10.

**Pride DT**, Meinersmann RJ, Blaser MJ. Allelic Variation within *Helicobacter pylori* babA and babB. *Infect Immun*. 2001 Feb;69(2):1160-71.

**Prinz C**, Schoniger M, Rad R, Becker I, Keiditsch E, Wagenpfeil S, Classen M, Rosch T, Schepp W, Gerhard M. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res*. 2001 Mar 1;61(5):1903-9.

**Putsep K**, Branden CI, Boman HG, Normark S. Antibacterial peptide from *H. pylori*. *Nature*. 1999 Apr 22;398(6729):671-2.

**Rad R**, Dossumbekova A, Neu B, Lang R, Bauer S, Saur D, Gerhard M, Prinz C. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 2004 Aug;53(8):1082-9.

**Rad R**, Gerhard M, Lang R, Schoniger M, Rosch T, Schepp W, Becker I, Wagner H, Prinz C. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J Immunol*. 2002 Mar 15;168(6):3033-41.

**Rechsteiner M**, Rogers SW. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*. 1996 Jul;21(7):267-71.

**Rena G**, Guo S, Cichy SC, Unterman TG, Cohen P. Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J Biol Chem*. 1999 Jun 11;274(24):17179-83.

**Revel JP**, Ball EG. The reaction of glutathione with amino acids and related compounds as catalyzed by gamma glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem*. 1959 Mar;234(3):577-82.

**Reynisdottir I**, Polyak K, Iavarone A, Massague J. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev*. 1995 Aug 1;9(15):1831-45.

**Rickert P**, Seghezzi W, Shanahan F, Cho H, Lees E. Cyclin C/Cdk8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II. *Oncogene*. 1996 Jun 20;12(12):2631-40.

**Riou JY**, Buissiere J, Richard C, Guibourdenche M. [gamma-Glutamyl-transferase activity in the family "Neisseriaceae" (author's transl)] *Ann Microbiol (Paris)*. 1982 May-Jun;133(3):387-92.

**Rohde T**, MacLean DA, Klarlund Pedersen B. Glutamine, lymphocyte proliferation and cytokine production. *Scand J Immunol.* 1996 Dec;44(6):648-50.

**Sachs G**, Weeks DL, Melchers K, Scott DR. The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:349-69.

**Saiki RK**, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988 Jan 29;239(4839):487-91.

**Salama NR**, Otto G, Tompkins L, Falkow S. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect Immun.* 2001 Feb;69(2):730-6.

**Salama N**, Guillemin K, McDaniel TK, Sherlock G, Tompkins L, Falkow S. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 19;97(26):14668-73.

**Sancho D**, Gomez M, Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 2005 Mar;26(3):136-40.

**Sapan CV**, Lundblad RL, Price NC. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol Appl Biochem.* 1999 Apr;29 ( Pt 2):99-108.

**Sasaki T**, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, Wakeham A, Itie A, Bouchard D, Kozieradzki I, Joza N, Mak TW, Ohashi PS, Suzuki A, Penninger JM. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science.* 2000 Feb 11;287(5455):1040-6.

**Schägger H**, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 1987 Nov 1;166(2):368-79.

**Schmausser B**, Andrulis M, Endrich S, Lee SK, Josenhans C, Muller-Hermelink HK, Eck M. Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Exp Immunol.* 2004 Jun;136(3):521-6.

**Schreiber SL**, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today.* 1992 Apr;13(4):136-42.

- Segal ED, Falkow S, Tompkins LS.** *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Feb 6;93(3):1259-64.
- Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS.** Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Dec 7;96(25):14559-64.
- Selbach M, Moese S, Hauck CR, Meyer TF, Backert S.** Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein *in vitro* and *in vivo*. J Biol Chem. 2002 Mar 1;277(9):6775-8.
- Serfling E, Avots A, Neumann M.** The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation. Biochim Biophys Acta. 1995 Sep 19;1263(3):181-200.
- Sherr CJ.** Mammalian G<sub>1</sub> cyclins. Cell. 1993 Jun 18;73(6):1059-65.
- Sherr CJ.** G<sub>1</sub> phase progression: cycling on cue. Cell. 1994 Nov 18;79(4):551-5.
- Sherr CJ, Roberts JM.** Inhibitors of mammalian G<sub>1</sub> cyclin-dependent kinases. Genes Dev. 1995 May 15;9(10):1149-63.
- Shibayama K, Kamachi K, Nagata N, Yagi T, Nada T, Doi Y, Shibata N, Yokoyama K, Yamane K, Kato H, Iinuma Y, Arakawa Y.** A novel apoptosis-inducing protein from *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol. 2003 Jan;47(2):443-51.
- Shirin H, Moss SF.** *Helicobacter pylori* induced apoptosis. Gut. 1998 Nov;43(5):592-4.
- Siliciano JD, Canman CE, Taya Y, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB.** DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. Genes Dev. 1997 Dec 15;11(24):3471-81.
- Smith TK, Ikeda Y, Fujii J, Taniguchi N, Meister A.** Different sites of acivicin binding and inactivation of gamma-glutamyl transpeptidases. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Mar 14;92(6):2360-4.
- Stark AA, Zeiger E, Pagano DA.** Glutathione metabolism by gamma-glutamyltranspeptidase leads to lipid peroxidation: characterization of the system and relevance to hepatocarcinogenesis. Carcinogenesis. 1993 Feb;14(2):183-9.
- Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fantl WJ, Covacci A.** c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. Mol Microbiol. 2002 Feb;43(4):971-80.

