

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

Die Rolle von Toll-like Rezeptoren bei der Vermittlung der adaptiven Immunität gegenüber *Helicobacter pylori*

Lena Rad

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Chr. Prinz
2. Univ.-Prof. Dr. D. Busch
3. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne)

Die Dissertation wurde am 19.05.2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.03.2009 angenommen.

Für meine Eltern
und Roland

Teile dieser Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Rad R, **Brenner L**, Krug A, Voland P, Mages J, Lang R, Schwendy S, Reindl W, Dossumbekova A, Ballhorn W, Wagner H, Schmid RM, Bauer S, Prinz C.

Toll-like receptor-dependent activation of antigen-presenting cells affects adaptive immunity to *Helicobacter pylori*.

Gastroenterology. 2007 Jul;133(1):150-163.

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.

Gastroenterology. 2007 May;132(5):1820-33.

Dossumbekova A, Prinz C, Gerhard M, **Brenner L**, Backert S, Kusters JG, Schmid RM, Rad R.

Helicobacter pylori outer membrane proteins and gastric inflammation.

Gut. 2006 Sep;55(9):1360-1;

Rad R, **Brenner L**, Bauer S, Schwendy S, Layland L, da Costa CP, Reindl W, Dossumbekova A, Friedrich M, Saur D, Wagner H, Schmid RM, Prinz C.

CD25⁺/Foxp3⁺ T cells regulate gastric inflammation and *Helicobacter pylori* colonization in vivo.

Gastroenterology. 2006 Aug;131(2):525-37.

Rad R, Ballhorn W, Voland P, Eisenächer K, Mages J, **Rad L**, Ferstl R, Lang R, Wagner H, Schmid RM, Bauer S, Prinz C, Kirschning CJ, Krug A.

Innate immune recognition of *H. pylori* through the cooperation of extra- and intracellular pathogen-recognition receptors.

Gastroenterology. 2009 Mar 6. [Epub ahead of print]

Rad L, Schwendy S, Dossumbekova A, Voland P, Prinz C, Rad R.

The role of the *cag* pathogenicity island for the activation of innate and adaptive immunity *H. pylori*. (Manuskript in Vorbereitung);

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	8
1.1. <i>Helicobacter pylori</i> - Epidemiologie, Pathogenese und klinische Relevanz	8
1.1.1. Die Entdeckung von <i>H. pylori</i>	8
1.1.2. Epidemiologie	9
1.1.3. Die klinische Relevanz von <i>H. pylori</i>	10
1.1.4. Die Virulenzfaktoren von <i>H. pylori</i>	14
1.1.5. Die Therapie der <i>H. pylori</i> -Infektion	15
1.2. Immunantwort bei der <i>H. pylori</i> -Infektion	17
1.2.1. Die angeborene Immunität	17
1.2.2. Aktivierung des adaptiven Immunsystems bei der <i>H. pylori</i> -Infektion	19
1.3. Dendritische Zellen	21
1.3.1. Subtypen dendritischer Zellen	22
1.3.2. Die zentrale Rolle dendritischer Zellen bei der Induktion innter und adaptiver Immunantwort	24
1.4. Toll-like Rezeptoren	26
1.4.1. Mustererkennende Rezeptoren	26
1.4.2. Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden	27
1.4.3. TLR-vermittelte Signalwege	30
1.4.3.1. Der Myd88-abhängige Signalweg	32
1.4.3.2. Der Myd88-unabhängige Signalweg	32
1.5. Zielsetzung der Arbeit	33
2. Material und Methoden	35
2.1. <i>H. pylori</i> -Stämme und Kultur von <i>H. pylori</i>	35
2.1.1. <i>H. pylori</i> -Stämme	35
2.1.2. Herstellung von Selektivnährböden	35
2.1.3. Anzucht von <i>H. pylori</i> auf Nährböden	36
2.1.4. Langzeitlagerung von <i>H. pylori</i>	36
2.1.5. Herstellung von bakteriellen Lysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration	37
2.1.6. Quantitative <i>H. pylori</i> -Kultur nach Reisolation aus dem murinen Magen	38
2.1.6.1. Herstellung von Selektivnährböden	38
2.1.6.2. Durchführung der quantitativen <i>H. pylori</i> -Kultur	39
2.2. Infektion von Mäusen mit <i>H. pylori</i>	40
2.2.1. Mausstämm	40
2.2.2. Inokulation der Mäuse mit <i>H. pylori</i>	40
2.3. Gewinnung von Mäuseserum	40
2.4. Töten der Mäuse und Bearbeiten der Mägen	41
2.4.1. Präparation des Gewebes für histologische und molekularbiologische Untersuchungen	41
2.5. Urease-Test zum Nachweis der Infektion mit <i>H. pylori</i>	42

2.6. Isolation von Nukleinsäuren	42
2.6.1. Isolation von DNA	42
2.6.2. Isolation von RNA	43
2.6.3. Maßnahmen zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen	44
2.7. Reverse Transkription	44
2.7.1. Prinzip der reversen Transkription	44
2.7.2. Reagenzien und Durchführung	44
2.8. Real-time quantitative PCR	45
2.8.1. Prinzip der quantitativen RT-PCR	45
2.8.2. Primer und Probes für die TaqMan-PCR	46
2.8.3. Durchführung der TaqMan-PCR	48
2.9. Generierung von BMDCs	48
2.9.1. Isolation von Knochenmarkzellen	48
2.9.2. Reifung von BMDCs in GM-CSF-haltigen Medien	49
2.9.3. Herstellung von GM-CSF-haltigen Überständen	50
2.9.4. Stimulation von BMDCs mit <i>H. pylori</i>	50
2.10. Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay	51
2.10.1. Prinzip des ELISA	51
2.10.2. Reagenzien für ELISA	51
2.10.3. Durchführung des ELISA zur Messung der Zytokinsekretion	54
2.10.4. Durchführung des ELISA zur Bestimmung von <i>H. pylori</i> -spezifischen IgG1 und IgG2c Antikörper-Titer im Mausserum	54
2.11. Durchflusszytometrie	55
2.11.1. Prinzip der Durchflusszytometrie	55
2.11.2. Reagenzien	56
2.11.3. Durchführung	56
2.12. cDNA Microarray-Analyse	58
2.13. Fluoreszenzmikroskopie und Laser Scanning Mikroskopie	58
2.13.1. Mikroskopische Untersuchungen	58
2.13.2. Reagenzien	59
2.13.3. Durchführung	60
2.14. Histologische Untersuchungen	60
2.14.1. Einbettung der Magenbiopsien in Paraffin	60
2.14.2. Herstellung von Schnittpräparaten	61
2.14.3. Entparaffinierung der Schnittpräparate	61
2.14.4. Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung	61
2.14.5. Histopathologische Klassifikation gastraler Pathologien	62
2.15. Statistik	62
3. Ergebnisse	63
3.1. Interaktion von <i>H. pylori</i> mit murinen Bone Marrow-Derived Dendritic Cells	63
3.1.1. Adhärenz von <i>H. pylori</i> an DCs	63
3.1.2. Aufnahme von <i>H. pylori</i> in die Zelle	65
3.1.3. <i>H. pylori</i> induziert die Oberflächenexpression von MHC-II und von kostimulatorischen Molekülen auf BMDCs	66
3.1.4. Zytokinsekretion aus BMDCs nach Stimulation mit <i>H. pylori</i>	68

3.2. Einfluss des TLR-vermittelten Signalweges auf die Aktivierung von murinen BMDCs	70
3.2.1. Toll-like Rezeptor-abhängige Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen bei DCs nach Stimulation mit <i>H. pylori</i>	70
3.2.2. TLR-Abhängigkeit der <i>H. pylori</i> -induzierten Zytokinsekretion DCs	75
3.3. Genexpressionsanalysen in <i>H. pylori</i> -stimulierten BMDCs decken TLR-abhängige und TLR-unabhängige Komponenten der DC-Aktivierung auf	77
3.3.1. Hierarchisches Clustering zur Visualisierung der Genexpression in Wildtyp und Myd88-defizienten DCs nach Stimulation mit <i>H. pylori</i>	77
3.3.2. Einteilung der <i>H. pylori</i> -regulierten Gene in funktionelle Gruppen	80
3.3.2.1. Zytokine und Entzündungs-assoziierte Moleküle	80
3.3.2.2. Gene, die an Aufnahme und Prozessierung von Antigenen beteiligt sind	83
3.3.2.3. Gene, die bei der Interaktion von DCs mit Leukozyten eine Rolle spielen	84
3.3.2.4. Chemokinexpression in DCs durch <i>H. pylori</i>	85
3.3.2.5. Gene, die bei der Reifung und Differenzierung von DCs eine Rolle spielen	86
3.3.2.6. Gene, die an der Regulation von Zellteilung und Apoptose beteiligt sind	87
3.3.2.7. Gene, die das Umorganisieren des Zytoskeletts und das migratorische Verhalten von DCs regulieren	88
3.3.2.8. Einfluss von <i>H. pylori</i> auf die Expression von Typ I Interferon-abhängigen Genen	89
3.3.2.9. Regulation von c-Fos in Myd88-defizienten DCs	91
3.4. Einfluss des Myd88-abhängigen Signalweges auf die gastrale Inflammation <i>in vivo</i>	91
3.4.1. Gastrale Entzündungsantwort bei <i>H. pylori</i> -infizierten Wildtyp und Myd88-defizienten Mäusen	92
3.4.2. Quantitative Bestimmung der gastralen Zytokinexpression in <i>H. pylori</i> -infizierten Wildtyp und Myd88-defizienten Mäusen	95
3.5. Einfluss des Myd88-abhängigen Signalweges auf die Polarisierung der T _H -Zell-Antwort <i>in vivo</i>	98
3.6. Einfluss der Myd88-Defizienz auf die Dichte der <i>H. pylori</i> -Kolonisation im Magen	100
4. Diskussion	103
4.1. Interaktion von <i>H. pylori</i> mit murinen DCs	104
4.2. Die Erkennung von <i>H. pylori</i> mittels Toll-like Rezeptoren ist entscheidend für die Aktivierung von BMDCs	105
4.3. Genexpressionsanalysen unterstreichen die zentrale Bedeutung des Myd88-abhängigen Signalweges bei der Induktion proinflammatorischer Prozesse in DCs durch <i>H. pylori</i> und decken einen Myd88-unabhängigen Mechanismus der Typ I Interferon-Induktion auf	106
4.4. Einfluss der Myd88-Defizienz auf die gastrale Entzündungsantwort während der <i>H. pylori</i> -Infektion	108

4.5. Der Myd88-abhängige Signalweg beeinflusst den Phänotyp der T_H-Polarisierung	109
4.6. Die Rolle einzelner TLRs bei der Erkennung von <i>H. pylori</i>	112
4.7. Ausblick	115
<i>5. Zusammenfassung</i>	<i>117</i>
<i>Literaturverzeichnis</i>	<i>120</i>
<i>Danksagung</i>	<i>135</i>

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Aktivierendes Protein 1
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BabA	Blood Group Antigen-Binding Adhesin A
BHI	Brain Heart Infusion
BMDC	Bone Marrow-derived Dendritic Cell
BSA	Bovine Serum Albumin
<i>cagA</i>	Cytotoxin Associated Gene A
<i>cagPAI</i>	Cag Pathogenitätsinsel
cDC	Konventionelle DC
cDNA	Komplementäre DNA
CFU	Colony Forming Units
CLP	Common Lymphoid Precursor
CMP	Common Myeloid Precursor
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CRP	Capsel-reaktives Protein
Ct	Threshold Cycle
DC	Dendritische Zelle
DNA	Deoxyribonucleinacid
dNTP	Desoxynucleotidtriohpsphat
D'TT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FC	Fold Change
FCS	Fetal Calf Serum
FP	Forward Primer
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GRO- α	Growth-related Oncogene alpha
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HC	Hierarchic Clustering
HE	Hämatoxillin-Eosin
HRP	Streptavidin-Horse-Raddish-Peroxidase
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICAM1	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül1
IFN	Interferon

Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin 1 Rezeptor
IRAK	IL-1 receptor associated Kinase
IRF	Interferon-regulierender Faktor
ITP	Idiopathische Thrombozytopenische Purpura
KI	Konfidenzintervall
Le ^b	Lewis B
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Repeats
MAL	Myd88-adaptor-like
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MAP-Kinase	Mitogen-activated Kinase
MDP	Muramyl-Dipeptide
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOI	Multiplicity of infection
Myd88	Myeloid Differentiation Primary Response Protein
NapA	Neutrophil Activating Protein
NF- κ B	Nukleärer Faktor kappa B
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NOD	Nucleotide-binding oligomerization-domain
NSAID	Non steroidal anti inflammatory drugs
OCPC-Ureasetest	O-Cresolphthalein Complexone-Ureasetest
OD	Optische Dichte
P	Probe
PAMP	Pathogen-associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pDC	Plasmozytoide DC
PFA	Paraformaldehyd
PPI	Protonenpumpeninhibitor
PRR	Pattern Recognition Receptor
RIG I	Retinoid acid inducible gene 1
RIP-1	Receptor-Interacting-Protein-1
RNA	Ribonucleinacid
RP	Reverse Primer

RPM	Round Per Minute
RSV	Respiratory-Syncytial-Virus
RT	Reverse Transcription
S2	Sicherheitsstufe 2
SAP	Serum Amyloid Protein
ssRNA	Single-stranded Ribonucleinacid
T4SS	Typ IV Sekretionssystem
TAB	TAK-binding Protein
TAK1	TGF-activated Kinase
TBK	TANK-Binding-Komplex
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
T _H	T-Helfer-Zellen
TICAM	TIR-Containing Molecule 1
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor
TIRAP	TIR-associated Protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TM	Schmelztemperatur
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAM	TRIF-Related Adaptor Molecule
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
TRIF	TIR-Domain-Containing Adapter Protein inducing IFN- β
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
VacA	Vacuolating Cytotoxin
WC-Agar	Wilkins Chalgren Agar
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. *Helicobacter pylori* - Epidemiologie, Pathogenese und klinische Relevanz

1.1.1. Die Entdeckung von *H. pylori*

Im Jahr 2005 wurden Barry Marshall und Robin Warren für die Entdeckung des Magenkeims *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet. Schon Anfang der 1980-er Jahre hatten die beiden australischen Mediziner postuliert, dass es ein Bakterium gebe, welches an die im Magen herrschenden Bedingungen adaptiert sei und beim Menschen zu einer Entzündung der Magenschleimhaut führen könne (Warren and Marshall, 1983). Warren war aufgefallen, dass etwa die Hälfte aller Biopsien der Magenschleimhaut, die er als Pathologe untersuchte, von kleinen s-förmigen, *Campylobacter*-ähnlichen Bakterien besiedelt war. Die Keime traten vor allem im Antrum des Magens auf und überall dort, wo die Bakterien zu finden waren, gab es Anzeichen einer Entzündung der Schleimhaut (Warren and Marshall, 1983). Es gelang den beiden Wissenschaftlern die Keime zu isolieren und im Labor zu kultivieren. In einer zweiten Arbeit konnten Warren und Marshall bereits ein Jahr später eine Assoziation der Infektion mit Magen- und Duodenalulzera nachweisen (Marshall and Warren, 1984).

Dennoch war es zunächst für die beiden Wissenschaftler schwer, die Fachwelt von der bedeutenden Rolle des Bakteriums zu überzeugen. Die These „keine Säure – kein Ulkus“ war zu sehr in den Köpfen der Ärzte und Wissenschaftler verwurzelt. Es war nicht vorstellbar, dass ein Bakterium in der Ulkuserkrankung eine entscheidende Rolle spielen könnte. Zum endgültigen Beweis der Pathogenität des Keimes und der Erfüllung des dritten Koch'schen Postulates startete Marshall einen Selbstversuch. Er trank die Bakterienlösung und entwickelte innerhalb weniger Tage eine akute Gastritis, die histologisch nachgewiesen wurde und tatsächlich auf die Besiedlung der Magenschleimhaut durch die Keime zurückzuführen war (Marshall et al., 1985). Zunächst wurde der gramnegative Keim der *Campylobacter*-Familie zugeordnet. In phylogenetischen Analysen stellte sich jedoch heraus, dass sich das Bakterium wesentlich von den übrigen *Campylobacter*-Spezies unterschied. Deshalb wurde 1989 ein neues Genus geschaffen: *Helicobacter* (Owen, 1998). Der Keim wurde in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) umbenannt (Goodwin and Armstrong, 1990). Zu diesem Zeitpunkt waren nur zwei *Helicobacter*-Spezies bekannt, *Helicobacter pylori* und *Helicobacter mustelae*. Inzwischen umfasst das Genus *Helicobacter* mehr als 20 Spezies (Owen, 1998). Heute wird ein ätiologischer Zusammenhang zwischen der *H. pylori*-Infektion und der Entstehung peptischer Magen- und Duodenalulzera sowie Neoplasien des Magens als selbstverständlich erachtet.

H. pylori ist unter dem Lichtmikroskop sichtbar. Es ist ein ca. 2-4 µm langes s-förmiges, gramnegatives Bakterium mit ein bis drei helixartigen Drehungen. Typischerweise besitzt der

Keim an einem Pol vier bis sechs Flagellen, die ihm eine aktive Fortbewegung ermöglichen (Dunn et al., 1997). *H. pylori* kann sich bei periplasmatischen pH-Werten zwischen 6,0 und 8,0 vermehren, der optimale pH für das Wachstum liegt bei 7,0 (Scott et al., 1998). Der Keim kann weder unter zu sauren (pH<4,0) noch unter zu alkalischen (pH>8,2) Bedingungen wachsen. Um sich im sauren Magen ein neutrales pH-Optimum zu schaffen und damit ein Überleben zu ermöglichen, setzt das Bakterium das Enzym Urease ein (Sachs et al., 2003). Dieses Enzym setzt Harnstoff zu Ammoniak (NH₃) und Kohlenstoffdioxid (CO₂) um. Urease ist überwiegend intrazellulär lokalisiert. Bei neutralen pH-Werten der Umgebung ist die Aktivität der Urease gering. Befindet sich der Keim jedoch im sauren Milieu, nimmt die Aktivität um ein Vielfaches zu. Dabei wird der pH-abhängige Harnstoffkanal (UreI) durch Protonierung geöffnet, was zu einer deutlichen Steigerung der Membranpermeabilität für Harnstoff führt (Weeks et al., 2000). Harnstoff gelangt in das Zytoplasma und kann dort durch Urease zu NH₃ und CO₂ gespalten werden. Das apolare Ammoniak gelangt in das bakterielle Periplasma und in die äußere Umgebung des Bakteriums und puffert die Magensäure ab. Dies ermöglicht dem Keim im sauren Magenmilieu zu überleben und lebenslang zu persistieren.

Beste Wachstumseigenschaften *in vitro* zeigt *Helicobacter pylori* auf einem bluthaltigen Nährmedium unter mikroaerophilen Bedingungen in einer Atmosphäre mit 5% Sauerstoff, 5-10% Kohlenstoffdioxid und 85% Stickstoff bei 37°C (Owen, 1998).

1.1.2. Epidemiologie

Die Infektion mit *H. pylori* kommt weltweit vor und betrifft alle Bevölkerungsgruppen. Etwa 50% der Weltbevölkerung sind mit dem Bakterium infiziert, dabei gibt es große Unterschiede in der Prävalenz der *H. pylori*-Infektion zwischen Industrienationen und Entwicklungsländern. Man geht in Entwicklungsländer bei Erwachsenen von einer Prävalenz von 80-90% aus, während in den entwickelten Ländern die Infektionsrate in den letzten Jahrzehnten auf bis zu 10-20% gesunken ist (Ernst et al., 2006).

In entwickelten Ländern ist die Infektionsrate innerhalb einer Population deutlich abhängig von der untersuchten Altersgruppe: Bei älteren Menschen ist die Prävalenz der *H. pylori*-Infektion am höchsten. Dies liegt vor allem daran, dass die Infektion bei Kindern immer mehr abnimmt. Die Infektion mit dem Keim erfolgt überwiegend im Kindesalter, meist nach dem ersten und vor dem fünften Lebensjahr, und der Keim persistiert in den meisten Fällen lebenslang (Rothenbacher and Brenner, 2003). Die Infektionsrate bzw. Reinfektionsrate nach erfolgreicher *Helicobacter*-Eradikation in entwickelten Ländern liegt bei Erwachsenen deutlich unter 1% pro Jahr. Die Infektion tritt gehäuft bei Kindern aus Familien mit niedrigem sozioökonomischem Status auf. Dichtes Zusammenleben, mangelnde Hygiene

und niedriger Bildungsstand sind mit einer hohen Infektionsrate assoziiert (Frenck, Jr. and Clemens, 2003; Malaty, 2007).

Die Übertragung von *H. pylori* erfolgt vor allem oral-oral von Mensch zu Mensch, insbesondere von Mutter zu Kind. Auch eine fäkal-orale Übertragung ist prinzipiell möglich, hat aber wahrscheinlich eine eher untergeordnete epidemiologische Bedeutung (Megraud, 1995). In den entwickelten Ländern nimmt die Durchseuchungsrate immer mehr ab. So ist bei Kindern deutscher Nationalität, die auch in Deutschland geboren wurden, die Prävalenz der *H. pylori*-Infektion mit 2-5% sehr niedrig (Rothenbacher and Brenner, 2003). In Entwicklungsländern ist die Prävalenz bei Kindern dagegen nach wie vor sehr hoch und beträgt zum Beispiel in Gambia bei 5-jährigen Kindern sogar 95% (Frenck, Jr. and Clemens, 2003).

1.1.3. Die klinische Relevanz von *H. pylori*

Die klinische Konsequenz einer Infektion mit *H. pylori* variiert stark und wird sowohl durch mikrobielle als auch durch wirtsspezifische Faktoren und Umweltfaktoren beeinflusst (Suerbaum and Michetti, 2002; Ernst et al., 2006). Die gastroduodenalen Erkrankungen, die mit einer Infektion in Verbindung gebracht werden, reichen von einer harmlosen Gastritis bis hin zum Ulkus, Magenkarzinom und MALT-Lymphom.

Im Gegensatz zu anderen bakteriellen Infektionen im Magen-Darm-Trakt heilt eine Infektion mit *H. pylori* meist nicht spontan aus, sondern persistiert ohne Therapie ein Leben lang als chronische Antrum- oder Pangastritis. 80-90% dieser Patienten werden jedoch nie Symptome entwickeln und die Entzündung der Mukosa kann nur histologisch nachgewiesen werden (Suerbaum and Michetti, 2002). Eine akute *H. pylori*-Infektion wird in der Regel nicht erkannt, denn die meisten Patienten ignorieren die kurzzeitigen Symptome wie Übelkeit oder Erbrechen. 10-20% der Infizierten entwickeln jedoch gastrointestinale Erkrankungen (Abbildung 1).

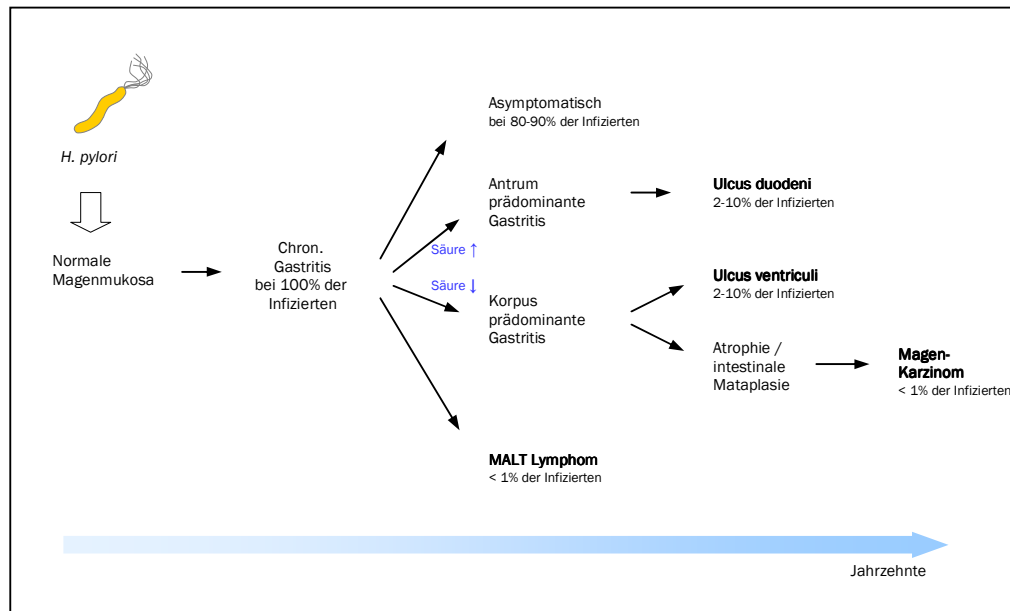


Abbildung 1: Natürlicher Verlauf der *H. pylori*-Infektion und Lebenszeitrisiko für verschiedene gastrointestinale Erkrankungen: Alle *H. pylori*-infizierten Personen entwickeln eine chronische Gastritis. Diese verläuft bei 80-90% der Infizierten asymptomatisch. Je nach Lokalisation der Gastritis im Magen und dem individuellen Vermögen zur Magensäuresekretion entwickeln sich unterschiedliche Krankheitsbilder. 2-10% der Infizierten entwickeln im Laufe ihres Lebens ein *Ulcus duodeni* (vorwiegend solche Personen, die viel Säure produzieren und demzufolge eine Antrum-prädominante Gastritis haben). Personen mit Hypochlorhydrie hingegen entwickeln häufiger eine Korpus-prädominante Gastritis und haben ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines *Ulcus ventriculi* und eines Magenkarzinoms. Bei weniger als 1% der infizierten Personen entsteht ein MALT-Lymphom.

Die Infektion mit *H. pylori* führt bei allen betroffenen Personen zu einer chronischen Entzündung der Magenschleimhaut, deren Ausmaß und Lokalisation jedoch stark variieren kann. *H. pylori* ist für die Mehrzahl der duodenalen und gastralen Ulzera verantwortlich. Circa 95% aller Duodenalulzera und 70% der Magenulzera entstehen auf dem Boden einer Infektion mit *H. pylori* (Rothenbacher and Brenner, 2003). Das Lebenszeitrisiko, peptische Ulzera zu entwickeln, liegt bei *H. pylori*-positiven Patienten zwischen 3% in den USA und 25% in Japan (Rothenbacher and Brenner, 2003; Suerbaum and Michetti, 2002). Die Eradikation des Keimes führt zu einer starken Abnahme der *H. pylori*-assoziierten peptischen Ulzera. Für die klinischen Folgen der Entzündung sind auch die Lokalisation der Gastritis und die individuelle Fähigkeit des Wirtes zur Magensäuresekretion entscheidend.

Bei Patienten mit hoher Säuresekretion kommt es vor allem zur Kolonisation des Magenanspruchs. Die hohe Säureproduktion der im Magenkorpus gelegenen Parietalzellen verhindert eine Korpusbesiedlung und scheint hierbei ausschlaggebend für die Entstehung

einer Antrum-prädominanten Gastritis zu sein. Die Antrumgastritis fördert eine Hypergastrinämie, was wiederum eine vermehrte Sekretion von Magensäure mit sich bringt. Die hohe Säuresekretion wiederum fördert die Entstehung von duodenalen Ulzera.

Bei Patienten mit geringer Säureproduktion kommt es im Gegensatz dazu häufiger zu einer Korpusgastritis. Die Korpus- oder Pangastritis ist mit einem erhöhten Risiko zur Entstehung eines Magenkarzinoms assoziiert (Lai and Sung, 2007; El-Omar et al., 2001). Magenkrebs ist weltweit einer der häufigsten Karzinomtypen und die zweithäufigste krebsassoziierte Todesursache (Suerbaum and Michetti, 2002). Die Entdeckung von *H. pylori* revolutionierte das Verständnis dieser Neoplasie, die inzwischen als Paradigma für ein infektionsassoziiertes, chronisch entzündlich vermitteltes Karzinom steht.

Metaanalysen zeigten, dass im weltweiten Mittel bei *H. pylori*-infizierten Personen das Risiko, ein Magenkarzinom zu entwickeln, um etwa das Zweifache gegenüber nicht-infizierten Personen erhöht ist (Odds Ratio 1,92–2,56; 95% KI) (Lochhead and El-Omar, 2007). Man muss sogar davon ausgehen, dass die meisten Studien die Bedeutung von *H. pylori* für die Entstehung des Magenkarzinoms unterbewerten. Dem Magenkarzinom vom intestinalen Typ gehen in der Regel histopathologische Veränderungen, wie Atrophie und intestinale Metaplasie, voraus (Fox and Wang, 2007). Diese Veränderungen der Mikroumgebung im atrophischen Magen hemmen das Wachstum von *H. pylori* und führen schließlich zur Eliminierung des Keimes (Rad et al., 2006b). Daher ist *H. pylori* und damit auch die Bildung von Immunglobulinen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung des Magenkarzinoms nicht immer nachweisbar, obwohl die Kolonisation mit dem Bakterium über Jahrzehnte bestand und die damit verbundenen pathophysiologischen Veränderungen schließlich zum Karzinom führten.

In sorgfältig durchgeführten Studien, die zusätzliche, verfeinerte Nachweismethoden für *H. pylori* berücksichtigen, wurde ein bis zu 21-fach erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines Non-Cardia Magenkarzinoms bei Nachweis einer aktuellen oder früheren *H. pylori*-Infektion gezeigt (Ekstrom et al., 2001; Brenner et al., 2004; Brenner et al., 2004). Bei diesen Studien wurden zusätzlich Antikörper gegen CagA IgG, die länger nachweisbar sind als das routinemäßig angewandte anti-*H. pylori* IgG, bestimmt.

1994 wurde *H. pylori* durch die „International Agency for Research on Cancer“ als Karzinogen der Klasse 1 eingestuft (IARC, 1994). Epidemiologische Studien zeigten, dass eine Infektion mit *H. pylori* die Entstehung des distalen Magenkarzinoms (non-cardia cancer) vom intestinalen, wie auch vom diffusen Typ fördert. Die Entstehung der Cardia-Karzinome ist bei Infektion mit *H. pylori* jedoch nicht erhöht (Lochhead and El-Omar, 2007).

In Deutschland, wie auch in anderen entwickelten Ländern, war in den letzten Jahrzehnten parallel zur Abnahme der *H. pylori*-Infektionsrate auch eine stetige Abnahme der Inzidenz des Magenkarzinoms zu beobachten. In Ländern mit einer hohen Infektionsrate ist die Inzidenz des Magenkarzinoms jedoch weiterhin hoch (Brenner et al., 2004). In

prospektiven Studien wurde gezeigt, dass die Eradikation des Keimes das Risiko zur Entstehung eines Magenkarzinoms senkt (Uemura et al., 2001). Ebenso kann das Risiko des Wiederauftretens von endoskopisch resezierten Magenfrühkarzinomen gesenkt werden (Suerbaum and Michetti, 2002).

Neben dem Magenkarzinom erhöht eine Infektion mit *H. pylori* auch das Risiko, ein gastrales MALT-Lymphom zu entwickeln. Zwischen 72 und 98% der Patienten mit MALT-Lymphomen sind mit *H. pylori* infiziert (Suerbaum and Michetti, 2002). Die Eradikation des Keimes allein bewirkt bei 70-80% der Patienten eine Regression des gastralen MALT-Lymphoms. Bei den Patienten, deren Lymphome bei *H. pylori*-Eradikation persistieren, finden sich in der Regel bestimmte genetische Veränderungen, wie beispielsweise die Translokation t(11;18)(q21;q21) (Lochhead and El-Omar, 2007). Mehr als 60% der Patienten mit niedriggradigem MALT-Lymphom, die nach Eradikation von *H. pylori* eine komplette histologische Remission erreichen, bleiben dauerhaft in kompletter histologischer Remission (Wundisch et al., 2005).

Neben gastroduodenalen Erkrankungen wird die *H. pylori*-Infektion außerdem mit verschiedenen extra-gastralen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Diskutiert wird eine Reihe von Krankheiten, die das kardiovaskuläre, hepatobiliäre, dermatologische, immunologische und hämatologische System betreffen. Für die meisten dieser Erkrankungen ist der Zusammenhang mit der *H. pylori*-Infektion jedoch nicht eindeutig geklärt und wird kontrovers diskutiert. Gut nachgewiesen ist jedoch die Assoziation der Infektion mit der Idiopathischen Thrombozytopenischen Purpura (ITP) sowie der unerklärten Eisenmangelanämie. Die ITP ist charakterisiert durch die Bildung von Autoantikörpern gegen Thrombozytenantigene, was zu einer Zerstörung dieser Thrombozyten führt. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte bei *H. pylori*-infizierten Patienten mit ITP eine Kreuzreaktion von anti-CagA-Antikörpern mit Thrombozytenantigenen. Anti-CagA-Antikörper binden bei dieser Erkrankung zwei Thrombozytenantigene, während sie bei gesunden Personen nur ein Antigen erkennen (Franceschi et al., 2004; Franceschi and Gasbarrini, 2007). Von klinischer Bedeutung ist, dass bei einem Teil der Patienten mit ITP die Eradikation von *H. pylori* zu einem Anstieg der Thrombozytenzahl führt (Franceschi and Gasbarrini, 2007).

Die ungeklärte Eisenmangelanämie ist eine weitere hämatopoetische Erkrankung, die möglicherweise im Zusammenhang mit einer *H. pylori*-Infektion steht (Rad et al., 2006c). Es wurden verschiedene Mechanismen zur Entstehung der *H. pylori*-assoziierten Eisenmangelanämie vorgeschlagen (Franceschi and Gasbarrini, 2007). So könnte die Anämie einerseits durch die chronische Entzündung bedingt sein, andererseits führt die *H. pylori*-Infektion zu einer Abnahme des intragastralen Ascorbinsäurespiegels und zu einer verringerten Säureproduktion. Beides sind wichtige Faktoren für die effiziente Eisenresorption. Von klinischer Relevanz ist, dass ein Teil der Patienten mit unerklärter

Eisenmangelanämie von der *H. pylori*-Eradikation profitiert (Franceschi and Gasbarrini, 2007; Cardenas et al., 2006).

1.1.4. Die Virulenzfaktoren von *H. pylori*

Das Ausmaß der klinischen Manifestation einer Infektion mit *H. pylori* kann stark variieren (Fox and Wang, 2007). Die Entstehung von gastroduodenalen Erkrankungen ist vor allem vom *H. pylori*-Stamm und den damit verbundenen Pathogenitäts- bzw. Virulenzfaktoren des Bakteriums abhängig. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht wichtiger Virulenzfaktoren von *H. pylori* und deren Funktion.

Tabelle 1: Die Virulenzfaktoren von *H. pylori* und deren Funktion

Virulenzfaktoren	Funktion
Flagellen	Beweglichkeit des Bakteriums
Urease	Pufferung von Magensäure
<i>cag</i> -Pathogenitätsinsel	Kodiert für Typ IV Sekretionssystem
Adhäsine: BabA, SabA, AlpA, AlpB, HopZ, HopH (OipA)	Adhäsion des Bakteriums an die Oberfläche von Zielzellen
Vakuolisierendes Zytotoxin (VacA)	Zytotoxische Wirkung auf das gastrale Epithel; Hemmung der Leukozytenproliferation; Hemmung der Phagozytose in Makrophagen
Katalase, Superoxid-Dismuthase	Schutz des Bakteriums vor oxidativen Schäden
Neutrophil Activating Protein (NapA)	Aktivierung neutrophiler Granulozyten

Nach der oralen Aufnahme müssen die Bakterien für kurze Zeit im sauren Milieu des Magenlumens überleben, bevor sie das fast neutrale Milieu des epithelnahen Magenschleims erreichen. Hierbei helfen den Keimen zum einen die Flagellen, die eine eigene Bewegung ermöglichen, und zum anderen das Enzym Urease, das für eine pH-neutrale Umgebung sorgt (Suerbaum and Michetti, 2002).

H. pylori kann mit Hilfe verschiedener Adhäsionsmoleküle an die Epithelzellen binden. Der durch Adhäsion vermittelte Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle ist eine Voraussetzung für weitere pathogene Prozesse. Das am besten charakterisierte Adhäsion ist das „outer-membrane“ Protein BabA, das an Lewis B (Le^b) Blutgruppenantigene auf der Oberfläche von Epithelzellen bindet (Ilver et al., 1998). Etwa 65% der in Deutschland vorkommenden *H. pylori*-Stämme exprimieren BabA. In verschiedenen Studien konnte gezeigt

werden, dass BabA mit der Entstehung von *H. pylori*-induzierten Ulzera und Karzinomen assoziiert ist (Rad et al., 2002; Suerbaum and Michetti, 2002). Ein Teil der *H. pylori*-Stämme sezerniert das vakuolisierende Zytotoxin VacA. VacA ist ein porenbildendes Protein, das vakuolisierende Effekte auf verschiedene Zelllinien hat (Fox and Wang, 2007). Die Vakuolisierung erhöht die transzelluläre Permeabilität und führt zur verstärkten Freisetzung von Bicarbonat, organischen Anionen und Harnstoff, was zu besseren Wachstumsbedingungen für den Keim beiträgt. VacA-positive Stämme können in den betroffenen Zellen Apoptose auslösen (Suerbaum and Michetti, 2002) und hemmen außerdem die T-Zell-Proliferation (Gebert et al., 2003). In westlichen Ländern ist die Infektion mit *H. pylori*-Stämmen, die bestimmte Varianten des *vacA*-Gens besitzen, mit einem höheren Risiko zur Ulkus- und Karzinomentstehung assoziiert (Atherton et al., 1997). *H. pylori*-Stämme, welche die *cag*-Pathogenintätsinsel (*cagPAI*) besitzen, werden als besonders pathogene Stämme angesehen (Fox and Wang, 2007). Die *cagPAI* besteht aus einer Serie von Genen, die für ein so genanntes Typ IV Sekretionssystem (T4SS) kodieren (Backert et al., 2000). Über dieses Sekretionssystem wird nach Adhärenz des Keimes an die Epithelzelle das Protein CagA sowie Peptidoglykan (Viala et al., 2004) in die Wirtszelle transloziert. Dadurch werden intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktiviert und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus der Epithelzelle induziert. So ist z.B. die Freisetzung von IL-8 aus Epithelzellen abhängig vom T4SS (Brandt et al., 2005).

Eine Vielzahl von klinischen Studien zeigt, dass die Infektion mit *cagA*⁺ *Helicobacter*-Stämmen häufiger zu Ulkuskrankheit, Magenkarzinomen und schwerer Gastritis mit intestinaler Metaplasie und Atrophie führt als eine Infektion mit *cagA*⁻ Stämmen (Blaser et al., 1995; Fox and Wang, 2007; Parsonnet et al., 1997).

1.1.5. Die Therapie der *H. pylori*-Infektion

Ohne adäquate Therapie persistiert *H. pylori* in der Regel ein Leben lang im Magen infizierter Personen. Tabelle 2 fasst die Indikationen zur *H. pylori*-Eradikation zusammen. Diese wurden von der European Helicobacter Pylori Study Group (EHPSG) erstellt und als „Maastricht III Consensus Report 2005“ publiziert (Malfertheiner et al., 2007):

Tabelle 2: Von der European Helicobacter Pylori Study Group erstellte Indikationen zur Eradikation von H. pylori (Maastricht III Consensus Report 2005)

Magen- und Duodenalulkus
Atrophische Gastritis
Gastrales MALT-Lymphom
Non-ulcer Dyspepsie
Nicht-abgeklärte Dyspepsie (in Gebieten mit einer Prävalenz der Infektion >10%)
Z.n. Resektion eines Magenkarzinoms
Verwandte ersten Grades von Patienten mit Magenkarzinom
Ungeklärte Eisenmangelanämie
Chronisch idiopathische thrombozytopenische Purpura
Vor Beginn einer NSAID Therapie bei NSAID-naiven Patienten
Bei Entwicklung einer gastrointestinalen Blutung unter Langzeit-Aspirin-Therapie
Auf Wunsch des Patienten (nach Diskussion von Risiken und Nutzen mit Arzt)

Nach den Maastricht III Richtlinien ist die Therapie erster Wahl die Triple-Therapie mit einem Protonenpumpenhemmer (PPI; z.B. Omeprazol 20 mg), Clarithromycin (500 mg) und Amoxicillin (1000 mg) oder PPI, Clarithromycin (500 mg) und Metronidazol (500 mg). Die Medikamente werden zweimal täglich über einen Zeitraum von mindestens sieben Tagen verabreicht.

In Gebieten mit einer Metronidazol-Resistenz <40% hat die Kombination PPI/Clarithromycin/Metronidazol einen kleinen Vorteil und ist deshalb zu bevorzugen. Ebenso ist diese Kombination bei Penicillin-Allergie zu empfehlen. In Regionen mit einer Metronidazol-Resistenz >40% sollte PPI/Clarithromycin/Amoxicillin eingesetzt werden.

Ist die Clarithromycin-Resistenz in einer Region >15-20%, sollte dieses Antibiotikum nicht eingesetzt werden, weil es zu einer deutlichen Senkung der Eradikations-Erfolgsrate kommt.

Bei Versagen der Erstlinientherapie wird die Bismuth-Quadruple-Therapie empfohlen (Bismuthsalz 4 x 120 mg, PPI, Tetracyclin 4 x 500 mg und Metronidazol 3 x 500 mg; über einen Zeitraum von zehn bis vierzehn Tagen). In Deutschland ist Bismuth jedoch nicht erhältlich. Steht kein Bismuth zur Verfügung, sollte die Zweitlinientherapie mit PPI, Amoxicillin und Metronidazol durchgeführt werden. Möglich ist auch die Kombination PPI mit Tetracyclin (500 mg) und Metronidazol (500 mg) (Malfertheiner et al., 2007).

Bei Versagen dieser Zweitlinientherapie sollte der Keim isoliert werden und eine Antibiotika-Resistenztestung erfolgen, an der die weitere antibiotische Therapie ausgerichtet werden muss.

Der Eradikationserfolg sollte sechs bis acht Wochen nach Ende der Therapie überprüft werden. Hierzu kann ein Urease-Atemtest durchgeführt werden. Aufgrund des Malignitätsrisikos ist bei Eradikation aufgrund eines Magenulkus eine gastroscopische Kontrolluntersuchung obligat. Der Eradikationserfolg kann hierbei z.B. im Rahmen eines Urease-Schnelltests untersucht werden. Eine serologische Untersuchung eignet sich nicht zur Überprüfung des Eradikationserfolges (Malfertheiner et al., 2007). Die Reinfektionsrate nach erfolgreicher Eradikation ist in westlichen Ländern gering (<1% pro Jahr).

1.2. Immunantwort bei der *H. pylori*-Infektion

Zum Schutz vor eindringenden Erregern entwickelten alle mehrzelligen Organismen schon früh in der Evolution Abwehrmechanismen, um Pathogene zu zerstören und ihre Virulenzfaktoren zu neutralisieren (Medzhitov and Janeway, Jr., 1997). Diese phylogenetisch älteste Form der Abwehr wird als angeborene (innate) Immunität bezeichnet und nutzt Rezeptoren, um damit Pathogene zu erkennen. Erst im Laufe der Evolution entwickelten Wirbeltiere, zusätzlich zur angeborenen Immunität, das so genannte adaptive (spezifische) Immunsystem, welches ein gezieltes Vorgehen gegen Erreger ermöglicht (Hoffmann et al., 1999).

Die Infektion mit *H. pylori* verursacht bei allen infizierten Personen eine chronische gastrale Entzündung (Dooley et al., 1989). Diese Entzündungsantwort ist sowohl durch die Induktion der angeborenen als auch der erworbenen Immunität charakterisiert (Prinz et al., 2003).

1.2.1. Die angeborene Immunität

Das angeborene Immunsystem kann Infektionserreger bekämpfen, ohne dass der Organismus zuvor mit dem Erreger Kontakt hatte. Die Abwehr kann auf mehreren Ebenen stattfinden und setzt sich häufig aus unterschiedlichen Komponenten zusammen (mechanische/physikalische, chemische und zelluläre) (Basset et al., 2003). Die physikalische Barrierefunktion von Epithelien der Haut und der Schleimhäute im Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt stellt einen ersten Schutz vor eindringenden Pathogenen dar. Diese Barriere wird zusätzlich durch physiologische Funktionen wie Zilienbewegungen oder die Sekretion von Mukus verstärkt.

Eine weitere Ebene der Abwehr stellt die Sekretion von Stoffen dar, die sowohl Erreger angreifen als auch Immunreaktionen einleiten können. Hierzu gehören z.B. Proteine oder Peptide, die Pathogene direkt oder indirekt angreifen (z.B. Sekretion von antimikrobiellen

Peptiden, beispielsweise Defensine, durch Epithelzellen). Zudem werden verstärkt Zytokine und Chemokine, wie TNF- α , IL-4, IL-12 oder IL-8, sezerniert, die die Induktion weiterer innater und adaptiver Immunmechanismen vermitteln (z.B. die Chemotaxis von Zellen des Immunsystems in das infizierte Organ).

Das zelluläre System in der angeborenen Immunität umfasst Epithelzellen, Mastzellen, dendritische Zellen (DCs), natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), zytotoxische T-Zellen sowie phagozytierende Zellen, wie Makrophagen und Granulozyten. Erkannt werden Erreger anhand ihrer charakteristischen Strukturmodule, so genannten Pathogen-assoziierten molekularen Muster („pathogen-associated molecular patterns“, PAMPs). Diese können über bestimmte Rezeptoren, den „pattern recognition receptors“ (PRRs), detektiert werden (Basset et al., 2003). Die Aktivierung der angeborenen Immunantwort ist eine Voraussetzung für die Einleitung der nachfolgenden adaptiven Immunität, welche erst nach einigen Tagen ihre vollständige Effektivität erlangt. Dabei stellen Antigen-präsentierende Zellen (APC) ein entscheidendes Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunität dar (Banchereau et al., 2000).

Bei der Vermittlung der *H. pylori*-induzierten Entzündungs- und Immunantwort spielt die Epithelschicht des Magens eine wichtige Rolle. Die Adhäsion von *H. pylori* an das Magenepithel induziert zunächst eine unspezifische Immunantwort. Nach Kontakt mit dem Keim erlangt die Epithelzelle die Fähigkeit, Chemokine zu bilden, die die Infiltration der Lamina propria des Magens mit inflammatorischen Zellen bewirken. Die vermehrte Sekretion von IL-8 ist eine der ersten Antworten der Epithelzellen auf die Infektion mit *H. pylori* (Algood and Cover, 2006). Dieses Chemokin rekrutiert vor allem neutrophile Granulozyten in die Mukosa, die zur Schädigung der Schleimhaut beitragen (Suerbaum and Michetti, 2002; Algood and Cover, 2006). Neben IL-8 sind auch weitere Chemokine der C-X-C-Familie (z.B. GRO- α = growth regulated α) bei der Vermittlung der granulozytären Antwort entscheidend (Yamaoka et al., 1998; Wilson and Crabtree, 2007). Neutrophile Granulozyten eliminieren die Bakterien und sezernieren ihrerseits Zytokine, die einerseits die nachfolgende spezifische Immunantwort beeinflussen (Wilson and Crabtree, 2007), andererseits aber auch die Apoptose der Epithelzellen verursachen und so zur entzündungsassoziierten Gewebeerstörung beitragen können (Ernst et al., 2006). *H. pylori*-Stämme, die *cagPAI* positiv sind, induzieren eine stärkere Sekretion des proinflammatorischen IL-8 und der C-X-C-Chemokine im Magenepithel (Suerbaum and Michetti, 2002).

Ein weiterer Zelltyp, der bei der *H. pylori*-induzierten innaten Immunantwort eine Rolle spielt, sind Makrophagen. *H. pylori* induziert die Aktivierung von Makrophagen, die zur Steigerung der Phagozytosefähigkeit sowie der Sekretion inflammatorischer Zytokine, wie z. B. IL-1, TNF- α oder IL-6, führt. Die hierbei beteiligten Mechanismen sind zum großen Teil

unbekannt. Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) eine Rolle bei der Erkennung von *H. pylori* durch Makrophagen spielt (Mandell et al., 2004).

Neben der Rolle bei der Vermittlung innater Immunvorgänge übernehmen Monozyten/Makrophagen, aber auch dendritische Zellen, eine wichtige Rolle bei der Induktion adaptiver Immunität. Sie präsentieren Antigene an T-Zellen und leiten hiermit eine Antigen-spezifische Immunantwort ein (Wilson and Crabtree, 2007).

In vitro Experimente zeigen, dass intakte *H. pylori* und eine Reihe von *H. pylori*-Bestandteilen auch die Aktivierung von Mastzellen bewirken können. Ein hierfür verantwortlicher *H. pylori*-Faktor ist VacA. VacA kann die Chemotaxis von Mastzellen in den Magen und die Expression zahlreicher proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1, TNF- α , IL-6, IL-13 und IL-10, induzieren (Algood and Cover, 2006).

1.2.2. Aktivierung des adaptiven Immunsystems bei der *H. pylori*-Infektion

Die spezifische oder adaptive Immunabwehr entwickelte sich im Laufe der Evolution der Vertebraten aus der angeborenen Immunabwehr. Sie zeichnet sich durch die Anpassungsfähigkeit gegenüber den verschiedenen Krankheitserregern aus. So sind die Zellen der adaptiven Immunabwehr in der Lage, spezifische Strukturen (Antigene) der Erreger zu erkennen und eine Antigen-spezifische zelluläre Abwehr einzuleiten oder Antikörper zu bilden. Es entstehen dabei Antigen-spezifische Effektorzellen, die eine erneute Infektion mit demselben Pathogen verhindern können. Neben Antigen-präsentierenden Zellen (APC), wie dendritischen Zellen (DCs), sind vor allem die T- und B-Zellen wichtige Elemente in der Abwehr. Die Aktivierung von DCs ist für die nachfolgende adaptive Immunantwort von großer Bedeutung. Die adaptive Immunität zeichnet sich durch eine zellvermittelte und eine humorale Komponente aus. Beide Systeme ergänzen sich und können zusammen Pathogene wirksam bekämpfen und eliminieren.

Unreife dendritische Zellen erkennen mittels der PRRs Erreger an ihren PAMPs, nehmen diese in die Zellen auf und präsentieren die Antigene an T-Zellen (Basset et al., 2003). Die Induktion einer TLR-abhängigen Signalkaskade bewirkt die Ausreifung der DCs und die Präsentation von Antigen-Peptiden auf ihrer Zelloberfläche. Reife DCs exprimieren verstärkt MHC-I und MHC-II-Moleküle sowie kostimulatorische Moleküle, wie z.B. CD80 und CD86, die für die T-Zell-Aktivierung notwendig sind (Banchereau and Steinman, 1998). Nach der Antigenaufnahme wandern die dendritischen Zellen in die T-Zell-Zone der sekundären lymphatischen Organe, wo sie mit naiven T-Zellen zusammentreffen. Die T-Vorläufer-Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche verschiedene T-Zell-Rezeptoren (TCR). Sie binden mit einem für das präsentierte Antigen spezifischen TCR an die DCs, werden daraufhin aktiviert und proliferieren zu zytotoxischen Zellen oder Helferzellen. Lymphozyten, die das

Zelloberflächenprotein CD4 tragen (T-Helfer-Zellen, T_H -Zellen), binden an das MHC-II-Molekül, während $CD8^+$ Lymphozyten (zytotoxische T-Zellen) das MHC-I-Molekül erkennen (Banchereau and Steinman, 1998). Zur vollständigen Aktivierung benötigen naive T-Zellen zusätzlich zur Erkennung des Antigens über TCR noch kostimulatorische Moleküle. Kostimulatorische Moleküle auf der Oberfläche von DCs sind z.B. die B7-Moleküle CD80 und CD86 oder das Molekül CD40, an welche T-Zellen über ihre Oberflächenmoleküle CD28 bzw. CD40L binden. Die weitere Ausdifferenzierung von T-Helfer-Zellen zu einer T_H1 - bzw. T_H2 -Zelle wird über die Zytokine IL-12 bzw. IL-4 entscheidend beeinflusst (Murphy and Reiner, 2002).

Unter Einfluss von IL-12 entwickeln sich T_H1 -Zellen, die selber $IFN-\gamma$ sezernieren (Trinchieri, 2003). T_H1 -Zellen leiten die T_H1 -Immunantwort ein, die überwiegend gegen intrazelluläre Pathogene gerichtet ist. Durch die T_H1 -Antwort werden Makrophagen aktiviert, die das Pathogen durch Phagozytose aufnehmen und eliminieren können. Zusätzlich stimuliert die T_H1 -Antwort B-Lymphozyten zur Produktion bestimmter Antigen-spezifischer Antikörperklassen (IgG2a). Im Gegensatz dazu leiten T_H2 -Zellen eine T_H2 -Immunantwort ein, die vor allem auf die Eliminierung extrazellulärer Pathogene spezialisiert ist. T_H2 -Zellen produzieren in erster Linie IL-4 und IL-10, regen B-Zellen zur Produktion von Immunglobulinen an und induzieren die Ausreifung und Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten (Wilson and Crabtree, 2007).

Eine weitere Gruppe der $CD4^+$ T-Zellen sind T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften (T_{reg}). Es gibt mehrere Untergruppen von T_{reg} , welche die Aufgabe haben, die pathologische und physiologische Immunantwort zu kontrollieren. Diese Zellen sind wichtig bei der Prävention von immun-vermittelten Allergien, Autoimmunität oder entzündlichen Darm-erkrankungen. Sie regulieren die Immunantwort auf eine Vielzahl von Infektionen (Robinson et al., 2007). $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen besitzen die Fähigkeit, Zellen zu detektieren und abzutöten, welche virale Antigene oder Tumorantigene exprimieren.

Die Vermittler der humoralen Immunität sind B-Lymphozyten. Nach spezifischer Aktivierung durch eine Antigen-präsentierende Zelle und unterstützt durch T-Helfer-Zellen, beginnen B-Lymphozyten mit der klonalen Expansion und Differenzierung zu Plasmazellen. Die Plasmazellen sezernieren Immunglobuline (Ig), die Antigene erkennen und binden. In der Entwicklung der B-Zellen unterlaufen die Gene der Immunglobuline einen Rekombinationsprozess, wodurch verschiedene Antigen-spezifische Immunglobuline gebildet werden. Jede einzelne Plasmazelle produziert nur ein Immunglobulin mit Spezifität für ein Antigen.

Die adaptive Immunantwort auf eine Infektion mit *H. pylori* ist von einer zellulären und humoralen Komponente geprägt. Nach der spezifischen Aktivierung durch eine APC kommt es zur klonalen Expansion und Differenzierung der T-Lymphozyten. In Vakzinierungs-

modellen sind T-Helfer-Zellen von zentraler Bedeutung für die bakterielle Elimination bei der *H. pylori*-Infektion (Ermak et al., 1998). Die Aufgabe dieser Zellen besteht darin, die Proliferation von T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen über die Sekretion verschiedener Zytokine zu steuern. Da *H. pylori* ein vorwiegend nicht-invasiver Keim ist, würde eine T_H2 -Antwort erwartet werden. Paradoxerweise besitzen die T-Zellen der Mukosa infizierter Patienten jedoch einen T_H1 -Phänotyp (Suerbaum and Michetti, 2002), der durch die Sekretion von $INF-\gamma$ charakterisiert ist. Ebenso wird eine gastrale Zytokinantwort beobachtet, die für die T_H1 -Polarisierung typisch ist. Hierzu gehört die verstärkte Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-12, $TNF-\alpha$ und IL-18, im Verlauf der Infektion. Im Gegensatz dazu ist die gastrale Expression von IL-4 sehr gering (Robinson et al., 2007).

Obwohl die gastrale Antwort T_H1 -geprägt ist, beobachtet man bei infizierten Personen eine starke Antikörperantwort. Die chronische Infektion führt zur Bildung von spezifischem IgM, IgA und IgG (Ernst et al., 2006). IgG (sowohl IgG1 als auch IgG2) und IgA lassen sich dabei im Allgemeinen sowohl lokal im Magengewebe als auch systemisch im Serum nachweisen (Wilson and Crabtree, 2007). Die Antikörperproduktion führt aber nicht, wie zu erwarten, zu einer Eradikation der Infektion, sondern kann zu einem zusätzlichen Gewebeschaden verursachen (Ernst et al., 2006). Außerdem spielt die B-Zell-Antwort eine bedeutende Rolle bei *H. pylori*-induzierten Autoimmunprozessen (Robinson et al., 2007). In diesem Fall kommt es zu einer Kreuzreaktion zwischen bakteriellen Antigenen und Antigenen des Wirtes, die zu einer lokalen Entzündung und Zellschädigung führt. So wurde z.B. molekulares Mimikry zwischen bakteriellen Antigenen und Epitopen der Parietalzell $H^+-K^+-ATPase$ nachgewiesen (Amedei et al., 2003).

Neben einer proinflammatorischen Immunreaktion induziert *H. pylori* auch eine regulatorische T-Zell-Antwort. Studien zeigten, dass T_{reg} die T_H1 -Antwort unterdrücken und so zur Persistenz der *H. pylori*-Infektion beitragen (Rad et al., 2006a; Raghavan and Holmgren, 2005; Wilson and Crabtree, 2007).

1.3. Dendritische Zellen

Paul Langerhans beschrieb bereits 1868 die ersten dendritischen Zellen in der Epidermis der Haut, hielt diese Zellen jedoch für Bestandteile des Nervensystems. Erst in den 70-er Jahren des letzten Jahrhunderts fanden Steinman und Cohn ähnliche Zellen in peripher lymphatischen Organen von Mäusen; nach ihrem charakteristischen mikroskopischen Erscheinungsbild mit zahlreichen astförmigen, zytoplasmatischen Ausläufern nannten sie diese dendritische Zellen (DC; von griechisch dendros = Baum) (Steinman and Cohn, 1973). Mitte der 80-er Jahre erkannte man, dass DCs und die bereits vor mehr als hundert Jahren

entdeckten Langerhanszellen einem gemeinsamen Zellsystem angehören (Schuler and Steinman, 1985). In den folgenden Jahren wurden verschiedene Typen von DCs auch in anderen lymphatischen Organen sowie in zahlreichen nicht-lymphatischen Geweben nachgewiesen und ihre Funktion beschrieben.

Die dendritischen Zellen stellen die bedeutendste Gruppe der Antigen-präsentierenden Zellen dar. Sie zeichnen sich durch verschiedene Eigenschaften aus, die es ihnen ermöglichen, die spezifische Immunantwort gegen Mikroorganismen zu aktivieren. DCs kommen in nahezu allen peripheren Geweben des Körpers vor. Sie können extrazelluläre Bestandteile durch Phagozytose und Endozytose aufnehmen, in der Zelle prozessieren und anschließend die Peptide auf ihrer Oberfläche im MHC-Komplex präsentieren (Banchereau and Steinman, 1998). DCs findet man in allen peripheren Organen in einer inaktiven Vorstufe (steady-state). Sie wandern erst nach dem Kontakt mit dem Pathogen und dessen Aufnahme in die regionalen Lymphknoten, um dort T-Zellen zu aktivieren.

1.3.1. Subtypen dendritischer Zellen

DCs stellen keine homogene Zellpopulation dar. Verschiedene DC-Subtypen durchlaufen unterschiedliche Differenzierungswege, exprimieren unterschiedliche Oberflächenmoleküle und besitzen spezifische Funktionen (Shortman and Liu, 2002). Alle Typen von DCs haben jedoch das Knochenmark als gemeinsamen Bildungsort und entwickeln sich dort aus Vorläuferzellen. Entscheidende Faktoren bei der Differenzierung zu DCs sind GM-CSF und Flt-3-Ligand (Banchereau et al., 2000; Ardavin et al., 2001). Diese sind notwendig für die Differenzierung von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen zu myeloiden (CMP = common myeloid precursors) und lymphoiden (CLP = common lymphoid precursors) Vorläuferzellen. Beide Zellpopulationen unterscheiden sich durch ihre Oberflächenmarker und durch die unterschiedlichen Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren, die für ihre Differenzierung notwendig sind. Es wurde bereits gezeigt, dass CMPs und CLPs unterschiedliche Profile an PRRs exprimieren und damit unterschiedliche Pathogene erkennen können (Shortman and Liu, 2002).

Unter dem Einfluss von Flt3-Ligand differenzieren die lymphoiden Vorläufer zu plasmazytoiden DCs (pDCs) und konventionellen DCs (cDCs) (Wu and Liu, 2007). CLPs können außerdem weiter zu Vorläuferzellen von T- und B-Lymphozyten reifen.

Aus myeloiden Vorläuferzellen können sich über verschiedene Vorläuferstadien Granulozyten, Monozyten, cDCs und unter Einfluss von Flt3-Ligand auch pDCs entwickeln. Unter inflammatorischen Bedingungen, z. B. durch die Anwesenheit von GM-CSF, können auch Monozyten weiter zu cDCs differenzieren (Cella et al., 1997).

pDCs wurden als erstes in humanem Blut und in Tonsillen identifiziert. Inzwischen wurden sie aber auch bei Mäusen in Knochenmark, Blut, Milz, Lymphknoten, Leber, Peyer'schem Plaque und Mukosagewebe charakterisiert. Im inaktiven Zustand sind diese Zellen rund und weisen nicht die charakteristische Form von DCs auf (Shortman and Naik, 2007). Die Aktivierung der pDCs führt zur Sekretion von Zytokinen, besonders von Typ I Interferonen, wie IFN- α oder IFN- β (Krug et al., 2001). Durch das freigesetzte IFN- α/β werden natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) aktiviert und zur Sekretion von IFN- γ angeregt (Bauer et al., 2001). Über die Ausschüttung von verschiedenen Zytokinen humaner und muriner pDCs werden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aktiviert.

Obwohl pDCs die Möglichkeit besitzen, virale Antigene nach viraler Infektion zu prozessieren und präsentieren, scheint ihre Fähigkeit, exogene Antigene via MHC-I-Moleküle zu präsentieren (Kreuzpräsentation), limitiert. Durch die Bildung von Typ I IFNs während einer viralen Infektion fördern pDCs jedoch die Fähigkeit anderer DCs, naive CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren und damit eine zytotoxische T-Zellantwort auf exogene Antigene einzuleiten (Liu, 2005). Weiterhin vermitteln pDCs auch die Differenzierung humaner B-Zellen zu Immunglobulin-produzierenden Plasmazellen. Hierzu trägt die Bildung beider Typ I Interferone sowie von IL-6 bei (Jego et al., 2003). pDCs exprimieren TLR7 und TLR9, was ihre starke Antwort auf Einzelstrang-RNA (ssRNA) sowie auf bakterielle und virale DNA erklärt (Yrlid et al., 2006). Virus-aktivierte pDCs induzieren in erster Linie eine T_H1-Antwort. Unter bestimmten Bedingungen können aktivierte pDCs aber auch eine T_H2-Immunantwort einleiten (Colonna et al., 2004). Immature pDCs hingegen haben tolerogene Funktionen. Sie können Anergie von T-Zellen induzieren und spielen auch eine Rolle bei der Elimination potentiell autoreaktiver T-Zellen (Vandenabeele and Wu, 1999; Penna et al., 2001).

cDCs werden entsprechend ihrer Lokalisation im Gewebe weiter unterteilt. So unterscheidet man dendritische Zellen der Haut (Langerhanszellen der Epidermis sowie dermale DCs), Mukosa-assoziierte DCs, DCs der lymphatischen Gewebe und DCs von interstitiellen Geweben, einschließlich der Lunge und Leber (Wu and Liu, 2007). Alle Subtypen werden in einem inaktiven Stadium im Organismus beobachtet. cDCs besitzen die strukturellen Voraussetzungen, um äußerst effizient Antigene zu erkennen, aufzunehmen und diese letztlich den T-Zellen, gebunden an MHC-I und MHC-II, zu präsentieren. Neben der Fähigkeit zur Antigenpräsentation können cDCs nach entsprechender Stimulation auch proinflammatorische Zytokine, z.B. IL-12, IL-6 und IL-10, bei Stimulation mit Lipopolysacchariden ausschütten (Langenkamp et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich CD11c⁺ cDCs aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark verschiedener Mausstämmen mit Hilfe von GM-CSF generiert und weiter untersucht.

pDCs und cDCs exprimieren unterschiedliche TLRs. Bei pDCs findet man eine Reihe von TLRs, TLR7 und TLR9 mit eingeschlossen. Humane pDCs exprimieren die Rezeptoren 1, 6,

7, 9 und 10, nicht jedoch 2, 3, 4, 5 oder 8. Dies erklärt, warum diese pDCs nicht auf bakterielle Produkte wie Peptidoglykan, Lipopolysaccharide oder Flagellin antworten. Murine pDCs exprimieren alle TLRs außer den Rezeptoren 3, 10 und 11.

Unter allen Zelltypen des Organismus besitzen cDCs das breiteste TLR-Repertoire. Humane cDCs exprimieren alle Toll-like Rezeptoren, bis auf TLR9, während murine cDCs alle bekannten TLRs exprimieren – ausgenommen TLR10, der jedoch in der Maus grundsätzlich nicht vorkommt (Germain, 2004).

1.3.2. Die zentrale Rolle dendritischer Zellen bei der Induktion innater und adaptiver Immunantwort

DCs zirkulieren als unreife Vorläuferzellen in der Blutbahn, bevor sie in periphere Gewebe einwandern. Hier findet man DCs in unterschiedlichen Reifestadien, die sich jeweils durch charakteristische Expression von Oberflächenmolekülen sowie in ihrer spezifischen Funktion unterscheiden. Die Wanderung der DCs aus dem peripheren Gewebe in die Lymphknoten sowie ihre funktionelle Differenzierung werden durch verschiedene Signale eingeleitet. Hierzu gehören die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine, wie das von Makrophagen sezernierte IL-10 oder TNF- α , und das Erkennen von mikrobiellen Bestandteilen (z.B. bakterielle DNA oder LPS) über die PRRs.

Unreife DCs können ein Antigen durch Phagozytose, Makropinozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose aufnehmen; sie wandern dann im aktivierten Zustand über die Lymphbahnen zu den regionalen Lymphknoten, wo sie eine T-Zell-Antwort induzieren (Banchereau and Steinman, 1998).

Die rezeptorvermittelte Endozytose erfordert die Bindung eines Antigens an einen Rezeptor der DCs. Dafür exprimieren die DCs unter anderem den Mannoserezeptor und Scavenger-Rezeptoren (Medzhitov, 2001; Shakushiro et al., 2004). Über Fc-Rezeptoren können DCs zusätzlich Antigene aufnehmen und prozessieren, die bereits an Antikörper gebunden haben (Regnault et al., 1999; Bajtay et al., 2006). Bei der Prozessierung wird das endogene Antigen durch Proteasen und Peptidasen gespalten (Hart, 1997), um anschließend den T-Lymphozyten über MHC-I- und/oder MHC-II-Komplexe präsentiert zu werden.

Während die DCs über Lymphbahnen in die umliegenden Lymphknoten wandern, durchlaufen die Zellen einen Aktivierungsprozess, der eine Reihe an phänotypischen, morphologischen und funktionellen Veränderungen mit sich bringt. Durch diese Veränderungen entstehen reife, Antigen-präsentierende DCs mit hoch effizientem stimulatorischem Potential. Es kommt zu einer gesteigerten Expression der Oberflächenmoleküle MHC-I und MHC-II sowie zur verstärkten Bildung verschiedener Adhärenzmoleküle (z.B. CD54 und CD58) und kostimulatorischer Moleküle, wie CD80

(B7.1), CD86 (B7.2) und CD40 (Hart, 1997). Reife DCs verlieren außerdem die Fähigkeit zur Phagozytose und Makropinozytose (Sato and Fujita, 2007). Sie sezernieren zudem verschiedene Zytokine, wie z.B. IL-12 oder IL-4, die Einfluss auf die T-/NK-Zell-Aktivierung und die Reifung weiterer DCs nehmen.

Neben der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen können DCs jedoch auch anti-inflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-10, freisetzen. IL-10 hemmt die Antigenpräsentation und die T-Zell-Aktivierung und verhindert damit eine überschießende Entzündungsreaktion (Wallet et al., 2005).

Naive T-Zellen gelangen über den Blutkreislauf zu den peripheren lymphatischen Organen (Janeway, Jr. and Medzhitov, 2002). Erkennen die naiven T-Zellen ein über MHC-Moleküle präsentiertes Antigen mit ihrem spezifischen T-Zell-Rezeptor (priming), proliferieren sie und differenzieren zu T-Effektorzellen. Die T-Zellen benötigen für ihre Aktivierung dreierlei Signale von APCs: 1) Antigenpräsentation; 2) Kostimulation; 3) Zytokinsekretion.

DCs präsentieren Antigene über MHC-Komplexe an T-Zellen. Über ihre T-Zell-Rezeptoren (TCR) können T-Zellen diese erkennen und binden. Zur Aktivierung der T-Zelle ist jedoch die zusätzliche Kostimulation von Seiten der APC nötig. Kostimulatorische Moleküle der DCs, wie z.B. CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) oder CD40, können mit entsprechenden Oberflächenmolekülen der T-Zellen interagieren. Zur Bindung an die B7-Moleküle exprimiert die T-Zelle CD28 an ihrer Oberfläche, über CD40L bindet sie an CD40-Moleküle der DCs. Diese beiden Signale, Antigenpräsentation und Kostimulation, führen zusammen zur verstärkten Freisetzung von IL-2 aus aktivierten T-Zellen, was zur Proliferation der T-Zellen führt (Lanzavecchia and Sallusto, 2001). Die Antigen-Erkennung ohne zusätzliche kostimulatorische Moleküle führt dagegen zur T-Zell-Toleranz. Dadurch wird die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen in Effektorzellen verhindert und die weitere Immunantwort gehemmt.

Handelt es sich bei den Antigenen um zytosolische Proteine (sowohl körpereigene als auch virale) oder kreuzpräsentierte Peptide, wird das Antigenpeptid über ein MHC-I-Molekül präsentiert. Naive CD8⁺ T-Zellen erkennen den MHC-I-Peptid-Komplex und werden zu zytotoxischen T-Effektorzellen aktiviert (Jensen, 2007). Zytotoxische T-Zellen können Zellen, die virale Proteine oder Tumorantigene exprimieren, detektieren und abtöten.

Wird hingegen das Antigen (z.B. bakterielle Proteine, Proteine von Pilzen) über einen MHC-II-Komplex präsentiert, werden vor allem Zellen des CD4⁺ T-Helfer-Typs (T_H) aktiviert, die nahezu alle Komponenten der adaptiven Immunität regulieren. Abhängig von den durch DCs ausgeschütteten Zytokinen, differenziert die naive T-Zelle zu einer T_H1-Zelle bzw. T_H2-Zelle. Ein wichtiges Zytokin, das bei der Induktion einer T_H1-Antwort ausgeschüttet wird, ist IL-12. Bei der Differenzierung von T_H2-Zellen spielt dagegen das

Zytokin IL-4 eine Rolle (Murphy and Reiner, 2002). Die aktivierten T_H1 - und T_H2 - Zellen verlassen den Lymphknoten und wandern in das entzündete Gewebe, um dort ihre Funktion als Effektorzellen zu erfüllen. Die T_H -Zellen sezernieren dabei selbst Zytokine. Ein typisches Zytokin, das von T_H1 -Zellen ausgeschüttet wird, ist IFN- γ . Im Gegensatz dazu produzieren T_H2 -Zellen unter anderem IL-4 und IL-5. IL-4 und IFN- γ fungieren als autokrine Wachstumsfaktoren der jeweiligen T-Helfer-Zellen und hemmen zusätzlich die Ausdifferenzierung der jeweils anderen Subgruppe (Liew, 2002). T_H1 -Zellen leiten eine T_H1 -Immunantwort ein, die für die Bekämpfung intrazellulärer Bakterien, vieler Viren und Tumorzellen benötigt wird (Patterson, 2000). Durch T_H1 -spezifische Zytokine werden vor allem Makrophagen, NK-Zellen, zytotoxische T-Zellen und neutrophile Granulozyten aktiviert. In B-Zellen fördert IFN- γ außerdem einen Isotypenwechsel der IgG Immunglobuline hin zu IgG2a (Martin et al., 1998; Finkelman et al., 1988; Stevens et al., 1988). Die T_H2 -Immunantwort ist gegen extrazelluläre Pathogene, wie z.B. Parasiten, gerichtet. IL-4 ist ein potenter Stimulus von B-Zellen. Anders als IFN- γ , kontrolliert IL-4 in der Maus den Antikörperklassenwechsel zu den Isotypen IgG1 und IgE (Gor et al., 2003). Zudem kommt es im Rahmen einer T_H2 -Antwort typischerweise zur Ausreifung und Rekrutierung von eosinophilen und basophilen Granulozyten und Mastzellen.

Werden DCs wiederholt hohen Mengen an IL-10 ausgesetzt, wird die Bildung von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) eingeleitet. Die T_{reg} sind durch die Produktion immunsuppressiver Faktoren, beispielsweise IL-10 und TGF- β , charakterisiert. Sie unterdrücken durch ihre Zytokin-Produktion die Effektor-Zell-Antworten T_H1 und T_H2 (MacPherson et al., 1999).

1.4. Toll-like Rezeptoren

1.4.1. Mustererkennende Rezeptoren

Das angeborene Immunsystem nutzt zur Detektierung von Pathogenen vor allem mustererkennende Rezeptoren (Pattern recognition receptors; PRRs). Es handelt sich hierbei um Rezeptoren der Wirtszelle, die Pathogene anhand bestimmter molekularer Strukturen, den PAMPs, erkennen (Medzhitov and Janeway, Jr., 1998). Zelloberflächenkomponenten von Mikroorganismen, wie Glykoproteine, Proteine, Peptide, Lipide, Oligo- oder Polysaccharide, aber auch bakterielle und virale Nukleinsäuren, können so erkannt werden. Die PAMPs besitzen konservierte Strukturen, die beim Wirt selbst nicht vorkommen. Dies ermöglicht dem Immunsystem, Erreger zu erkennen und zwischen körpereigenem und körperfremdem Gewebe zu unterscheiden. Meist repräsentieren PAMPs Strukturen, die großen Gruppen von

Mikroorganismen gemeinsam sind, wie beispielsweise die Lipopolysaccharide der äußeren Zellwand aller gramnegativer Bakterien (Aderem and Ulevitch, 2000). Letztlich führt diese Eigenschaft der PAMPs dazu, dass eine limitierte Anzahl keimbahnkodierter Rezeptoren eine große Vielfalt an Mikroorganismen erkennen und abwehren kann (Medzhitov and Janeway, Jr., 1997). PRRs werden sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär exprimiert; oder sie werden ins Blut oder in Gewebsflüssigkeiten sezerniert. Man findet sie bei einer Reihe von Zellen des angeborenen Immunsystems, insbesondere auf Epithelzellen, Granulozyten, Mastzellen und Antigen-präsentierenden Zellen, wie Makrophagen und dendritischen Zellen. Sie dienen der Opsonierung von Mikroorganismen, der Aktivierung der Komplement- oder Gerinnungskaskade, der Aktivierung proinflammatorischer Signalwege oder der Induktion von Apoptose.

Innerhalb der PRRs gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptor-Familien. Eine zentrale Rolle spielen dabei die Toll-like Rezeptoren (TLRs). Alle Mitglieder der TLR-Familie sind membranständig, manche befinden sich an der Zelloberfläche, andere in intrazellulären Organellen. Auch die Scavenger-Rezeptoren und C-Typ Lektin-Rezeptoren zählen zu den Oberflächen-PRRs. Beispiele für Familien der intrazellulären PRRs sind RIG-I, DAE oder NOD-Proteine (nucleotide-binding oligomerization domain-Proteine) (Chamaillard et al., 2003). Moleküle der NOD-Familie erkennen Bestandteile des Peptidoglykans in der bakteriellen Zellwand. NOD1 detektiert γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid (γ E-DAP0), während NOD2 Muramyl-Dipeptide (MDP) erkennt. Beide NOD-Proteine regulieren proinflammatorische Signalwege über die Aktivierung von NF- κ B. Zu der Gruppe der sezernierten PRRs gehören unter anderem Capsel-reaktives Protein (CRP) oder Serum Amyloid Protein (SAP), welche in der akuten Phase einer Infektion in der Leber gebildet werden (Janeway, Jr. and Medzhitov, 2002).

1.4.2. Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

Die bisher am besten charakterisierte Klasse an PRRs in Säugetieren stellt die Familie der TLR dar. Der Rezeptor Toll wurde in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo er in der Embryogenese bei der dorso-ventralen Ausrichtung des Embryos von Bedeutung ist (Anderson et al., 1985). Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind transmembrane Rezeptoren; sie sind charakterisiert durch den intrazellulären Bereich, der dem IL-1-Rezeptor ähnlich ist (TIR = Toll/Interleukin-1-Rezeptor), und den extrazellulären, Leucin-reichen Abschnitt (leucin rich repeats, LRR) (Gay and Keith, 1991; Medzhitov et al., 1997; Akira et al., 2006). Aufgrund von Sequenzhomologien zu dem IL-1-Rezeptor (IL-1R), über welchen in Säugetieren die Aktivierung des nukleären Faktors κ B (NF- κ B) induziert wird, wurde ein Zusammenhang zwischen Toll und der Einleitung der angeborenen Immunität vermutet (Gay and Keith,

1991); dies wurde mit Untersuchungen an *Drosophila*-Stämmen, die eine Mutation im Toll-Signalweg aufweisen, bestätigt (Lemaitre et al., 1996). Inzwischen wurden in Säugetieren homologe Sequenzen zu Toll identifiziert und als Toll-like Rezeptoren bezeichnet (Medzhitov et al., 1997). Beim Menschen sind zehn verschiedene TLRs bekannt, in der Maus konnten bisher zwölf TLRs (Kaisho and Akira, 2006) identifiziert werden, die direkt durch verschiedenste PAMPs oder endogene Liganden aktiviert werden können. Dabei werden PAMPs oder endogene Liganden vom LRR-Bereich der TLRs erkannt. Über die TIR-Domäne der Rezeptoren wird eine intrazelluläre Signalkaskade eingeleitet. Für viele der TLRs kennt man bereits die Liganden. Durch die Aktivierung der TLRs wird die Expression verschiedener immunstimulatorischer Zytokine, wie IL-1, IL-6, IL-8, sowie kostimulatorischer Moleküle induziert (Medzhitov et al., 1997). Die Sekretion diese Zytokine führt zur Aktivierung des Immunsystems. TLRs werden von verschiedenen Immunzellen, einschließlich DCs, Makrophagen, B-Zellen, einigen Gruppen von T-Zellen, sowie von Nicht-Immunzellen, wie Fibroblasten oder Epithelzellen, exprimiert (Akira et al., 2006). Dabei variiert die Expression der TLRs von Zelltyp zu Zelltyp. Außerdem ist die Expression der TLRs nicht statisch, sondern kann durch Pathogene, durch die Ausschüttung von Zytokinen oder durch Stressfaktoren moduliert werden. Die TLRs 1, 2, 4, 5 und 6 befinden sich auf der Oberfläche von Zellen, während TLR3, 7, 8 und 9 vor allem intrazellulär, z.B. in der Endosomenmembran, gefunden werden.

Als Liganden für TLRs wurden Bestandteile von Bakterien, Viren, Protozoen oder Pilzen beschrieben (Kawai and Akira, 2007). In Tabelle 3 sind die heute bekannten Liganden für die verschiedenen TLRs aufgezählt. Die TLR1-10 werden beim Menschen exprimiert. In der Maus findet man TLR1-9 sowie TLR11-13. TLR10 wird in der Maus nicht exprimiert (Kaisho and Akira, 2006). Durch kombinatorische Dimerisierung (z.B. zwischen TLR1 und TLR2 oder TLR2 und TLR6) und zusätzliche Erkennungsmoleküle (z.B. CD14 bei TLR4) wird die Erkennungsvielfalt der Rezeptoren noch vergrößert. Die Stimulation von TLRs, die sich auf DCs oder Makrophagen befinden, führt zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, AP-1 und IRF3, und damit zur Expression proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Typ I Interferone sowie kostimulatorischer B7-Moleküle auf der Oberfläche von DCs. Zusätzlich wird die Phagozytosefähigkeit durch Freisetzung von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen gesteigert.

Tabelle 3: Bekannte TLRs und ihre Liganden (Akira et al., 2006)

TLR	Ligand	Ursprung des Liganden
TLR1	Triacyl-Lipopetide	Bakterien und Mykobakterien
TLR2	Peptidoglykan	Gram-positive Bakterien
	Diacyl-Lipopeptide	Mykoplasmen
	Triacyl-Lipopetide	Bakterien und Mykobakterien
	Lipoteichonsäure	B-Streptokokken
	Porine	Neisserien
	Lipoarabinomannan	Mykobakterien
	Zymosan	Saccharomyces cerevisiae
	Phospholipomannan	Candida albicans
	Glucuronoxylomannan	Cryptococcus neoformans
	tGPI-mutin	Trypanosomen
	Hämagglutinin Protein	Masernvirus
	noch nicht bekannt	HCMV, HSV1
TLR3	dsRNA	Viren
TLR4	Lipopolysaccharid (LPS)	Gram-negative Bakterien
	Glucuronoxylomannan	Cryptococcus neoformans
	Mannan	Candida albicans
	Glycoinositolphospholipide	Trypanosomen
	Envelope proteins	RSV, MMTV
	Hitzeschock Protein 60, 70	Wirt
	Fibrinogen	Wirt
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Diacyl Lipopeptide	Mykoplasmen
	Lipoteichonsäure	B-Streptokokken
	Zymosan	Saccharomyces cerevisiae
TLR7	ssRNA	RNA Viren
TLR8	ssRNA	RNA Viren
TLR9	CpG-DNA (unmethylierte DNA)	Bakterien und Mykobakterien
	DNA	Viren
	Hemozoin	Plasmodien
TLR10	Noch nicht bekannt	
TLR11	Noch nicht bekannt	uropathogene Bakterien
	Profillin-ähnliche Moleküle	Toxoplasma gondii
TLR12	Noch nicht bekannt	

HCMV = Human Cytomegalie Virus; HSV1 = Herpes simplex Typ1 Virus; RSV = Respiratory-Syncytial Virus;
MMTV = Maus-Mammatumor Virus

1.4.3. TLR-vermittelte Signalwege

Der Kontakt von TLRs mit mikrobiellen Bestandteilen führt zu einer gesteigerten Expression von Transkriptionsfaktoren und aktiviert damit die Bildung wichtiger Mediatoren der angeborenen Immunität, wie z.B. Zytokine und Chemokine. Zusätzlich wird über die TLR-Signalwege, z.B. über Expression kostimulatorischer Moleküle, die Einleitung der adaptiven Immunität induziert (Kawai and Akira, 2007). Einige TLRs induzieren außerdem Typ I Interferone und aktivieren damit eine antivirale Antwort (Kawai and Akira, 2007). Durch die Stimulierung der TLRs werden Adaptermoleküle, die eine TIR-Domäne enthalten, zur Bindung an die TIR-Domäne der TLRs rekrutiert. Es gibt vier Adaptermoleküle (Akira et al., 2006):

- Myd88 (myeloid differentiation primary response protein)
- TIR-associated protein (TIRAP)/Myd88-adaptor-like protein (MAL)
- TIR-domain-containing adapter protein-inducing IFN- β (TRIF)/TIR-containing molecule 1 (TICAM1)
- TRIF-related adaptor molecule (TRAM)

Die unterschiedlichen Antworten der TLRs auf Pathogene werden durch unterschiedliche Kombination dieser Adaptermoleküle ausgelöst. Myd88 und TRIF sind für die Aktivierung von Signalwegen, die zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und Typ I Interferone führen, verantwortlich. Alle TLR, mit Ausnahme von TLR3, nutzen einen Myd88-abhängigen Signalweg (Kawai and Akira, 2005). TIRAP fungiert zusammen mit Myd88 als Adaptermolekül für TLR1, TLR2, TLR4 und TLR6. TLR4 nutzt zusätzlich zu Myd88 und TIRAP auch noch TRAM und TRIF als Adaptermoleküle. TLR3 interagiert ausschließlich mit dem Molekül TRIF. Abbildung 2 stellt die TLR-vermittelten Signalwege im Überblick dar.

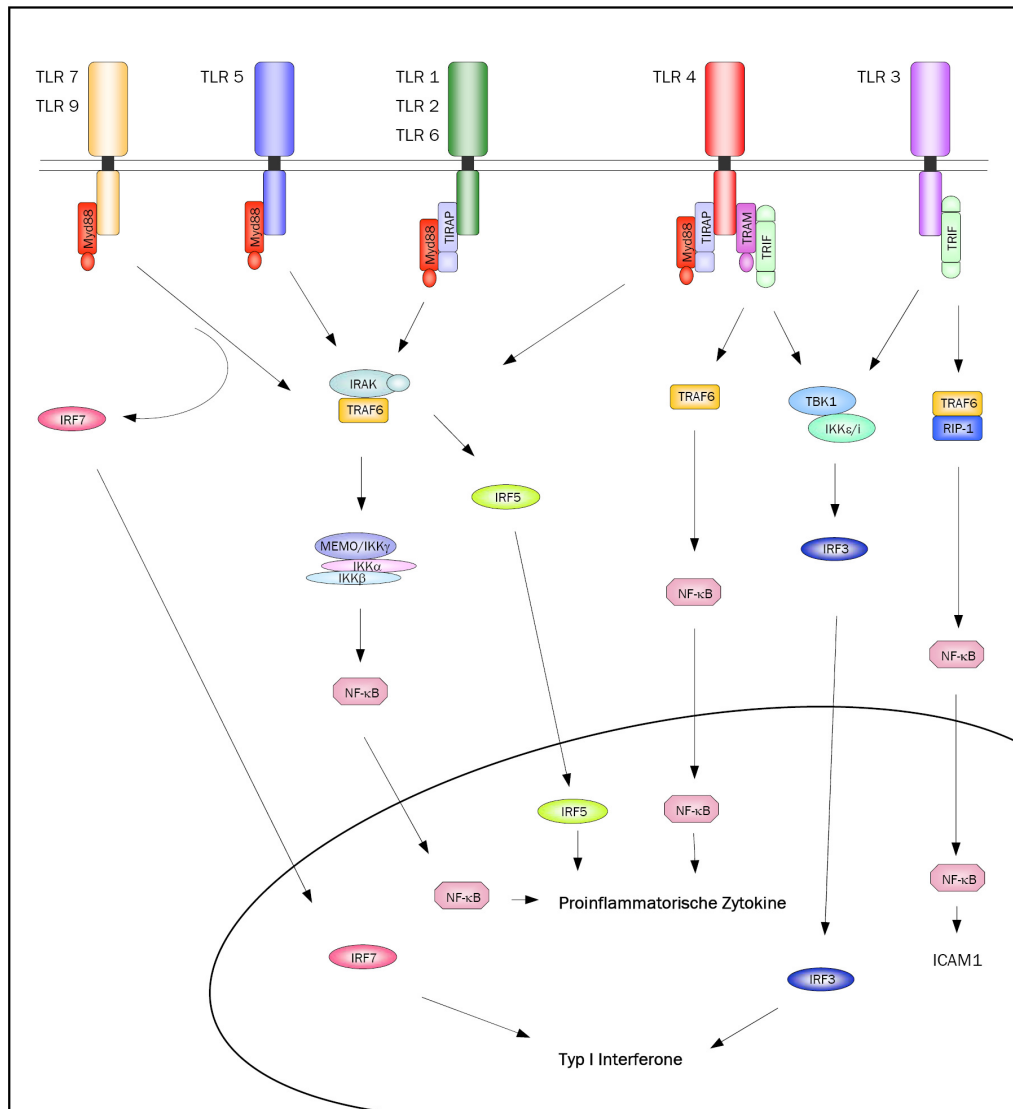


Abbildung 2: Signalkaskade der TLRs und Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren: Nach Aktivierung der TLRs durch die Bindung des entsprechenden Liganden kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Adaptermoleküle und Kinasen. Es werden der Myd88-abhängige und Myd88-unabhängige Signalweg unterschieden. Über beide Wege werden der Transkriptionsfaktor NF-κB sowie verschiedene Interferon-regulierende-Faktoren, wie IRF3, IRF5 und IRF7, aktiviert. NF-κB sowie IRF5 induzieren die Produktion proinflammatorischer Zytokine. Die Aktivierung von IRF3 und IRF7 führt zur Induktion von Typ I Interferonen.