- Stein M**, Rappuoli R, Covacci A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag driven host cell translocation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Feb 1;97(3):1263-8.
- Stingl K**, Altendorf K, Bakker EP. Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? Trends Microbiol. 2002 Feb;10(2):70-4.
- Stole E**, Smith TK, Manning JM, Meister A. Interaction of gamma-glutamyl transpeptidase with acivicin. J Biol Chem. 1994 Aug 26;269(34):21435-9.
- Strömberg E**, Lundgren A, Edebo A, Lundin S, Svennerholm AM, Lindholm C. Increased frequency of activated T-cells in the *Helicobacter pylori*-infected antrum and duodenum. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003 May 25;36(3):159-68.
- Suerbaum S**, Michetti P. Helicobacter pylori infection. N Engl J Med. 2002 Oct 10;347(15):1175-86.
- Sun Z**, Arendt CW, Ellmeier W, Schaeffer EM, Sunshine MJ, Gandhi L, Annes J, Petrzilka D, Kupfer A, Schwartzberg PL, Littman DR. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. Nature. 2000 Mar 23;404(6776):402-7.
- Sundrud MS**, Torres VJ, Unutmaz D, Cover TL. 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. 2004 May 18;101(20):7727-32.
- Suzuki H**, Kumagai H, Tochikura T. gamma-Glutamyltranspeptidase from Escherichia coli K-12: formation and localization. J Bacteriol. 1986 Dec;168(3):1332-5.
- Takahashi H**, Watanabe H. Post-translational processing of Neisseria meningitidis gamma-glutamyl aminopeptidase and its association with inner membrane facing to the cytoplasmic space. FEMS Microbiol Lett. 2004 May 1;234(1):27-35.
- Takuwa N**, Takuwa Y. Ras activity late in G<sub>1</sub> phase required for p27kip1 downregulation, passage through the restriction point, and entry into S phase in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. Mol Cell Biol. 1997 Sep;17(9):5348-58.
- Takuwa N**, Takuwa Y. Regulation of cell cycle molecules by the Ras effector system. Mol Cell Endocrinol. 2001 May 25;177(1-2):25-33.
- Tate SS**, Meister A. Stimulation of the hydrolytic activity and decrease of the transpeptidase activity of gamma glutamyl transpeptidase by maleate; identity of a rat kidney maleate-stimulated glutaminase and gamma-glutamyl transpeptidase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1974a Sep;71(9):3329-33.

**Tate SS, Meister A.** Interaction of gamma-glutamyl transpeptidase with amino acids, dipeptides, and derivatives and analogs of glutathione. *J Biol Chem.* 1974b Dec 10;249(23):7593-602.

**Tate SS, Meister A.** Serine-borate complex as a transition-state inhibitor of gamma-glutamyl transpeptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Oct;75(10):4806-9.

**Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burroni D, Bugnoli M, Tecce MF, Censini S, Covacci A, Xiang Z, et al.** Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med.* 1994 May 1;179(5):1653-58.

**Terres AM, Pajares JM.** An increased number of follicles containing activated CD69+ helper T cells and proliferating CD71+ B cells are found in *H. pylori*-infected gastric mucosa. *Am J Gastroenterol.* 1998 Apr;93(4):579-83.

**Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A.** The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today.* 1994 Oct;15(10):479-83.

**Tietze F.** Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* 1969 Mar;27(3):502-22.

**Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC.** The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* 1997 Aug 7;388(6642):539-47.

**Umehara S, Higashi H, Ohnishi N, Asaka M, Hatakeyama M.** Effects of *Helicobacter pylori* CagA protein on the growth and survival of B lymphocytes, the origin of MALT lymphoma. *Oncogene.* 2003 Nov 13;22(51):8337-42.

**Valkonen KH, Wadstrom T, Moran AP.** Identification of the N-acetylneuraminylactose-specific laminin-binding protein of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 1997 Mar;65(3):916-23.

**Vanhaesebroeck B, Alessi DR.** The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J.* 2000 Mar 15;346 Pt 3:561-76.