Myd88: Myeloider Differenzierungsfaktor 88; TIRAP: TIR-assoziiertes Adapterprotein; TRIF: TIR-enthaltendes Adaptermolekül; TRAM: TRIF-verwandtes Adaptermolekül; IRAK: IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase; TRAF: Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor; IRF: IFN-regulierender Faktor; IFN: Interferon; NF-κB: Nukleärer Faktor-κB; IKK: IκB-Kinase-Komplex; TBK1: TANK-Binding-Komplex; RIP-1: Receptor-Interacting-Protein-1; ICAM1: intrazelluläres Adhäsionsmolekül

1.4.3.1. Der Myd88-abhängige Signalweg

Das Adaptermolekül Myd88 setzt sich aus einer C-terminalen TIR-Domäne und einer N-terminalen „Todesdomäne“ zusammen. Über die TIR-Domäne tritt Myd88 mit der TIR-Domäne der TLRs in Wechselwirkung. Myd88 rekrutiert IRAK4 (IL-1 receptor associated Kinase 4) zu den TLRs und bindet über die Todesdomäne an IRAK4, was zur Phosphorylierung von IRAK1 führt (Takeda and Akira, 2005). Das aktivierte IRAK1 bildet mit TRAF6 (Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 6) einen Komplex, was zur Aktivierung von zwei verschiedenen Signalwegen führt. Über den einen Weg werden MAP-Kinasen (mitogenaktivierte Proteinkinasen) aktiviert, was wiederum zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 führt und Gene, die an der inflammatorischen Antwort beteiligt sind, induziert. Der zweite Signalweg aktiviert über TAK1/TAB den I κ B Kinase (IKK)-Komplex. Hierdurch wird die Phosphorylierung und anschließende Degradierung von I κ B induziert, was zur Einwanderung von NF- κ B in den Zellkern führt (Takeda and Akira, 2005). NF- κ B induziert dann die Transkription von Genen inflammatorischer Zytokine, einschließlich TNF- α , IL-6, IL-1 β und IL-12 (Kawai and Akira, 2007). Myd88-defiziente Mäuse zeigen keine Produktion inflammatorischer Zytokine als Antwort auf alle TLR-Liganden (Kawai et al., 1999; Schnare et al., 2000; Takeuchi et al., 2000).

Zusätzlich werden Myd88-abhängig die Transkriptionsfaktoren IRF5 und IRF7 aktiviert. IRF5 induziert Gene, die für proinflammatorische Zytokine, wie IL-6 IL-12 oder TNF- α , kodieren (Takaoka et al., 2005). Im Gegensatz dazu ist IRF7, der über TLR7 und TLR9 aktiviert wird, essentiell für die Induktion von IFN- α/β bei viraler Infektion (Honda et al., 2005). Bei TLR7 und 9 erfolgt die Induktion von IFN- α zusätzlich über NF- κ B.

TLRs, die ausschließlich über Myd88-Adaptermoleküle funktionieren, sind TLR5, 7 und 9. Die TLRs 1, 2, 4 und 6 benötigen im Gegensatz dazu zur Einleitung ihres Signalweges und schließlich der Ausschüttung inflammatorischer Zytokine zusätzlich zum Myd88-Molekül noch das Adapterprotein TIRAP. Analog zum Myd88-abhängigen Signalweg der TLRs werden auch die Signalkaskaden des IL-1-Rezeptors sowie des IL-18-Rezeptors über Myd88 vermittelt (Schnare et al., 2001).

1.4.3.2. Der Myd88-unabhängige Signalweg

Außer bei TLR3 und TLR4 ist die intrazelluläre Signaltransduktion aller TLRs vollständig Myd88-abhängig. Experimente mit Myd88-defizienten Makrophagen zeigten die Existenz eines Myd88-unabhängigen Signalweges lediglich bei TLR3 und TLR4 (Youn et al., 2005). Die Aktivierung dieser Myd88-unabhängigen Signalwege durch Bindung spezifischer Liganden an TLR3 und TLR4 (z.B. LPS oder dsRNA) führt zur Reifung von DCs, zur Expression

kostimulatorischer Moleküle und zur Regulation der Typ I Interferon-Antwort (Akira et al., 2006). Beide Rezeptoren nutzen bei der Induktion der Signalkaskade das Adapterprotein TRIF.

TLR4 kann sowohl über TRIF als auch über Myd88 eine Zellantwort auslösen. Im Myd88-unabhängig vermittelten Signalweg benötigt TLR4 zusätzlich zum TRIF-Molekül noch das Adapterprotein TRAM. Über TRIF/TRAM wird zum einen TRAF6-abhängig der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert, was zur Expression inflammatorischer Zytokine und IFN- β führt (Kaisho and Akira, 2006). Zum anderen kann über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 direkt die IFN- β Expression induziert werden.

Die Signalübertragung von TLR3 ist vollständig unabhängig von Myd88 und führt ausschließlich über TRIF zur Aktivierung von IRF3 und NF- κ B. IRF3 induziert vor allem die Bildung von IFN- β . Die TRIF-abhängige NF- κ B Aktivierung zeigt eine verspätete Kinetik und führt beispielsweise zur Induktion der IFN- β und ICAM1 Expression.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Die Infektion mit *H. pylori* ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten des Menschen. Ohne adäquate Therapie persistiert der Keim ein Leben lang im Magen der Infizierten und ist für eine Reihe von gastroduodenalen Krankheiten, wie peptische Ulzera, Magenkarzinom und MALT-Lymphom, verantwortlich. Die durch den Keim ausgelöste Entzündungsantwort ist von großer Bedeutung bei der Entstehung gastraler Pathologien. Die Mechanismen der Erkennung von *H. pylori* durch Zellen des Immunsystems und der Einleitung der Entzündungsantwort werden bisher jedoch nur unzureichend verstanden. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche Rolle Toll-like Rezeptoren bei der Erkennung von *H. pylori* durch die dendritische Zelle spielen und inwieweit dies bei der Induktion der Immunantwort *in vivo* von Bedeutung ist.

Im ersten Teil der Arbeit sollten die molekularen Grundlagen der Interaktion von dendritischen Zellen mit *H. pylori* untersucht werden. Folgende Fragen galt es hierbei zu klären:

(1) Inwieweit kann *H. pylori* an DCs binden und von DCs internalisiert werden? Hierzu sollten fluoreszenz- und konfokalmikroskopische Aufnahmen von DCs, die mit GFP-exprimierendem *H. pylori* inkubiert wurden, analysiert werden.

(2) Kann *H. pylori* Reifungsprozesse in DCs induzieren? Hierzu sollte untersucht werden, ob *H. pylori* in DCs die Sekretion von Zytokinen, die Präsentation von Antigenen an T-Zellen und die Kostimulation mittels kostimulatorischer Moleküle induzieren kann.

(3) Inwieweit ist die durch *H. pylori* induzierte Reifung der DCs von TLRs abhängig? Zur Beantwortung dieser Frage sollten Versuchsreihen mit stimulierten BMDCs aus verschiedenen Mausstämmen durchgeführt werden. Von besonderem Interesse sollte dabei die durchflusszytometrische Analyse stimulierter BMDCs aus WT, Myd88^{-/-}, IL-1R^{-/-} und IL-18^{-/-} Tieren sein. Zum anderen sollte die Sekretion bestimmter Zytokine aus den DCs der verschiedenen Maus-Stämme miteinander verglichen werden. Um die molekularen Ereignisse der Interaktion zwischen *H. pylori* und dendritischen Zellen noch genauer zu untersuchen, sollten außerdem Genexpressionsanalysen an infizierten und nicht-infizierten DCs durchgeführt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Bedeutung der TLR-abhängigen Erkennung von *H. pylori* für die Induktion innater und adaptiver Immunität *in vivo* untersucht werden. Hierzu sollte ein murines *H. pylori*-Infektionsmodell etabliert werden. Die Infektion von WT und Myd88^{-/-} Mäusen sollte dabei folgende Fragen klären:

(1) Hat Myd88-Defizienz einen Einfluss auf die gastrale Entzündungsantwort? Hierzu sollten zunächst das Ausmaß und der Schweregrad der Gastritis mikroskopisch bestimmt werden. Weiterhin sollte die Expression bestimmter Zytokine der Mukosa nach Infektion mit *H. pylori* näher untersucht und mittels TaqMan-PCR quantitativ bestimmt werden. Insbesondere sollte hierbei die Expression von T_H1-typischen Zytokinen untersucht werden.

(2) Beeinflusst Myd88^{-/-} die Kolonisation von *H. pylori* im Magen? Hierzu sollte die Expression ureB DNA infizierter Mäuse analysiert und zusätzlich eine quantitative Kultur zur Bestimmung der bakteriellen Kolonisation des Magens durchgeführt werden.

(3) Inwieweit beeinflusst die Myd88-abhängige Erkennung von *H. pylori* die Polarisierung der T-Zell-Antwort? Zur Klärung dieser Frage sollte im Serum infizierter Mäuse *Helicobacter*-spezifische IgG1 und IgG2c Titer mittels ELISA bestimmt werden.

Anhand dieser Versuche sollte gezeigt werden, welche Rolle TLRs bei der Interaktion von *H. pylori* mit DCs sowie im Infektionsmodell spielen.

2. Material und Methoden

2.1. *H. pylori*-Stämme und Kultur von *H. pylori*

2.1.1. *H. pylori*-Stämme

Für die Mausinfektionsexperimente wurden zunächst verschiedene *H. pylori*-Stämme getestet. In Tabelle 4 sind die Stämme hinsichtlich ihrer bakteriellen Virulenzfaktoren charakterisiert.

Tabelle 4: *H. pylori*-Stämme und ihre Virulenzfaktoren

<i>H. pylori</i> -Stamm	Virulenzfaktoren
SS1	<i>vacAs1</i> ; <i>cagPAI</i> +; <i>cagPAI</i> jedoch hinsichtlich IL-8 Induktion in Zielzellen nicht funktionell;
HP76	<i>vacAs2/m2</i> ; <i>cagPAI</i> -negativ;
256	<i>vacAs1/m1</i> ; <i>cagPAI</i> +
X47-2AL	<i>vacAs2m2</i> ; <i>cagPAI</i> -negativ;
B128	<i>vacAs1/m1</i> ; <i>cagPAI</i> +
G27	<i>vacAs1/m1</i> ; <i>cagPAI</i> +
G27 GFP- <i>H.pylori</i>	<i>vacAs1/m1</i> ; <i>cagPAI</i> +

Die mausadaptierten *H. pylori*-Stämme SS1, X47-2AL, 256 und B128 wurden von Dr. Richard Ferrero (Institute Pasteur, Paris, Frankreich) zu Verfügung gestellt. Das GFP-Expressionsplasmid wurde von Dr. Steffen Backert (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Otto von Guericke Universität, Magdeburg, Deutschland) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der *H. pylori*-Stamm G27 wurde im Rahmen einer anderen Studie mit dem Plasmid transformiert (Dossumbekova et al., 2006).

2.1.2. Herstellung von Selektivnährböden

Die Anzucht von *H. pylori* erfolgte auf WC-Agarplatten (Wilkins Chalgren-Agarplatten). In Tabelle 5 sind die dafür nötigen Reagenzien aufgelistet. Zur Herstellung der Platten wurden WC-Agar und Hefeextrakt in destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Anschließend wurde die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt, bevor 10% Fetales Kälberserum (FCS) und eine Antibiotika-Mischung (DENT-Supplement) zugegeben werden konnten. Das Agar wurde unter der Sterilbank in Petrischalen ausgegossen. Die Platten wurden bis zum Gebrauch umgedreht bei 4°C gelagert.

Tabelle 5: Reagenzien zur Herstellung von 1 Liter WC- Agar (Wilkins Chalgren-Agar)

WC-Agar (Oxoid; Basingstoke; UK)	43 g/l
Hefeextrakt (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)	0,25%
Aqua dest.	ad 1 l
FCS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ^a	10%
DENT-Supplement (Oxoid) ^a	2 Röhrchen/1000 ml
- Vancomycin 5 mg	
- Trimethoprim Lactat 2,5 mg	
- Cefsulodin 2,5 mg	
- Amphotericin B 2,5 mg	

^aZugabe nach dem Autoklavieren bei maximal 56°C

2.1.3. Anzucht von *H. pylori* auf Nährböden

Die Anzucht von *H. pylori* erfolgte in einem Labor mit Sicherheitsstufe 2 (S2 Labor). Hierzu wurden 100 µl eingefrorene Bakterienkultur auf einer WC-Agarplatte ausgestrichen. Die Kulturplatten wurden anschließend bei 37°C im Brutschrank unter mikroaerophilen Bedingungen (10% CO₂, 5% O₂ und 85% N₂) bebrütet. Nach ungefähr drei Tagen sind die Bakterien auf den Nährböden angewachsen. Beim Ernten wurde ihre Vitalität lichtmikroskopisch überprüft. Dabei wurde die Beweglichkeit und Morphologie der Bakterien beurteilt. Erstrebenswert sind möglichst viele sehr bewegliche, helikale Bakterien. Wachsen die Keime zu dicht oder werden sie zu lange auf der Platte belassen, werden sie kokkoid und verlieren ihre Beweglichkeit. Für die Weiterzucht der Bakterien bzw. für die Weiterverarbeitung wurden nur Kulturen verwendet, deren Bakterien überwiegend helikal und beweglich waren.

2.1.4. Langzeitlagerung von *H. pylori*

Zur Langzeitlagerung von *H. pylori* wurden Keime mit einem Wattestäbchen von Agarplatten geerntet und in Brain Heart Infusion (BHI) Medium aufgenommen. Tabelle 6 zeigt die zur BHI-Herstellung verwendeten Materialien. Die Vitalität der Keime wurde unter dem Lichtmikroskop überprüft. Zur Standardisierung wurden jeweils 10 ml der initialen Kultur photometrisch auf eine OD₅₇₈ von 1,0 eingestellt. Anschließend wurde die Bakterienlösung abzentrifugiert (10 min bei 3500 g). Der Überstand wurde verworfen und die Keime in 1 ml Lösung, bestehend aus BHI, 20% Glycerin und 10% FCS, aufgenommen. Je 100 µl davon wurden in 1,5 ml Eppendorfröhrchen bei -80°C eingefroren.

Tabelle 6: Reagenzien zur Herstellung von BHI-Medium (Brain Heart Infusion)

BHI (Sigma)	36 g/l
Hefeextrakt (Sigma)	0,25%
Aqua dest.	ad 1000 ml
FCS (Invitrogen) ^a	10%

^aZugabe nach dem Autoklavieren bei maximal 56°C

2.1.5. Herstellung von bakteriellen Lysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Herstellung von *H. pylori* Lysat wurden Bakterien zunächst auf WC-DENT-Agar-Platten ausgestrichen. Nach drei Tagen Wachstum wurden die Keime mit einem Wattestäbchen in 20 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) geerntet. Tabelle 7 enthält die Reagenzien zur Herstellung von PBS. Zur Lyse wurden die Keime im Röhrchen auf Eis gekühlt und mit Ultraschall behandelt. Dazu wurden die Keime fünfmal mit jeweils 50 Ultraschallstößen (output control: 3,3; duty cycle: 50) lysiert. Zwischen den einzelnen Beschallungen wurden die Keime jeweils für zwei Minuten auf Eis gekühlt. Die 250 Ultraschallstöße entsprechen einer Beschallungszeit von vier Minuten.

Zur Kontrolle des angestrebten Lysats wurde die Bakterien-Lösung lichtmikroskopisch beurteilt. Falls noch vitale Keime in der Lösung gefunden wurden, wurde erneut für einige Minuten beschallt. Die Konzentration des Lysats wurde photometrisch mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt und anschließend entsprechend der gewünschten Konzentration mit PBS verdünnt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zunächst nach Tabelle 8 ein Standard hergestellt. Hierzu wurde erst eine Lösung mit 200 µg BSA/ml PBS gemischt und anschließend in verschiedenen Konzentrationen mit PBS verdünnt (BSA, Pierce, Rockford, USA). Der Standard wurde zur späteren photometrischen Doppelbestimmung zweifach hergestellt. Der BioRad-Farbstoff (Bio-Rad Laboratoriers, München, Deutschland) wurde vor Verwendung 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. Die Lösung wurde gut geschüttelt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Proben nach Bedarf verdünnt. Zu jeweils 100 µl Lysat bzw. Standard-Konzentration wurde je 1 ml Farbstofflösung pipettiert.

Sodann wurden die Negativkontrolle und die Standardreihe photometrisch (Bradford 6,25 – 100 µl/ml) gemessen (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg). Am Ende ermittelte das

Gerät einen vk-Wert. Wenn dieser kleiner als 10% war, wurden anschließend alle Proben photometrisch bestimmt. Die Proteinkonzentrationen wurden vom Gerät in $\mu\text{g/ml}$ angegeben.

Tabelle 7: Reagenzien zur Herstellung von Phosphate Buffered Saline (PBS)

KCl	0,2 g
NaCl	8,0 g
KH_2PO_4	0,2 g
Na_2HPO_4	1,44g
Aqua dest.	ad 1000 ml, pH 7,4

Tabelle 8: Standard für Bradford-Proteinassay von Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories)

BSA/ml PBS	BSA (μl)	PBS (μl)
100 $\mu\text{l/ml}$	50	50
75 $\mu\text{l/ml}$	37,5	62,5
50 $\mu\text{l/ml}$	25	75
25 $\mu\text{l/ml}$	12,5	87,5
12,5 $\mu\text{l/ml}$	6,25	93,75
6,25 $\mu\text{l/ml}$	3,12	96,88
Negativkontrolle	0	100

2.1.6. Quantitative *H. pylori*-Kultur nach Reisolation aus dem murinen Magen

2.1.6.1. Herstellung von Selektivnährböden

Zur Anzucht von *H. pylori* aus infizierten Mäusemägen wurden Selektivnährböden, die zusätzlich zu der DENT-Antibiotika-Kombination auch Bacitracin, Nalidixinsäure und Polymyxin B enthalten, hergestellt. Diese Antibiotika-Komponenten wurden gewählt, um das Wachstum diverser Bakterien aus dem Magen der Maus zu unterdrücken. *H. pylori* weist jedoch gegenüber diesen Antibiotika Resistenzen auf und wächst daher auf diesen Platten. Tabelle 9 enthält die Reagenzien dieser Selektivnährböden. Die Herstellung der Nährböden entspricht der von WC-Agar-Platten.

Tabelle 9: Reagenzien zur Herstellung von Bacitracin-WC-Agar-Platten

WC-(Wilkins Chalgren)-Agar (Oxoid)	43 g/l
Hefeextrakt (Sigma)	0,25%
Aqua dest.	ad 1 l
FCS(Invitrogen) ^a	10%
DENT-Supplement (Oxoid)	2 Röhrchen/1000 ml
Bacitracin ^a	200 mg
Nalidixinsäure ^a	10,7 mg
PolymyxinB ^a	3,3 mg

^aZugabe nach dem Autoklavieren bei maximal 56°C

2.1.6.2. Durchführung der quantitativen *H. pylori*-Kultur

Zur Feststellung der quantitativen *H. pylori*-Besiedlung des Magens infizierter Mäuse wurde nach der Entnahme der Mägen ein kleines Stück Magengewebe abgetrennt und in 500 µl BHI in einem 2 ml Eppendorfröhrchen aufgenommen. Die Röhrchen (inklusive 500 µl BHI) wurden zuvor gewogen. Nachdem das Magenstückchen zugegeben worden war, wurde anhand der Gewichts Differenz (vor und nach Zugabe des Magenstückchens) das jeweilige Magengewicht ermittelt.

Anschließend wurden die Röhrchen für zehn Minuten geschüttelt, um die Bakterien aus dem Drüsengewebe herauszuwaschen. Die Magen-Lösung wurde dann 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 100 µl Lösung auf eine Bacitracin-Platte ausplattiert und im Brutschrank inkubiert.

Nach fünf Tagen wurden die Kolonien ausgezählt. Die Anzahl der Kolonien wurde nun auf das Magengewicht bezogen und schließlich die CFU (Colony Forming Units) pro 100 µg Magengewebe bestimmt.

2.2. Infektion von Mäusen mit *H. pylori*

2.2.1. Mausstämmen

Für die Infektionsversuche dieser Arbeit lag ein Tierversuchsantrag vor (Prof. S. Bauer, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Technische Universität München). Alle Infektionen erfolgten im Infektionsstall (S2) des Institutes für Mikrobiologie der TU München. Für die Infektionsversuche wurden folgende Mausstämmen eingesetzt:

C57BL/6 (Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland)

Myd88^{-/-} (Dr. S. Akira, Osaka-Universität, Japan)

IL-1R^{-/-} (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA)

IL-18^{-/-} (Inst. für Med. Mikrobiologie TUM, Prof. Heeg; (Hochholzer et al., 2000))

2.2.2. Inokulation der Mäuse mit *H. pylori*

Zur Infektion der Mäuse wurde *H. pylori* auf WC-Agar-Platten ausgestrichen und bei optimaler Bedingung im Brutschrank angezüchtet. Am dritten Tag wurde die Vitalität der Keime mikroskopisch überprüft und anschließend nur Platten mit über 90% vitalen, also spiralförmigen und gut beweglichen *H. pylori* in BHI geerntet. Die BHI-Keim-Lösung wurde photometrisch auf eine OD₅₇₈ von 10 eingestellt. Diese OD entspricht der Keimzahl von 10⁹/ml Flüssigkeit.

Jeder Maus wurden von dieser Lösung 100 µl mit einer Knopfkanüle möglichst tief in die Speiseröhre injiziert. Dazu wurden die Mäuse jeweils am Nacken mit Zeigefinger und Daumen gehalten und der Schwanz mit dem kleinen Finger an die Handfläche gedrückt. Die Infektion wurde drei und fünf Tage später wiederholt. Inokuliert wurden sechs Wochen alte männliche Mäuse.

2.3. Gewinnung von Mäuseserum

Vier Monate nach Infektion wurde den Mäusen 100 µl Ketamin-Xylacin-Lösung (10% Ketamin (Dr. E. Gräub AG, Bern, Schweiz), 2% Xylacin (Bayer, Leverkusen, Deutschland), Aqua dest.) intraperitoneal zur Anästhesie gespritzt. Anschließend wurde den Mäusen mit einer Insulinspritze aus der Vena subclavia oder intrakardial Blut abgenommen. Sollten die Mäuse anschließend getötet werden, wurden insgesamt ca. 500 µl Blut entnommen. Diente die Blutabnahme zur Antikörperbestimmung, reichte eine Menge von 50 µl aus der V. subclavia aus. Das Blut wurde bei 10000 g für zehn Minuten abzentrifugiert, der Überstand (Serum)

abpipettiert und der Rest verworfen. Das Serum wurde bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

2.4. Töten der Mäuse und Bearbeiten der Mägen

2.4.1. Präparation des Gewebes für histologische und molekularbiologische Untersuchungen

Getötet wurden die Mäuse in der Regel 16 Wochen nach Infektion mittels Genickbruch. Dazu wurden die zuvor anästhesierten Mäuse am Schwanz gehalten, ein dicker Stift wurde am Genick des Tieres angelegt und daraufhin das Tier am Schwanz bis zum Nackenbruch in die Länge gezogen.

Den toten Tieren wurde der Magen herauspräpariert und in sterilem PBS kurz gewaschen. Anschließend wurde mit einer feinen Schere der großen Kurvatur entlang ein schmaler Gewebestreifen abgeschnitten. Dieses Magenstück, welches Gewebe vom Ösophagus bis zum Duodenum enthielt, wurde noch einmal in einer mit PBS gefüllten Petrischale ausgewaschen und für die histologischen und immunhistologischen Experimente vorbereitet. Dazu wurde sowohl das ösophageale als auch das duodenale Ende der Biopsie mit einem Faden markiert und das Gewebe vor der Fixierung in Paraffin in die Länge gezogen. So war es später möglich, den gesamten Gewebestreifen mikroskopisch auf einem Schnittpräparat zu betrachten. Dieses Gewebestück wurde in 1 ml 4%-igem Paraformaldehyd (PFA) bis zur Einbettung aufbewahrt.

Der Rest des Magens wurde jeweils in zwei größere und ein kleineres Stück geteilt. Auch diese Magenteile wurden noch einmal in sterilem PBS gewaschen.

Eines der größeren Stücke wurde dazu verwendet, eine quantitative *H. pylori*-Kultur vorzunehmen, siehe Kapitel 2.1.6.

Das zweite Magensegment wurde zur Isolation von DNA und RNA verwendet. Dazu wurde es mit einer Schere weiter zerstückelt und die kleinen Gewebeteilchen in einem 2 ml Eppendorfröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das Gewebe mit einem Mörser homogenisiert und auf zwei Eppendorfröhrchen, eines zur späteren RNA- und eines zur DNA-Isolation, aufgeteilt. Beide Röhrchen wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Das kleinere Magenteil wurde zum Nachweis von *H. pylori* in einen Urease-Test gegeben (siehe Kapitel 2.5.).

2.5. Urease-Test zum Nachweis der Infektion mit *H. pylori*

H. pylori exprimiert das Enzym Urease, welches die Spaltung von Harnstoff zu Kohlenstoffdioxid und Ammoniak katalysiert. Die Base Ammoniak puffert im Magen die saure Umgebung des Keimes ab und schafft so gute Bedingungen für das Überleben der Bakterien. Der Nachweis von *H. pylori* kann relativ einfach durch die Bestimmung der Expression von Urease über ein Indikatorverfahren erfolgen.

Tabelle 10 fasst die für den OCPC-Urease-Test (O-Cresolphthalein Complexone) verwendeten Reagenzien zusammen.

Tabelle 10: Reagenzien zur Herstellung von OCPC-Urease-Test

EDTA 2Na	2,5 mmol/l
Harnstoff (Merck)	100 mg/dl
OCPC (Sigma)	2,5 mmol/l

Der pH der Lösung wurde auf 7,0 eingestellt.

Dieser Urease-Test bleibt unter Aufbewahrung bei 4-8°C für mindestens ein Jahr stabil. Zum Nachweis von *H. pylori* im Magen von Mäusen wird die Biopsie in 500 µl Urease-Test gegeben. Bei Raumtemperatur (25°C) wurde nun inkubiert, bis eine Farbreaktion sichtbar wurde. Je nach Anzahl der Keime variierte die Dauer von zehn Sekunden bis zu einem Tag.

2.6. Isolation von Nukleinsäuren

2.6.1. Isolation von DNA

Die Präparation der DNA aus den Magenbiopsien erfolgte mit dem DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Zur Isolation der DNA sind drei Schritte nötig. Im ersten Schritt wird das Gewebe lysiert, im zweiten die DNA ausgefällt und im letzten Schritt die DNA von den übrigen Gewebekomponenten getrennt.

Zur Vorbereitung der DNA-Isolation wurde das Magenstückchen in einem 2 ml Eppendorfröhrchen auf flüssigem Stickstoff so lange gemörsert, bis das Gewebe pulverisiert war. Zur Lyse wurden 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K auf das gemörserte Gewebe gegeben. Dann wurde gut geschüttelt und anschließend das Gemisch für mindestens drei Stunden bei 55°C auf einem Schüttler inkubiert. Dabei entstand eine visköse Lösung, die vor der Fällung der DNA noch einmal für 15 Sekunden gut geschüttelt wurde. Ausgefällt wurde

die DNA durch die Zugabe von 200 μl AL-Puffer und die anschließende zehnminütige Inkubation bei 70°C. Zuletzt erfolgte die Trennung der DNA von den restlichen Bestandteilen der Biopsie. Hierzu wurden der Lösung 200 μl Ethanol (96-100%) zugegeben, gut geschüttelt und die Mischung auf eine spezielle Säule aufgetragen. Diese wurde eine Minute bei 6000 g zentrifugiert (Tischzentrifuge; Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Bei der Zentrifugation wurde die DNA an die Membran der Säule gebunden, während alle übrigen Gewebestandteile die Membran durchdrangen und im Sammeltube aufgefangen wurden und anschließend verworfen werden konnten. Die DNA wurde dann mit 500 μl AW-Puffer gewaschen (Auftragung auf die Säule und Zentrifugation bei 6000 g für eine Minute). Der Waschschritt wurde wiederholt, nun wurde jedoch bei 10000 g für drei Minuten zentrifugiert, so dass der gesamte im Waschpuffer enthaltene Alkohol entfernt wurde. Zuletzt wurde die DNA zweimal eluiert. Hierzu wurde die Säule in ein 2 ml Eppendorf-Tube gestellt, 200 μl AE-Puffer auf die Säule gegeben und diese bei 6000 g für eine Minute zentrifugiert. Auf dieselbe Säule wurden noch einmal 200 μl AE-Puffer pipettiert und bei 6000 g eine weitere Minute zentrifugiert. Die gewonnene DNA-Lösung wurde bis zur Weiterverwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.6.2. Isolation von RNA

Die Isolierung der RNA erfolgte nach der von Chomczynski und Mitarbeitern entwickelten Methode (Chomczynski and Sacchi, 1987). Die Isolation der RNA umfasst drei Schritte. Im ersten Schritt werden die Zellen lysiert, im nächsten erfolgt die Phasenpräparation und im letzten Schritt die Fällung der RNA. Zunächst wurde zur Lyse 1 ml peqGOLD TriFast Reagenz (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) auf das gemörserte Magengewebe pipettiert. Das Gemisch wurde gut geschüttelt und anschließend für 30 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasenpräparation wurden nun 200 μl Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben 15 Sekunden mit der Hand geschüttelt und 15 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nachdem sich zwei Phasen gebildet hatten, wurden die Proben für 20 Minuten bei 4°C mit 10000 g abzentrifugiert (Eppendorf Kühlzentrifuge 5403). Im nächsten Schritt wurde die wässrige obere Phase, ca. 500 μl , welche die RNA enthält, abgenommen und mit 500 μl Isopropylalkohol (Merck) vermischt. Zur Fällung der RNA wurden die Proben nun für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 4°C und 10000 g erneut für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit je 1 ml 75%-igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation mit 12000 g für jeweils 15 Minuten). Nach gründlicher Entfernung des Alkohols aus dem Röhrchen wurde

das Pellet zehn Minuten getrocknet und schließlich in 50 µl RNase-freiem Wasser (Merck) aufgenommen. Die aufgefangene RNA-Lösung wurde bis zur Weiterverwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.6.3. Maßnahmen zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen

Um einen Abbau der RNA durch exogene RNAsen zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Außerdem wurden die frisch isolierten RNA-Pellets in RNase-freiem Wasser aufgenommen. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden während allen Arbeitsschritten Einmalhandschuhe getragen und diese regelmäßig gewechselt. Außerdem wurden Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Lösungen jeweils für zwei Stunden bei 121°C und 2 Bar autoklaviert und anschließend vier Stunden bei 65°C getrocknet.

2.7. Reverse Transkription

2.7.1. Prinzip der reversen Transkription

Da die Taq-Polymerase einzelsträngige RNA nicht als Matrize erkennen kann, musste die RNA zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dies erfolgt mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der reversen Transkriptase, welche zur Ausgangs-RNA einen komplementären DNA-Strang (cDNA) bildet. Durch den Einsatz spezifischer Primer kann eine bestimmte RNA-Sequenz zur Umschreibung in cDNA ausgewählt werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, Random Primer, ein Gemisch aus kurzen Oligonukleotiden mit zufälligen Sequenzen, zu verwenden. Die Transkription findet dann an verschiedenen, unspezifischen Stellen der RNA statt. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit angewandt.

2.7.2. Reagenzien und Durchführung

Die reverse Transkription wurde mit der SuperScript Reversen Transkriptase der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Tabelle 11 zeigt die nötigen Reagenzien.

Tabelle 11: Reagenzien für SuperScript™ II Reverse Transkriptase

5x Reaktionspuffer	Tris-HCL	250 mmol/l
	KCl	375 mmol/l
	MgCl ₂	15 mmol/l
	pH	8,3
Dithiothreitol (DTT)		0,1 mol/l
Desoxynucleotid-Mix (dNTP)	dATP	je 10 mmol/l
	dTTP	
	dCTP	
	dGTP	
Random Hexamer		250 ng/μl
Reverse Transkriptase	SuperScript™ II	200 U/μl
RNAse Inhibitor	RNAse OUT™	40 U/μl

Zur Synthese von cDNA aus RNA wurde zunächst ein Ansatz aus 1 μl Random Hexamer und 10 μl RNA-Lösung hergestellt. Die zehnmütige Inkubationszeit des Ansatzes konnte zur Herstellung eines weiteren Ansatzes genutzt werden:

- 4 μl 5x Reaktionspuffer
- 2 μl DTT
- 1 μl dNTP Mix
- 1 μl SuperScript II

Anschließend wurden beide Ansätze zusammen pipettiert. Der Gesamtansatz wurde im Primus 96 plus (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) erst bei 42°C für 60 Minuten und für weitere fünf Minuten bei 95°C inkubiert. Zur fertigen cDNA wurden noch 80 μl Aqua dest. zugegeben. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt.

2.8. Real-time quantitative PCR

2.8.1. Prinzip der quantitativen RT-PCR

Die real-time TaqMan-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für DNA und cDNA, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt.

Zusätzlich zu den beiden Primern, die in jeder PCR benötigt werden, wird in dieser Reaktion eine fluoreszierende Sonde (eine so genannte Probe) eingesetzt. Die Probe ist ein Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenz-Farbstoff (FAM) und sein 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff (TAMRA) markiert ist. Die Probe ist in ihrer Nukleotidsequenz spezifisch für die zu amplifizierende DNA-Matrize. Sie bindet an eine Gensequenz zwischen beiden Primern. Solange die beiden Fluoreszenzfarbstoffe nahe zusammen sind, wird nach Anregung durch den Laser die Energie des Reporterfarbstoffes auf den Quencherfarbstoff übertragen. Während der PCR wird die Probe vom DNA-Strang gelöst und mit Hilfe der 5'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase verdaut. Hierbei wird die räumliche Nähe zwischen den beiden Farbstoffen der Probe unterbrochen, was zu einer Zunahme der Reporterfluoreszenz führt. Da die freie, nicht hybridisierte Sonde nicht gespalten wird, ist die Zunahme der Reporterfarbstofffluoreszenz zu jedem Zeitpunkt der PCR direkt proportional zur Konzentration der amplifizierten Zielsequenz. Das TaqMan-Gerät 7700 ABI PRISM Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) regt mit einem Laser die Proben an und misst und speichert ihr Fluoreszenzsignal. Nach jeder Elongation der Proben wird die Fluoreszenz, die sich proportional zur gebildeten DNA-Menge verhält, erneut gemessen. Das Gerät ermittelt für jede Probe den so genannten Ct-Wert. Der Ct-Wert entspricht der Zykluszahl, bei der die Reporterfluoreszenz zum ersten Mal das Baselinesignal messbar überschreitet, das heißt, wenn zum ersten Mal die durch die PCR-Amplifikation entstandene Fluoreszenz detektierbar wird. Der Ct-Wert wird zum Vergleich verschiedener Proben herangezogen und ist somit der wichtigste Parameter bei der TaqMan-PCR. Mit geeigneten Referenzproben, deren Kopienzahl bekannt ist, kann man auf die ursprüngliche Kopienzahl der zu untersuchenden Probe rückschließen.

2.8.2. Primer und Probes für die TaqMan-PCR

Primer- und Probesequenzen wurden mit Hilfe der Primerdesign Software Primer-Express (Applied Biosystems) erstellt. Um die Amplifikation von genomischer DNA zu verhindern, wurden die Primer über Exongrenzen gelegt. Die Primer wurden bei der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) in lyophilisierter Form bestellt. Die gelieferten Primer wurden in sterilem Wasser aufgenommen, wobei jeweils eine Primerkonzentration von 25 $\mu\text{mol/l}$ erstellt wurde. Ebenfalls in lyophilisierter Form wurden die fluorogenen Oligonukleotidsonden (Probes) von der Firma MWG-Biotech hergestellt. Bei der Auflösung in sterilem Wasser wurde eine Probekonzentration von 4 $\mu\text{mol/l}$ erstellt. Die Probes wurden in lichtgeschützten Behältern bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Primer- und Probesequenzen mit den dazugehörigen Annealingtemperaturen sowie die Länge des jeweiligen PCR-Produktes sind in der nachfolgenden Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Primer- und Probesequenzen für die quantitative TaqMan RT-PCR

PCR-Produkt	T_m		Primer- und Probesequenzen
mouse β-Aktin-DNA	58°C	FP	5'- TTCAACACCCCAGCCATGTA -3'
		RP	5'- TGTGGTACGACCAGAGGCATAC -3'
		P	5'- TAGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCC -3'
mouse β-Aktin	58°C	FP	5'- CGTGAAAAGATGACCCAGATCA -3'
		RP	5'- CACAGCCTGGATGGCTACGT -3'
		P	5'- TTTGAGACCTTCAACACCCCAGCCA -3'
mouse IFN-γ	58°C	FP	5'- CAGCAACAGCAAGGCGAAA -3'
		RP	5'- CTGGACCTGTGGGTGTTGAC -3'
		P	5'- AGGATGCATTCATGAGTATTGCCAAGTTTGA -3'
mouse IL-10	58°C	FP	5'- CCAGAGCCACATGCTCCTAGA -3'
		RP	5'- GGTCCTTTGTTTGAAAAGAAAAGTCTTC -3'
		P	5'- CTGCGGACTGCCTTCAGCCAGG -3'
mouse IL-12A =IL12p35	58°C	FP	5'- ACTAGAGAGACTTCTTCCACAACAAGAG -3'
		RP	5'- GCACAGGGTCATCATCAAAGAC -3'
		P	5'- AGCTGCCTGCCCCACAGAAGA -3'
mouse IL-12B =IL-12p40	58°C	FP	5'- CTACAGCACCAGCTTCTTCATCA -3'
		RP	5'- TCAAAGGCTTCATCTGCAAGTTC -3'
		P	5'- CATCATCAAACCAGACCCGCCCA -3'
mouse TNF-α	58°C	FP	5'- CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA -3'
		RP	5'- CCAGCTGCTCCTCCACTTG -3'
		P	5'- CCTGTAGCCCACGTCGTAGCAAACCA -3'
mouse IL-6	58°C	FP	5'- ACAAGTCGGAGGCTTAATTACACAT -3'
		RP	5'- TTGCCATTGCACAACCTCTTTTC -3'
		P	5'- TTCTCTGGGAAATCGTGGAAATG -3'
H. pylori ureB-DNA	58°C	FP	5'- CAACAAAATCCCTACAGCTTTTGC -3'
		RP	5'- CCATCAGCAGGGCCAGTT -3'
		P	5'- AGCGGTGTAACAACGATGATTGGTGGC -3'

T_m = Annealingtemperatur; FP = Vorwärtsprimer; RP = Rückwärtsprimer; P = Probe

2.8.3. Durchführung der TaqMan-PCR

Für die quantitative TaqMan-PCR wurde der gebrauchsfertige Absolute™ QPCR ROX Mix (ABgene, Hamburg, Deutschland) eingesetzt. Folgender Ansatz wurde für ein 25 µl Reaktionsgemisch mit Universal Master Mix verwendet:

Absolute™ QPCR ROX Mix		12 µl
H ₂ O steril		5,5 µl
Primer (25 µM)	je	1 µl
Probe (10 µM)		0,5 µl
cDNA		5 µl

Der Reaktionsansatz wurde in einem ABI PRISM Sequence Detector 7700 (Applied Biosystems) nach folgendem Temperaturschema amplifiziert:

1 Zyklus:	AmpErase-Verdau	50°C	2 min
	Denaturierung:	95° C	15 min
	Anlagerung:	58° C	20 sec
	Extension:	72° C	30 min
2 - 40 Zyklus:	Denaturierung:	94° C	15 sec
	Anlagerung:	58° C	20 sec
	Extension:	72° C	30 sec

Die Aufzeichnung und Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der ABI PRISM Sequence Detection Software Version 1.9.1 (Applied Biosystems). Zur Quantifizierung der Ergebnisse dieser Arbeit wurden alle Messungen auf β -Aktin bezogen.

2.9. Generierung von BMDCs

2.9.1. Isolation von Knochenmarkzellen

Die dendritischen Zellen wurden aus C56BL/6-WT, Myd88^{-/-}, IL18R^{-/-} und IL1R^{-/-} Mäusen generiert. Dazu mussten zuerst Knochenmarkszellen aus den Oberschenkelknochen der Mäuse gewonnen werden. Die Mäuse wurden nach kurzer Isofluran-Narkose durch

zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde das Fell der Hinterbeine entfernt und die Muskulatur mit Hilfe eines Skalpells möglichst sorgfältig abpräpariert. Die Oberschenkel wurden oberhalb des Hüftgelenkes mit einer Schere abgetrennt. Nun wurden die restlichen Muskeln entfernt und die Knochen und Gelenke mit einem Papiertuch abgerieben, bis sämtliches Muskel- und Sehngewebe entfernt war. Bevor die Knochen eröffnet wurden, wurden sie zur Desinfektion dreimal kurz in 70% Ethanol getaucht. Dabei ist wichtig, darauf zu achten, dass die Knochen unbeschädigt sind, denn beim Waschen in Alkohol können die Knochenmarkszellen zerstört werden. Das Ethanol wurde mit sterilem PBS abgewaschen, bevor im nächsten Schritt die Gelenke von Femur und Tibia abgetrennt wurden.

Anschließend wurde das Knochenmark mit PBS aus Femur und Tibia herausgespült. Hierzu wurde eine Spritze mit 27G-Nadel zu Hilfe genommen. Die herausgelösten Zellen wurden durch ein Nylon-Zellsieb (Porengröße 100 μm ; BD GmbH, Heidelberg, Deutschland) in ein 50 ml Falcon-Röhrchen (BD Falcon™) gespült.

Die Knochen wurden so lange mit PBS gespült, bis diese durchsichtig erschienen. Hierzu wurden ungefähr 30 ml PBS benötigt. Zum Schluss wurde noch das Nylon-Sieb mit etwas PBS abgespült. Nach Zentrifugation bei 340 g für sieben Minuten wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml Medium aufgenommen. Tabelle 13 zeigt die Zusammensetzung des verwendeten Zellkultur-Mediums.

Tabelle 13: Zellkultur-Medium zur Anzucht von BMDC

RPMI 1640 very low endotoxin (Biochem AG FG1415)	
FCS	10%
Penicillin	1%
Streptomycin	1%
β -Mercaptoethanol 50mM (Invitrogen, 2- Mercaptoethanol)	0,1%

2.9.2. Reifung von BMDCs in GM-CSF-haltigen Medien

Zur Anzucht von BMDCs (bone marrow derived DCs) wurden die isolierten Knochenmarkszellen in 5 ml Medium gelöst, mit einer Neubauerzählkammer gezählt und schließlich je 5×10^5 Zellen pro ml Medium aufgenommen. Je 5×10^5 Zellen wurden in eine Petrischale (BD Falcon™) gegeben und mit 8 ml Medium und 1 ml GM-CSF-Überstand aufgefüllt. Aus einer Maus können Zellen für acht bis zehn Petrischalen isoliert werden. Die Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zwei Tage nach der Präparation wurden zu jeder Petrischale 10 ml Medium mit 1% GM-CSF zugegeben. Am fünften Tag nach der Isolation wurden aus

jeder Schale 10 ml Medium entnommen und durch neues GM-CSF-haltiges Medium ersetzt. Dieser Schritt wurde nach zwei Tagen wiederholt.

Am siebten Tag nach der Isolation wurden die Zellen in ein 50 ml Falcon-Röhrchen geerntet. Die Petrischale wurde mit frischem Medium gut abgespült. Anschließend wurde die Zellschlösung abzentrifugiert (340 g; 7 Minuten) und in 1 ml Medium aufgenommen. Danach wurden die Zellen ausgezählt und für *H. pylori*-Stimulationsexperimente benutzt.

2.9.3. Herstellung von GM-CSF-haltigen Überständen

Zur Reifung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen wurde dem Medium GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) zugesetzt. Das verwendete GM-CSF wurde aus dem Überstand einer B-Zell hybridoma Zell-Linie (G418 resistent) gewonnen.

Die Zellen wurden einige Tage im Brutschrank angezüchtet. Dann wurden die GM-CSF-produzierenden Zellen über vier bis fünf Tage durch Zugabe von Neomycin (1 mg/ml) selektioniert. Die übrig gebliebenen Zellen wurden nun für bis zu zehn Tage erneut in Kultur gebracht, bis sich das Medium gelb verfärbt hatte. Das Medium wurde dann abgenommen und steril filtriert. Anschließend musste getestet werden, in welcher Konzentration der GM-CSF-Überstand zur Stimulation von BMDC eingesetzt werden sollte. Dazu wurden DCs mit verschiedenen Mengen von GM-CSF-Überstand stimuliert und anschließend mittels FACS-Analyse der Prozentsatz an CD11c-positiven Zellen bestimmt. Angestrebt wurden mindestens 90% CD11c⁺ Zellen. Ein optimales Ergebnis wurde beim Einsetzen von 1% GMCSF-haltigem Überstand erreicht. Der hergestellte GM-CSF-Überstand wurde bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

2.9.4. Stimulation von BMDCs mit *H. pylori*

Die reifen, geernteten BMDCs wurden auf einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Dazu wurden die Zellen 1:5 mit Trypan-blau verdünnt und von dieser Verdünnung 10 µl auf die Zählkammer gegeben. Die Zell-Zahl wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellen/ml} = \text{gezählte Zellen} / 4 \times 10^4 \times \text{Verdünnung}$$

Zur Stimulation der BMDCs mit *H. pylori* wurden 5×10^5 Zellen pro ml Medium aufgenommen. Auch hier wurde dem Medium 1% GM-CSF zugegeben, da sonst die Zellen entdifferenzieren. Von dieser Zellschlösung wurden je 100 µl pro Loch einer 96-Loch-Platte pipettiert.

Stimuliert wurden die Zellen mit *H. pylori* Lysat, in verschiedenen Konzentrationen (1-10 µg/ml) und LPS (100 ng/ml). Einige Löcher der Platte wurden als Negativ-Kontrolle genutzt und daher nicht stimuliert. Die Platten wurden im Brutschrank inkubiert.

Nach 24 Stunden wurden die Überstände abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung mittels ELISA zur Bestimmung der IL-10- und IL-12-Konzentration bei -20°C eingefroren.

Die stimulierten BMDCs wurden entweder zur FACS-Analyse vorbereitet oder abzentrifugiert (340 g / 7 Minuten) und das Zellpellet für die RNA-Isolation in 1ml Trizol aufgenommen.

Ein kleiner Teil der BMDCs wurde mit *H. pylori* inkubiert und anschließend gefärbt, um die Adhärenz von *H. pylori* an DCs zu zeigen.

2.10. Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay

2.10.1. Prinzip des ELISA

Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) ist eine quantitative Nachweismethode für Proteine. Zunächst wird eine ELISA-Mikropipettierplatte im Überschuss mit einem Antikörper (Capture antibody) beschichtet, der gegen das nachzuweisende Protein gerichtet ist. Anschließend wird die Probe dazugegeben, um das darin enthaltene Antigen an dem Antikörper zu binden. Ein folgender Waschschrift trägt dazu bei, dass nur das gewünschte Protein gebunden bleibt. Die Detektion des gebundenen Proteins erfolgt durch einen biotinylierten Detektionsantikörper. Im nächsten Schritt wird Streptavidin zugegeben, welches an das Enzym HRP (Streptavidin-Horse-Raddish-Peroxidase) gebunden ist. Das enthaltene Avidin bindet an den biotinylierten Detektionsantikörper. Zuletzt erfolgt die Zugabe von Chromogen TMB (Tetramethylbenzidine). Hierdurch wird nach einer bestimmten Zeit eine der Konjugatkonzentration äquivalente Farbreaktion hervorgerufen. Diese kann mit einem Photometer gemessen und die Konzentration des nachzuweisenden Proteins anhand einer Standardkurve berechnet werden.

2.10.2. Reagenzien für ELISA

In der vorliegenden Arbeit wurde die IL-10- und IL-12-Proteinkonzentration in Zellkultur-Überständen nach Stimulation mit *H. pylori* mit Hilfe von ELSA bestimmt. Weiterhin wurden *H. pylori*-spezifische IgG1 und IgG2c Titer im Serum der Versuchstiere gemessen. Tabelle 14 enthält die für den IL-12-ELISA verwendeten Reagenzien.

Tabelle 14: Reagenzien für den IL-12-ELISA (Biosource Europe, Nivelles, Belgien):

Coating-Puffer B	NaHCO ₃	4,3g
	Na ₂ CO ₃	5,3g
	H ₂ O dest.	ad 1000 ml, pH 9,4
Blocking-Lösung	NaCl	8,0 g
	Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O	1,42 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	KCl	0,2 g
	BSA (Sigma)	5,0 g
	H ₂ O dest.	ad 1000 ml, pH 7,4
	Standard Diluent	NaCl
	Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O	1,42 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	KCl	0,2 g
	BSA	5,0 g
	Tween 20 (Biosource)	1 ml
	H ₂ O dest.	ad 1000 ml, pH 7,4
Waschpuffer	NaCl	9,0 g
	Tween 20	1 ml
	H ₂ O dest.	ad 1000 ml, pH 7,4
Stopp-Lösung	H ₂ SO ₄ (Biosource)	1,8 N
Coating-Antikörper (Biosource)	Rat x Ms IL-12	1,25 µg/ml
	0,125 mg/0.125 ml	Verdünnung in Coating-Puffer-B
Detektions-Antikörper (Biosource)	Rat x Ms IL-12 Biotin	0,125 µl/ml
	0,125 mg/0,125 ml	Verdünnung in Standard Diluent
Streptavidin-Horseraddish- Peroxidase Conjugate	0,025 mg/0,125ml	10 µl in 10 ml Standard Diluent
Stabilized Chromogen (Biosource)		
Standardverdünnungen (Biosource)	1:2 Verdünnungen beginnend mit 500 pg/ml	

IL-10 wurde ebenfalls mit dem ELISA CytoSet von Biosource durchgeführt. Dabei konnte jeweils derselbe Ansatz von Coating-Puffer, Blocking-Lösung, Standard Diluent, Waschpuffer und Stopp-Lösung wie für den IL-12-ELISA verwendet werden. Tabelle 15 enthält die weiteren Reagenzien.

Tabelle 15: Reagenzien für IL-10-ELISA

Coating-Antikörper (Biosource)	Rat x Ms IL-10 0,125 mg/0.125 ml	1,25 µg/ml Verdünnung in Coating-Puffer-B
Detektions-Antikörper (Biosource)	Rat x Ms IL-10 Biotin	0,06 µl/ml Verdünnung in Standard Diluent
Streptavidin-Horseradish- Peroxidase Conjugate	0,025 mg/0,125ml	10 µl in 10 ml Standard Diluent
Stabilized Chromogen (Biosource)		
Standardverdünnungen (Biosource)	1:2 Verdünnungen beginnend mit 2000 pg/ml	

Um die Entwicklung der adaptiven Immunität bei Infektion mit *H. pylori* zu bestimmen, wurden im Serum infizierter Mäuse mit Hilfe von ELISA *H. pylori*-spezifische IgG2c und IgG1 Antikörper bestimmt. Tabelle 16 enthält die hierzu verwendeten Reagenzien.

Tabelle 16: Reagenzien für ELISA für IgG1 und IgG2c

Antikörper:		
IgG2c:	biotinylierter Maus-anti-Maus IgG _{2a} ^b (BD Biosciences)	1:1000 in Blocking- Lösung
IgG1:	biotinylierter Ratte-anti-Maus IgG ₁ monoklonal (BD Biosciences)	1:1000 in Blocking- Lösung
Coating: <i>H. pylori</i> Lysat		50 µg/ml
Waschpuffer:	1 x PBS 0,05 % Tween (Biosource)	1 l 500 µl
Blockingpuffer:	1 x PBS BSA (Sigma)	1 l 10 g
Strept-HRP		1:1000 in Blocking- Lösung
Chromogen-TMB (Biosource)		
Stopp-Lösung	H ₂ SO ₄ (Biosource)	1,0 N

2.10.3. Durchführung des ELISA zur Messung der Zytokinsekretion

Zunächst wurden NUNG Maxisorb 96-Loch Platten mit dem Coating-Antikörper beschichtet. In jede Vertiefung wurden hierzu 100 µl Antikörper-Lösung pipettiert. Anschließend wurden die Platten mit Klebefolie bedeckt und über Nacht (12-18 h) bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten zuerst ausgeleert und ausgeklopft. Dann wurde in jede Vertiefung 300 µl Blocking-Lösung gegeben. Nach einer Inkubation von mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur wurden die Platten erneut ausgeklopft und dann mit je 300 µl Waschlösung viermal ausgewaschen. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Löcher nie austrocknen. Anschließend wurden je 100 µl Standard, Negativkontrolle und Proben in geeigneter Verdünnung in Doppelbestimmung auf die Platte pipettiert. Die Platten wurden daraufhin mit einer Folie abgedeckt und für 90 Minuten bei Raumtemperatur und 700 rpm auf dem Horizontalschüttler geschüttelt.

Nach erneutem Waschen (4 x mit 300 µl Waschpuffer) wurden in jedes Well 100 µl biotinylierter Detektionsantikörper gegeben und die Platten bei 700 rpm bei Raumtemperatur eine Stunde geschüttelt. Der Waschschritt wurde wiederholt und anschließend je 100 µl Streptavidin/HRP in jede Vertiefung gegeben. Die Platten wurden für weitere 45 Minuten geschüttelt (abgedeckt, Raumtemperatur, 700 rpm).

Im letzten Waschschritt wurde erneut viermal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen und schließlich je 100 µl Chromogen TMB in jedes Loch pipettiert. Mit Alufolie bedeckt, wurden die Platten inkubiert (Raumtemperatur, 700 rpm), bis eine Blaufärbung der Lösung eintrat (10-15 Minuten).

Die Reaktion wurde dann mit 100 µl Stopp-Lösung angehalten. Die Messung und Auswertung erfolgte mit dem Plate Reader bei 450 nm.

2.10.4. Durchführung des ELISA zur Bestimmung von *H. pylori*-spezifischen IgG1 und IgG2c Antikörper-Titer im Mausserum

Zur Bestimmung von *H. pylori*-spezifischen IgG1 und IgG2c Antikörpern im Mausserum wurden NUNC Maxisorb Platten (Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland) zunächst mit *H. pylori* Lysat beschichtet. Dazu wurden 50 µl *H. pylori* Lysat (50 µg/ml in PBS) in jedes Well der 96-Platte gegeben. Die anschließende Inkubation der mit Klebefolie abgedeckten Platte erfolgte bei 4°C über Nacht. Am folgenden Tag wurden die Platten ausgeleert und ausgeklopft und dreimal mit je 100 µl Waschpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Wells mit je 100 µl Blocking-Lösung gefüllt und bei 37°C für zwei Stunden inkubiert. Nach dem folgenden Waschschritt (3 x mit 100 µl Waschpuffer) wurden die Proben aufgetragen. Das

Mäuseserum wurde hierzu 1:1000 in der Blocking Solution verdünnt und davon 100 µl pro Well verwendet. Als Negativ-Kontrollen wurden jeweils 100 µl Blocking Solution verwendet. Erneut wurde unter denselben Bedingungen inkubiert, bevor der nächste Waschschrift (3 x mit 100 µl Waschpuffer) vorgenommen wurde. Als nächstes wurden je 100 µl des Antikörpers (IgG1 bzw. IgG2c 1:1000 verdünnt in Blocking Lösung) in die Löcher gegeben. Auf dem Horizontalschüttler wurden die Platten für 90 Minuten bei 700 rpm geschüttelt. Anschließend wurde erneut gewaschen (3 x mit 100 µl Waschpuffer) und 100 µl Streptavidin-HRP, 1:1000 verdünnt in Blocking Solution, auf die Platten aufgetragen. Der nächste Inkubationsschritt wurde bei Raumtemperatur für 20 Minuten durchgeführt.

Nach einem letzten Waschschrift (3 x mit je 100 µl Waschpuffer) wurde in jedes Loch 100 µl Chromogen pipettiert. Die Platten wurden mit Alufolie abgedeckt und nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Farbreaktion mit je 100 µl 1 N Schwefelsäure gestoppt. Die Messung und Auswertung erfolgte mit dem Plate Reader bei 450 nm. Da hierbei keine Verdünnungsreihe zur Verfügung steht, konnte die Auswertung der Ergebnisse lediglich anhand des Vergleichs von relativen Messwerten (OD) erfolgen.

2.11. Durchflusszytometrie

2.11.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen von Zellen. Die Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen, wie z. B. die Expression von Oberflächen- oder intrazellulären Molekülen, auf Einzelzellebene zu analysieren. Grundlage ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. In dem FACS-Gerät befindet sich ein ständiger Fluss einer Trägerflüssigkeit (sheath fluid), in welche die Probe in Form einer Zellsuspension eingebracht wird. Zur Analyse werden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Ein Photodetektor registriert die emittierte Photonenkonzentration. Diese verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle und ermöglicht so eine Aussage über z.B. die Expression von Oberflächenmolekülen. Zusätzlich werden durch die

Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (wie Kerngröße oder Granularität) der Zellen gewonnen.

Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, wenn sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche Emissionsspektren verfügen.

In der vorliegenden Arbeit wurden dendritische Zellen mit monoklonalen Antikörpern für CD11c IgG1, CD80 IgG2, CD86 IgG2a und IA gefärbt. Um eine unspezifische Bindung der Fc-Teile der Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper an die Oberflächenrezeptoren Fc γ I (CD64), Fc γ II (CD16) und Fc γ III (CD32) zu vermeiden, wurden diese Rezeptoren mit Hilfe von einem gegen die Fc-Rezeptoren gerichteten Antikörper (Fc-Block) blockiert. Die Fluoreszenz wurde mit einem FACS-Calibur flow cytometer und der Software CELLQuest (beides Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Zur Auswertung der Messungen wurde ein Histogramm erstellt, in welchem die Fluoreszenz gegen die Zellzahl dargestellt ist.

2.11.2. Reagenzien

Die verwendeten Antikörper wurden alle von BD Biosciences (Becton Dickinson) hergestellt. Folgende Antikörper wurden zur Färbung von stimulierten BMDC benutzt:

- Allophycocyanin (APC)-konjugierter armenischer Hamster-anti-Maus CD11c monoklonaler Antikörper (IgG1)
- R-Phycoerythrin (r-PE)-konjugierter armenischer Hamster-anti-Maus CD80 monoklonaler Antikörper (IgG2)
- R-Phycoerythrin (r-PE)-konjugierter Ratte-anti-Maus CD86 monoklonaler Antikörper (IgG2a) (PE-labeled)
- Biotinylierter anti-Maus IA^b monoklonaler Antikörper

Des Weiteren wurden ein Puffer, bestehend aus 1 x PBS mit 0,5% BSA und 0,01% Natriumacid, und ein Fc-Block (BD Biosciences) zur Färbung benötigt.

2.11.3. Durchführung

BMDCs wurden nach 24 Stunden Stimulation mit *H. pylori* geerntet, abzentrifugiert und anschließend so aufgenommen, dass 100 μ l Puffer 1 x 10⁶ Zellen enthielten. Zu dieser Zelllösung wurde zur Blockierung der oberflächlichen Fc-Rezeptoren 1 ml 1:100 verdünnter Fc-Block gegeben. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei 4°C wurde die Lösung mit einer Zentrifuge für drei Minuten bei 4°C und 3000 rpm abzentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit Puffer so verdünnt, dass 600 μl Puffer 10^5 bis 5×10^5 Zellen enthielten. Die Lösung wurde auf sechs Eppendorfröhrchen à 100 μl verteilt. Die Färbungen wurden wie in Tabelle 17 angegeben durchgeführt.

Tabelle 17: Färbung von BMDC

Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Negativ-Kontrolle	CD11c APC (1:100)	CD11c APC (1:100)	CD11c APC (1:100)	CD11c APC single col. (1:100)	MHC II bio SA PE single col. (1:100)
	CD86 (B7.2) PE (1:200)	MHC II (entspricht IA ^b für C57B/6 Tiere) -bio (1:100)	CD80 PE (1:200)		

Die gefärbten Proben wurden nun bei 4° C für 20 Minuten nochmals inkubiert, dann bei 3000 rpm für drei Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 μl Puffer gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Die Proben 1, 2, 4 und 5 wurden nun in 500 μl , die Proben 3 und 6 in 100 μl Puffer aufgenommen. Die in 500 μl Puffer aufgenommenen Zellen wurden bei 4°C aufbewahrt. Die Proben 3 und 6 wurden zusätzlich mit Streptavidin-PE 1:200 gefärbt und für 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach dieser letzten Inkubationszeit wurden alle Proben noch zweimal mit je 500 μl Puffer gewaschen. Zuletzt wurden die Proben jeweils in 1000 μl Puffer in einem FACS-Röhrchen aufgenommen.

Die Proben können bis zur FACS-Analyse für maximal 14 Stunden dunkel bei 4°C gelagert werden.

2.12. cDNA Microarray-Analyse

Zur Untersuchung der molekularen Ereignisse bei der Interaktion zwischen *H. pylori* und dendritischen Zellen wurden Genexpressionsanalysen benutzt. Die hierbei angewandte Microarray-Analyse erlaubt eine globale Untersuchung der Genexpression.

Zunächst wurden hierzu BMDCs aus WT und Myd88-defizienten Mäusen für sechs Stunden mit *H. pylori* (MOI 50) stimuliert (die basale Kontrolle blieb unstimuliert). Anschließend wurde aus den Zellen die Gesamt-RNA wie zuvor beschrieben isoliert. Jeweils 5 µg RNA wurden markiert und an Affymetrix MOE430A 2.0 Genchips hybridisiert (entsprechend der Angaben des Herstellers; Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Dr. Roland Lang und seine Arbeitsgruppe (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, TU München) führten die Untersuchungen durch.

Die Microarrays wurden zunächst hinsichtlich der allgemeinen Assay-Qualität mittels des Simpleaffy package für R analysiert. Zwei biologische Replikate pro Bedingung wurden untersucht. Eine Liste von signifikant regulierten Genen (*H. pylori* stimuliert versus unstimuliert) wurde durch Anwendung des SAM Multiclass Algorithmus des SAMR Package für R ermittelt. Die False Discovery Rate wurde hierbei als <1% definiert. 1546 Probe-Sets waren hierbei signifikant durch *H. pylori* reguliert. Ein weiteres Filtern der signifikant regulierten Gene erfolgte durch Anwendung eines Minimum-Fold-Change-Kriteriums (Fold-Change Expression >3; basal versus *H. pylori* stimuliert). Eine weitere Datenverarbeitung erfolgte mit Hilfe von Spotfire DecisionSite Software (Spotfire, Somerville, USA). Hierarchisches Clustering erfolgte mittels des Programms Genesis (Version 1.1.3).

2.13. Fluoreszenzmikroskopie und Laser Scanning Mikroskopie

2.13.1. Mikroskopische Untersuchungen

Zum Nachweis der Bindung von *H. pylori* an dendritische Zellen wurde die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Hierzu wurden DCs zunächst mit GFP-markiertem *H. pylori* inkubiert und anschließend die Färbung von Zellkern mit fluoreszierendem TOPRO3 und des Zytoplasmas mit fluoreszierendem Nile red vorgenommen. Der Grundaufbau des Fluoreszenzmikroskops entspricht einem Auflichtmikroskop. Die für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes notwendige Wellenlänge wird mit optischen Filtern herausgefiltert. Bei der Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie werden Fluoreszenzsignale aus allen Ebenen des Objekts reflektiert, deshalb kann nicht genau festgestellt werden, ob sich die Bakterien intrazellulär befinden oder nur an der DC adhären. Um zu sehen, ob *H. pylori* wirklich auch in die DCs internalisiert wird, wurden zusätzliche Versuche mit dem konfokalen

Laserscanningmikroskop durchgeführt. Auch hierzu wurden DCs mit GPP-markiertem *H. pylori* inkubiert und anschließend die Membran der DC gefärbt. Das Laserscanningmikroskop erzeugt virtuelle optische Schnitte durch das Objekt. Zum Abrastern (Scannen) des Objektes muss der Laser nacheinander auf viele Punkte des Objektes gelenkt werden. Um ein Bild zu erhalten, wird das Objekt Punkt für Punkt abgescannt. Hierzu sind zwei Scan-Spiegel nötig. Einer für die Punkte innerhalb einer Zeile (x-Richtung) und ein zweiter für die Zeilen des Bildes (y-Richtung). Dieses Abscannen steuert ein Rechner. Zudem kann der Rechner über einen weiteren Stellmotor das Objekt in Richtung des Strahlengangs (z-Richtung) bewegen. Die dabei entstandenen Schnittbilder können anschließend durch eine geeignete Software zu einer räumlichen Darstellung zusammengesetzt werden. Im Gegensatz zur Auflichtmikroskopie ist es dadurch möglich, die Position der fluoreszierenden Struktur innerhalb des untersuchten Objektes auch entlang der optischen Achse (z-Scan) genau zu bestimmen.

2.13.2. Reagenzien

Zur Färbung der DCs wurden die in Tabelle 18 zusammengestellten Reagenzien verwendet. Zur Kernfärbung diente TOPRO3, die Färbung von dendritischem Zytoplasma erfolgte mit Nile red.

Tabelle 18: Reagenzien zur Fluoreszenzfärbung (TOPRO3 und Nile red)

1 x PBS		
Paraformaldehyd	4%	
Saponin-Puffer	PBS	
	Saponin (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)	0,5 %
	BSA	0,5 %
	NaAcid	0,01 %
TOPRO3 (Invitrogen)	1 µg/ml	1: 1000 verdünnt
Nile red (Sigma)	0,5 mg/ml in Aceton	5 µl
	75:25 Glycerol:H ₂ O-Lösung	5 ml
Hamster-anti-Maus CD11c IgG1 mAb		1: 50 verdünnt
Antikörper (APC labeled) (BD)		

2.13.3. Durchführung

Zum Beweis der Adhärenz von *H. pylori* an dendritische Zellen wurden BMDCs nach sieben Tagen Anzucht für 24 Stunden in Gewebe-Kultur-Slides (BD) gegeben. Anschließend wurden diese Zellen für 15 Minuten mit *H. pylori* G27-GFP (MOI 10 bzw. MOI 50) inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit PBS (zehnmal) wurden die Zellen in 4%-igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert und mit Saponin-Puffer für 25 Minuten inkubiert. Zur Kernfärbung wurden die Zellen mit 1:1000 verdünntem TOPRO3 gefärbt und für weitere 40 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die membranösen und zytoplasmatischen Lipide mit 0,5 mg/ml Nile red (Sigma; verdünnt in einer 75%-igen glycerolhaltigen wässrigen Lösung), welches als Mounting-Medium verwendet wurde, gefärbt.

Um die Aufnahme von *H. pylori* in dendritische Zellen zu beweisen, wurden Oberflächenmoleküle (CD11c) der dendritischen Zellen mittels anti-CD11c Antikörpern gefärbt und mit GFP-markiertem *H. pylori* inkubiert. Nach siebentägiger Anzucht der BMDCs in Petrischalen und einer weiteren 24-stündigen Kultur in Gewebe-Kultur-Slides wurden diese Zellen mit *H. pylori* G27-GFP MOI 10 für sechs Stunden inkubiert. Nach gründlichem Waschen (zehnmal) und der Fixation mit 4%-igem PFA wurde die Färbung mit einem 1:50 verdünnten APC-markierten armenischen Hamster-anti-Maus CD11c IgG1 mAb monoklonalen Antikörper (BD) durchgeführt. Die Auswertung dieser Färbungen wurde mit einem Laser Scanning Mikroskop 510 (Carl Zeiss Microimaging; Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) durchgeführt.

2.14. Histologische Untersuchungen

2.14.1. Einbettung der Magenbiopsien in Paraffin

Um die Autolyse der Magenbiopsien aus Mäusen zu verhindern und damit das Gewebe in möglichst natürlichem Zustand zu erhalten, wurde das frisch entnommene Magen-Gewebe sofort in 4%-igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die Parafineinbettung erfolgte im Institut für Pathologie der TU München. Über eine aufsteigende Alkoholreihe wurde das PFA-fixierte Gewebe zunächst entwässert und gehärtet und anschließend über ein Intermedium (z.B. Xylol) in Paraffin überführt. Über Nacht wurden die Präparate in einem Fixierungsapparat (Shandon Pathcentre; Thermo Fisher Scientific, INC., Waltham, MA, USA) fixiert und vorparaffinisiert.

Die Einbettung der Präparate in Paraffinblöcke erfolgte in 60°C warmem, flüssigem Paraffin (Histosec; Merck) (TBS 88 Paraffin Embedding System: Thermal Unit, Cool Unit, Dispenser Unit; Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland). Zur Aushärtung wurden die

Paraffinblöcke auf einer Kühlplatte (Tissue Cool Plate COP 2; Medite Medizintechnik) abgekühlt. Durch die Abkühlung wurde das Paraffin fest und die Blöcke ließen sich gut schneiden.

2.14.2. Herstellung von Schnittpräparaten

Zur weiteren Verarbeitung wurden aus den Paraffinblöcken 2 µm dicke Schnitte am Rotationsmikrotom (Microm HM 335 E; Microm GmbH, Walldorf, Deutschland) angefertigt. Um Falten im Paraffinschnitt zu vermeiden, wurden die Schnitte in einem Paraffin-Streckbad (Paraffin Streckbad, TFB 35; Medite Medizintechnik) bei 50°C gestreckt. Danach wurden die Schnitte auf SuperFrost Plus Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. Bei 53°C wurden die Objektträger ca. 30 Minuten getrocknet.

2.14.3. Entparaffinierung der Schnittpräparate

Bevor die Färbungen durchgeführt werden konnten, mussten die Gewebeschnitte aus ihrem Einbettmedium, dem Paraffin, gelöst werden. Dazu wurden die Schnittpräparate über Nacht bei ca. 60°C inkubiert. Zunächst wurden sie dann mit Xylol entparaffiniert und anschließend über eine absteigende Alkoholreihe in Wasser überführt. Dies ist nötig, da Färbungen in der Regel in wässrigen Lösungen erfolgen. Folgende Entparaffinierungsschritte wurden vor der Färbung angewendet:

Arbeitsschritt	Reagenz	Einwirkdauer
1. Entparaffinierung:		
	Xylol	2 x 20 min
2. Überführung ins wässrige Milieu :		
	Ethanol 100%	5 min
	Ethanol 90%	5 min
	Ethanol 70%	5 min
	Aqua dest.	5 min

2.14.4. Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Zur besseren Differenzierung unter dem Lichtmikroskop wurden die histologischen Präparate mit Hämatoxylin-Eosin (HE) nach Ehrlich gefärbt. Die Färbung der Präparate erfolgte durch Auftropfen von HE-Gebrauchslösung (Sigma-Aldrich, München, Deutschland). Nach 15-45 Sekunden Einwirkzeit wurden die Präparate mit H₂O abgespült.

Anschließend wurden die histologischen Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Eindeckmedium (Histolap Covermount) bedeckt.

2.14.5. Histopathologische Klassifikation gastraler Pathologien

Bei zunehmender Infektionsdauer mit *H. pylori* schreitet die Entzündung der Magenschleimhaut der Mäuse fort. Zur besseren Beurteilung und zur einheitlichen Evaluierbarkeit wurden die histologischen Schnitte am Übergang von Korpus zu Antrum untersucht. Die Grade der Gastritis wurden folgendermaßen definiert:

- Grad 0: kein Unterschied zu normalem Magen-Gewebe
- Grad 1: unifokale, geringgradige zelluläre Infiltration in die Lamina Propria
- Grad 2: einzelne (2-5) multifokale Läsionen mit mäßiger Infiltration von Entzündungszellen in die Lamina Propria
- Grad 3: Läsionen, die ein größeres Mukosagebiet umfassen, oder >5 multifokale Läsionen
- Grad 4: diffuse und schwere Entzündung, ausnahmslos transmurale Entzündung

Die Auswertung wurde von zwei von einander unabhängigen Personen durchgeführt. Diese erhielten identische Ergebnisse bei nahezu allen Präparaten.

2.15. Statistik

Die statistische Auswertung aller Daten wurde mit Hilfe des T-Tests oder des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Alle Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als signifikant erklärt. Die statistische Auswertung der Microarrays wurde bereits in Kapitel 2.12. beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1. Interaktion von *H. pylori* mit murinen Bone Marrow-Derived Dendritic Cells

Mikroorganismen werden von dendritischen Zellen erkannt, gebunden, aufgenommen und prozessiert. Die Aktivierung von T-Zellen durch die DCs benötigt dreierlei Arten von Signalen: (a) die Präsentation von Antigen durch MHC-II Moleküle, (b) Kostimulation mittels kostimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86 und (c) Sekretion von Zytokinen. Um zu untersuchen, inwieweit *H. pylori* diese Prozesse in DCs induzieren kann, wurden BMDCs von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen generiert und deren Interaktion mit *H. pylori* im Detail analysiert (Kapsenberg, 2003).

3.1.1. Adhärenz von *H. pylori* an DCs

Um eine mögliche Adhärenz von *H. pylori* an dendritische Zellen zu zeigen, wurde die Bindung GFP-(green fluorescent protein-2)-exprimierender Bakterien an DCs mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Die GFP-Expression in Bakterien wurde durch die Transformation der Keime mit einem GFP-Expressionsplasmid (pSB14) (Backert et al., 2005) erreicht. Hierzu wurde zunächst ein Tropfen einer frisch geernteten Bakterienlösung (MOI 1) auf einer Agarplatte über Nacht kultiviert. Anschließend wurde 1 µg Plasmid-DNA auf den angewachsenen Bakterienhaufen gegeben und für weitere 48 Stunden inkubiert. Die Bakterienkultur wurde dann auf Kanamycin-haltige Agarplatten übertragen und über weitere sieben Tage kultiviert. Die auf dem GFP-Expressionsplasmid kodierte Kanamycin-Resistenz ermöglichte eine Selektion erfolgreich transformierter Klone.

Zur Generierung von murinen BMDCs wurden Knochenmarkszellen aus Femur und Tibia von Mäusen isoliert und in GM-CSF-haltigem Medium angezüchtet. Am siebten Tag wurden die Zellen geerntet und abzentrifugiert. Jeweils 2×10^5 Zellen wurden in die Kammern von Gewebekultur-Objektträgern pipettiert und für weitere 24 Stunden angezüchtet. Am nächsten Tag wurden die herangereiften, an die Objektträger adhärierenden BMDCs mit GFP-exprimierenden *H. pylori* G27 (MOI 10 bzw. MOI 50) inkubiert.

Nach 15 Minuten Inkubation im Brutschrank wurden die Kultur-Objektträger mehrmals mit PBS gewaschen, um die nicht-adhärenen Bakterien zu entfernen. Anschließend wurden die verbliebenen Zellen auf den Objektträgern fixiert und gefärbt. Zur Färbung des Zellkernes wurde der Farbstoff TOPRO3, zur Färbung des Zytoplasmas und der Zellmembran Nilrot-Lösung verwendet. Nach der Färbung wurden die Kammern der Kultur-Objektträger entfernt und die Objektträger eingedeckelt. Die Objektträger wurden schließlich unter dem

Fluoreszenzmikroskop analysiert. Abbildung 3 zeigt in 400-facher Vergrößerung eine einzelne dendritische Zelle, deren Kern blau und deren Zytoplasma/Zellmembran rot fluoreszieren. Unter dem konfokalen Mikroskop imponiert das GFP-exprimierende Bakterium *H. pylori* leuchtend grün. Man sieht adhärierende Keime, die selbst nach exzessivem Waschen nicht von der Zelle gelöst wurden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *H. pylori* an dendritische Zellen adhäriert.

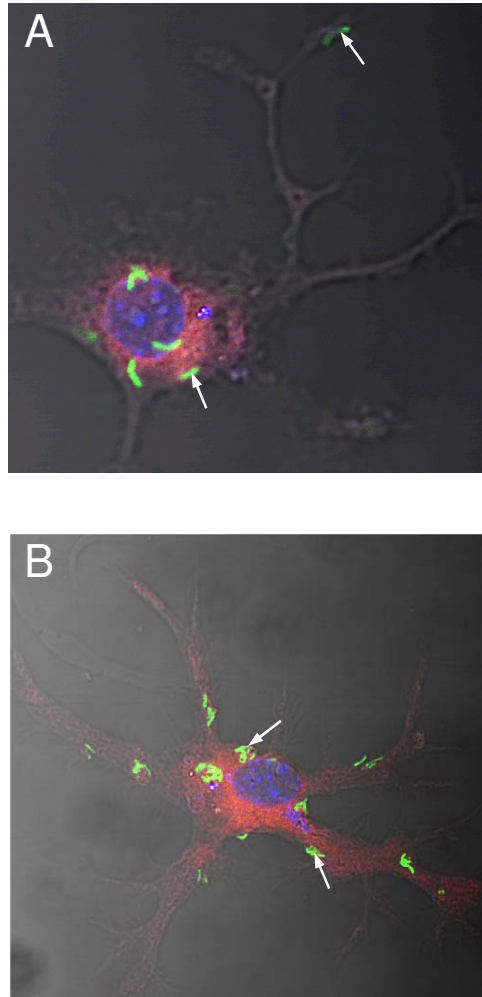


Abbildung 3: Adhärenz von GFP-exprimierendem *H. pylori* an BMDCs: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von BMDCs, die 15 Minuten mit GFP-transformiertem *H. pylori* inkubiert und anschließend gewaschen wurden. Die Zellkerne der DCs wurden mit TOPRO3 (blau), das Zytoplasma und die Membran mit Nile red (rot) gefärbt. Die Pfeile zeigen jeweils auf GFP-markierte *H. pylori* (grün), die an die DC adhären. Für Aufnahme (A) wurden DCs mit *H. pylori* mit einer Konzentration von MOI 10 inkubiert. Für Aufnahme (B) wurde mit einer höheren Bakterienzahl (MOI 50) inkubiert. Die Aufnahmen sind 400-fach vergrößert.

3.1.2. Aufnahme von *H. pylori* in die Zelle

Voraussetzung für die Präsentation von Antigen ist deren Aufnahme und Prozessierung durch die DC. Es wurde bereits gezeigt, dass DCs Tight Junctions zwischen intestinalen Epithelzellen öffnen können und ihre Dendriten bis in das Lumen strecken, um Mikroorganismen zu erkennen (Rescigno et al., 2001). Um eine mögliche Aufnahme von *H. pylori* in dendritische Zellen zu zeigen, wurden BMDCs mit GFP-exprimierenden Bakterien inkubiert und später mittels konfokaler Mikroskopie analysiert.

Zur Durchführung dieses Versuches wurden Knochenmarkszellen aus den Oberschenkelknochen von WT Mäusen isoliert und über sieben Tage in GM-CSF-haltigem Medium herangezüchtet. Nach dem Ernten der Zellen wurden diese für weitere 24 Stunden in Gewebekultur-Objektträgern kultiviert. Um die Aufnahme von *H. pylori* in die Zelle nachzuweisen, wurden anschließend die DCs über sechs Stunden mit dem GFP-transformierten *H. pylori* G27-Stamm (MOI 10) inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurden die Zellen auf den Objektträgern mit Paraformaldehyd fixiert. Im Anschluss erfolgte die Färbung der DC-Membran mittels eines APC-markierten Hamster-anti-Maus-CD11c IgG1 monoklonalen Antikörpers.

Die Aufnahme der DCs mit einem konfokalen Mikroskop zeigt in Abbildung 4 extra- und intrazelluläre Bakterien. Der definitive Nachweis einer intrazellulären Lokalisation der Keime erfolgte mittels eines so genannten z-Scans, wobei mikroskopische Aufnahmen der Zellen in einer Vielzahl von Schnittebenen erfolgten.

Die Ergebnisse zeigen, dass DCs die Fähigkeit besitzen, *H. pylori* in die Zelle aufzunehmen.

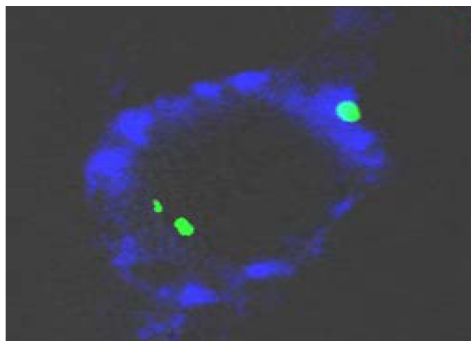


Abbildung 4: Aufnahme von *H. pylori* in BMDCs: Konfokalmikroskopische Aufnahme einer DC, die mit GFP-transformiertem *H. pylori* (MOI 10) über sechs Stunden inkubiert wurde und deren Membran nach einem Waschschriff mit APC-markierten Hamster-anti-Maus-CD11c IgG1 monoklonalen Antikörpern gefärbt wurde. Die dendritische Membran stellt sich blau dar, der GFP-transformierte *H. pylori* grün. 400-fache Vergrößerung.

3.1.3. *H. pylori* induziert die Oberflächenexpression von MHC-II und von kostimulatorischen Molekülen auf BMDCs

Nach dem DCs Mikroorganismen erkannt haben, erfahren sie einen Reifungsprozess. Er führt zu einer verstärkten Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche der DCs. Unreife DCs, die sich noch nicht mit einem Mikroorganismus auseinandergesetzt haben, exprimieren dagegen nur wenig MHC-II, CD80 und CD86; sie können keine naiven T-Zellen aktivieren. Um zu untersuchen, inwieweit *H. pylori* die Expression von MHC-II (IA^b) und von kostimulatorischen Molekülen auf DCs induziert, wurden durchflusszytometrische Versuche mit BMDCs durchgeführt.

Auch für diese Versuche wurden BMDCs aus murinen Knochenmarkszellen generiert. Die Zellen wurden am siebten Tag geerntet und mit 1 µg bzw. 10 µg *H. pylori* Lysat stimuliert. Als Kontrollgruppe dienten Zellen, welchen anstatt von Lysat PBS zugesetzt wurde. Das Lysat wurde aus *H. pylori* SS1 hergestellt. Dazu wurden die Bakterien nach Anzucht auf WC-DENT-Agar-Platten geerntet und in 20 ml PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Keime auf Eis gekühlt und mittels Ultraschall lysiert. Die Konzentration des Lysats wurde photometrisch bestimmt und entsprechend der gewünschten Konzentration mit PBS verdünnt.

Die unstimulierten und stimulierten DCs wurden nach 24 Stunden geerntet, abzentrifugiert und in FACS-Puffer aufgenommen (10⁶ DCs pro 100 µl). Nach "Blockierung" von oberflächlichen Fc-Rezeptoren erfolgte die Färbung mit anti-CD11c-APC, anti-CD80-PE, anti-CD86-PE und biotinylierten anti-IA^b monoklonalen Antikörpern. CD11c ist ein Oberflächenmarker von BMDCs und IA^b färbt die MHC-II-Komplexe auf der Oberfläche von DCs. Mit Hilfe der CD11c-Färbung konnten DCs von anderen Zelltypen unterschieden werden. Nach dem Färbeschritt erfolgte die FACS-Analyse an einem FACS-Calibur Durchflusszytometer. Die Auswertung wurde mit Hilfe der Software CELLQuest durchgeführt.

In allen Versuchen betrug der Anteil der CD11c-positiven Zellen mehr als 90%. Dies zeigt, dass die Generierung von BMDCs *in vitro* erfolgreich war und eine hohe Reinheit der DC-Population erzielt werden konnte. In den Histogrammen der Abbildung 5 sind die unstimulierten dendritischen Zellen als schwarze Linie, die mit 1 µg/ml stimulierten Zellen als blaue Linie und die mit 10 µg/ml stimulierten DCs als rote Flächen dargestellt. Histogramm A zeigt die Expression von CD80, Histogramm B die von CD86 und Histogramm C die Expression von IA^b innerhalb der CD11c-positiven BMDCs.

Die Ergebnisse zeigen, dass *H. pylori* eine dosisabhängige Hochregulation von CD80, CD86 und IA^b auf CD11c-positiven BMDCs induziert.