**Vermes I**, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995 Jul 17;184(1):39-51.

**Vermeulen K**, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif*. 2003 Jun;36(3):165-75.

**Viala J**, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Memet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL. Nod1 responds to Peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*. 2004 Nov;5(11):1166-74.

**Villalba M**, Coudronniere N, Deckert M, Teixeira E, Mas P, Altman A. A novel functional interaction between Vav and PKCtheta is required for TCR-induced T cell activation. *Immunity*. 2000 Feb;12(2):151-60.

**Vlach J**, Hennecke S, Alevizopoulos K, Conti D, Amati B. Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. *EMBO J*. 1996 Dec 2;15(23):6595-604.

**Vlach J**, Hennecke S, Amati B. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J*. 1997 Sep 1;16(17):5334-44.

**Voitenleitner C**, Fanning E, Nasheuer HP. Phosphorylation of DNA polymerase alpha-primase by cyclin A dependent kinases regulates initiation of DNA replication *in vitro*. *Oncogene*. 1997 Apr 3;14(13):1611-5.

**Voland P**, Weeks DL, Marcus EA, Prinz C, Sachs G, Scott D. Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene cluster. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003 Jan;284(1):G96-G106.

**Wang J**, Brooks EG, Bamford KB, Denning TL, Pappo J, Ernst PB. Negative selection of T cells by *Helicobacter pylori* as a model for bacterial strain selection by immune evasion. *J Immunol*. 2001 Jul 15;167(2):926-34.

**Wang G**, Maier RJ. An NADPH quinone reductase of *Helicobacter pylori* plays an important role in oxidative stress resistance and host colonization. *Infect Immun*. 2004 Mar;72(3):1391-6.

**Webb PM**, Crabtree JE, Forman D. Gastric cancer, cytotoxin-associated gene A-positive *Helicobacter pylori*, and serum pepsinogens: an international study. The Eurogst Study Group. *Gastroenterology*. 1999 Feb;116(2):269-76.

- Weeks DL**, Eskandari S, Scott DR, Sachs G. A H<sup>+</sup>-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*. 2000 Jan 21;287(5452):482-5.
- Wightkin WT**. Stress ulcer: pathophysiology and prevention. *Am J Hosp Pharm*. 1980 Dec;37(12):1651-5.
- Wilfinger WW**, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*. 1997 Mar;22(3):474-6, 478-81.
- Williams CL**, Preston T, Hossack M, Slater C, McColl KE. *Helicobacter pylori* utilizes urea for amino acid synthesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1996 Jan;13(1):87-94.
- Wirth HP**, Yang M, Peek RM Jr, Tham KT, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* Lewis expression is related to the host Lewis phenotype. *Gastroenterology*. 1997 Oct;113(4):1091-8.
- Wirth HP**, Beins MH, Yang M, Tham KT, Blaser MJ. Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant *Helicobacter pylori* strains. *Infect Immun*. 1998 Oct;66(10):4856-66.
- Wong KT**, Lee YY, Brusica V, Tan J, Yap MG, Nissom PM. Elevation of gamma-glutamyltransferase activity in 293 HEK cells constitutively expressing antisense glutaminase mRNA. *Metab Eng*. 2005 Sep-Nov;7(5-6):375-83.
- Xiang Z**, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R, Covacci A. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun*. 1995 Jan;63(1):94-8.
- Xu K**, Strauch MA. Identification, sequence, and expression of the gene encoding gamma-glutamyltranspeptidase in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 1996 Jul;178(14):4319-22.
- Yang W**, Shen J, Wu M, Arsura M, FitzGerald M, Suldan Z, Kim DW, Hofmann CS, Pianetti S, Romieu-Mourez R, Freedman LP, Sonenshein GE. Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene*. 2001 Mar 29;20(14):1688-702.
- Yoshiyama H**, Nakamura H, Kimoto M, Okita K, Nakazawa T. Chemotaxis and motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *J Gastroenterol*. 1999;34 Suppl 11:18-23.
- You WC**, Zhang L, Gail MH, Chang YS, Liu WD, Ma JL, Li JY, Jin ML, Hu YR, Yang CS, Blaser MJ, Correa P, Blot WJ, Fraumeni JF Jr, Xu GW. Gastric dysplasia and gastric cancer: *Helicobacter pylori*, serum vitamin C, and other risk factors. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Oct 4;92(19):1607-12.

**Yun** CH, Lundgren A, Azem J, Sjoling A, Holmgren J, Svennerholm AM, Lundin BS. Natural killer cells and *Helicobacter pylori* infection: bacterial antigens and interleukin-12 act synergistically to induce gamma interferon production. *Infect Immun.* 2005 Mar;73(3):1482-90.