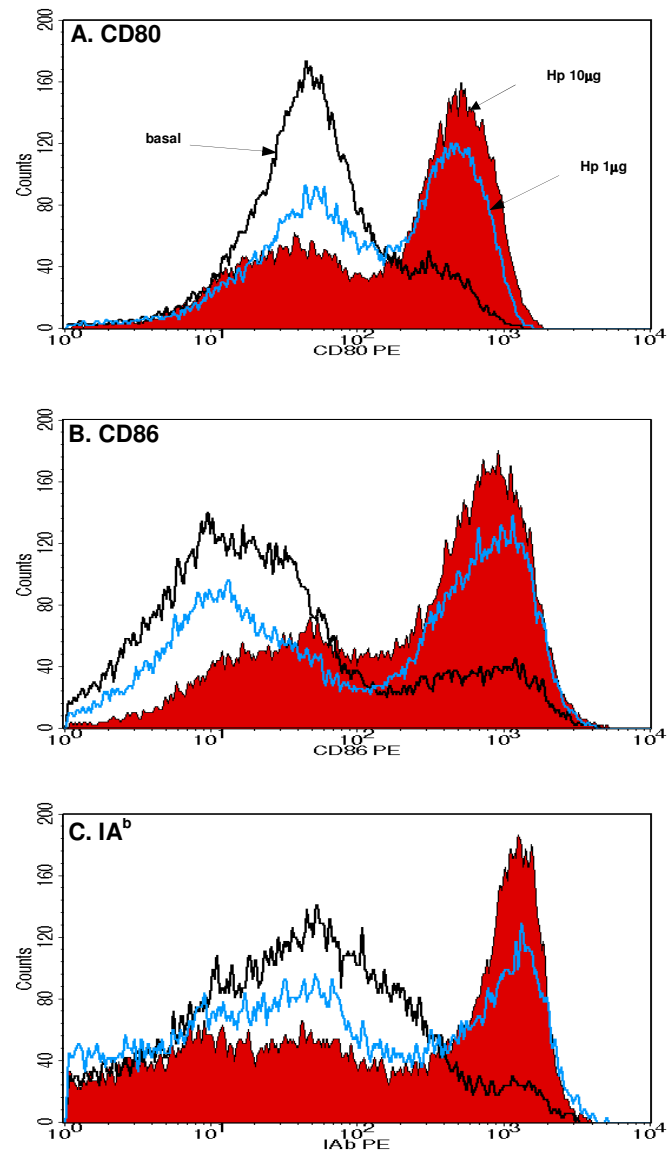


Abbildung 5: FACS-Analyse der Expression von MHC-II (IA^b) und kostimulatorischen Molekülen von DCs: Die Histogramme zeigen die Expression von CD80 (A), CD86 (B) und IA^b (C) gated auf CD11c-positive BMDCs. Die FACS-Analysen wurden nach siebentägiger Anzucht von BMDCs durchgeführt. Schwarze Kurven: unstimulierte BMDCs; blaue Kurven: BMDCs stimuliert mit 1 μ g H. pylori Lysat für 24 Stunden; rot gefüllte Kurven: BMDCs stimuliert mit 10 μ g H. pylori über 24 Stunden. Dargestellt ist eines von drei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

3.1.4. Zytokinsekretion aus BMDCs nach Stimulation mit *H. pylori*

Als nächstes wurde untersucht, inwieweit *H. pylori* Zytokinsekretion in DCs induzieren kann. Hierzu wurden nach Stimulation der Zellen mit *H. pylori* die IL-12p70 und IL-10 Spiegel im Überstand bestimmt. Die Stimulationsexperimente erfolgten in 96-Loch-Platten. Zunächst wurden BMDCs über sieben Tage in GM-CSF-haltigem Medium angezüchtet. Jeweils 5×10^4 Zellen wurden mit *H. pylori* Lysat (Stamm SS1 und G27) in verschiedenen Konzentrationen und außerdem mit *E. coli* LPS (100 ng/ml) stimuliert. Nach 24 Stunden Stimulation wurde die IL-12p70 und IL-10 Sekretion im Überstand mittels ELISA bestimmt. In der Abbildung 6 sind die arithmetischen Mittel und die Standardfehler der Sekretion von IL-12p70 und IL-10 aus vier bis sechs Versuchen pro Gruppe dargestellt.

Die Abbildung zeigt, dass nach Stimulation mit *H. pylori* die IL-12p70-Sekretion aus DCs induziert wird. IL-12p70 stellt einen wichtigen Faktor für die Aktivierung der T_H1 -Antwort dar. Die Sekretion von IL-12p70 war nach Stimulation mit 100 ng/ml *E. coli* LPS um das 63-fache erhöht. Bei Stimulation mit 10 μ g *H. pylori* Lysat stieg die Sekretion um das 36-fache. Auch die Stimulation mit 1 μ g *H. pylori* Lysat ergab eine verstärkte Induktion der Sekretion (zehnfach). Sie entsprach damit jedoch nur einem Viertel der Sekretion nach Stimulation mit 10 μ g Bakterien.

Die Sekretion von IL-10 aus DCs war nach Stimulation mit *H. pylori* und *E. coli* LPS weitaus geringer als die Ausschüttung von IL-12p70. Während unstimulierte DCs keine nachweisbare Menge an IL-10 sezernierten, konnte nach Stimulation mit *E. coli* LPS eine im Mittel um 0,19 ng/ml erhöhte Sekretion gemessen werden. Bei Stimulation mit 10 μ g *H. pylori* Lysat betrug die Induktion im Mittel ca. 0,17 ng/ml. Auch bei der Sekretion von IL-10 nach Stimulation mit *H. pylori* Lysat zeigte sich also eine Dosisabhängigkeit.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *H. pylori* durch Maus-BMDCs erkannt, gebunden und aufgenommen wird. Die DCs durchlaufen einen Reifungsprozess, der sie zur Antigenpräsentation, Kostimulation und Zytokinsekretion befähigt. Diese Signale sind entscheidend für die Aktivierung von T-Zellen und die Induktion adaptiver Immunität.

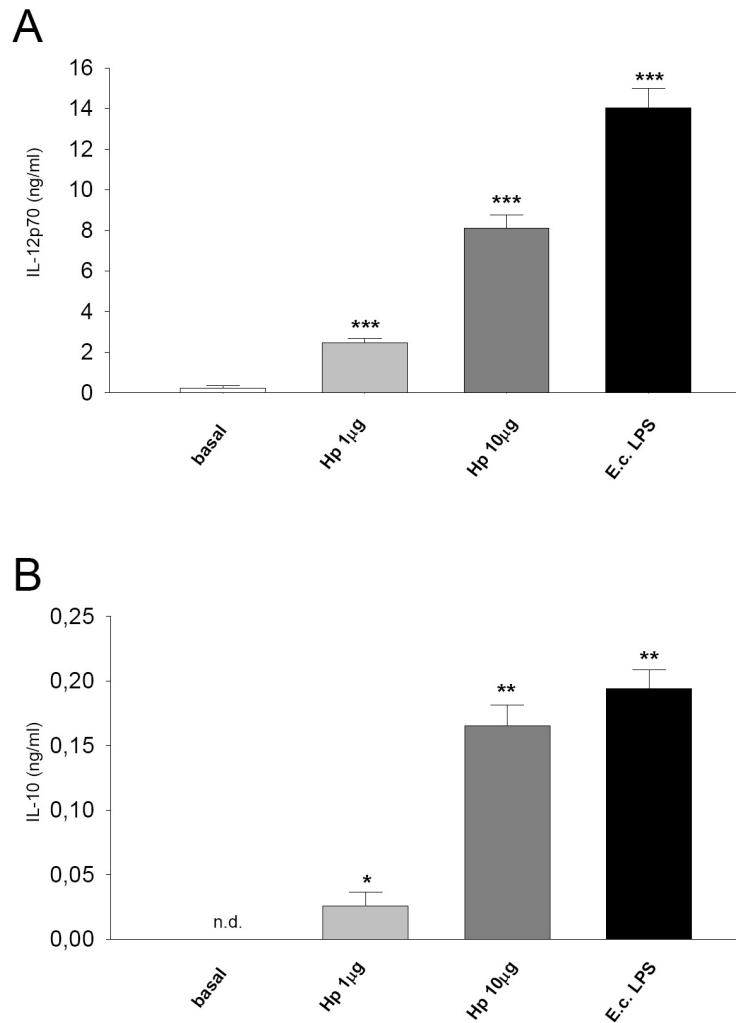


Abbildung 6: Zytokinsekretion von BMDCs nach Stimulation mit *H. pylori*: Bestimmung der Sekretion von IL-12p70 (A) und IL-10 (B) nach Stimulation mittels ELISA. Stimuliert wurde jeweils mit *H. pylori* Lysat (1 und 10 μ g/ml) und *E.coli* LPS(100 ng/ml). Die Balken zeigen das arithmetische Mittel und Standardfehler aus vier bis sechs Proben pro Gruppe. Die basale IL-10 Sekretion war nicht detektierbar (n. d.). Die P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001. Dargestellt ist eines von drei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

3.2. Einfluss des TLR-vermittelten Signalweges auf die Aktivierung von murinen BMDCs

Das nächste Ziel der Arbeit war, zu untersuchen, ob die durch *H. pylori* verursachte Aktivierung der DCs über Signale von Toll-like Rezeptoren vermittelt wird. Für diese Versuche wurden BMDCs von C57BL/6 Wildtyp und von Myd88^{-/-} Mäusen verwendet. Myd88 ist ein wichtiger Bestandteil des TLR-Signalweges, spielt aber auch bei der intrazellulären Weiterleitung der IL-1- und IL-18-Signalwege eine wichtige Rolle (Akira and Takeda, 2004). Zur Abgrenzung von TLR-vermittelten Effekten und solchen, die von IL-1 bzw. IL-18 vermittelt werden, dienten in allen Versuchen BMDCs von IL1R^{-/-} und IL18^{-/-} Mäusen als Kontrolle.

3.2.1. Toll-like Rezeptor-abhängige Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen bei DCs nach Stimulation mit *H. pylori*

Zunächst wurde an DCs untersucht, ob der TLR-Signalweg die durch *H. pylori*-induzierte Antigenpräsentation und Kostimulation beeinflusst. Hierzu wurde analysiert, inwieweit *H. pylori* die Hochregulation von MHC-II, CD80 und CD86 auf der Oberfläche von WT, Myd88^{-/-}, IL1R^{-/-} und IL18^{-/-} BMDCs induzieren kann.

Reife BMDCs wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von *H. pylori* SS1 Lysat (1 µg/ml bis 10 µg/ml) oder mit 100 ng *E. coli* LPS stimuliert. Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert und mit anti-CD11c-APC, anti-CD80-PE, anti-CD86-PE und biotinylierten anti-IA^b monoklonalen Antikörpern gefärbt. Die Fluoreszenz der gefärbten Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer gemessen und analysiert.

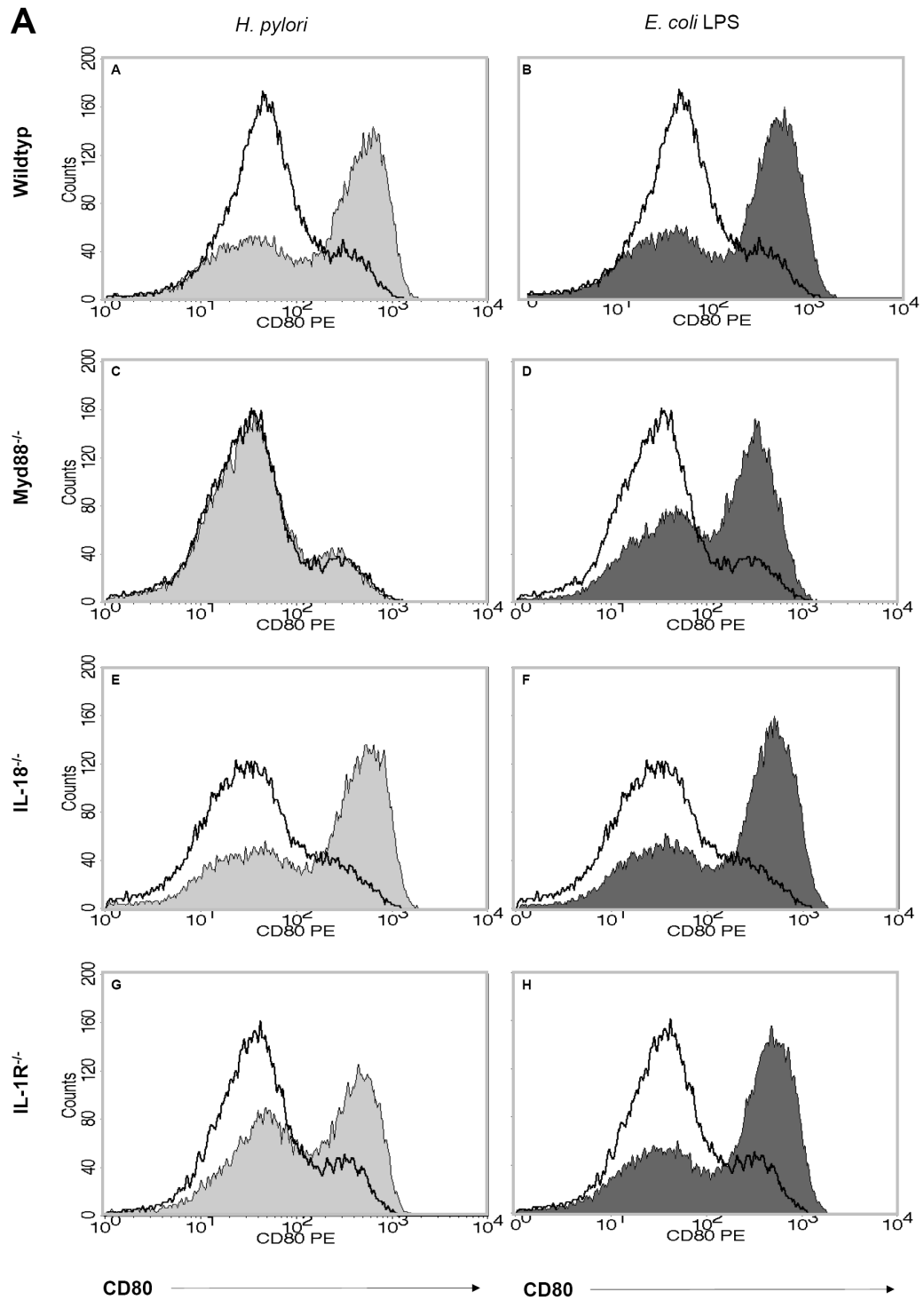
Die Histogramme in Abbildung 7 zeigen jeweils die Expression der Oberflächen-Marker CD80 bzw. CD86 auf CD11c-positiven DCs. Man erkennt, dass die Expression von CD80 und CD86 durch Stimulation mit *H. pylori* Lysat und *E. coli* LPS bei WT, IL1R^{-/-} und IL18^{-/-} BMDCs deutlich hochreguliert wird. Im Gegensatz hierzu findet keinerlei Hochregulation bei Stimulation von Myd88^{-/-} BMDCs mit *H. pylori* Lysat statt. Die Zellen verhalten sich in der FACS-Analyse wie unstimulierte DCs. Auch das Einsetzen von sehr hohen *H. pylori* Lysat-Konzentrationen bis zu 10 µg verändert das Ergebnis nicht. Der Effekt wurde auch bestätigt, als die Stimulierung mit verschiedenen Lysaten aus anderen *H. pylori*-Stämmen (HP76, G27) erfolgte. *E. coli* LPS diente als Kontrolle, da bereits vorausgegangene Studien zeigten, dass die Hochregulation von CD80 und CD86 bei Stimulierung mit *E. coli* LPS auch unabhängig von Myd88 induziert werden kann (Hoebe et al., 2003).

Wie erwartet, reagierten BMDCs aus Myd88^{-/-} Mäusen auf Stimulierung durch *E. coli* LPS mit einer deutlichen Hochregulation von CD80/CD86, die dem Verhalten von WT DCs

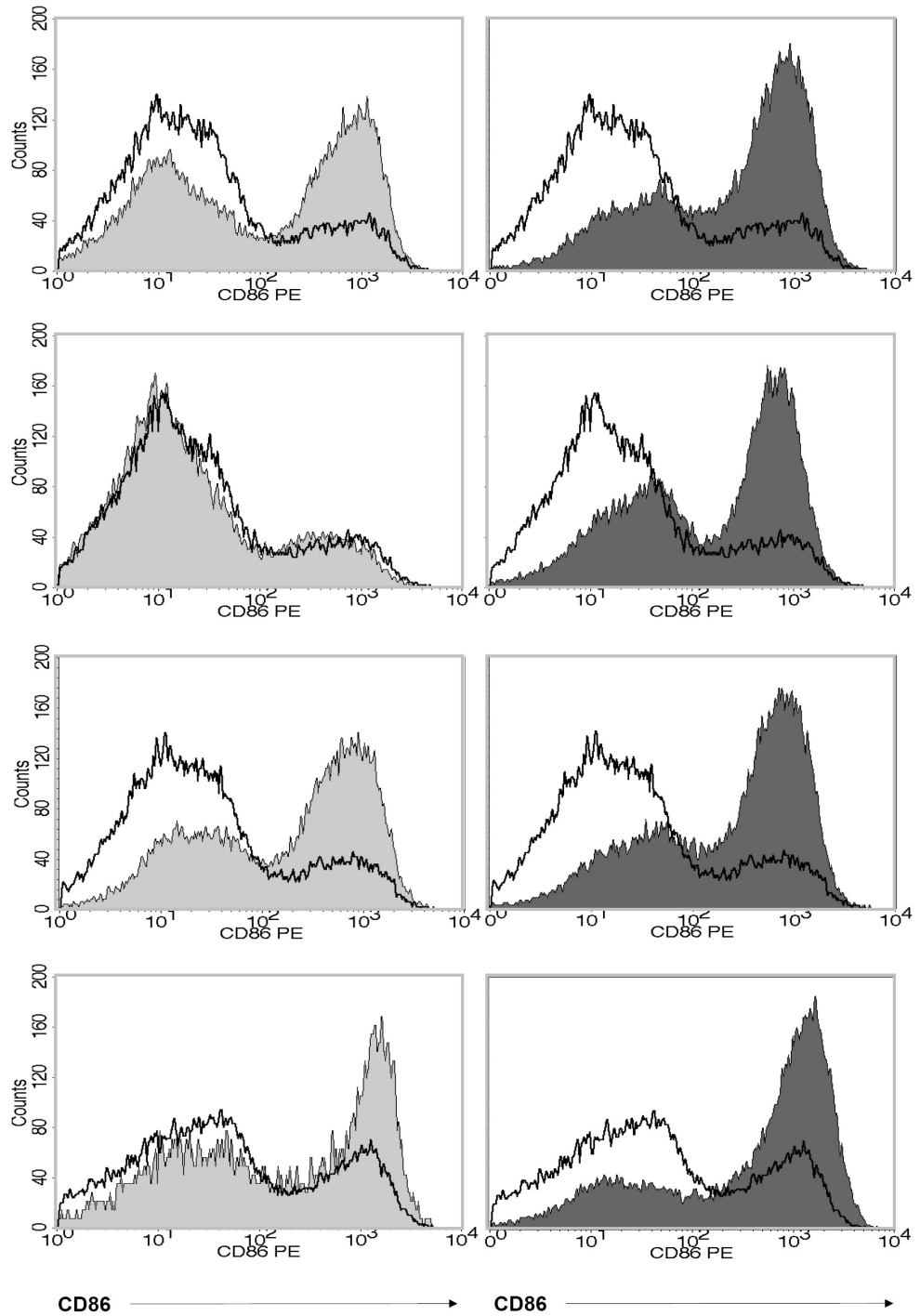
entsprach. Auch bei der Messung der Expression von IA^b nach Stimulation mit *H. pylori* und *E. coli* LPS wurden die gleichen Effekte festgestellt (Abbildung 7). Eine Hochregulation von IA^b wurde bei WT, IL-18^{-/-} und IL-1R^{-/-} BMDCs beobachtet, während sich die BMDCs von Myd88-defizienten Mäusen bei Stimulation mit *H. pylori* Lysat wie unstimulierte Zellen verhielten.

Wurden lebende *H. pylori* benutzt, so war die Hochregulation von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen bei Myd88-defizienten DCs im Vergleich zu WT BMDCs ebenfalls deutlich eingeschränkt, jedoch nicht komplett aufgehoben.

Diese Ergebnisse zeigen: Im Kontext der *H. pylori*-Infektion wird die Fähigkeit der DCs zur Antigenpräsentation und Kostimulation maßgeblich durch TLR-abhängige Erkennung des Keimes beeinflusst.



B



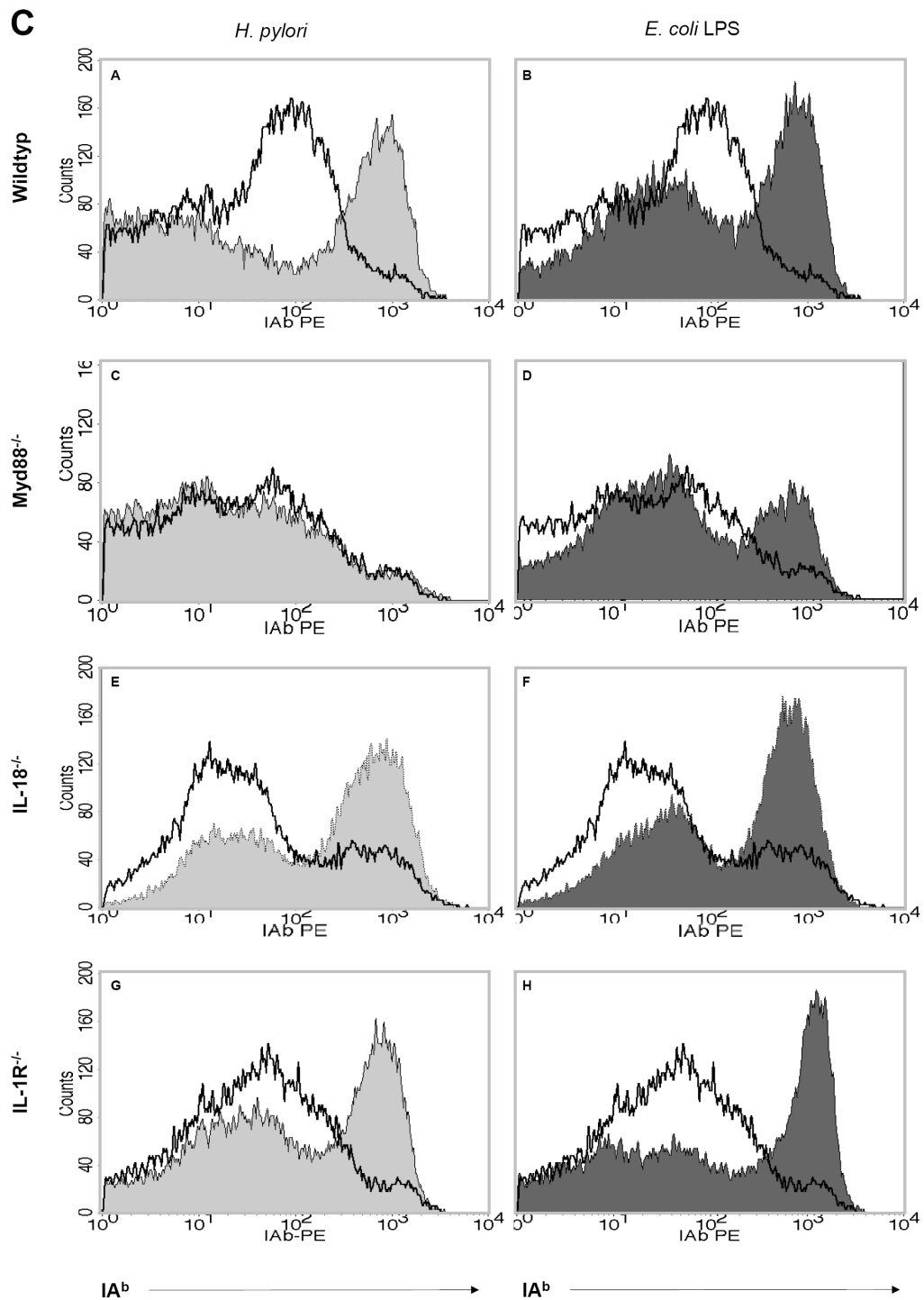


Abbildung 7: TLR-abhängige Hochregulation von MHC-II (Ia^b) und kostimulatorischen Molekülen als Antwort auf *H. pylori*: Dargestellt sind FACS-Analysen von CD80-, CD86- und IA^b-Expression durch BMDCs aus WT, Myd88^{-/-}, IL-1R^{-/-} und IL-18^{-/-} Mäusen. Gemessen wurden die Expressionen über sieben Tage kultivierter BMDCs zunächst unstimuliert

(ungefüllte Kurven), sowie nach Stimulation mit 10 μg *H. pylori* SS1-Lysat (hellgrau ausgefüllte Kurven) und mit 100 ng *E. coli* LPS (dunkelgrau gefüllte Kurven) über 24 Stunden. Die Histogramme zeigen die Expression von CD80 (A), von CD86 (B) und von LA^b (C) bezogen auf CD11c⁺DCs. Es ist eines von jeweils zwei bis drei repräsentativen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen dargestellt. Auch bei Stimulation mit lebenden *H. pylori* war die Hochregulation von LA^b und der kostimulatorischen Moleküle in Myd88-defizienten Mäusen signifikant reduziert, jedoch nicht komplett aufgehoben (Ergebnisse werden nicht gezeigt).

3.2.2. TLR-Abhängigkeit der *H. pylori*-induzierten Zytokinsekretion DCs

Um zu untersuchen, ob die Signale, die über TLRs weitergeleitet werden, eine *H. pylori*-induzierte Aktivierung von DCs bedingen, wurde weiterhin die Zytokinsekretion von BMDCs als Antwort auf *H. pylori* bestimmt. Die Analyse der Zytokinexpression in stimulierten und unstimulierten DCs von WT, Myd88^{-/-}, IL-1R^{-/-} und IL-18^{-/-} Mäusen wurde mittels quantitativer RT-PCR durchgeführt.

Reife BMDCs wurden hierzu für sechs Stunden mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *H. pylori* SS1 Lysat und PBS in Petrischalen stimuliert. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Isolation von RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion. Die RT-PCR und die quantitative Analyse der Expression von β -Aktin, IL-12p40, IL-12p35, IL-6, TNF- α und IL-10 wurde mittels TaqMan-PCR durchgeführt.

Abbildung 8 zeigt die Expression von IL-12p40, IL-12p35, IL-6, TNF- α und IL-10 von stimulierten und unstimulierten BMDCs. Die Zytokinexpression wurde jeweils auf die β -Aktin-Expression normalisiert. Im Gegensatz zu den Myd88^{-/-} BMDCs nimmt bei stimulierten DCs aus WT, IL1R^{-/-} und IL18^{-/-} Mäusen die Expression dieser proinflammatorischen Zytokine bis um das 100-Fache zu. Die Expression in Myd88^{-/-} DCs kann hingegen durch *H. pylori* nur sehr schwach induziert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass wichtige Schritte der durch *H. pylori*-induzierten Aktivierung von dendritischen Zellen durch Signale von Toll-like Rezeptoren vermittelt werden.

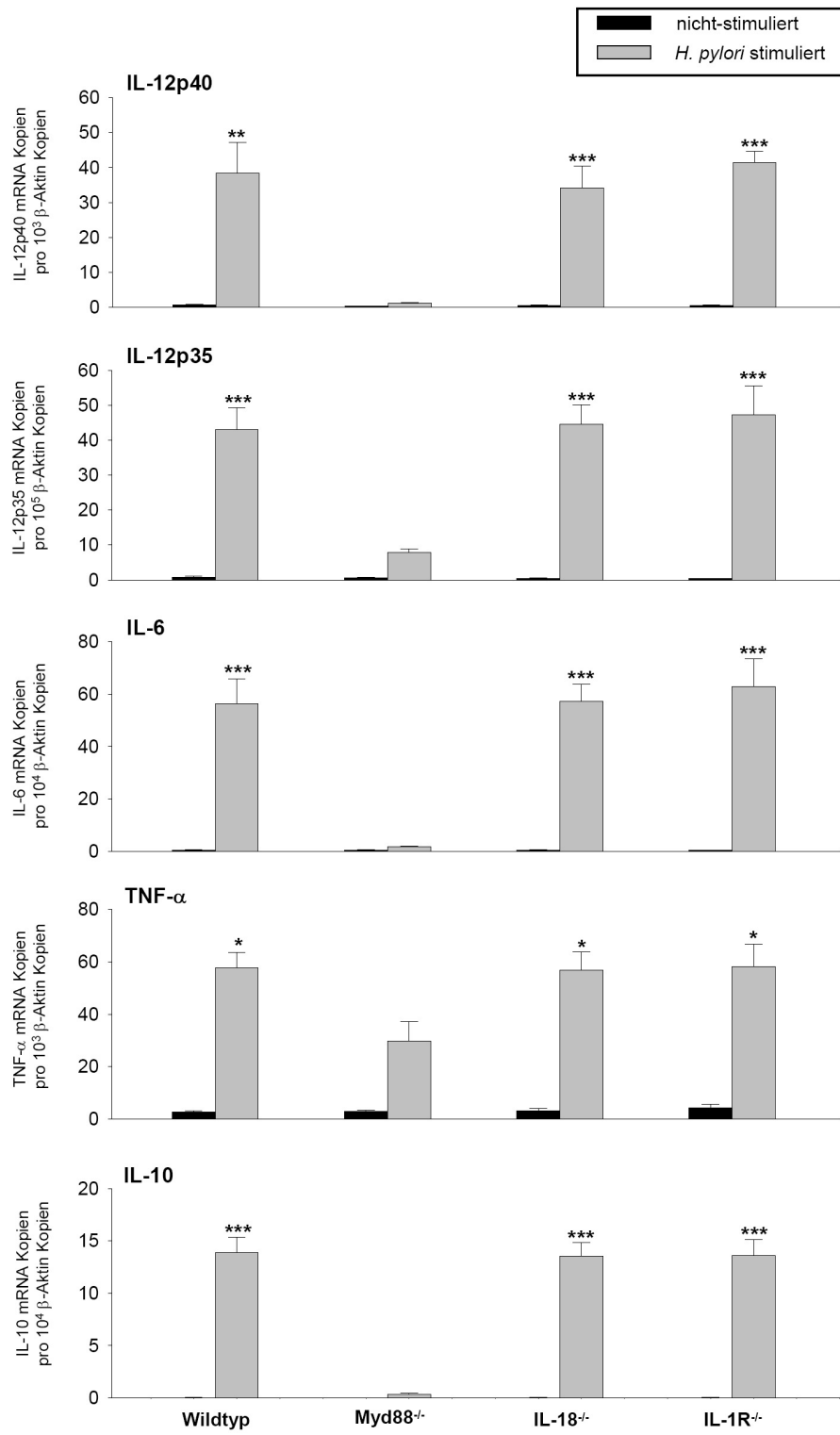


Abbildung 8 (Seite 76): Kontrolle der Zytokin-Expression über Signale der TLRs: Abgebildet ist die Expression proinflammatorischer Zytokine in BMDCs aus WT, Myd88^{-/-}, IL-1R^{-/-} und IL-18^{-/-} Mäusen unstimuliert (schwarze Balken) und nach Stimulation mit *H. pylori* SS1 MOI 50 über sechs Stunden (graue Balken) mittels real-time PCR (normalisiert auf β -Aktin). Gezeigt werden die Daten aus drei ähnlichen Experimenten. Die Balken zeigen das arithmetische Mittel und SEM von sechs bis acht Experimenten pro Gruppe. Es wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Werten stimulierter Myd88^{-/-} DCs und Werten der stimulierten WT, IL-1R^{-/-} und IL-18^{-/-} DCs in allen Fällen gemessen (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001).

3.3. Genexpressionsanalysen in *H. pylori*-stimulierten BMDCs decken TLR-abhängige und TLR-unabhängige Komponenten der DC-Aktivierung auf

Um die molekularen Ereignisse der Interaktion zwischen *H. pylori* und dendritischen Zellen genauer zu untersuchen, wurden Genexpressionsanalysen an infizierten und nicht-infizierten DCs durchgeführt. Die hierbei angewandte Microarray-Analyse erlaubt eine globale Untersuchung der Genexpression.

Für diese Versuchsreihe wurden Knochenmarkszellen aus Oberschenkelknochen von WT und Myd88^{-/-} Mäusen isoliert und über sieben Tage angezchtet. Ein Teil dieser BMDCs wurde in Petrischalen über sechs Stunden mit *H. pylori* SS1 (MOI 50) stimuliert und anschließend mit PBS gewaschen. Schließlich wurde RNA aus den Zellen isoliert. Jeweils 5 μ g RNA wurden entsprechend dem Affymetrix-Protokoll markiert und zu Affymetrix MOE430A2.0GeneChips hybridisiert. Analysiert wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Simpleaffy Software.

3.3.1. Hierarchisches Clustering zur Visualisierung der Genexpression in Wildtyp und Myd88-defizienten DCs nach Stimulation mit *H. pylori*

Zunächst wurde die Genexpression in unstimulierten WT und Myd88-defizienten DCs untersucht und verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Genexpression bei unstimulierten WT und Myd88-defizienten Zellen sehr ähnlich ist. Bei den 22690 Probe-Sets, die auf den Affymetrix Chips vorhanden sind, gab es hinsichtlich der Genexpression nur in drei Fällen signifikante Unterschiede zwischen WT und Myd88^{-/-} DCs ($p < 0.01$; SAM Multiclass Analysis; $p_{\text{sign}} < 0.01$).

Nach der Stimulation von WT DCs mit *H. pylori* (MOI 50) kam es zu einer signifikanten Regulation (Induktion oder Hemmung der Expression) von 1546 Genen (SAM Multiclass Analysis; FDR<1%). Diese starken Veränderungen in der Genexpression deuten darauf hin,

dass es nach *H. pylori*-Stimulation zu einer tiefgreifenden Änderung des zellulären Phänotyps von DCs kommt.

Im Gegensatz zur basalen Genexpression konnten nach Stimulation mit *H. pylori* signifikante Unterschiede in der Expression vieler Gene bei WT und Myd88-defizienten DCs festgestellt werden. Zur vergleichenden Visualisierung der Genexpression in WT und Myd88^{-/-} DCs wurde „Hierarchic Clustering“ (HC) durchgeführt. Abbildung 9A zeigt eine HC-Analyse, durchgeführt an Genen, die nach der Stimulation mehr als dreifach in WT und/oder Myd88-defizienten DCs reguliert wurden. 178 Gene wurden nach Stimulation mit *H. pylori* um mehr als das Dreifache in WT und/oder Myd88^{-/-} DCs reguliert. Wie aus Abbildung 9B zu ersehen ist, wurden von diesen 178 Genen 70,8% nur in WT DCs, 27% in WT und Myd88^{-/-} DCs und 2,2% nur in Myd88-defizienten DCs verstärkt exprimiert.

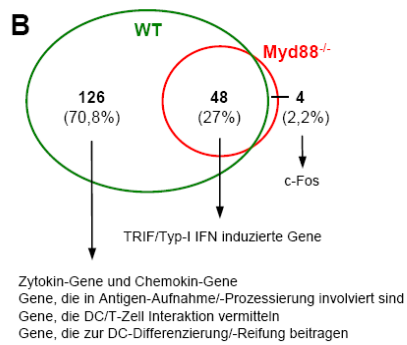
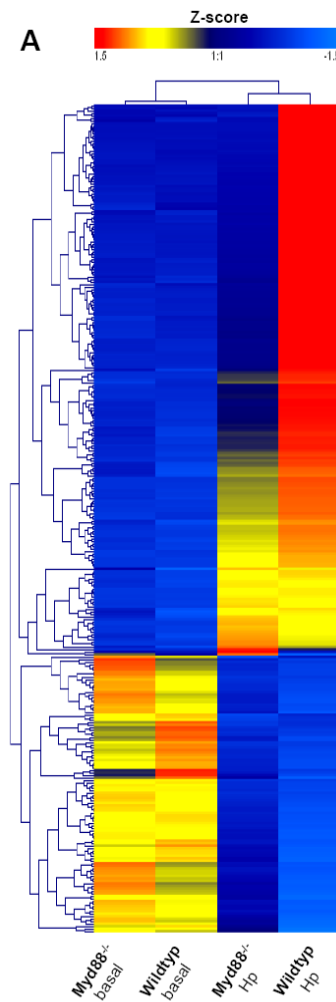


Abbildung 9: Das *H. pylori*-induzierte DC-Transkriptom ist zum großen Teil von Myd88-Signalwegen abhängig: Dargestellt sind die nach *H. pylori*-Stimulation regulierten Gene von DCs von WT und Myd88-defizienten Mäusen. (A) Hierarchisches Clustering signifikant regulierter Gene,

die in WT oder Myd88^{-/-} BMDCs mindestens dreifach induziert oder unterdrückt werden. Die durchschnittliche Expression ist Gen-weise normalisiert mit Hilfe eines Z-score. Gemessen wurde die Expression unstimulierter sowie mit *H. pylori* SS1 (MOI 50; 6 Stunden) stimulierter DCs. (B) Das Kreisdiagramm verdeutlicht die Unterschiede der Transkription zwischen WT und Myd88^{-/-}. Insgesamt wurden in den DCs (WT und Myd88^{-/-}) 178 Gene mehr als dreifach reguliert. Der grüne Kreis enthält alle in WT regulierten Gene, während der rote Kreis die regulierten Gene der Myd88-defizienten DCs enthält. Von den mehr als dreifach regulierten Genen wurden 126 Gene (70,8%) nur in WT DCs reguliert, vier Gene (2,2%) nur in Myd88^{-/-} und 48 Gene (27%) in WT und Myd88^{-/-} DCs.

3.3.2. Einteilung der *H. pylori*-regulierten Gene in funktionelle Gruppen

Anschließend wurden jene Gene näher betrachtet, deren Expression sich um mindestens das Dreifache nach Stimulation mit *H. pylori* verändert hatte. Diese ausgewählten Gene wurden, je nach molekularer und physiologischer Funktion, in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Hierbei wurden besonders immunologische Funktionen berücksichtigt. Die Ermittlung der Funktion jedes einzelnen regulierten Gens erfolgte mittels Literaturrecherche in medizinischen Datenbanken (PubMed). Folgende Gruppen wurden ermittelt und sollen nachfolgend im Detail diskutiert werden:

- Zytokine und andere Entzündungs-assoziierte Moleküle
- Gene, die bei der Aufnahme und Prozessierung von Antigenen eine Rolle spielen
- Gene, die bei der Interaktion von DCs mit anderen Leukozyten eine Rolle spielen
- Chemokine
- Gene, die an der Differenzierung, Reifung und Funktion der DCs partizipieren
- Gene, die das zelluläre Überleben steuern
- Gene, die an der Regulation von DNA-Replikation und Zellzyklus beteiligt sind
- Gene, die an der Modulation von Zellstruktur/Zellform und am Migrationsverhalten von DCs partizipieren
- Typ I Interferon-abhängige oder TRIF-abhängige Gene
- Regulation von c-Fos in Myd88-defizienten DCs

Nicht eingegangen wird in dieser Arbeit auf eine große Anzahl von Genen, die den Lipid-, Aminosäure- und Glukosestoffwechsel oder die generelle Regulation der Transkription und Translation beeinflussen.

3.3.2.1. Zytokine und Entzündungs-assoziierte Moleküle

DCs, die mit *H. pylori* stimuliert wurden, weisen eine starke Induktion pro-inflammatorischer Zytokine auf. Tabelle 19 zeigt, dass zahlreiche Zytokine induziert werden,

die eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung spielen. So kommt es z.B. zu einer bis zu 110-fachen Induktion der Expression von IL-6, IL-1 β , IL-12, TNF- α , IL-1 α . Ein wichtiger intrazellulärer transkriptioneller Regulator proinflammatorischer Genexpression ist I κ B ζ (Yamamoto et al., 2004). Das Kernprotein ist entscheidend für die Expression einer großen Anzahl von Genen, die über den TLR-Signalweg aktiviert werden, und wird durch *H. pylori* induziert (Tabelle 19).

Neben proinflammatorischen Zytokinen kam es bei Stimulation mit *H. pylori* zu einer ausgeprägten Induktion der Expression von Enzymen, welche die Regulation von Prostaglandinen oder die Biosynthese von Stickoxid beeinflussen. Zu diesen Enzymen gehören Ptgs2, Ptges, Nos2 und Arg2.

Auch die Akut-Phase-Proteine SAA3 und F3, der Komplement-Faktor H2-Bf sowie das antimikrobielle Peptid Hcpidin wurden verstärkt exprimiert. Diese Gene sind in WT DCs nach Stimulation der Zellen deutlich verstärkt, in Myd88-defizienten DCs werden sie dagegen kaum hochreguliert. Dies zeigt, dass der Myd88-abhängige Signalweg eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Immunantwort spielt. ST2 und DOK2, die hemmend auf den TLR-Signalweg wirken (Akira and Takeda, 2004), wurden dementsprechend nach *H. pylori* Stimulation unterdrückt.

Tabelle 19: Für Zytokine und andere Entzündungs-assoziierte Moleküle kodierende Gene, die in WT und/oder Myd88^{-/-} DCs nach Stimulation mit *H. pylori* über sechs Stunden um mindestens das Dreifache induziert wurden

Entrez Gene ID	Gename	Gensymbol	FC WT	FC Myd88 ^{-/-}
19225	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Ptgs2 (Cox2)	119,6	12,9
16193	Interleukin 6	IL-6	112,5	3,3
16160	Interleukin 12b	IL-12b	59,1	1,8
21926	Tumor necrosis factor	Tnf- α	24,1	6,7
16153	Interleukin 10	IL-10	22,3	1,1
16176	Interleukin 1 β	IL-1 β	20,4	3,6
20210	Serum amyloid A 3	Saa3	18,9	2,9
80859	Nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	Nfkbiz	16,3	2,9
14066	Coagulation factor III	F3	14,6	7,6
84506	Hepcidin antimicrobial peptide	Hamp	12,9	1,2
12702	Suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	11,3	4,3
16175	Interleukin 1 α	IL-1 α	10,4	2,7
14962	Histocompatibility 2, complement component factor B	H2-Bf	7,9	4,8
11847	Arginase type II	Arg2	6,6	3,2
16992	Lymphotoxin A	LTA	6,5	2,3
54448	Interleukin 1 family, member 6	IL-1F6	6,1	1,4
16159	Interleukin 12a	IL-12a	5,2	1,2
16181	Interleukin 1 receptor antagonist	IL-1RN	4,6	2,5
50498	Interleukin 27	IL-27 (Ebi3)	3,7	1,2
215257	Interleukin 1 family, member 9	IL-1F9	3,5	1,8
64292	Prostaglandin E synthase	Ptges	3,5	3,1
18126	Nitric oxide synthase 2, inducible	Nos2 (Inos)	3,4	1,1
13449	Docking protein 2	Dok2	-3,0	-1,8
17082	Interleukin 1 receptor-like 1	IL-1RL1 (ST2)	-4,1	-2,6
16600	Kruppel-like factor 4 (gut)	Klf4	-9,9	-3,0

FC = Fold change; WT = Wildtyp

3.3.2.2. Gene, die an Aufnahme und Prozessierung von Antigen beteiligt sind

Die Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigen ist entscheidend für die Einleitung spezifischer Immunität. Wie erwartet, wurden durch *H. pylori* Gene, die bei der Antigenaufnahme und Prozessierung eine Rolle spielen, in DCs induziert.

Wie die Tabelle 20 zeigt, schließt diese Gruppe C-Typ Lectine, wie die klassischen endozytotischen Mannose-Rezeptoren LY75 (DEC-205) und MARCO, ein. Auch CLEC4E, ein weiteres C-Typ Lectin, dessen Funktion noch unbekannt ist, sowie der „Scavenger Rezeptor“ LOX-1, welcher eine Schlüsselrolle bei der Endozytose von Hitzeschockproteinen und bei der Antigen-Kreuz-Präsentation spielt (Delneste et al., 2002), wurden nach *H. pylori* Stimulation verstärkt exprimiert. Ebenso wurde durch *H. pylori* die Expression von Molekülen induziert, die an der intrazellulären Antigenprozessierung beteiligt sind. Zu diesen Molekülen zählen CAV1, CAV2, CPD, ACPP und UBE2L6. Bei vielen dieser Gene konnte eine deutliche Myd88-Abhängigkeit der Induktion festgestellt werden.

Tabelle 20: An Antigen-Aufnahme und –Prozessierung beteiligte Gene, die in WT und/oder Myd88^{-/-} DCs nach Stimulation mit *H. pylori* über sechs Stunden um mindestens das Dreifache induziert wurden

Gene ID	Gennamen	Gensymbol	FC WT	FC Myd88 ^{-/-}
56619	C-type lectin domain family 4, member e	Clec4e	12,8	10,3
56318	Lysosomal acid phosphatase	Acpp	12,3	2,2
17167	Macrophage receptor with collagenous structure	Marco	7,1	-1,2
17076	Lymphocyte antigen 75	Ly75 (DEC205)	4,5	1,9
12874	Carboxypeptidase D	Cpd	4,1	1,8
12389	Caveolin, caveolae protein 1	Cav1	3,9	2,7
56791	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	Ube2l6	3,9	2,0
12390	Caveolin 2	Cav2	2,7	3,1

3.3.2.3. Gene, die bei der Interaktion von DCs mit Leukozyten eine Rolle spielen

Die Microarray-Analysen zeigten, dass eine Reihe von Genen, die an der Aktivierung von T-Zellen oder natürlichen Killerzellen beteiligt sind, nach Stimulation mit *H. pylori* in WT DCs vermehrt exprimiert wurden (Tabelle 21).

Tabelle 21: An der T-Zell-Interaktion beteiligte Gene, die in WT und/oder Myd88^{-/-} DCs nach Stimulation mit *H. pylori* über sechs Stunden um mindestens das Dreifache induziert wurden

Gene ID	Genname	Gensymbol	FC WT	FC Myd88 ^{-/-}
21939	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	Tnfrsf5 (CD40)	14,9	3,4
21948	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7	Tnfsf7 (CD70)	14,0	2,6
53606	Interferon, alpha-inducible protein	G1p2 (Ifi15)	11,9	8,0
108078	Oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	Lox-1 (Olr1)	9,6	4,3
27218	Signaling lymphocytic activation molecule family member 1	Slamf1 (CD150)	8,5	1,1
21950	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	Tnfsf9 (41BBL)	8,0	2,3
22329	Vascular cell adhesion molecule 1	Vcam1 (CD106)	6,8	2,9
52118	Poliovirus receptor	CD155	5,8	2,1
12517	CD72 antigen	CD72	4,8	-1,3
12519	CD80 antigen	CD80	3,9	-1,3
12524	CD86 antigen	CD86	3,5	1,3
11658	Activated leukocyte cell adhesion molecule	Alcam	3,3	2,1

Im Gegensatz hierzu werden diese jedoch in Myd88-defizienten DCs nicht bzw. nur sehr schwach exprimiert. Es wurde bereits gezeigt, dass Oberflächenmoleküle wie CD80 und CD86 zusammen mit kostimulatorischen Molekülen der TNF-Familie, wie TNFSF9 (4-1BB-L), TNFSF5 (CD40) und TNFSF7 (CD70), eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen spielen. CD155, welches an DNAM-1 bindet, ist z.B. ein

wichtiges Molekül für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen (Watts, 2005). Die Interaktion von CD70 mit CD27 spielt eine ausschlaggebende Rolle in der CD8⁺ T-Zell-Aktivierung, während das Interferon-induzierbare ubiquitin-like Protein IFI15 (ISG15) die Proliferation von NK-Zellen induziert und die MHC-unabhängige Zytotoxizität verstärkt (D' Cunha et al., 1996). Auch hier wurden die meisten Gene dieser Gruppe überwiegend in WT DCs induziert, während in Myd88-defizienten DCs keine bzw. nur eine geringe Hochregulation stattfand.

3.3.2.4. Chemokinexpression in DCs durch *H. pylori*

DCs vermitteln, zumindest teilweise, die Chemotaxis von Immun-Effektorzellen zum Ort der Infektion. Im Einklang hiermit kam es nach *H. pylori* Stimulation zu einer ausgeprägten Induktion verschiedener Chemokine der C-C- und C-X-C-Familien. Tabelle 22 zeigt, dass es durch die bakterielle Infektion zu einer deutlichen Induktion von CXCL2, CXCL3, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, CCL7 kam. Außerdem wurde CD38, das einen wichtigen Faktor für die Chemotaxis dendritischer Zellen darstellt, durch Stimulation mit *H. pylori* hochreguliert (Partida-Sanchez et al., 2004).

Tabelle 22: Für Chemokine kodierende Gene, die in WT und/oder Myd88^{-/-} DCs nach Stimulation mit *H. pylori* um mindestens das Dreifache induziert wurden

Gene ID	Genname	Gensymbol	FC WT	FC Myd88 ^{-/-}
20311	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	CXCL5 (ENA-78)	11,8	1,0
20310	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2 (Gro-β)	7,1	2,4
15945	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10 (IP-10)	5,1	4,1
20302	Chemokine (C-C motif) ligand 3	CCL3 (MIP-1α)	7,6	2,4
20306	Chemokine (C-C motif) ligand 7	CCL7 (MCP-3)	7,2	1,2
20303	Chemokine (C-C motif) ligand 4	CCL4 (MIP-1β)	6,8	2,8
20296	Chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2 (MCP-1)	3,9	1,5
54199	Chemokine (C-C motif) receptor- like 2	CCRL2	6,1	3,8
12494	CD38 Antigen	CD38	5,2	2,0

3.3.2.5. Gene, die bei der Reifung und Differenzierung von DCs eine Rolle spielen

Die Reifung von DCs ist ein komplexer Differenzierungsvorgang, der durch ein koordiniertes Zusammenspiel zahlreicher Gene gesteuert wird. Eine Reihe von Genen, die bei der Differenzierung und Reifung von DCs entscheidend sind, werden durch *H. pylori* reguliert. Tabelle 23 zeigt, dass Gene wie *Gfi1*, *Edn1* und *Csf3*, die eine wesentliche Rolle im Reifungsprozess, beim Überleben und bei der Funktion von DCs spielen, durch *H. pylori* induziert werden (Rathinam et al., 2005; Guruli et al., 2004; Roberts, 2005). Im Gegensatz dazu wurden Gene wie *Mafb* und *Hhex*, welche bekannt dafür sind, dass sie die Differenzierung und Reifung von DCs unterdrücken, nach Stimulation mit *H. pylori* herunterreguliert (Bakri et al., 2005). Phänotypische Marker der DC-Reifung, wie CD80 oder CD86, wurden auf Stimulation mit *H. pylori* hin induziert, während Antigene wie CD206 und CD301a, welche nur auf unreifen DCs exprimiert werden, in ihrer Expression gehemmt wurden.

Während dieses Spezialisierungsprogrammes wird die Zellteilung wahrscheinlich gehemmt. Gene, die an der Replikation der DNA und am Nukleinsäuremetabolismus beteiligt sind, wurden vorwiegend in den unterdrückten Clustern gefunden. Außerdem gehörte der Transkriptionsfaktor Myc, welcher die Zellproliferation fördert, zu den signifikant (>3-fach) herunterregulierten Genen. Generell waren jedoch in dieser Gruppe von Genen die Unterschiede zwischen WT und Myd88-defizienten Mäusen nicht so ausgeprägt wie in den oben beschriebenen Gruppen.

Tabelle 23: An Reifung, Funktion und Differenzierung von DCs beteiligte Gene, die in WT und/oder Myd88^{-/-} DCs nach Stimulation mit *H. pylori* über sechs Stunden um mindestens das Dreifache induziert wurden

Gene ID	Gename	Gensymbol	FC WT	FC Myd88 ^{-/-}
12985	Colony stimulating factor 3	Csf3	19,5	1,1
14581	Growth factor independent 1	Gfi1	11,8	2,9
13614	Endothelin 1	Edn1	9,9	2,2
23886	Growth differentiation factor 15	Gdf15	3,0	1,6
59027	Pre-B-cell colony-enhancing factor 1	Pbef1	3,0	2,3
15242	Hematopoietically expressed homeobox	Hhex	-3,4	-2,0
16658	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (avian)	Mafb	-7,8	-3,0

3.3.2.6. Gene, die an der Regulation von Zellteilung und Apoptose beteiligt sind

Die Regulation der Zellteilung ist ein komplexer Vorgang, an dem eine Reihe von Genen beteiligt sind. Tabelle 24 umfasst die regulierten Gene, welche bei der DNA-Replikation und im Nukleinsäure-Metabolismus eine Rolle spielen. Bei den Transkripten, die in diese Gruppe eingeordnet wurden, konnte zumeist eine Hemmung der Genexpression beobachtet werden. So wurden z.B. Mcm5, Mcm6, Mcm7, Ung and Cdca5 nach *H. pylori* Stimulation signifikant herunterreguliert. Dies deutet darauf hin, dass das Spezialisierungsprogramm der DCs von einer Hemmung der Zellteilung begleitet wurde.

Tabelle 24: An DNA-Replikation und Zellzyklus beteiligte Gene, die in WT und/oder Myd88^{-/-} DCs nach Stimulation mit *H. pylori* über sechs Stunden um mindestens das Dreifache induziert wurden

Gene ID	Genname	Gensymbol	FC WT	FC Myd88 ^{-/-}
327762	DNA2 DNA replication helicase 2-like	Dna2l	-6,1	-2,7
18479	P21 (CDKN1A)-activated kinase 1	Pak1	-3,8	-2,2
22256	Uracil-DNA glycosylase	Ung	-3,4	-2,5
67849	Cell division cycle associated 5	Cdca5	-3,3	-1,7
17219	Minichromosome maintenance deficient 6	Mcm6	-3,3	-2,7
17220	Minichromosome maintenance deficient 7	Mcm7	-3,2	-2,4
17218	Minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46	Mcm5	-3,1	-2,1

Im Gegensatz dazu wurden Gene, die für das Überleben der Zellen wichtig sind, verstärkt transkribiert. Die Expression von Genen, welche die Apoptose hemmen oder die Zellen vor dem programmierten Zelltod schützen, wurden nach Stimulation der DCs mit *H. pylori* zumeist induziert, so z.B. Tnfaip3, Gadd45b, Cflar (FLIP) and Sgk (Tabelle 25).

Die Expression von proapoptotischen Genen, wie z. B. Fas, Fas-Ligand oder Bax, blieb nach *H. pylori* Stimulation unbeeinflusst. Verstärkt exprimiert wurden schließlich mehrere Mitglieder einer Familie von Serin-Proteinase-Inhibitoren (Serpib9, Serpinb6b und Serpinc1). Frühere Studien haben gezeigt, dass diese Protease-Inhibitoren DCs vor T-Lymphozyten-

induzierter Apoptose während der T-Lymphozytenaktivierung schützen (Bladergroen et al., 2001; Medema et al., 2001).

Tabelle 25: Für das Überleben von Zellen wichtige Gene, die in WT und/oder Myd88^{-/-} DCs nach Stimulation mit *H. pylori* über sechs Stunden um mindestens das Dreifache induziert wurden

Gene ID	Gennamen	Gensymbol	FC WT	FC Myd88 ^{-/-}
21929	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	Tnfaip3	4,6	2,5
17873	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	Gadd45b	4,3	2,4
12633	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	Cflar (FLIP)	4,2	2,2
20393	Serum/glucocorticoid regulated kinase	Sgk	3,5	2,8
20723	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 9	Serpib9 (PAI9)	3,7	1,9
20708	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 6b	Serpib6b	3,5	1,9

3.3.2.7. Gene, die das Umorganisieren des Zytoskeletts und das migratorische Verhalten von DCs regulieren

Für die Aufnahme von Antigen und für die Wanderung von DCs zu sekundären lymphatischen Organen ist die Umorganisation der Zellstruktur notwendig. Gene, die bei der Regulation der Zellstruktur beteiligt sind, wie z.B. Lad1, Plek2, Tiam1, Pak1, Synpo oder Arhgap4, wurden durch *H. pylori* in DCs reguliert (Tabelle 26). Dies deutet auf die Notwendigkeit zytoskelettaler Neuordnung während der DC-Aktivierung hin. Im Allgemeinen war der Einfluss der Myd88-Defizienz auf die Gene, welche an Veränderungen im Zytoskelett, am Überleben der Zellen und an der Zellteilung beteiligt sind, schwächer als der Einfluss auf Gene, die für die Regulation der Immunantwort verantwortlich sind.

Tabelle 26: An Zellstruktur und Zellform beteiligte Gene, die in WT und/oder Myd88^{-/-} DCs nach Stimulation mit *H. pylori* über sechs Stunden um mindestens das Dreifache induziert wurden

Gene ID	Gename	Gensymbol	FC WT	FC Myd88 ^{-/-}
16763	Ladinin 1	Lad1	4,4	2,0
71994	Calponin 3, acidic (F-actin-binding)	Cnn3	3,8	1,5
27260	Pleckstrin 2	Plek2	3,3	1,2
14544	Guanine deaminase	Gda	-3,7	-1,4
104027	Synaptopodin	Synpo	-3,2	-2,2
21844	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	Tiam1	-3,0	-1,8
216445	Rho GTPase activating protein 9	Arhgap9	-3,5	-1,9
171207	Rho GTPase activating protein 4	Arhgap4	-3,5	-2,5

3.3.2.8. Einfluss von *H. pylori* auf die Expression von Typ I Interferon-abhängigen Genen

Beim Vergleich der WT- und Myd88-spezifischen Transkriptome fiel auf, dass eine Gruppe von Genen Myd88-unabhängig von *H. pylori* induziert wird. Interessanterweise zeigte sich, dass es sich hierbei vor allem um eine Gruppe Typ I Interferon-induzierter Gene handelt (Tabelle 27).

Typ I Interferone spielen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von Viren. Darüber hinaus haben diese Zytokine jedoch auch verschiedene Funktionen bei der Steuerung adaptiver Immunität gegenüber bakteriellen Mikroorganismen (Decker et al., 2005; Iwasaki and Medzhitov, 2004). Eine Reihe Typ I-induzierter Gene, wie z.B. Cxcl10 (IP-10), NK-Zell-Aktivierendes Protein ISG15 und Ifit1, wurden sowohl in WT als auch in Myd88^{-/-} DCs nach Stimulation mit *H. pylori* induziert. Dies deutet darauf hin, dass es einen Myd88-unabhängigen Mechanismus der Induktion von Typ I Interferonen gibt. Diese Typ I Interferon Antwort könnte entweder TRIF-vermittelt sein oder durch einen TLR-unabhängigen Rezeptor induziert werden.

Tabelle 27: Typ I Interferon-abhängige Gene, die in WT und/oder Myd88^{-/-} DCs nach Stimulation mit H. pylori über sechs Stunden um mindestens das Dreifache induziert wurden

Gene ID	Gename	Gensymbol	FC WT	FC Myd88 ^{-/-}
58185	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2	Rsad2	15,6	11,0
15957	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	Ifit1	12,0	6,6
53606	Interferon, alpha-inducible protein	G1p2	11,9	8,0
12702	Suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	11,3	4,3
14962	Histocompatibility 2, complement component factor B	H2-Bf	7,9	4,8
19288	Pentaxin related gene	Ptx3	7,0	4,6
23962	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2	Oasl2	6,0	4,7
22169	Thymidylate kinase family LPS-inducible member	Tyki	5,8	5,5
226695	Interferon activated gene 205	Ifi205	5,7	4,8
16365	Immunoresponsive gene 1	Irg1	5,4	5,1
67775	28kD interferon alpha responsive protein	Ifrg28	5,2	4,6
15945	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10 (IP10)	5,1	4,1
15958	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	Ifit2	4,4	4,0
24110	Übiquitin specific protease 18	Usp18	4,3	3,7
15944	Interferon inducible protein 1	Ifi1	3,4	3,0
54123	Interferon regulatory factor 7	Irf7	4,2	2,8
15950	Interferon activated gene 203	Ifi203	3,2	2,7
231655	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1	Oasl1	4,3	2,5
71586	Interferon induced with helicase C domain 1	Ifih1	3,6	2,3
64164	Interferon alpha responsive gene	Ifrg15	3,3	1,9
54131	Interferon regulatory factor 3	Irf3	3,1	3,0
15959	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	Ifit3	2,6	3,2

3.3.2.9. Regulation von c-Fos in Myd88-defizienten DCs

Insgesamt wurden in Myd88^{-/-} DCs nach Stimulation mit *H. pylori* 52 Gene um mehr als das Dreifache hochreguliert. Davon wurden 48 Gene auch in den DCs der WT Mäuse verstärkt exprimiert. Nur vier Gene wurden allein in Myd88-defizienten DCs um mehr als das Dreifache reguliert (Tabelle 28). Zu ihnen gehören die Typ I Interferon-abhängigen Gene IFIT3 und CAV-2 sowie LAT, welche nur geringfügige Unterschiede in der Expression bei WT und Myd88^{-/-} DCs aufweisen. Überraschenderweise wurde der Transkriptionsfaktor c-Fos, welcher ein negativer Regulator der IL-12-Expression ist (Agrawal et al., 2003), in Myd88^{-/-} DCs deutlich hochreguliert, jedoch nicht in WT DCs induziert.

Tabelle 28: Gene, die ausschließlich in Myd88^{-/-} DCs nach Stimulation mit *H. pylori* über sechs Stunden um mindestens das Dreifache induziert wurden

Gene ID	Gename	Gensymbol	FC WT	FC Myd88 ^{-/-}
14281	FBJ osteosarcoma oncogene	<i>Fos (c-Fos)</i>	1,1	4,4
16797	Linker for activation of T cells	<i>Lat</i>	1,9	3,1
15959	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	<i>Ifit3</i>	2,6	3,2
12390	Caveolin 2	<i>Cav2</i>	2,7	3,1

Zusammengefasst verdeutlichen die Daten der Genexpression stimulierter DCs die Komplexität der Prozesse, die durch *H. pylori* auf molekularer Ebene induziert werden, und zeigen die Schlüsselrolle des Myd88-vermittelten Signalweges bei der Aktivierung von DCs. Zudem ermöglichte die Microarray-Analyse die Identifikation einer Gruppe von Genen, die durch einen Myd88-unabhängigen Mechanismus durch *H. pylori* induziert wurden; diese Gruppe umfasst in erster Linie Typ I Interferon-abhängige Transkripte.

3.4. Einfluss des Myd88-abhängigen Signalweges auf die gastrale Inflammation *in vivo*

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die Aktivierung von DCs durch *H. pylori* zu großen Teilen über Toll-like Rezeptoren vermittelt wird. Zur weiteren Klärung der Rolle der TLRs wurden Antworten auf die folgenden Fragen gesucht: Welche Bedeutung hat die TLR-abhängige Erkennung von *H. pylori* für die Induktion innater und adaptiver Immunität? Welche Bedeutung hat die TLR-abhängige Erkennung von *H. pylori* für die Entstehung gastraler Inflammation? Welche Bedeutung hat die TLR-abhängige Erkennung von *H. pylori*

auf das Ausmaß der bakteriellen Kolonisation? Für diese Untersuchungen wurde ein murines Infektionsmodell etabliert. Hierzu wurden C57BL/6-Wildtyp und Myd88^{-/-} Mäuse mit dem mausadaptierten *H. pylori*-Stamm SS1 infiziert.

Die Infektion erfolgte mit je 100 µl einer Bakterienlösung von OD5 (frisch von der Platte geerntete Bakterien, aufgenommen in PBS und photometrisch auf eine OD von 5 eingestellt; ~ 5 x 10⁸ Bakterien pro 100 µl). Als Kontrolle wurden WT Tiere mit je 100 µl PBS inokuliert. Die Infektion wurde an Tag drei und fünf wiederholt. Nach vier Monaten wurde den Mäusen Blut abgenommen, um aus dem Serum die T_H1- und T_H2-spezifischen Antikörper IgG1 und IgG2c zu bestimmen. Anschließend wurden die Tiere getötet und die Mägen entnommen, um die bakterielle Kolonisationsdichte, die Entzündungsantwort und die Zytokinantwort im Magen zu ermitteln. Hierzu wurde zunächst für die histologischen Untersuchungen ein schmaler Gewebestreifen vom Magen abgetrennt. Der Rest der Mägen wurde in zwei größere und ein kleineres Stück geteilt. Eines der größeren Stücke wurde dazu verwendet, die Kolonisationsdichte von *H. pylori* in den Mägen der Mäuse zu bestimmen. Das zweite Magensegment wurde zur Isolation von DNA und RNA verwendet, um die Zytokinantwort nach Infektion mit *H. pylori* zu analysieren. Das dritte, kleinere Magenteil wurde zum Nachweis von *H. pylori* in einen Urease-Test gegeben.

3.4.1. Gastrale Entzündungsantwort bei *H. pylori*-infizierten Wildtyp und Myd88-defizienten Mäusen

Nach Entnahme der Mägen wurden diese in PBS gespült und anschließend entlang der großen Krümmung vom Duodenum bis zum Pylorus ein Streifen Magengewebe herauspräpariert. Dieser Gewebestreifen wurde mit 4%-igem Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffinblöcken wurden mit dem Rotationsmikrotom 2 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Präparate wurden entparaffiniert und anschließend mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Um das Ausmaß der gastralen Inflammation ermitteln zu können, wurde eine Einteilung der Gastritis anhand der granulozytären und lymphozytären Infiltration in fünf Grade vorgenommen. Die Kriterien zur Klassifikation der Schwere der Gastritis sind in Tabelle 29 dargestellt.

Tabelle 29: Histologische Einteilung des Gastritisgrades der Mukosa am Korpus/Antrum-Übergang:

Gastritisgrad	Histologischer Befund
Grad 0	Kein sichtbarer Unterschied zu normalem gesundem Gewebe
Grad 1	Unifokale, leichte Zellinfiltration in die lamina propria
Grad 2	Einzelne (2-5) multifokale Läsionen mit mäßiger Infiltration von Entzündungszellen in die Lamina propria
Grad 3	Läsionen, die ein größeres Mukosagebiet umfassen, oder >5 multifokale Läsionen
Grad 4	Diffuse, schwere Entzündung, häufig transmurale Entzündung

Abbildung 10 zeigt histologische Aufnahmen von Magenschleimhaut infizierter und nicht infizierter Tiere. In der Magenmukosa von nicht-infizierten WT Mäusen (n = 21) (Abbildung 10A und B) sind keine Zeichen einer Entzündung zu erkennen. Nur wenige einzelne Leukozyten sind im Bereich des Korpus/Antrum-Übergangs verstreut zu sehen. Ein ähnliches Bild konnte bei nicht-infizierten Myd88^{-/-} Mäusen beobachtet werden.

Bei der Analyse der Mägen der infizierten Versuchstiere, zeigten die meisten Präparate der Mägen von WT Mäusen eine deutliche Entzündungsantwort im Bereich des Korpus/Antrum-Übergangs. Abbildung 10C verdeutlicht, dass eine große Anzahl von mononukleären Zellen die Mukosa und Submukosa dieser Mäuse infiltrieren. Die dichte Infiltration mit Leukozyten in der Lamina propria und zwischen den Drüsen entspricht einer Grad 4 Entzündung. Abbildung 10D zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus 10C.

Die mikroskopische Untersuchung der Magenpräparate brachte zusätzliche Ergebnisse: Erstens fällt mit Zunahme der Wanddicke des Magens häufig eine begleitende Hyperplasie auf. Zweitens lässt sich häufig eine partielle Atrophie der Magenmukosa erkennen. Diese Veränderungen können bei den infizierten Mäusen gelegentlich schon nach einer 16-wöchigen Infektionszeit beobachtet werden.

Bei der Analyse der Schleimhaut infizierter Myd88-defizienter Mäuse fiel auf: Zwar kommt es auch hier zu einer leukozytären Infiltration der Magenschleimhaut, das Ausmaß der Entzündungsantwort ist jedoch geringer als bei den WT Kontrollen.

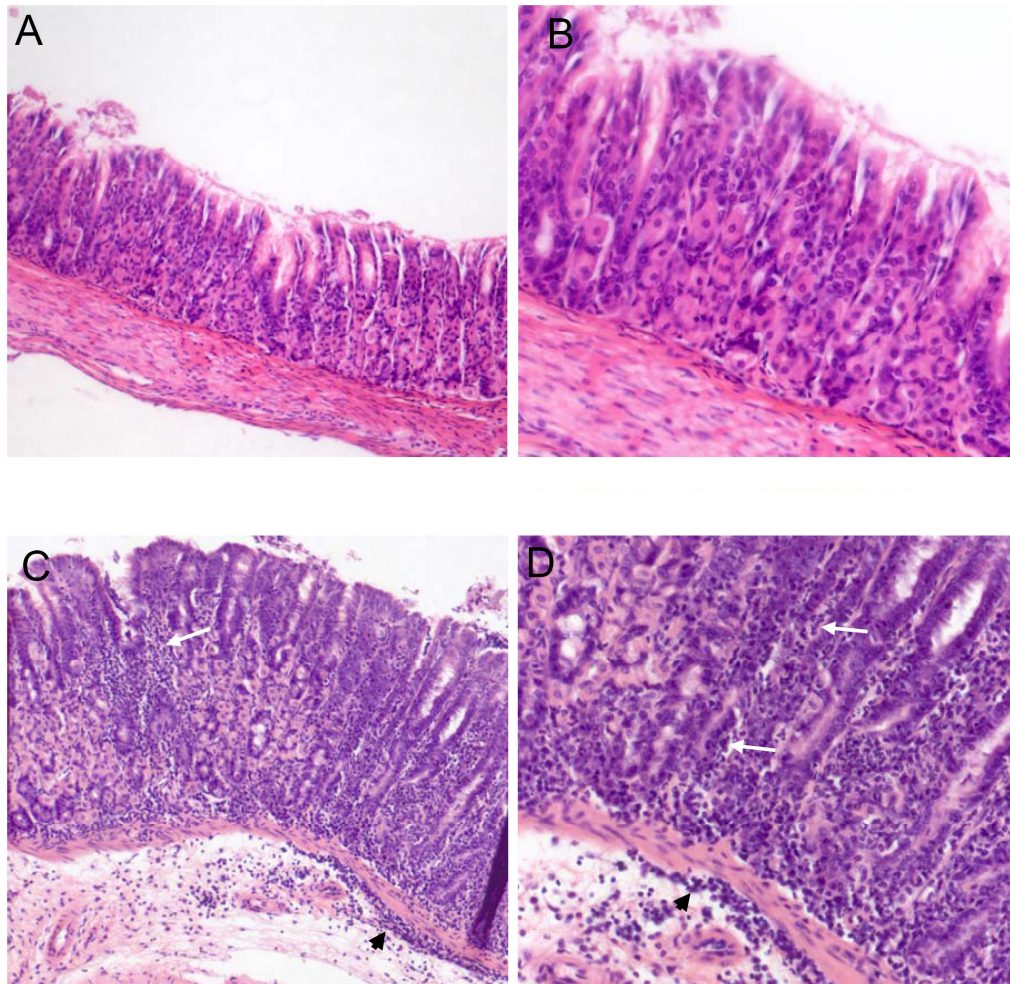


Abbildung 10: Gastrale Inflammation nicht-infizierter und infizierter Mäuse; HE-Färbung: (A) und (B) zeigen repräsentative histologische Schnitte eines nicht-infizierten Magens. Sie stellen eine Grad 0 Gastritis dar; (C) und (D) sind Aufnahmen eines mit *H. pylori* SS1 infizierten Magens (vier Monate nach Infektion). Es liegt hier eine Grad 4 Gastritis vor. Die weißen Pfeile weisen jeweils auf Leukozyten zwischen den Drüsen hin, die schwarzen Pfeilspitzen markieren Leukozyten im Bereich der Lamina propria. Die Photographien (A) und (C) wurden mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen, (B) und (D) mit 200-facher Vergrößerung.

Die histologische Untersuchung der Mägen ergab, dass die Gastritis in infizierten WT Mäusen stärker ausfiel als in *Myd88*^{-/-} Tieren. Abbildung 11 zeigt das Ausmaß der Gastritis von WT und *Myd88*^{-/-} Mäusen auf einen Blick. Jedes dargestellte Dreieck steht für die Entzündungsantwort einer Maus. Die horizontalen Linien geben den Mittelwert an. Es ist deutlich zu sehen, dass im Mittel die Schleimhautentzündung in *Myd88*^{-/-} Mäusen geringer ausfällt als bei WT Mäusen. Dabei sollte jedoch erwähnt werden, dass vereinzelt auch *Myd88*-

defiziente Tiere eine starke Entzündungsreaktion entwickeln können. Insgesamt zeigen die Ergebnisse jedoch, dass bei Myd88-defizienten Mäusen die Fähigkeit zur Ausbildung einer starken Entzündungsantwort nach *H. pylori*-Infektion reduziert ist.

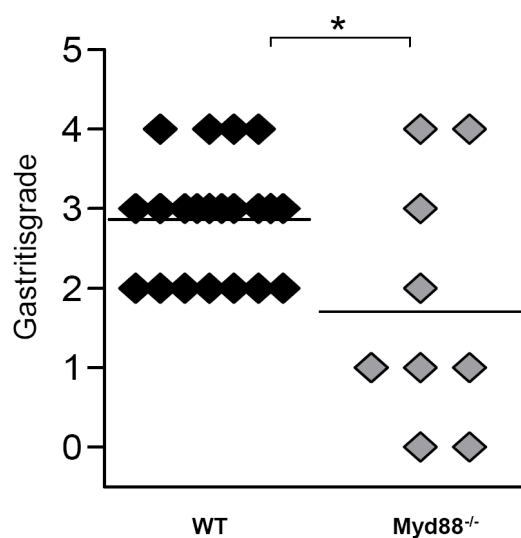


Abbildung 11: Stärke der Gastritis *H. pylori*-infizierter Wildtyp und *Myd88*^{-/-} Mäuse vier Monate nach Infektion: Jede Raute repräsentiert eine Maus. Die WT Tiere sind schwarz, die *Myd88*^{-/-} Mäuse grau dargestellt. Die horizontale Linie zeigt jeweils den Mittelwert. Abgebildet ist eines von drei ähnlichen Experimenten. * $P < 0,05$.

3.4.2. Quantitative Bestimmung der gastralen Zytokinexpression in *H. pylori*-infizierten Wildtyp und *Myd88*-defizienten Mäusen

Frühere Studien zeigten bereits, dass die Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *H. pylori* zu einer T_H1-polarisierten lokalen Immunantwort in der Magenschleimhaut führt (Smythies et al., 2000).

Um zu untersuchen, inwieweit die *Myd88*-Defizienz die gastrale Zytokinantwort beeinflusst, wurde die Zytokinexpression der Mukosa nach Infektion mit *H. pylori* näher untersucht. Vier Monate nach Infektion von WT und *Myd88*^{-/-} Mäusen mit *H. pylori* SS1 wurden die Mägen der infizierten Tiere entnommen und in PBS gewaschen. Ein Teil der Mägen wurde zur Isolation von RNA verwendet. Dazu wurde das Gewebe fein zermörsert und in Trizol-Lösung aufgenommen. Die RNA wurde mittels Phenol/Chloroformextraktion isoliert und später mit Hilfe einer reversen Transkriptase weiter zu cDNA umgeschrieben.

Zur quantitativen Bestimmung der Expression von T_H1-Zytokinen wurde die TaqMan-PCR eingesetzt. Typischerweise werden im Rahmen einer T_H1-Antwort unter anderem die

Zytokine IL-12, INF- γ , TNF- α und IL-6 stark exprimiert. Ein sehr spezifischer Marker von T_H1-Zellen ist die IL-12Rezeptor β 2-Kette (IL-12R β 2). Der IL-12-Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten und wird typischerweise auf T_H1-Zellen exprimiert (Presky et al., 1996). Die β 1-Kette wird auf T_H1- und auf T_H2-Zellen, die β 2-Kette dagegen nur selektiv auf T_H1-Zellen (Rogge et al., 1997; Szabo et al., 1997) exprimiert. Abbildung 12 zeigt die Expression verschiedener Zytokine im Magen infizierter WT und Myd88-defizienter Mäuse. Alle Werte wurden auf β -Aktin normalisiert. Die Balken zeigen jeweils das arithmetische Mittel und SEM eines Experiments mit jeweils zehn Mäusen. Es wird deutlich, dass die Expression von IL-12, INF- γ , TNF- α und IL-6 bei Myd88-defizienten Mäusen im Vergleich zu den WT Kontrollen reduziert ist.

Als Nächstes wurde die Expression von Interleukin-4 bestimmt. IL-4 ist ein wichtiges Zytokin, welches typischerweise bei einer T_H2-Immunantwort ausgeschüttet wird (Swain et al., 1990). Die gastrale IL-4-Expression war sowohl bei Myd88-/- Mäusen als auch bei WT Tieren sehr gering war. Des Weiteren konnte zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied in der IL-4-Expression gesehen werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Myd88-Defizienz bei infizierten Mäusen mit einer reduzierten lokalen T_H1-Antwort assoziiert ist. Die lokale T_H2-Antwort im Magen scheint sehr gering zu sein und ist von der Myd88-Defizienz nicht signifikant betroffen.

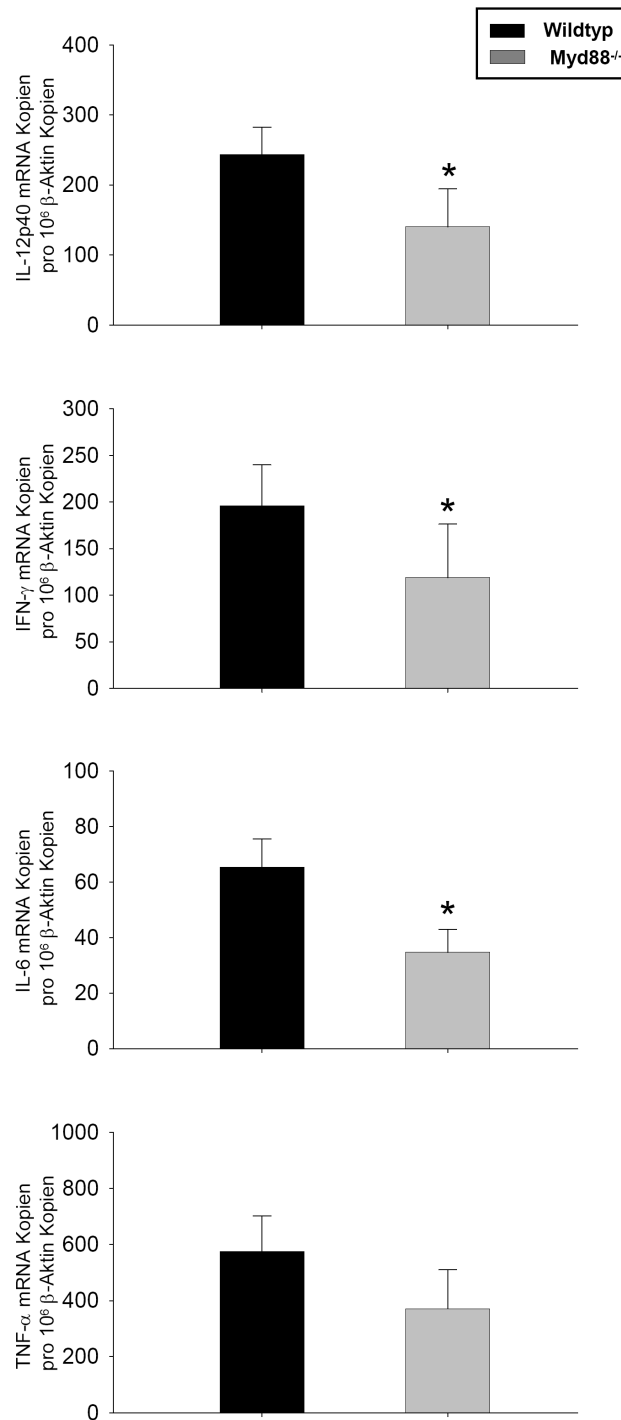


Abbildung 12: Zytokin-Expression infizierter Wildtyp und Myd88^{-/-} Mäuse: Die Expression von IL-12p40, IFN- γ , IL-6 und TNF- α wurde vier Monate nach Infektion mit *H. pylori* SS1 in der Magenmukosa mittels TaqMan RT-PCR analysiert und auf 10⁶ β -Aktin-Kopienzahlen normalisiert.

Die schwarz gefüllten Balken stehen für WT Tiere, die grau gefüllten Balken für Myd88-defiziente Mäuse. Die Balken zeigen das arithmetische Mittel und die Standardabweichung eines Experimentes, in welches 20 WT und 10 Myd88^{-/-} Mäuse einbezogen wurden. Ähnliche Ergebnisse zeigten zwei weitere Experimente. * $p < 0,05$.

3.5. Einfluss des Myd88-abhängigen Signalweges auf die Polarisierung der T_H-Zell-Antwort *in vivo*

Die Aktivierung von T_H1- und T_H2-Antworten geht mit der Produktion bestimmter Klassen von Immunglobulinen einher. So ist z. B. die Expression von IFN- γ mit der Bildung von IgG2a, die von Interleukin-4 mit der Bildung von IgG1 assoziiert (Toellner et al., 1998). Bei C57BL/6 Mäusen liegt eine Deletion des *igg2a*-Gens vor. Diese Mäuse exprimieren den IgG2c (IgG2a^e) Isotyp, dessen Aminosäuresequenz mehr als 80% Übereinstimmung mit IgG2a hat (Martin et al., 1998).

Um den Einfluss des Myd88-abhängigen TLR-Signalweges auf die Entwicklung der adaptiven Immunität bei Mäusen zu untersuchen, wurden *H. pylori*-spezifische IgG2c und IgG1 Antikörper bestimmt. Vier Monate nach der Infektion wurden die Mäuse narkotisiert und bei jedem Tier bis zu 500 μ l Blut aus der Vena subclavia entnommen. Anschließend wurden die Tiere getötet. Das Blut wurde bei 10000 g für zehn Minuten abzentrifugiert und der Überstand (Serum) abpipettiert. Nach Verdünnung des Serums wurde dieses auf NUNG Maxisorb Platten, die zuvor mit *H. pylori* Lysat beschichtet wurden, gegeben. Nach zweistündiger Inkubation und einem Waschschrift wurde Streptavidin in die Löcher pipettiert. Eine Farbreaktion wurde nach erneutem Waschen durch Zugabe von Chromogen erzielt. Nach 20 Minuten wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 1 N Schwefelsäure gestoppt. Die *H. pylori*-spezifische Menge an IgG1 und IgG2c wurde mit dem Plate Reader bei 450 nm gemessen.

Abbildung 13 zeigt, dass es bei Myd88-defizienten Mäusen, verglichen mit den WT Tieren, zu einer geringeren Bildung von *H. pylori*-spezifischen IgG2c-Antikörpern kommt ($p < 0,001$). Der Unterschied der Titer-Menge im Serum der verschiedenen Mausstämmen ist signifikant. Im Gegensatz dazu sind die Unterschiede zwischen den *H. pylori*-spezifischen IgG1 Titern bei Myd88^{-/-} und WT Mäusen nicht signifikant unterschiedlich. Die verminderte IgG2c-Antwort bei Myd88^{-/-} Mäusen zeigt also, dass hier im Vergleich zu den WT Mäusen eine geringere T_H1-Immunantwort stattfindet.

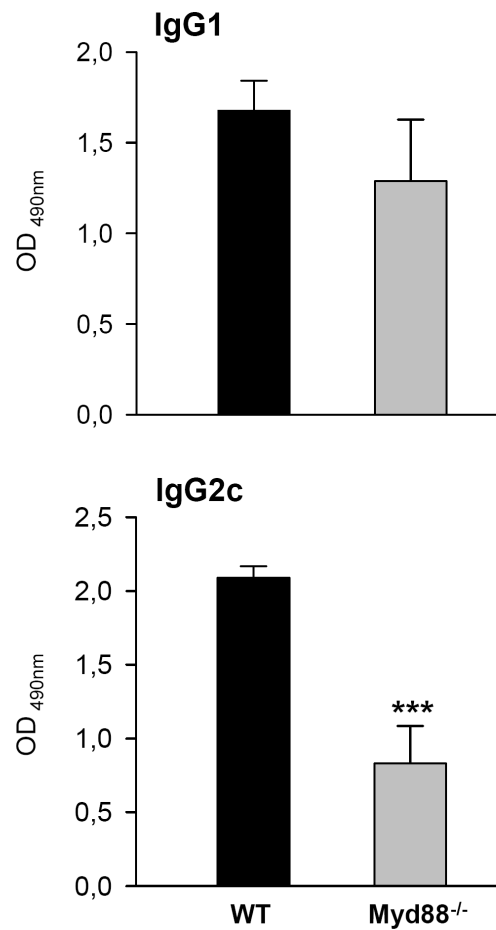


Abbildung 13: *H. pylori*-spezifische IgG2c und IgG1 Titer im Serum infizierter Wildtyp und Myd88^{-/-} Mäuse: Es wurde die Menge der *H. pylori*-spezifischen Immunglobulin-Titer IgG1 und IgG2c, 1:1000 verdünnt, im Serum *H. pylori* SS1-infizierter WT Mäuse (schwarze Balken) und Myd88^{-/-} Mäuse (graue Balken) vier Monate nach der Infektion mittels ELISA gemessen. WT: n = 20; Myd^{-/-}: n = 10. Ähnliche Ergebnisse wurden in zwei weiteren Infektions-Experimenten gefunden (n = 4-10 Mäuse pro Gruppe jedes Experimentes). Der P-Wert wurde mittels eines Mann-Whitney-U-Tests errechnet. ***P<0,001.

Abbildung 14 zeigt das Verhältnis von IgG2c zu IgG1 bei den jeweiligen Mausstämmen. Es wird deutlich, dass bei Myd88^{-/-} Mäusen das Gewicht auf der Seite der T_H2-Antwort liegt. Bei Myd88-defizienten Mäusen fällt der Quotient aus T_H1/T_H2 signifikant (p<0,001) geringer aus als bei den Kontrollen.

Dieser Versuch zeigt, dass die beiden Richtungen der adaptiven Immunität unterschiedlich reguliert werden. Die Signalweiterleitung führt bei Myd88-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Tieren zu einer geringeren T_H1-Antwort, während die T_H2-Antwort nicht

beeinflusst wird. Myd88 spielt also *in vivo* eine große Rolle in der Kontrolle der adaptiven Immunität.

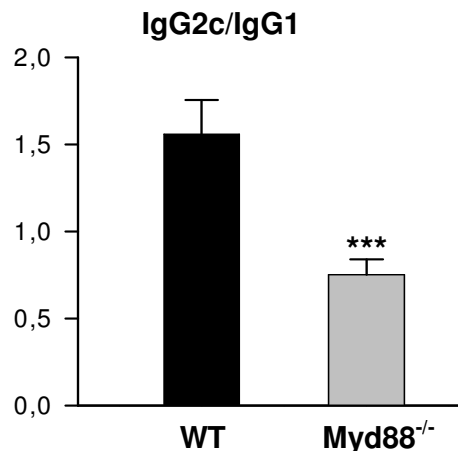


Abbildung 14: Verhältnis IgG2c zu IgG1 im Serum mit *H. pylori* infizierter Wildtyp und Myd88^{-/-} Mäuse: Der Unterschied des Verhältnisses von IgG2c zu IgG1 bei WT (schwarzer Balken) und Myd88^{-/-} (grauer Balken) war signifikant. ***P<0,001.

3.6. Einfluss der Myd88-Defizienz auf die Dichte der *H. pylori*-Kolonisation im Magen

In vorangegangenen Immunisierungsstudien wurde bereits gezeigt, dass die Elimination von *H. pylori* durch eine Aktivierung der T_H1-Immunantwort vermittelt wird (Akhiani et al., 2002).

Um den Einfluss der verminderten T_H1-Antwort in Myd88^{-/-} Mäusen auf das Überleben der Bakterien zu untersuchen, wurde die Kolonisationsdichte in infizierten Mäusemägen durch Quantifizierung der bakteriellen ureB DNA bestimmt. Hierzu wurde aus den Mägen von infizierten WT und Myd88^{-/-} Mäusen DNA mit Hilfe des DNeasy-Kits isoliert und anschließend eine RT-PCR durchgeführt. Die ermittelten Werte wurden auf die Kopienzahl von β -Aktin DNA normalisiert.

Abbildung 15 zeigt das Ergebnis: Die *H. pylori* ureB DNA-Menge ist in Myd88-defizienten Mäusen im Vergleich zu infizierten WT Mäusen deutlich erhöht.

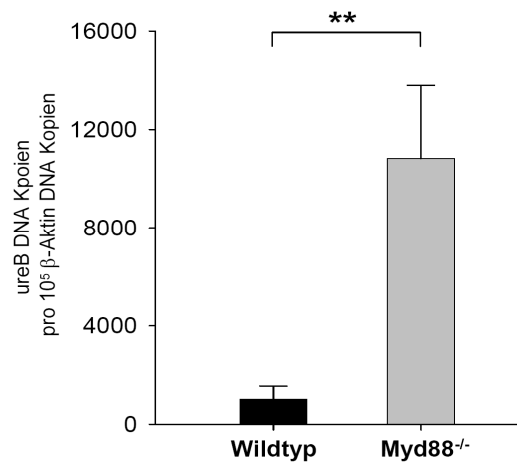


Abbildung 15: Quantitative Bestimmung der *H. pylori*-Kolonisation des Magens infizierter Wildtyp und Myd88^{-/-} Mäuse: *ureB* DNA Quantifizierung in Mägen *H. pylori*-infizierter Mäuse (Infektionsdauer vier Monate) mittels TaqMan PCR und Normalisierung der Ergebnisse auf 10⁵ β-Aktin DNA Kopienzahlen. Der P-Wert wurde mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Gezeigt wird eines von drei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen. **P<0,01.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde eine quantitative *H. pylori*-Kultur aus den Mägen infizierter Mäuse angelegt. Hierzu wurde nach Entnahme und Spülung der Mägen in PBS ein Stück des Magengewebes in 500 µl BHI aufgenommen, gut geschüttelt und anschließend je 100 µl in verschiedenen Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000) auf speziellen Agar-Platten ausgestrichen (siehe Material und Methoden). Nach fünf Tagen wurden die *H. pylori*-Kolonien ausgezählt und deren Anzahl auf das entnommene Magengewebe normalisiert.

Die Abbildung 16 zeigt, dass die Anzahl der CFUs (colony forming units) bei infizierten Myd88-defizienten Mäusen deutlich höher war als bei den WT Kontrollen.

Myd88-Defizienz ist also mit einer größeren Bakterienlast assoziiert. Dies deutet darauf hin, dass die reduzierte T_H1-Antwort in Myd88^{-/-} Mäusen ein besseres Überleben von *H. pylori* ermöglicht.

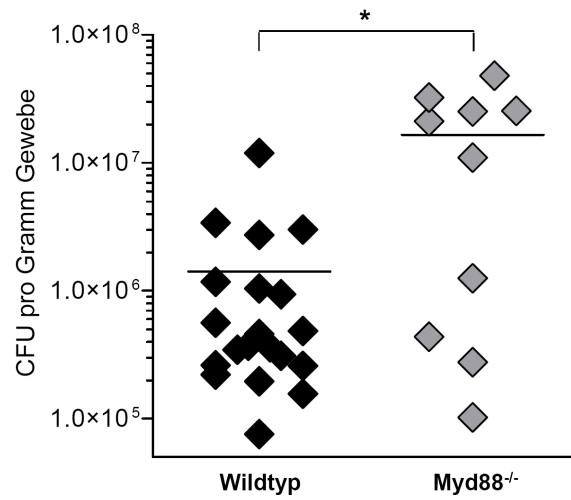


Abbildung 16: Quantitative Kultur zur Bestimmung der bakteriellen Kolonisation des Magens infizierter Wildtyp und Myd88^{-/-} Mäuse: Bestimmung der Kolonienzahl vier Monate nach Infektion der Tiere mittels quantitativer Kultur. Die Werte der Abbildung sind dargestellt als Colony Forming Units (CFUs) pro Gramm Magengewebe. Jede Raute repräsentiert ein Tier (schwarz = WT; grau = Myd88^{-/-}). Die horizontalen Linien zeigen die Mittelwerte. Der P-Wert wurde mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Gezeigt wird eines von drei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen. *P<0,05.

4. Diskussion

Bereits 1863 erkannte Rudolf Virchow, dass die Entstehung verschiedener Tumore mit Inflammation assoziiert ist (Balkwill and Mantovani, 2001).

Heute weiß man, dass eine Reihe von chronischen Infektionen die Karzinogenese in verschiedenen Organen fördern können. Das bekannteste Beispiel ist die *H. pylori*-Infektion. Die durch *H. pylori* induzierte gastrale Inflammation ist von entscheidender Bedeutung für die Karzinogenese im Magen (Nomura et al., 1991; Talley et al., 1991; Fox and Wang, 2007; Correa and Houghton, 2007). Weitere Beispiele chronischer Infektionen, die die Entstehung eines Karzinoms fördern können, sind die chronische Infektion mit humanen Papillomaviren, die als Auslöser für das Zervixkarzinom gilt, die chronische Hepatitis B/C, die mit dem hepatozellulären Karzinom assoziiert ist, oder die chronische Schistosomen-Infektion, die zum Blasenkarzinom führen kann.

Die zentrale Rolle der Inflammation bei der durch *H. pylori* induzierten Karzinogenese zeigen Arbeiten in T-Zell-defizienten Mäusen. Diese Tiere entwickeln im Gegensatz zu WT Kontrolltieren bei Infektion mit *H. pylori* keine gastrale Inflammation und keine präkanzerösen Läsionen (intestinale Metaplasie und Atrophie) im Magen (Roth et al., 1999). Dies zeigt, dass die T-Zell-Antwort des Wirtes in entscheidender Weise zur Entstehung Infekt-assoziiertes gastraler Pathologie beiträgt. Zusätzlich zu den *Helicobacter*-spezifischen Virulenzfaktoren spielt also die Immunantwort des Wirtes eine wichtige Rolle bei der Entstehung *Helicobacter*-assoziiertes Erkrankungen.

Das Immunsystem höherer Organismen setzt sich aus zwei entwicklungsgeschichtlich verschiedenen, aber eng miteinander interagierenden Teilen zusammen. Das angeborene Immunsystem ist phylogenetisch älter und zeichnet sich durch eine kurze Reaktionszeit aus. Das spezifische Immunsystem dagegen, welches nur in Vertebraten vorkommt, entwickelte sich erst später in der Evolution. Das spezifische Immunsystem hat eine relativ lange Reaktionszeit (mehrere Tage) und wird über Signale der adaptiven Immunität aktiviert. Es zeichnet sich durch eine extrem hohe Spezifität aus und besitzt ein riesiges Repertoire an Erkennungsmustern. Die dendritischen Zellen sind das entscheidende Bindeglied zwischen unspezifischer und spezifischer Immunität (Kapsenberg, 2003). DCs verarbeiten die Informationen der unspezifischen Immunität und übermitteln sie weiter an Lymphozyten.

Die an der Erkennung von *H. pylori* beteiligten Rezeptoren und die Mechanismen der Aktivierung innater Immunität wurden bisher vor allem auf der Ebene von Epithelzellen untersucht. Vor allem die *cag*PAI-abhängige Aktivierung proinflammatorischer Signalwege in der Epithelzelle wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen analysiert. Der Mechanismus der *H. pylori*-Erkennung durch DCs und die Interaktion zwischen DCs und *H. pylori* ist dagegen noch kaum verstanden. So sind die für die Erkennung des Keimes verantwortlichen Moleküle der DCs weitgehend unbekannt. Dasselbe gilt für die transkriptionelle Antwort von DCs, die

zellulären Prozesse, die zur Aktivierung von DCs führen, sowie für den Einfluss aktivierter DCs auf die adaptive Immunität.

Antworten auf die offenen Fragen zu finden, war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Zunächst wurde die Interaktion von *H. pylori* mit DCs detailliert untersucht. Dazu gehörten Analysen zur Adhärenz von *H. pylori* an die DC, die Aufnahme des Bakteriums in die DC, die Induktion der Antigenpräsentation sowie die Zytokinsekretion der DC.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass entscheidende Mechanismen der *H. pylori*-induzierten DC-Aktivierung durch Toll-like Rezeptoren gesteuert werden. Es stellte sich heraus, dass TLRs z.B. von zentraler Bedeutung bei der Induktion proinflammatorischer Signaltransduktion in DCs sind. Darüber hinaus konnte ein TLR-unabhängiger Mechanismus der Typ I Interferon-Induktion aufgedeckt werden.

Zur Untersuchung der Rolle von Myd88 *in vivo* wurde für diese Arbeit ein murines Infektionsmodell etabliert. Dabei stellte sich heraus, dass TLR-abhängige Erkennung von *H. pylori* die adaptive Immunität beeinflusst.

Die Ergebnisse werden nachfolgend im Einzelnen diskutiert.

4.1. Interaktion von *H. pylori* mit murinen DCs

Zunächst wurde die Adhärenz von *H. pylori* an murine BMDCs nach Inkubation der Zellen mit GFP-exprimierenden *H. pylori* mittels Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Die Ergebnisse zeigten zum ersten Mal, dass *H. pylori* an murine BMDCs adhären kann und selbst nach exzessivem Waschen nicht von der Zelle gelöst wird. Zudem beweisen konfokalmikroskopische Aufnahmen, dass DCs die Fähigkeit besitzen, *H. pylori* in die Zelle aufzunehmen. FACS-Analysen stimulierter DCs zeigten die Induktion der Expression von MHC-II und von kostimulatorischen Molekülen auf BMDCs. Außerdem konnte nach Stimulation mit *H. pylori* die Sekretion von IL-12p70 und IL-10 gezeigt werden.

Diese drei Signale – Antigenpräsentation, Kostimulation und Zytokinsekretion – sind essentielle Voraussetzungen für die Aktivierung von T-Zellen und die Einleitung adaptiver Immunität. *H. pylori* wird also durch murine BMDCs erkannt, gebunden und aufgenommen. Dies führt zur Reifung der DCs und zur anschließenden T-Zell-Aktivierung.

4.2. Die Erkennung von *H. pylori* mittels Toll-like Rezeptoren ist entscheidend für die Aktivierung von BMDCs

In verschiedenen Stimulationsexperimenten mit BMDCs wurde analysiert, ob Signale der TLRs die Aktivierung von DCs nach Infektion mit *H. pylori* induzieren. Hierzu wurden DCs aus Myd88^{-/-}, WT, IL1R^{-/-} und IL18^{-/-} Mäusen isoliert. Wie beim TLR-Signalweg ist Myd88 auch bei der intrazellulären Signaltransduktion von IL-1 und IL-18 von entscheidender Bedeutung. Um TLR-Effekte gegenüber Effekten, die IL-1- bzw. IL-18-vermittelt sind, abgrenzen zu können, dienten BMDCs von IL-1R^{-/-} und IL-18^{-/-} Tieren als Kontrolle. Sowohl WT DCs wie auch DCs von IL-1R^{-/-} oder IL18^{-/-} Mäusen reagierten auf Stimulation durch *H. pylori* mit der Expression zahlreicher proinflammatorischer Zytokine (wie z.B. IL-12p40, IL-12p35, IL-6 und TNF- α) und einer deutlich verstärkten Expression von MHC-II sowie kostimulatorischer Moleküle (z.B. CD80 und CD86).

Die Stimulation von Myd88^{-/-} DCs mit *H. pylori* führte dagegen nur zu einer sehr schwachen Induktion der Zytokinexpression. Zusätzlich fand sich hier eine eingeschränkte Induktion der Expression von MHC-II-Molekülen sowie von kostimulatorischen Molekülen.

Eine TLR-vermittelte Erkennung von *H. pylori* ist also von entscheidender Bedeutung für die Aktivierung von DCs durch den Keim.

Bei der Untersuchung der durch *H. pylori* induzierten MHC-II/CD80/CD86 Expression fiel auf, dass die Ergebnisse abhängig davon waren, ob lebende Keime oder Bakterienlysate zur Stimulation eingesetzt worden waren.

Während *H. pylori* Lysat zur Hochregulation von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen in WT DCs führte, konnte bei Stimulation von Myd88^{-/-} DCs mit *H. pylori* Lysat keine Induktion der MHC-II-Expression festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu induzierten lebende *H. pylori* in WT wie auch in Myd88^{-/-} DCs die MHC-II-Expression, wenn auch dieser Effekt in WT DCs sehr viel stärker ausgeprägt war als in Myd88^{-/-} DCs. Über die Ursachen dieser Unterschiede zwischen intakten und lysierten Bakterien kann nur spekuliert werden. Möglich ist, dass die Internalisierung von ganzen Bakterien effizienter ist. Vorstellbar ist auch, dass beim Internalisierungsprozess ganzer Bakterien (im Vergleich zu Lysat) die Zugänglichkeit zu unterschiedlichen TLRs oder Non-TLRs verschieden ist.

4.3. Genexpressionsanalysen unterstreichen die zentrale Bedeutung des Myd88-abhängigen Signalweges bei der Induktion proinflammatorischer Prozesse in DCs durch *H. pylori* und decken einen Myd88-unabhängigen Mechanismus der Typ I Interferon-Induktion auf

Um eine umfassende Übersicht über die Regulierung immunologisch relevanter Gene bei Stimulation mit *H. pylori* zu erhalten, wurden Microarray-Analysen durchgeführt. Hierbei wurde die Genexpression von WT und Myd88^{-/-} DCs vor und nach Stimulation mit dem Keim untersucht und miteinander verglichen. Die *H. pylori*-spezifische Genexpression dendritischer Zellen zeigte eine beachtliche Dimension und Komplexität der Interaktion von Keim und DCs. Außerdem unterstreichen die Ergebnisse die wichtige Rolle der TLRs für die Aktivierung von DCs.

Das basale Transkriptom unstimulierter WT und Myd88^{-/-} DCs ist erstaunlich ähnlich. Beim Vergleich der basalen Genexpression von WT und Myd88^{-/-} DCs fanden sich nur drei Gene, die sich in ihrer Expression unterschieden.

Auf die Stimulation mit *H. pylori* reagierten WT und Myd88-defiziente DCs jedoch sehr unterschiedlich. Nach der Stimulation von WT DCs mit dem Keim kam es zu einer signifikanten Regulation (Induktion oder Hemmung der Expression) von 1546 Genen, darunter eine Vielzahl von Genen, die bei der Regulation der Immunantwort, der Zelldifferenzierung, des zellulären Überlebens und der Zellstruktur verantwortlich sind. Die Stimulation von Myd88^{-/-} DCs führte zu einer deutlich geringeren Zahl an signifikant regulierten Genen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die mehr als dreifach regulierten Gene stimulierter WT und Myd88^{-/-} DCs (178 Gene) näher analysiert und klassifiziert. Von diesen Genen wurden 70,8% nur in WT DCs, 27% in WT und Myd88^{-/-} DCs und 2,2% nur in Myd88-defizienten DCs verstärkt exprimiert.

Stimulierte WT DCs zeigten eine starke Induktion einer Vielzahl von Zytokinen sowie weiterer Gene, die eine inflammatorische Antwort vermitteln. Hochreguliert wurden dabei unter anderem Zytokin- und Chemokingene, Gene, die an der Antigenaufnahme und -prozessierung beteiligt sind, Gene, die eine Interaktion von DCs mit T-Zellen vermitteln und Gene, die für die Differenzierung und Reifung von DCs verantwortlich sind.

Obwohl diese Gene in WT DCs sehr stark reguliert werden, werden sie in stimulierten Myd88^{-/-} DCs nicht bzw. nur schwach exprimiert. Der größte Unterschied der Genexpression zwischen WT und Myd88^{-/-} DCs wurde bei Genen gefunden, die für die Immunantwort verantwortlich sind, wie z.B. Zytokingene (wie IL-6 oder IL12-p40) oder Gene, die für wichtige Komponenten der DC/T-Zell-Interaktion (CD40 oder CD70) kodieren. Diese

Ergebnisse zeigen die Schlüsselrolle der Myd88-abhängigen Signalwege für die Aktivierung der Immunantwort durch DCs nach der Stimulation mit *H. pylori*.

Etwa 30% der durch *H. pylori* regulierten Gene in DCs werden Myd88-unabhängig induziert (Induktion sowohl in WT wie auch in Myd88^{-/-} DC). Erstaunlicherweise fallen alle Typ I Interferon-induzierten Gene in diese Gruppe. Dies beweist, dass die Typ I Interferonantwort auf *H. pylori* durch einen Myd88-unabhängigen Weg aktiviert werden kann. Zwei Mechanismen zur Myd88-unabhängigen IFN-Aktivierung kommen in Betracht: Eine Möglichkeit ist die Aktivierung der TRIF-Signalkaskade von TLR3 und TLR4, die andere ist ein TLR-unabhängiger Weg. Virale dsRNA kann z.B. über RIG-I (retinoic-acid-inducible protein I) und MDA-5 (melanoma differentiation associated gene 5) die IFN-Aktivierung TLR-unabhängig induzieren (Akira et al., 2006). Interferone sind Zytokine, die eine entscheidende Rolle bei der Einleitung einer Immunantwort vor allem gegen Viren und intrazelluläre Bakterien spielen.

Bereits vor etwa einem halben Jahrhundert wurde Interferon entdeckt. Zunächst wurde angenommen, dass IFNs nur durch Viren induziert werden (ISAACS and LINDENMANN, 1957) und die virale Replikation und Ausbreitung hemmen. Die Effekte der Typ I IFNs auf die Replikation nicht-viraler Pathogene wurden erstmals in den 1960er Jahren für *Chlamydia psittaci* beschrieben (Sueltenfuss and Pollard, 1963). Seither wurde die Induktion zur Bildung von IFNs durch verschiedene Bakterien (z.B. *Chlamydia* spp, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia* spp. oder *Listeria monocytogenes*) nachgewiesen.

Es gibt zwei verschiedene Typen von Interferonen: Typ I IFNs (z.B. IFN- α und IFN- β) und Typ II IFN (IFN- γ). Die Typ I Interferone haben verschiedene Effekte auf die antibakterielle Immunität. Einen direkten Einfluss nehmen sie unter anderem auf die Reifung und Aktivierung von DCs. Auf diese Weise beeinflussen sie die Antigenpräsentation, die T-Zell-Aktivierung bzw. -Differenzierung zu T_H1-Zellen und die Entwicklung der adaptiven Immunität. Zusätzlich können Typ I Interferone T_H1-Zellen und NK-Zellen direkt zur Ausschüttung von IFN- γ stimulieren (Decker et al., 2005). Dies führt wiederum zur Aktivierung von Makrophagen. IFN- α aktiviert zusätzlich die T-bet Expression naiver humaner T-Zellen, was zur Hochregulation von IL-12R β 2 führt (Hibbert et al., 2003). Es wird davon ausgegangen, dass über IL-12R β 2 die IL-12-gesteuerte T_H1-Differenzierung begünstigt wird. IFN- α/β zusammen mit IL-6 fördern außerdem die Differenzierung aktivierter B-Lymphozyten zu Immunglobulin (Ig)-sezernierenden Plasmazellen und aktivieren Makrophagen.

Interessanterweise wurden bei den Genexpressionsanalysen der stimulierten DCs nur vier Gene identifiziert, die ausschließlich von Myd88^{-/-} DCs exprimiert wurden. Hierzu gehört der Transkriptionsfaktor c-Fos, der die IL-12-Expression negativ reguliert.

Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten bereits die Interaktion von *H. pylori* mit dem Wirt anhand von Genexpression in Microarrays (Guillemin et al., 2002; Maeda et al., 2001b; Huff et al., 2004; Wen et al., 2004). Versuche hierzu wurden bisher jedoch nicht mit DCs, sondern nur mit Magenbiopsien oder mit stimulierten Epithelzellen bzw. Makrophagen durchgeführt. Die Epithelzell-Antwort auf *H. pylori* unterscheidet sich jedoch von der DC-Antwort deutlich. Analysiert wurde bereits in verschiedenen Studien das gastrale Transkriptom von Menschen bzw. Rhesus-Affen bei Infektion mit *H. pylori* (Huff et al., 2004; Wen et al., 2004). Die Ergebnisse zeigen, dass in infizierten Magenbiopsien signifikante Veränderungen der Genexpression auftreten. Diese veränderte Expression betrifft vor allem Gene, die eine Rolle bei der inflammatorischen Antwort und der Immunität spielen, wie z.B. die für Zytokine oder Chemokine, Zellwachstum oder Zelldifferenzierung sowie für Transkriptionsfaktoren kodierenden Gene. Vergleicht man die Expression der Gene von Magenproben mit der Genexpression von Epithelzell-Linien, welche *in vitro* mit *H. pylori* stimuliert wurden, fällt die Expression proinflammatorischer Gene in den Magenproben deutlich stärker aus (Guillemin et al., 2002; Maeda et al., 2001b). Die Veränderungen bei der Genexpression stimulierter Epithelzellen werden vor allem über das Typ IV Sekretionssystem vermittelt. Über T4SS werden bakterielle Makromoleküle, wie z.B. CagA oder Peptidoglykan, in die eukaryotische Zelle injiziert, wodurch intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus der Epithelzelle induziert wird.

Im Gegensatz hierzu scheint die Expression proinflammatorischer Gene bei dendritischen Zellen nicht besonders vom T4SS beeinflusst zu werden. Unveröffentlichte Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass *H. pylori*-Stämme, bei denen das T4SS ausgeknockt wurde, DCs in ähnlicher Weise aktivieren wie die korrespondierenden WT *H. pylori*-Stämme. Im Gegensatz zur Epithelzelle ist also die Expression proinflammatorischer Gene in DCs unabhängig vom T4SS. Die Aktivierung von DCs wird dagegen zu einem beachtlichen Teil über Myd88-abhängige Signalwege eingeleitet.

4.4. Einfluss der Myd88-Defizienz auf die gastrale Entzündungsantwort während der *H. pylori*-Infektion

Zur Analyse der gastralen Entzündungsantwort in WT und Myd88^{-/-} Mäusen während der *H. pylori*-Infektion wurde ein Infektionsmodell etabliert. Vier Monate nach *H. pylori*-Infektion wiesen Myd88-defiziente Mäuse histologisch eine geringere gastrale Inflammation auf als WT Tiere. Die Analyse der Expression proinflammatorischer Zytokine, wie IL-12, IL-6 oder TNF- α , in Magenbiopsien infizierter Tiere zeigt, dass die Sekretion dieser Zytokine bei

Myd88^{-/-} Mäusen im Vergleich zu der Zytokinsekretion der WT Kontrollen deutlich geringer ausfällt. Bei einem Teil der Myd88^{-/-} Mäuse konnte allerdings eine schwere gastrale Entzündung nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass bei Myd88-Defizienz die Möglichkeit zur Entstehung einer starken Entzündungsantwort *in vivo* nicht ausgeschlossen ist. Weiterhin wurde in den Tierversuchen deutlich, dass die Myd88-Defizienz mit einer größeren Bakterienlast assoziiert ist.

4.5. Der Myd88-abhängige Signalweg beeinflusst den Phänotyp der T_H-Polarisierung

Neben der Einleitung einer unspezifischen Entzündungsantwort sind DCs an der Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen beteiligt (Kapsenberg, 2003). Die Differenzierung naiver T-Zellen wird durch drei Signale, die von den DCs ausgehen, bestimmt. Das erste stimulierende Signal kommt durch die Bindung der T-Zell-Rezeptoren an den Antigen-MHC-II-Komplex auf der Oberfläche der reifen DCs zustande und bedingt die Antigen-spezifische Antwort. Zur Einleitung der spezifischen Immunität benötigt die T-Zelle als zweites Signal kostimulierende Moleküle (z.B. CD80, CD86). Für die T-Zell-Polarisierung ist als drittes Signal die Expression von Zytokinen (z.B. IL-12) entscheidend. Zur Beurteilung der T-Zell-Antwort auf *H. pylori* wurden die IgG-Spiegel im Serum infizierter Mäuse bestimmt. Die T_H1-Antwort ist mit der Fähigkeit der Induktion eines Immunglobulin-Klassen-Wechsels in Richtung IgG2a bzw. IgG2c assoziiert, während es bei einer T_H2-Antwort zur Bildung des IgG1 Isotyps kommt. Bei infizierten C57Bl/6 WT Mäusen wird eine T_H1-Polarisierung beobachtet (Abbildung 17). In Myd88^{-/-} Mäusen induziert die Infektion mit *H. pylori* dagegen eine deutlich schwächere T_H1-Antwort, stattdessen findet man hier eine Verschiebung der T_H-Zell-Polarisierung in Richtung T_H2.

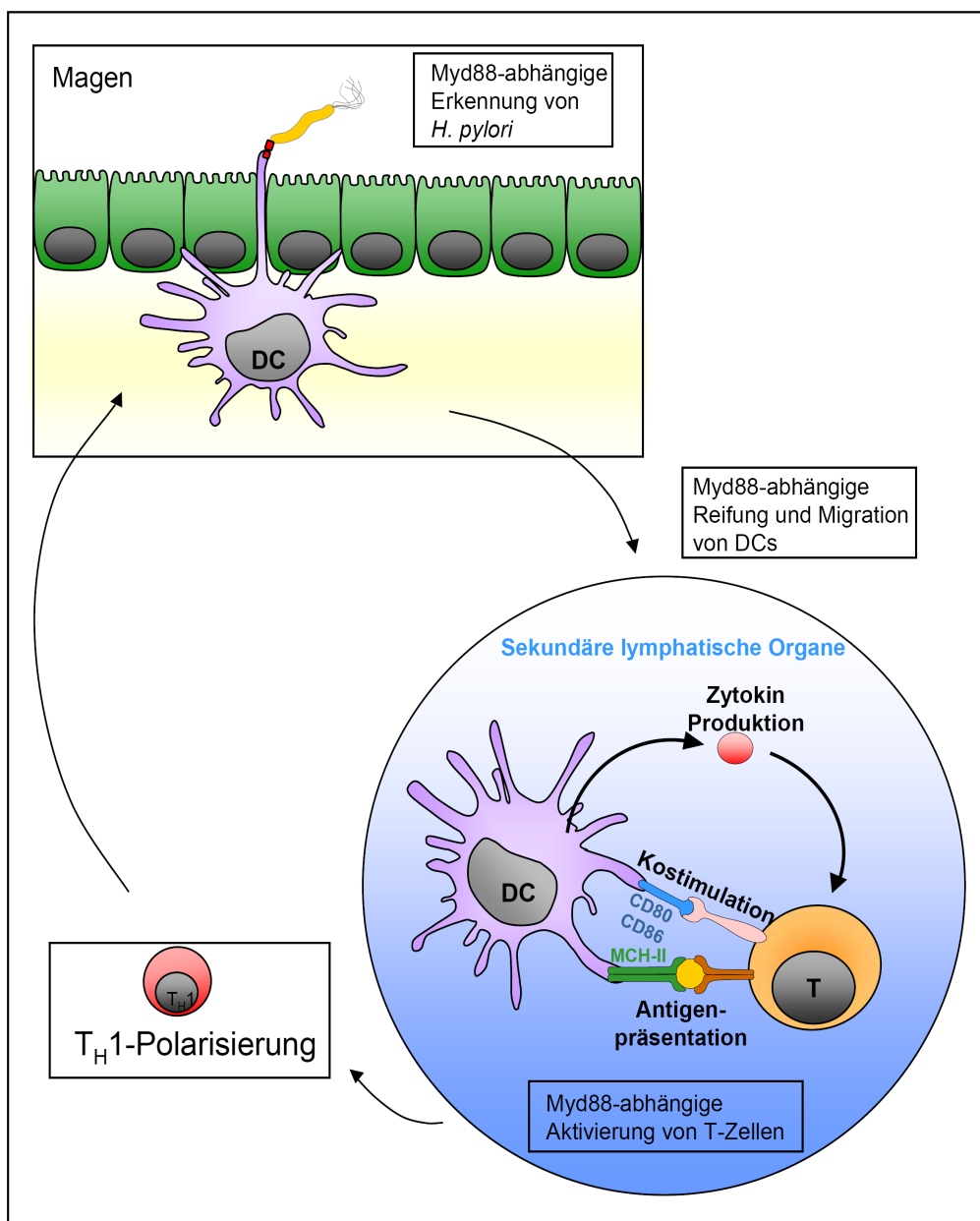


Abbildung 17: Die Rolle von TLRs bei der *H. pylori*-induzierten Immunantwort:

Dendritische Zellen besitzen die Fähigkeit, ihre Zellausläufer zwischen Epithelzellen hindurch in das Lumen des Magens zu strecken. Dort können die DCs über ihre TLRs *H. pylori* erkennen und binden. Nach Kontakt mit dem Keim werden Myd88-abhängige Signalwege aktiviert, welche die Reifung der DCs einleiten. Anschließend wandern die DCs in sekundär lymphatische Organe. Dort aktivieren sie T-Zellen mittels: 1. Antigenpräsentation über MHC-II, 2. Kostimulation mit CD80 und CD86 sowie 3. Zytokin-Produktion. Myd88-abhängige Signale fördern bei der *H. pylori*-Infektion eine Polarisation der T_H1-Zellen in Richtung T_H1. DC: dendritische Zelle; T_H1: T1-Helfer-Zelle.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass ein Teil der *H. pylori*-induzierten TLR-Signale zur Polarisation der spezifischen Immunität in Richtung eines T_H1-Phänotypes beiträgt. Ähnliches wurde bereits bei Infektionen mit *Mykobakterien* und *Toxoplasma gondii* beobachtet (Scanga et al., 2002; Schnare et al., 2001). Auch bei diesen Infektionen beobachtet man eine T_H1-Polarisierung der T-Zell-Antwort in C57Bl/6 WT Mäusen. In Myd88^{-/-} Tieren hingegen ist auch hier die Aktivierung Antigen-spezifischer T_H1-Immunität vermindert.

Sun et al. zeigten außerdem, dass über TLRs aktivierte murine DCs nicht nur positive Signale für die T_H1-Differenzierung aktivieren. Zusätzlich zu den positiven werden auch negative Signale, welche die Entstehung von T_H2-Zellen hemmen, weitergeleitet (Sun et al., 2005).

Die Hemmung der Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 in T-Zellen durch IL-12 (das von DCs freigesetzt wird) ist z.B. ein wesentlicher Faktor, der die T-Zell-Differenzierung zu T_H2-Zellen hemmt. Studien zu *Leishmania major* zeigten, dass die Anwesenheit bzw. das Fehlen von IL-12 die entscheidende Rolle im Differenzierungsprozess zu T_H1/T_H2-Zellen spielt. In WT Mäusen induzierte *Leishmania major* IL-12-abhängig eine T_H1-Antwort, die das Wachstum und die Ausbreitung der Parasiten hemmt. In IL-12^{-/-} Mäusen hingegen induzierte derselbe Parasit eine T_H2-Antwort (Mattner et al., 1996).

Die *in vitro* DCs/*H. pylori*-Kokulturrexperimente der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die IL-12 Sekretion aus Myd88^{-/-} DCs im Vergleich zu WT DCs dramatisch reduziert ist. Diese Beobachtung ist eine mögliche Ursache der reduzierten T_H1-Antwort, die in *H. pylori*-infizierten Myd88-defizienten Mäusen gesehen wird. Ein möglicher Transkriptionsfaktor, welcher die reduzierte IL-12 Sekretion von Myd88-defizienten DCs vermitteln könnte, ist c-Fos. c-Fos ist ein Suppressor der IL-12p70-Produktion in DCs (Agrawal et al., 2003). Interessanterweise ist c-Fos eines der vier Gene, die in der Genexpressionsanalyse ausschließlich in Myd88-defizienten DCs nach Stimulation mit *H. pylori* hochreguliert wurden. Die verstärkte Expression von c-Fos in Myd88-defizienten DCs könnte also die Verschiebung der T-Zell-Antwort in Richtung T_H2 begünstigen.

Ein Zytokin-unabhängiger Weg, über den die T_H-Zell-Differenzierung durch DCs induziert wird, ist der Notch-Signalweg. Zwei Familien der Notch-Liganden steuern hierbei Zellkontakt-abhängig die T-Zell-Differenzierung. Die Liganden Delta, vor allem Delta-4, induzieren eine T_H1-Antwort, während die Jagged-Liganden, besonders Jagged1, die Differenzierung naiver T-Zellen zu T_H2-Zellen induzieren (Amsen et al., 2004). Notch leitet die T_H2-Differenzierung sowohl durch die Induktion von GATA3 als auch durch die direkte Regulation des *IL-4*-Gens ein.

Die Expression von Delta4 und Jagged1 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei stimulierten WT, IL-1R^{-/-}, IL-18^{-/-} und Myd88^{-/-} DCs mittels TaqMan-PCR quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit nicht im Detail dargestellt werden, zeigten die

Induktion der Expression beider Notch-Liganden durch *H. pylori* in WT, IL-1R^{-/-} und IL-18^{-/-} DCs. Im Gegensatz dazu wurde in Myd88^{-/-} DC ausschließlich die Expression des Jagged1-Liganden induziert. Die Aktivierung von Delta4 war also Myd88-abhängig. Die Myd88-abhängige Aktivierung der Expression von Delta4 könnte ein wichtiges Signal für die Polarisierung der T_H1-Antwort bei Infektion mit *H. pylori* sein.

Nicht nur DCs, sondern auch andere APCs, z.B. B-Zellen oder Makrophagen, haben die Fähigkeit, MHC-II-abhängig eine Antigen-spezifische T-Zell-Antwort einzuleiten. Untersuchungen in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Dr. Anne Krug zeigten, dass auch in B-Zellen und Makrophagen eine proinflammatorische Antwort durch *H. pylori* zumindest teilweise über den Myd88-abhängigen Signaltransduktionsweg induziert wird (Rad et al., 2007).

4.6. Die Rolle einzelner TLRs bei der Erkennung von *H. pylori*

Die Rolle von individuellen TLRs bei der Erkennung von *H. pylori* ist zum großen Teil noch unbekannt und wird kontrovers diskutiert. Einige Arbeitsgruppen zeigten, dass *H. pylori* oder auch *H. pylori* LPS durch TLR4 auf Epithelzellen oder auch Makrophagen erkannt wird (Ishihara et al., 2004; Kawahara et al., 2001; Maeda et al., 2001a; Su et al., 2003). Im Gegensatz dazu schließen andere Wissenschaftler die Erkennung von *H. pylori* über epitheliale TLR4 aus (Maeda et al., 2001a; Su et al., 2003; Backhed et al., 2003; Smith, Jr. et al., 2003).

H. pylori LPS setzt sich aus zwei verschiedenen Bestandteilen zusammen: einer prädominanten Tetraazyl-Form und einer Hexaazyl-Form (Moran et al., 1997). Es wurde bereits durch Pulendran et al. gezeigt, dass Endotoxin, das eine tetraazetylierte Lipid A-Struktur aufweist, wie z.B. LPS von *Rhodobacter capsulatus* oder *Porphyromonas gingivalis*, nicht über TLR4 erkannt werden kann (Pulendran et al., 2001). Dies scheint auch auf die Erkennung von *H. pylori* LPS zuzutreffen, und ist ein Grund für die schwache biologische Aktivität von *H. pylori* LPS (Smith, Jr. et al., 2003; Moran et al., 1997; Bliss, Jr. et al., 1998).

Ein möglicher Grund der konträren Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen zu TLR4 im Kontext der *H. pylori*-Infektion könnte darin liegen, dass jeweils unterschiedliche *H. pylori*-Stämme verwendet wurden. Das quantitativ unterschiedliche Vorkommen der zwei Lipid A-Varianten bei verschiedenen *H. pylori*-Stämmen könnte zu einer mehr oder minder starken Aktivierung des TLR4 Signalweges führen.

Für verschiedene Experimente in dieser Arbeit wurde *E. coli* LPS als Positivkontrolle in Stimulationsexperimenten verwendet. LPS von *E. coli* ist ein potenter Aktivator von TLR4. Selbst in Myd88-defizienten Makrophagen wird über den TRIF-Signalweg von TLR4 eine starke Genexpression induziert. Die niedrige biologische Aktivität von *Helicobacter* LPS könnte

erklären, warum in Myd88^{-/-} DCs die Aktivierung proinflammatorischer Prozesse trotz intaktem TRIF-Signalweg so deutlich eingeschränkt ist.

Diskutiert wird auch die Erkennung von *H. pylori* über TLR2 (Smith, Jr. et al., 2003). Smith et al. analysierten die Interaktion von *H. pylori* mit verschiedenen epithelialen TLRs. Sie fanden eine TLR-abhängige Aktivierung von NF- κ B durch die TLR2. Ihren Untersuchungen zufolge wird *H. pylori* LPS über TLR2 und nicht über TLR4 erkannt. Man weiß, dass über TLR2 verschiedene bakterielle Komponenten, wie Peptidoglykan oder Lipopeptide detektiert werden können. Kürzlich wurde auch der Virulenzfaktor HP-NAP (*H. pylori* neutrophil-activating protein) als TLR2-Ligand identifiziert. Mandell et al. zeigten, dass TLR2 bei der Erkennung von *H. pylori* durch Monozyten und Makrophagen eine wichtige Rolle spielt (Mandell et al., 2004). Untersuchungen an TLR2-defizienten Makrophagen zeigten außerdem bei Stimulation mit *H. pylori* eine geringere Induktion von IL-6 und IL-1 β als WT Zellen (Obonyo et al., 2007). Kürzlich beschrieben Alvarez-Arellano et al., dass die Induktion einer frühen inflammatorischen Antwort humaner neutrophiler Granulozyten auf die Stimulation durch *H. pylori* teilweise über die Aktivierung von TLR2 und TLR4 vermittelt werden (Alvarez-Arellano et al., 2007). Neutrophile Granulozyten reagierten auf Stimulation mit *H. pylori* mit einem signifikanten Anstieg der Produktion von IL-8, IL-1 β , IL-10 und TNF- α . Die Zugabe von Antikörpern gegen TLR2 und TLR4 schwächte die *H. pylori*-induzierte Bildung von IL-8 und IL-10 deutlich ab. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der über TLR2 aktivierte Myd88-Signalweg für die *H. pylori*-induzierte proinflammatorische Antwort (IL-6 und IL-1 β) des Wirtes eine wichtige Rolle spielt.

Die Flagelline verschiedener Bakterien-Spezies sind – über die Induktion eines TLR5-abhängigen Signalweges – potente Aktivatoren des humanen innate Immunsystems. Es werden jedoch nicht die Flagellin-Moleküle aller Mikroorganismen über TLR5 erkannt. Anderson-Nissen et al. zeigten vor kurzem, dass Flagellin-Moleküle von ϵ und α Proteobakterien nicht über TLR5 erkannt werden (Anderson-Nissen et al., 2005). *H. pylori* ist ein Beispiel der ϵ Proteobakterien. Diese Keime besitzen spezifische Veränderungen der Aminosäuresequenz in der TLR5-Erkennungssequenz des Flagellins, welche die Erkennung über TLR5 verhindern. Zusätzlich weisen sie kompensatorische Veränderungen in der Aminosäuresequenz der Flagellin-Moleküle auf, welche die Motilität der Keime erhalten. Gewirtz et al. beschrieben zudem eine signifikant schwächere (1000-fach) TLR5-vermittelte Sekretion von IL-8 durch *H. pylori* Flagellin (FlaA) als durch Flagellin von *Salmonella typhimurium*. Weiterhin beobachteten sie, dass die Zerstörung von *H. pylori* FlaA die Motilität des Keimes, nicht jedoch die IL-8 Sekretion beeinflusst (Gewirtz et al., 2004; Lee et al., 2003). *H. pylori* scheint also die Detektion über TLR5 zu umgehen, was zu seiner Persistenz im Magen des Wirtes beitragen könnte.

Schmausser et al. verglichen in einer ihrer Arbeiten die Expression verschiedener TLRs im Magenepithel *H. pylori*-infizierter Patienten mit intestinaler Metaplasie, Dysplasie und Magenkarzinom (Schmausser et al., 2005). Bei Patienten mit intestinaler Metaplasie und Dysplasie wurde dabei die Expression von TLR4 und TLR5 gesehen. In Gewebeproben mit Magenkarzinom wurden TLR4 bei 17 von 22 Patienten verstärkt exprimiert, während TLR5 bei allen 22 Patienten verstärkt war. Im Gegensatz zu TLR4 und TLR5 war TLR9 bei intestinaler Metaplasie und Dysplasie nicht detektierbar. Im Falle eines Magenkarzinoms wurde TLR9 dagegen bei sechs von 22 Patienten exprimiert. Die Studie zeigt, dass die Expression von TLRs den Magenkarzinom-Zellen ermöglicht, mit *H. pylori* zu interagieren. Verschiedene Zellarten nutzen unterschiedliche Mechanismen zur Erkennung von Mikroorganismen. Die Detektion von Bakterien wird über eine Vielzahl von Rezeptoren und Adaptermolekülen gesteuert. Jede Zellart besitzt einen typischen Besatz mit Rezeptoren und Hilfsmolekülen. Die Expression der hierfür kodierenden Gene, die zelluläre Lokalisation der Genprodukte sowie deren intrazelluläre Regulierung beeinflussen den Prozess der Erkennung von Mikroorganismen durch verschiedene Zelltypen.

Die Erkennung von *H. pylori* durch verschiedene TLRs wurde bisher hauptsächlich auf der Ebene der Epithelzellen untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass verschiedene TLRs sowie auch CD14 und MD-2 in Magenkarzinom-Zell-Linien nicht exprimiert werden (Ferrero, 2005). CD14 und MD-2 sind wichtige Kofaktoren bei der TLR4-abhängigen Erkennung von bakteriellem LPS. Darüber hinaus können epitheliale Zellen des Magen-Darm-Traktes nach mikrobieller Exposition ihre TLR-Lokalisation nach basolateral verschieben, um so überschießende Immunreaktionen zu verhindern (Schmausser et al., 2004; Cario et al., 2002). Auf epithelialer Ebene verläuft die Erkennung von *H. pylori* möglicherweise über andere Mechanismen als in DCs. Von allen Zelltypen von Säugetieren besitzen DCs das größte Repertoire an TLRs, über die sie eine Vielzahl an mikrobiellen Strukturen detektieren können. Murine BMDCs exprimieren alle zwölf bisher identifizierten TLRs und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass TLRs die Schlüsselmoleküle bei der Interaktion zwischen *Helicobacter* und DCs spielen.

Kennzeichen der Immunität von Säugetieren sind Veränderungen und Anpassungen des Immunsystems im Laufe der Evolution. Das gleiche Bakterium kann eine Vielzahl von PAMPs besitzen, und die Aktivierung von DCs ist das Ergebnis einer Summe aus verschiedenen Stimuli, die auf die Zelle einwirken. Sehr wahrscheinlich wird die Immunantwort auf *H. pylori*, wie bei auch bei anderen bakteriellen Infektionen, über die Aktivierung verschiedener TLRs induziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von TLR-abhängiger Signalübertragung im Zusammenhang mit der *H. pylori*-Infektion umfassend untersucht. Weitere Projekte zur Aufdeckung beteiligter Komponenten sind noch in Arbeit.

Vor kurzem wurde von Napolitani et al. untersucht, inwieweit verschiedene TLRs synergistisch an der Aktivierung von DCs mitwirken (Napolitani et al., 2005). Dabei wurde deutlich, dass TLR3 und TLR4 humaner und muriner DCs synergistisch mit TLR7, TLR8 und TLR9 die Induktion einer bestimmten Gruppe an Genen bewirken. So wird über diese synergistisch wirkenden TLR eine verstärkte Produktion von IL-12 und IL-23 sowie ein verringertes Verhältnis der Delta4-/Jagged1-Expression erreicht, was zu einer stärkeren Ausprägung der T_H1-Polarisierung der T-Zellen führt. Entsprechend diesen Beobachtungen könnte auch die T_H1-Polarisierung im Zusammenhang mit der *H. pylori*-Infektion das Ergebnis synergistischer Interaktion verschiedener TLRs sein.

Unterschiedliche TLR-Liganden, die von demselben Mikroorganismus stammen, könnten jedoch auch gegensätzliche Effekte auf DCs haben. So ist zum Beispiel gezeigt worden, dass im Gegensatz zu Liganden von TLR4, TLR5 und TLR9, die eine T_H1-Antwort einleiten, Liganden von TLR2 die Produktion von IL-10 induzieren, die Bildung von IL-12 unterdrücken und damit die T_H2-gewichtete Immunantwort fördern (Dillon et al., 2004; Redecke et al., 2004). Es scheint also, dass sich einige Aspekte des Signalweges von TLR2 deutlich von den Signalwegen anderer TLRs unterscheiden; bisher ist dies noch nicht ausreichend untersucht worden. Die Unterschiede in der Signalleitung könnten jedoch erklären, warum bei TLR2-defizienten Mäusen kein Defekt in der Ausbildung der proinflammatorischen Antwort auf die Infektion mit *H. pylori* gefunden wurde (Panthel et al., 2003).

4.7. Ausblick

Neben der Klärung der Frage, welche TLRs an der Erkennung von *H. pylori* beteiligt sind, wird es entscheidend sein zu verstehen, wie DCs Informationen verarbeiten, die sie über TLR und über weitere Pattern Recognition Receptors sowie Chemokin- und Zytokin-Rezeptoren erhalten. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich gezeigt, dass das C-Typ Lecitin DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin) als Antwort auf Lewis x/y, das einige *H. pylori*-Stämme bilden, die IL-10 Produktion durch DCs induzieren und die Ausbildung einer T_H1-Antwort blockieren (Bergman et al., 2004). Mäuse besitzen im Gegensatz zum Menschen kein DC-SIGN Gen. Inzwischen wurden jedoch transgene Mäuse, die humanes DC-SIGN unter Kontrolle des DC-spezifischen CD11c Promotors exprimieren, generiert (T. Sparwasser, noch nicht publiziert). Die DCs dieser Mäuse antworten auf *H. pylori* im Vergleich zu WT DCs mit einer reduzierten IL-12 Sekretion. Dies zeigt, dass die TLR-induzierten molekularen Prozesse durch weitere Signale moduliert werden können (noch nicht publiziert). Dieses Beispiel spiegelt wiederum die bemerkenswerte Komplexität der Interaktion zwischen

H. pylori und seinem Wirt wider, welche sich im Laufe Tausender Jahre von Ko-Evolution entwickelte.

Angesichts der hohen Prävalenz der *H. pylori*-Infektion weltweit, der hohen Kosten einer antibiotischen Behandlung und aufgrund der ansteigenden Resistenzraten wurden bereits beachtliche Bemühungen unternommen, einen Impfstoff gegen *H. pylori* zu entwickeln. Bis heute wurde jedoch noch kein wirksames Vakzin für den Menschen gefunden. Die Entdeckung der Signale, die DCs zu immunstimulatorischen, Antigen-präsentierenden Zellen reifen lassen und damit eine angemessene T-Effektorzell-Antwort auslösen, wird Grundlage für die Entwicklung besserer Impfstrategien sein. In diesem Zusammenhang könnte das Verständnis von TLR-vermittelten Prozessen in DCs eine signifikante Bedeutung für die Herstellung effizienter Impfstoffe haben. Es wurde kürzlich gezeigt, dass verschiedene Arten von TLR-Liganden sehr wirksame Vakzin-Adjuvantien sein können (Ulevitch, 2004). Die Entdeckung der *H. pylori* Bestandteile, die für die TLR-Aktivierung entscheidend sind, könnte eine Chance darstellen, wirksame Adjuvantien für die Herstellung von *H. pylori*-Vakzinen zu entwickeln.

5. Zusammenfassung

Die Entdeckung von *H. pylori* durch Marshall und Warren (Warren and Marshall, 1983) vor über 20 Jahren hat die Gastroenterologie entscheidend beeinflusst. Mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung ist mit diesem Pathogen, das in den meisten Fällen lebenslänglich im Magen der Betroffenen persistiert, infiziert. Die Konsequenz der Infektion ist ein chronischer Entzündungsprozess im Magen, der bei 10-20% der infizierten Personen zur Entstehung gastroduodener Krankheiten führt (Suerbaum and Michetti, 2002). So ist die persistierende Infektion Ursache für Magen- oder Duodenalulzera, Magenkarzinom und MALT-Lymphom (Parsonnet et al., 1997; Uemura et al., 2001; Suerbaum and Michetti, 2002). Zusätzlich werden heute einige extraintestinale Erkrankungen, wie z.B. die Idiopathische Thrombozytopenische Purpura oder die ungeklärte Eisenmangelanämie, mit dem Keim in Verbindung gebracht (Franceschi and Gasbarrini, 2007). Man geht davon aus, dass die durch *H. pylori* induzierte Entzündung und Immunantwort eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese gastrointestinaler Erkrankungen spielen. Die genauen Mechanismen der Erkennung von *H. pylori* durch Zellen des Immunsystems und der Einleitung der Entzündungsantwort werden bisher jedoch nur unzureichend verstanden.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Rolle Toll-like Rezeptoren bei der Erkennung von *H. pylori* durch die dendritische Zelle spielen und inwieweit dies bei der Induktion der Immunantwort *in vivo* von Bedeutung ist. Im ersten Teil der Arbeit wurden molekulare Grundlagen der Interaktion von dendritischen Zellen mit *H. pylori* untersucht. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von DCs, die mit GFP-markierten *H. pylori* inkubiert wurden, konnten die Bindung und Internalisation von *H. pylori* an bzw. in DCs zeigen. Weiter wurde durch Analyse der Expression von MHC-II und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 mittels FACS-Analysen sowie durch Messung der Sekretion von IL-12p40 und IL-10 die Reaktion von DCs auf Stimulation mit *H. pylori* untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass *H. pylori* durch Maus-BMDCs erkannt, gebunden und aufgenommen wird. Die DCs durchlaufen nach Kontakt mit dem Keim einen Reifungsprozess, der sie zur Antigenpräsentation, Kostimulation und Zytokinsekretion befähigt. Diese Signale sind entscheidend für die Aktivierung von T-Zellen und die Induktion adaptiver Immunität.

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit die durch *H. pylori* verursachte Aktivierung der DCs über Signale von Toll-like Rezeptoren vermittelt wird. Zunächst wurde an DCs analysiert, ob der TLR-Signalweg die durch *H. pylori* induzierte Antigenpräsentation und Kostimulation beeinflusst. Hierzu wurden BMDCs aus dem Knochenmark Myd88-defizienter Mäuse generiert. Myd88 ist ein wichtiger Bestandteil des TLR-Signalweges, spielt aber auch bei der intrazellulären Signalweiterleitung des IL-1- und IL-18-Rezeptors eine wichtige Rolle. Um mögliche TLR-vermittelte Effekte von IL-1- und IL-18-Effekten abzugrenzen, dienten in allen Versuchen BMDCs von IL1R^{-/-} und IL18^{-/-} Mäusen als Kontrolle. Es wurde mittels

FACS analysiert, inwieweit *H. pylori* die Hochregulation von MHC-II, CD80 und CD86 auf der Oberfläche von WT, Myd88^{-/-}, IL1R^{-/-} und IL18^{-/-} BMDCs induzieren kann. Es zeigte sich, dass im Kontext der *H. pylori*-Infektion die Fähigkeit der DCs zur Antigenpräsentation und Kostimulation maßgeblich durch Myd88-abhängige Erkennung des Keimes beeinflusst wird. Daneben war auch die Zytokinexpression (IL-12p40, IL-12p35, IL-10, IL-1 β und TNF α) bei *Helicobacter*-stimulierten DCs in starkem Maße Myd88-abhängig, jedoch IL-1- und IL-18-unabhängig. Diese Ergebnisse zeigen, dass wichtige Schritte der durch *H. pylori* induzierten Aktivierung von dendritischen Zellen durch Signale von Toll-like Rezeptoren vermittelt werden.

Um die molekularen Ereignisse der Interaktion zwischen *H. pylori* und dendritischen Zellen näher zu untersuchen, wurden Genexpressionsanalysen an infizierten und nicht-infizierten DCs aus WT und Myd88-defizienten Mäusen durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse macht deutlich, dass die Genexpression bei unstimulierten WT und Myd88^{-/-} Zellen sehr ähnlich ist. Die Analyse stimulierter Zellen zeigt jedoch große Unterschiede in der Expression von Genen. Von allen mehr als dreifach regulierten Genen wurden 70,8% nur in WT DCs, 27% in WT und Myd88^{-/-} DCs und 2,2% ausschließlich in Myd88^{-/-} DCs verstärkt exprimiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Großteil der durch *H. pylori* stimulierten Gene, über einen Myd88-abhängigen Signalweg induziert wird. Etliche dieser Gene sind bei der Regulation der Immunantwort von entscheidender Bedeutung. Es wurden z.B. Gene, die an der Reifung und Differenzierung von DCs sowie an Antigen-Aufnahme und -Präsentation und Effektorzell-Aktivierung beteiligt sind, reguliert. Die Genexpressionsanalysen stimulierter DCs zeigen die Komplexität der Prozesse, die durch *H. pylori* auf molekularer Ebene induziert werden, und beweisen die Schlüsselrolle des Myd88-vermittelten Signalweges bei der Aktivierung von DCs. Zudem wurde durch die Microarray-Analyse eine Gruppe von Genen identifiziert, die durch einen Myd88-unabhängigen Mechanismus bei Stimulation mit *H. pylori* induziert wird. Diese umfasst in erster Linie Typ I Interferon-abhängige Gene.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Bedeutung der TLR-abhängigen Erkennung von *H. pylori* für die Induktion innater und adaptiver Immunität *in vivo* untersucht. Hierzu wurde ein murines *H. pylori*-Infektionsmodell etabliert. Die Infektion von WT und Myd88^{-/-} Mäusen zeigte dabei einen Unterschied in der bakteriellen Kolonisationsdichte und im Ausmaß der Gastritis der infizierten Tiere. Es wurde deutlich, dass die Myd88-Defizienz mit einer geringeren gastralen Inflammation und einer größeren Bakterienlast assoziiert ist. Dies deutet darauf hin, dass die reduzierte Inflammation in Myd88^{-/-} Mäusen ein besseres Überleben von *H. pylori* ermöglicht.

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit Myd88-Defizienz die gastrale Entzündungsantwort beeinflusst. Die Analyse der gastralen Expression ausgewählter Zytokine zeigt, dass die

Myd88-Defizienz bei infizierten Mäusen mit einer reduzierten lokalen T_H1 -Antwort assoziiert ist.

Da die Aktivierung von T_H1 - und T_H2 -Antworten gleichzeitig mit der Produktion bestimmter Klassen von Immunglobulinen einhergeht, wurde weiterhin untersucht, welche *H. pylori*-spezifischen Immunglobuline bei der Infektion gebildet werden. Hierzu wurden im Serum infizierter Mäuse die Antikörper-Titer von *Helicobacter*-spezifischen IgG1 und IgG2c mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich, dass Myd88-defiziente Mäuse ein niedrigeres IgG2c/IgG1-Verhältnis haben als WT Mäuse. Myd88-abhängige Signale scheinen also die T_H -Zell-Polarisierung in Richtung T_H1 -Antwort zu steuern.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass TLRs bei der Erkennung von *H. pylori* durch DCs und der nachfolgenden Aktivierung von DCs eine entscheidende Rolle spielen. Die Experimente im Mausmodell beweisen, dass diese TLR-abhängigen Prozesse die Stärke und den Phänotyp der adaptiven Immunantwort gegen das Bakterium beeinflussen.

Literaturverzeichnis

- Aderem, A. and Ulevitch, R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* *406*, 782-787.
- Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Van, D.T., and Pulendran, B. (2003). Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J. Immunol.* *171*, 4984-4989.
- Akhiani, A.A., Pappo, J., Kabok, Z., Schon, K., Gao, W., Franzen, L.E., and Lycke, N. (2002). Protection against *Helicobacter pylori* infection following immunization is IL-12-dependent and mediated by Th1 cells. *J. Immunol.* *169*, 6977-6984.
- Akira, S. and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 499-511.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* *124*, 783-801.
- Algood, H.M. and Cover, T.L. (2006). *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* *19*, 597-613.
- Alvarez-Arellano, L., Camorlinga-Ponce, M., Maldonado-Bernal, C., and Torres, J. (2007). Activation of human neutrophils with *Helicobacter pylori* and the role of Toll-like receptors 2 and 4 in the response. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *51*, 473-479.
- Amedei, A., Bergman, M.P., Appelmek, B.J., Azzurri, A., Benaglio, M., Tamburini, C., van der, Z.R., Telford, J.L., Vandenbroucke-Grauls, C.M., D'Elia, M.M., and Del, P.G. (2003). Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* antigens and H+, K+ -- adenosine triphosphatase in human gastric autoimmunity. *J. Exp. Med.* *198*, 1147-1156.
- Amsen, D., Blander, J.M., Lee, G.R., Tanigaki, K., Honjo, T., and Flavell, R.A. (2004). Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* *117*, 515-526.
- Andersen-Nissen, E., Smith, K.D., Strobe, K.L., Barrett, S.L., Cookson, B.T., Logan, S.M., and Aderem, A. (2005). Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 9247-9252.
- Anderson, K.V., Bokla, L., and Nusslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* *42*, 791-798.

Ardavin,C., Martinez del,H.G., Martin,P., Anjuere,F., Arias,C.F., Marin,A.R., Ruiz,S., Parrillas,V., and Hernandez,H. (2001). Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol.* 22, 691-700.

Atherton,J.C., Peek,R.M., Jr., Tham,K.T., Cover,T.L., and Blaser,M.J. (1997). Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 112, 92-99.

Backert,S., Kwok,T., and Konig,W. (2005). Conjugative plasmid DNA transfer in *Helicobacter pylori* mediated by chromosomally encoded relaxase and TraG-like proteins. *Microbiology* 151, 3493-3503.

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

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

Bajtay,Z., Csomor,E., Sandor,N., and Erdei,A. (2006). Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells. *Immunol. Lett.* 104, 46-52.

Bakri,Y., Sarrazin,S., Mayer,U.P., Tillmanns,S., Nerlov,C., Boned,A., and Sieweke,M.H. (2005). Balance of MafB and PU.1 specifies alternative macrophage or dendritic cell fate. *Blood* 105, 2707-2716.

Balkwill,F. and Mantovani,A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539-545.

Banchereau,J., Briere,F., Caux,C., Davoust,J., Lebecque,S., Liu,Y.J., Pulendran,B., and Palucka,K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767-811.

Banchereau,J. and Steinman,R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Basset,C., Holton,J., O'Mahony,R., and Roitt,I. (2003). Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine* 21 *Suppl* 2, S12-S23.

Bauer,M., Redecke,V., Ellwart,J.W., Scherer,B., Kremer,J.P., Wagner,H., and Lipford,G.B. (2001). Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J. Immunol.* 166, 5000-5007.

Bergman,M.P., Engering,A., Smits,H.H., van Vliet,S.J., van Bodegraven,A.A., Wirth,H.P., Kapsenberg,M.L., Vandenbroucke-Grauls,C.M., van,K.Y., and Appelmek,B.J. (2004). *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell

2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *J. Exp. Med.* *200*, 979-990.

Bladergroen,B.A., Strik,M.C., Bovenschen,N., van,B.O., Scheffer,G.L., Meijer,C.J., Hack,C.E., and Kummer,J.A. (2001). The granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, is mainly expressed by dendritic cells and at immune-privileged sites. *J. Immunol.* *166*, 3218-3225.

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

Bliss,C.M., Jr., Golenbock,D.T., Keates,S., Linevsky,J.K., and Kelly,C.P. (1998). *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemotactic protein 1 by human monocytes. *Infect. Immun.* *66*, 5357-5363.

Brandt,S., Kwok,T., Hartig,R., Konig,W., and Backert,S. (2005). NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 9300-9305.

Brenner,H., Arndt,V., Stegmaier,C., Ziegler,H., and Rothenbacher,D. (2004). Is *Helicobacter pylori* infection a necessary condition for noncardia gastric cancer? *Am. J. Epidemiol.* *159*, 252-258.

Cardenas,V.M., Mulla,Z.D., Ortiz,M., and Graham,D.Y. (2006). Iron deficiency and *Helicobacter pylori* infection in the United States. *Am. J. Epidemiol.* *163*, 127-134.

Cario,E., Brown,D., McKee,M., Lynch-Devaney,K., Gerken,G., and Podolsky,D.K. (2002). Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am. J. Pathol.* *160*, 165-173.

Cella,M., Sallusto,F., and Lanzavecchia,A. (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* *9*, 10-16.

Chamaillard,M., Girardin,S.E., Viala,J., and Philpott,D.J. (2003). Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol.* *5*, 581-592.

Chomczynski,P. and Sacchi,N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* *162*, 156-159.

Colonna,M., Trinchieri,G., and Liu,Y.J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* *5*, 1219-1226.

Correa,P. and Houghton,J. (2007). Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* *133*, 659-672.

- D'Cunha,J., Knight E Jr, Haas,A.L., Truitt,R.L., and Borden,E.C. (1996). Immunoregulatory properties of ISG15, an interferon-induced cytokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 211-215.
- Decker,T., Muller,M., and Stockinger,S. (2005). The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 675-687.
- Delneste,Y., Magistrelli,G., Gauchat,J., Haeuw,J., Aubry,J., Nakamura,K., Kawakami-Honda,N., Goetsch,L., Sawamura,T., Bonnefoy,J., and Jeannin,P. (2002). Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity.* *17*, 353-362.
- Dillon,S., Agrawal,A., Van,D.T., Landreth,G., McCauley,L., Koh,A., Maliszewski,C., Akira,S., and Pulendran,B. (2004). A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J. Immunol.* *172*, 4733-4743.
- Dooley,C.P., Cohen,H., Fitzgibbons,P.L., Bauer,M., Appleman,M.D., Perez-Perez,G.I., and Blaser,M.J. (1989). Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N. Engl. J. Med.* *321*, 1562-1566.
- Dossumbekova,A., Prinz,C., Mages,J., Lang,R., Kusters,J.G., Van Vliet,A.H., Reindl,W., Backert,S., Saur,D., Schmid,R.M., and Rad,R. (2006). *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of hopH gene polymorphisms. *J. Infect. Dis.* *194*, 1346-1355.
- Dunn,B.E., Cohen,H., and Blaser,M.J. (1997). *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.* *10*, 720-741.
- Ekstrom,A.M., Held,M., Hansson,L.E., Engstrand,L., and Nyren,O. (2001). *Helicobacter pylori* in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. *Gastroenterology* *121*, 784-791.
- El-Omar,E.M., Chow,W.H., and Rabkin,C.S. (2001). Gastric cancer and *H. pylori*: Host genetics open the way. *Gastroenterology* *121*, 1002-1004.
- Ermak,T.H., Giannasca,P.J., Nichols,R., Myers,G.A., Nedrud,J., Weltzin,R., Lee,C.K., Kleanthous,H., and Monath,T.P. (1998). Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J. Exp. Med.* *188*, 2277-2288.
- Ernst,P.B., Peura,D.A., and Crowe,S.E. (2006). The translation of *Helicobacter pylori* basic research to patient care. *Gastroenterology* *130*, 188-206.
- Ferrero,R.L. (2005). Innate immune recognition of the extracellular mucosal pathogen, *Helicobacter pylori*. *Mol. Immunol.* *42*, 879-885.

- Finkelman, F.D., Katona, I.M., Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1988). IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J. Immunol.* *140*, 1022-1027.
- Fox, J.G. and Wang, T.C. (2007). Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J. Clin. Invest.* *117*, 60-69.
- Franceschi, F., Christodoulides, N., Kroll, M.H., and Genta, R.M. (2004). Helicobacter pylori and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann. Intern. Med.* *140*, 766-767.
- Franceschi, F. and Gasbarrini, A. (2007). Helicobacter pylori and extragastric diseases. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *21*, 325-334.
- Frencik, R.W., Jr. and Clemens, J. (2003). Helicobacter in the developing world. *Microbes. Infect.* *5*, 705-713.
- Gay, N.J. and Keith, F.J. (1991). Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* *351*, 355-356.
- Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hoffmann, R., and Haas, R. (2003). Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* *301*, 1099-1102.
- Germain, R.N. (2004). An innately interesting decade of research in immunology. *Nat. Med.* *10*, 1307-1320.
- Gewirtz, A.T., Yu, Y., Krishna, U.S., Israel, D.A., Lyons, S.L., and Peek, R.M., Jr. (2004). Helicobacter pylori flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *J. Infect. Dis.* *189*, 1914-1920.
- Goodwin, C.S. and Armstrong, J.A. (1990). Microbiological aspects of Helicobacter pylori (Campylobacter pylori). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *9*, 1-13.
- Gor, D.O., Rose, N.R., and Greenspan, N.S. (2003). TH1-TH2: a procrustean paradigm. *Nat. Immunol.* *4*, 503-505.
- Guillemin, K., Salama, N.R., Tompkins, L.S., and Falkow, S. (2002). Cag pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to Helicobacter pylori infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 15136-15141.
- Guruli, G., Pflug, B.R., Pecher, S., Makarenkova, V., Shurin, M.R., and Nelson, J.B. (2004). Function and survival of dendritic cells depend on endothelin-1 and endothelin receptor autocrine loops. *Blood* *104*, 2107-2115.
- Hart, D.N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* *90*, 3245-3287.
- Hibbert, L., Pflanz, S., De Waal, M.R., and Kastelein, R.A. (2003). IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J. Interferon Cytokine Res.* *23*, 513-522.

Hochholzer,P., Lipford,G.B., Wagner,H., Pfeffer,K., and Heeg,K. (2000). Role of interleukin-18 (IL-18) during lethal shock: decreased lipopolysaccharide sensitivity but normal superantigen reaction in IL-18-deficient mice. *Infect. Immun.* 68, 3502-3508.

Hoebel,K., Janssen,E.M., Kim,S.O., Alexopoulou,L., Flavell,R.A., Han,J., and Beutler,B. (2003). Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat. Immunol.* 4, 1223-1229.

Hoffmann,J.A., Kafatos,F.C., Janeway,C.A., and Ezekowitz,R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.

Honda,K., Yanai,H., Negishi,H., Asagiri,M., Sato,M., Mizutani,T., Shimada,N., Ohba,Y., Takaoka,A., Yoshida,N., and Taniguchi,T. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434, 772-777.

Huff,J.L., Hansen,L.M., and Solnick,J.V. (2004). Gastric transcription profile of *Helicobacter pylori* infection in the rhesus macaque. *Infect. Immun.* 72, 5216-5226.

IARC (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval. Carcinog. Risks Hum. 61, 1-241.

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

ISAACS,A. and LINDENMANN,J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 147, 258-267.

Ishihara,S., Rumi,M.A., Kadowaki,Y., Ortega-Cava,C.F., Yuki,T., Yoshino,N., Miyaoka,Y., Kazumori,H., Ishimura,N., Amano,Y., and Kinoshita,Y. (2004). Essential role of MD-2 in TLR4-dependent signaling during *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *J. Immunol.* 173, 1406-1416.

Iwasaki,A. and Medzhitov,R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5, 987-995.

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

Jego,G., Palucka,A.K., Blanck,J.P., Chalouni,C., Pascual,V., and Banchereau,J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity.* 19, 225-234.

Jensen,P.E. (2007). Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat. Immunol.* 8, 1041-1048.

- Kaisho,T. and Akira,S. (2006). Toll-like receptor function and signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* *117*, 979-987.
- Kapsenberg,M.L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 984-993.
- Kawahara,T., Teshima,S., Oka,A., Sugiyama,T., Kishi,K., and Rokutan,K. (2001). Type I *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide stimulates toll-like receptor 4 and activates mitogen oxidase 1 in gastric pit cells. *Infect. Immun.* *69*, 4382-4389.
- Kawai,T., Adachi,O., Ogawa,T., Takeda,K., and Akira,S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* *11*, 115-122.
- Kawai,T. and Akira,S. (2005). Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* *17*, 338-344.
- Kawai,T. and Akira,S. (2007). TLR signaling. *Semin. Immunol.* *19*, 24-32.
- Krug,A., Rothenfusser,S., Hornung,V., Jahrsdorfer,B., Blackwell,S., Ballas,Z.K., Endres,S., Krieg,A.M., and Hartmann,G. (2001). Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *31*, 2154-2163.
- Lai,L.H. and Sung,J.J. (2007). *Helicobacter pylori* and benign upper digestive disease. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *21*, 261-279.
- Langenkamp,A., Messi,M., Lanzavecchia,A., and Sallusto,F. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* *1*, 311-316.
- Lanzavecchia,A. and Sallusto,F. (2001). Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* *106*, 263-266.
- Lee,S.K., Stack,A., Katzowitsch,E., Aizawa,S.I., Suerbaum,S., and Josenhans,C. (2003). *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes. Infect.* *5*, 1345-1356.
- Lemaitre,B., Nicolas,E., Michaut,L., Reichhart,J.M., and Hoffmann,J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973-983.
- Liew,F.Y. (2002). T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 55-60.
- Liu,Y.J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 275-306.
- Lochhead,P. and El-Omar,E.M. (2007). *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *21*, 281-297.

- MacPherson,G., Kushnir,N., and Wykes,M. (1999). Dendritic cells, B cells and the regulation of antibody synthesis. *Immunol. Rev.* 172, 325-334.
- Maeda,S., Akanuma,M., Mitsuno,Y., Hirata,Y., Ogura,K., Yoshida,H., Shiratori,Y., and Omata,M. (2001a). Distinct mechanism of *Helicobacter pylori*-mediated NF-kappa B activation between gastric cancer cells and monocytic cells. *J. Biol. Chem.* 276, 44856-44864.
- Maeda,S., Otsuka,M., Hirata,Y., Mitsuno,Y., Yoshida,H., Shiratori,Y., Masuho,Y., Muramatsu,M., Seki,N., and Omata,M. (2001b). cDNA microarray analysis of *Helicobacter pylori*-mediated alteration of gene expression in gastric cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 443-449.
- Malaty,H.M. (2007). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 21, 205-214.
- Malfertheiner,P., Megraud,F., O'Morain,C., Bazzoli,F., El-Omar,E., Graham,D., Hunt,R., Rokkas,T., Vakil,N., and Kuipers,E.J. (2007). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 56, 772-781.
- Mandell,L., Moran,A.P., Cocchiarella,A., Houghton,J., Taylor,N., Fox,J.G., Wang,T.C., and Kurt-Jones,E.A. (2004). Intact gram-negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4. *Infect. Immun.* 72, 6446-6454.
- Marshall,B.J., Armstrong,J.A., McGeachie,D.B., and Glancy,R.J. (1985). Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med. J. Aust.* 142, 436-439.
- Marshall,B.J. and Warren,J.R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1, 1311-1315.
- Martin,R.M., Brady,J.L., and Lew,A.M. (1998). The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice. *J. Immunol. Methods* 212, 187-192.
- Mattner,F., Magram,J., Ferrante,J., Launois,P., Di,P.K., Behin,R., Gately,M.K., Louis,J.A., and Alber,G. (1996). Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. *Eur. J. Immunol.* 26, 1553-1559.
- Medema,J.P., Schuurhuis,D.H., Rea,D., van,T.J., de,J.J., Bres,S.A., Laban,S., Toes,R.E., Toebes,M., Schumacher,T.N., Bladergroen,B.A., Ossendorp,F., Kummer,J.A., Melief,C.J., and Offringa,R. (2001). Expression of the serpin serine protease inhibitor 6 protects dendritic cells from cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis: differential modulation by T helper type 1 and type 2 cells. *J. Exp. Med.* 194, 657-667.
- Medzhitov,R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 135-145.

- Medzhitov,R. and Janeway,C.A., Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295-298.
- Medzhitov,R. and Janeway,C.A., Jr. (1998). Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin. Immunol.* 10, 351-353.
- Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., and Janeway,C.A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Megraud,F. (1995). Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9 *Suppl* 2, 85-91.
- Moran,A.P., Lindner,B., and Walsh,E.J. (1997). Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides. *J. Bacteriol.* 179, 6453-6463.
- Murphy,K.M. and Reiner,S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 933-944.
- Napolitani,G., Rinaldi,A., Bertonni,F., Sallusto,F., and Lanzavecchia,A. (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.* 6, 769-776.
- Nomura,A., Stemmermann,G.N., Chyou,P.H., Kato,I., Perez-Perez,G.I., and Blaser,M.J. (1991). *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N. Engl. J. Med.* 325, 1132-1136.
- Obonyo,M., Sabet,M., Cole,S.P., Ebmeyer,J., Uematsu,S., Akira,S., and Guiney,D.G. (2007). Deficiencies of myeloid differentiation factor 88, Toll-like receptor 2 (TLR2), or TLR4 produce specific defects in macrophage cytokine secretion induced by *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 75, 2408-2414.
- Owen,R.J. (1998). *Helicobacter*--species classification and identification. *Br. Med. Bull.* 54, 17-30.
- Pantheil,K., Faller,G., and Haas,R. (2003). Colonization of C57BL/6J and BALB/c wild-type and knockout mice with *Helicobacter pylori*: effect of vaccination and implications for innate and acquired immunity. *Infect. Immun.* 71, 794-800.
- Parsonnet,J., Friedman,G.D., Orentreich,N., and Vogelman,H. (1997). Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 40, 297-301.
- Partida-Sanchez,S., Goodrich,S., Kusser,K., Oppenheimer,N., Randall,T.D., and Lund,F.E. (2004). Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity. *Immunity.* 20, 279-291.

- Patterson,S. (2000). Flexibility and cooperation among dendritic cells. *Nat. Immunol.* *1*, 273-274.
- Penna,G., Sozzani,S., and Adorini,L. (2001). Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* *167*, 1862-1866.
- Presky,D.H., Yang,H., Minetti,L.J., Chua,A.O., Nabavi,N., Wu,C.Y., Gately,M.K., and Gubler,U. (1996). A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 14002-14007.
- Prinz,C., Hafsi,N., and Volland,P. (2003). Helicobacter pylori virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. *Trends Microbiol.* *11*, 134-138.
- Pulendran,B., Kumar,P., Cutler,C.W., Mohamadzadeh,M., Van,D.T., and Banchereau,J. (2001). Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J. Immunol.* *167*, 5067-5076.
- Rad,R., Brenner,L., Bauer,S., Schwendy,S., Layland,L., da Costa,C.P., Reindl,W., Dossumbekova,A., Friedrich,M., Saur,D., Wagner,H., Schmid,R.M., and Prinz,C. (2006a). CD25⁺/Foxp3⁺ T cells regulate gastric inflammation and Helicobacter pylori colonization in vivo. *Gastroenterology* *131*, 525-537.
- Rad,R., Brenner,L., Krug,A., Volland,P., Mages,J., Lang,R., Schwendy,S., Reindl,W., Dossumbekova,A., Ballhorn,W., Wagner,H., Schmid,R.M., Bauer,S., and Prinz,C. (2007). Toll-like receptor-dependent activation of antigen-presenting cells affects adaptive immunity to Helicobacter pylori. *Gastroenterology* *133*, 150-163.
- Rad,R., Gerhard,M., Lang,R., Schoniger,M., Rosch,T., Schepp,W., Becker,I., Wagner,H., and Prinz,C. (2002). The Helicobacter pylori blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J. Immunol.* *168*, 3033-3041.
- Rad,R., Prinz,C., and Schmid,R.M. (2006b). Helicobacter pylori and prognosis of gastric carcinoma. *Lancet Oncol.* *7*, 364-365.
- Rad,R., Schmid,R.M., and Prinz,C. (2006c). Helicobacter pylori, iron deficiency, and gastric autoimmunity. *Blood* *107*, 4969-4970.
- Raghavan,S. and Holmgren,J. (2005). CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *44*, 121-127.
- Rathinam,C., Geffers,R., Yucel,R., Buer,J., Welte,K., Moroy,T., and Klein,C. (2005). The transcriptional repressor Gfi1 controls STAT3-dependent dendritic cell development and function. *Immunity.* *22*, 717-728.

- Redecke,V., Hacker,H., Datta,S.K., Fermin,A., Pitha,P.M., Broide,D.H., and Raz,E. (2004). Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J. Immunol.* 172, 2739-2743.
- Regnault,A., Lankar,D., Lacabanne,V., Rodriguez,A., Thery,C., Rescigno,M., Saito,T., Verbeek,S., Bonnerot,C., Ricciardi-Castagnoli,P., and Amigorena,S. (1999). Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189, 371-380.
- Rescigno,M., Urbano,M., Valzasina,B., Francolini,M., Rotta,G., Bonasio,R., Granucci,F., Kraehenbuhl,J.P., and Ricciardi-Castagnoli,P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2, 361-367.
- Roberts,A.W. (2005). G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors* 23, 33-41.
- Robinson,K., Argent,R.H., and Atherton,J.C. (2007). The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 21, 237-259.
- Rogge,L., Barberis-Maino,L., Biffi,M., Passini,N., Presky,D.H., Gubler,U., and Sinigaglia,F. (1997). Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J. Exp. Med.* 185, 825-831.
- Roth,K.A., Kapadia,S.B., Martin,S.M., and Lorenz,R.G. (1999). Cellular immune responses are essential for the development of *Helicobacter felis*-associated gastric pathology. *J. Immunol.* 163, 1490-1497.
- Rothenbacher,D. and Brenner,H. (2003). Burden of *Helicobacter pylori* and *H. pylori*-related diseases in developed countries: recent developments and future implications. *Microbes. Infect.* 5, 693-703.
- Sachs,G., Weeks,D.L., Melchers,K., and Scott,D.R. (2003). The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 349-369.
- Sato,K. and Fujita,S. (2007). Dendritic cells: nature and classification. *Allergol. Int.* 56, 183-191.
- Scanga,C.A., Aliberti,J., Jankovic,D., Tilloy,F., Bennouna,S., Denkers,E.Y., Medzhitov,R., and Sher,A. (2002). Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.* 168, 5997-6001.
- Schmausser,B., Andrusis,M., Endrich,S., Lee,S.K., Josenhans,C., Muller-Hermelink,H.K., and Eck,M. (2004). Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 136, 521-526.

- Schmausser,B., Andrulis,M., Endrich,S., Muller-Hermelink,H.K., and Eck,M. (2005). Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*. *Int. J. Med. Microbiol.* *295*, 179-185.
- Schnare,M., Barton,G.M., Holt,A.C., Takeda,K., Akira,S., and Medzhitov,R. (2001). Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* *2*, 947-950.
- Schnare,M., Holt,A.C., Takeda,K., Akira,S., and Medzhitov,R. (2000). Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr. Biol.* *10*, 1139-1142.
- Schuler,G. and Steinman,R.M. (1985). Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.* *161*, 526-546.
- Scott,D.R., Weeks,D., Hong,C., Postius,S., Melchers,K., and Sachs,G. (1998). The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* *114*, 58-70.
- Shakushiro,K., Yamasaki,Y., Nishikawa,M., and Takakura,Y. (2004). Efficient scavenger receptor-mediated uptake and cross-presentation of negatively charged soluble antigens by dendritic cells. *Immunology* *112*, 211-218.
- Shortman,K. and Liu,Y.J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 151-161.
- Shortman,K. and Naik,S.H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 19-30.
- Smith,M.F., Jr., Mitchell,A., Li,G., Ding,S., Fitzmaurice,A.M., Ryan,K., Crowe,S., and Goldberg,J.B. (2003). Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 32552-32560.
- Smythies,L.E., Waites,K.B., Lindsey,J.R., Harris,P.R., Ghiara,P., and Smith,P.D. (2000). *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN-gamma, gene-deficient mice. *J. Immunol.* *165*, 1022-1029.
- Steinman,R.M. and Cohn,Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* *137*, 1142-1162.
- Stevens,T.L., Bossie,A., Sanders,V.M., Fernandez-Botran,R., Coffman,R.L., Mosmann,T.R., and Vitetta,E.S. (1988). Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* *334*, 255-258.

Su,B., Ceponis,P.J., Lebel,S., Huynh,H., and Sherman,P.M. (2003). Helicobacter pylori activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* *71*, 3496-3502.

Sueltenfuss,E.A. and Pollard,M. (1963). Cytochemical Assay of Interferon Produced by Duck Hepatitis Virus. *Science* *139*, 595-596.

Suerbaum,S. and Michetti,P. (2002). Helicobacter pylori infection. *N. Engl. J. Med.* *347*, 1175-1186.

Sun,J., Walsh,M., Villarino,A.V., Cervi,L., Hunter,C.A., Choi,Y., and Pearce,E.J. (2005). TLR ligands can activate dendritic cells to provide a MyD88-dependent negative signal for Th2 cell development. *J. Immunol.* *174*, 742-751.

Swain,S.L., Weinberg,A.D., English,M., and Huston,G. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* *145*, 3796-3806.

Szabo,S.J., Dighe,A.S., Gubler,U., and Murphy,K.M. (1997). Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J. Exp. Med.* *185*, 817-824.

Takaoka,A., Yanai,H., Kondo,S., Duncan,G., Negishi,H., Mizutani,T., Kano,S., Honda,K., Ohba,Y., Mak,T.W., and Taniguchi,T. (2005). Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* *434*, 243-249.

Takeda,K. and Akira,S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* *17*, 1-14.

Takeuchi,O., Takeda,K., Hoshino,K., Adachi,O., Ogawa,T., and Akira,S. (2000). Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int. Immunol.* *12*, 113-117.

Talley,N.J., Zinsmeister,A.R., Weaver,A., DiMagno,E.P., Carpenter,H.A., Perez-Perez,G.I., and Blaser,M.J. (1991). Gastric adenocarcinoma and Helicobacter pylori infection. *J. Natl. Cancer Inst.* *83*, 1734-1739.

Toellner,K.M., Luther,S.A., Sze,D.M., Choy,R.K., Taylor,D.R., MacLennan,I.C., and cha-Orbea,H. (1998). T helper 1 (Th1) and Th2 characteristics start to develop during T cell priming and are associated with an immediate ability to induce immunoglobulin class switching. *J. Exp. Med.* *187*, 1193-1204.

Trinchieri,G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 133-146.

Uemura,N., Okamoto,S., Yamamoto,S., Matsumura,N., Yamaguchi,S., Yamakido,M., Taniyama,K., Sasaki,N., and Schlemper,R.J. (2001). Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *N. Engl. J. Med.* *345*, 784-789.

- Ulevitch,R.J. (2004). Therapeutics targeting the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 512-520.
- Vandenabeele,S. and Wu,L. (1999). Dendritic cell origins: puzzles and paradoxes. *Immunol. Cell Biol.* *77*, 411-419.
- Viala,J., Chaput,C., Boneca,I.G., Cardona,A., Girardin,S.E., Moran,A.P., Athman,R., Memet,S., Huerre,M.R., Coyle,A.J., DiStefano,P.S., Sansonetti,P.J., Labigne,A., Bertin,J., Philpott,D.J., and Ferrero,R.L. (2004). Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat. Immunol.* *5*, 1166-1174.
- Wallet,M.A., Sen,P., and Tisch,R. (2005). Immunoregulation of dendritic cells. *Clin. Med. Res.* *3*, 166-175.
- Warren,J.R. and Marshall,B.J. (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* *1*, 1273-1275.
- Watts,T.H. (2005). TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 23-68.
- Weeks,D.L., Eskandari,S., Scott,D.R., and Sachs,G. (2000). A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* *287*, 482-485.
- Wen,S., Felley,C.P., Bouzourene,H., Reimers,M., Michetti,P., and Pan-Hammarstrom,Q. (2004). Inflammatory gene profiles in gastric mucosa during *Helicobacter pylori* infection in humans. *J. Immunol.* *172*, 2595-2606.
- Wilson,K.T. and Crabtree,J.E. (2007). Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology* *133*, 288-308.
- Wu,L. and Liu,Y.J. (2007). Development of dendritic-cell lineages. *Immunity.* *26*, 741-750.
- Wundisch,T., Thiede,C., Morgner,A., Dempfle,A., Gunther,A., Liu,H., Ye,H., Du,M.Q., Kim,T.D., Bayerdorffer,E., Stolte,M., and Neubauer,A. (2005). Long-term follow-up of gastric MALT lymphoma after *Helicobacter pylori* eradication. *J. Clin. Oncol.* *23*, 8018-8024.
- Yamamoto,M., Yamazaki,S., Uematsu,S., Sato,S., Hemmi,H., Hoshino,K., Kaisho,T., Kuwata,H., Takeuchi,O., Takeshige,K., Saitoh,T., Yamaoka,S., Yamamoto,N., Yamamoto,S., Muta,T., Takeda,K., and Akira,S. (2004). Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature* *430*, 218-222.

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

Youn, H.S., Lee, J.Y., Fitzgerald, K.A., Young, H.A., Akira, S., and Hwang, D.H. (2005). Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex. *J. Immunol.* 175, 3339-3346.

Yrlid, U., Cerovic, V., Milling, S., Jenkins, C.D., Zhang, J., Crocker, P.R., Klavinskis, L.S., and MacPherson, G.G. (2006). Plasmacytoid dendritic cells do not migrate in intestinal or hepatic lymph. *J. Immunol.* 177, 6115-6121.

Danksagung

Mein Dank gilt:

An erster Stelle meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Christian Prinz, der mir diese Doktorarbeit erst ermöglicht hat, und der mich stets unterstützte und motivierte. Für sein Vertrauen und seine wertvolle fachliche Betreuung danke ich ihm sehr herzlich.

Von ganzem Herzen danken möchte ich auch meinem Mann Roland Rad für seinen immerwährenden fachlichen Beistand, für seinen uneingeschränkten Rückhalt, seine liebevolle Geduld und seinen Glauben an mich.

Mein Dank gilt weiterhin der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Prinz für die angenehme und herzliche Atmosphäre; ganz besonders jedoch Frau Dr. Petra Voland und Herrn Dr. Mathias Friedrich, die immer ein offenes Ohr und eine helfende Hand bei den kleinen und großen Problemen hatten.

Zum Gelingen dieser Arbeit haben zudem beigetragen: die Herren Dr. Wolfgang Reindl (der immer half, wenn es schwierig wurde), Prof. Stefan Bauer, Prof. Roland Lang, Dr. Jörg Mages sowie Frau Angela Servatius. Ich danke ihnen ganz herzlich.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinen Eltern, Heidi und Ulrich Brenner, für ihre Geduld und ihr Verständnis, ihre stetige liebevolle Unterstützung, ihre konstruktive Kritik und ihr gutes Vorbild. Nicht zuletzt danke ich ihnen auch für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Dissertation.