



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



***Helicobacter pylori* induzierte Apoptose in Parietalzellen der Ratte**

Pamela Randlkofer

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. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 11.04.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.09.2005 angenommen.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Publikation vorbereitet:

Neu, B.; Randlkofer, P.; Neuhofer, M.; Volland, P.; Mayerhofer, A.; Gerhard, M.; Schepp, W.; Prinz, C.: *Helicobacter pylori* induces apoptosis of rat gastric parietal cells, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 283 (2002), G309-G318

Neu, B.; Randlkofer, P.; Neuhofer, M.; Volland, P.; Mayerhofer, A.; Gerhard, M.; Schepp, W.; Prinz, C.: *H. pylori* induces apoptosis in parietal cells by activation of NF- κ B, Gastroenterology 122/4 (2002), 8 Suppl.

Neu, B.; Randlkofer, P.; Neuhofer, M.; Volland, P.; Mayerhofer, A.; Gerhard, M.; Schepp, W.; Prinz, C.: *H. pylori* specifically induces apoptosis in parietal cells, Gastroenterology 120/5 (2001), 2609 Suppl.

Randlkofer, P.; Neu, B.; Gerhard, M.; Schepp, W.; Prinz, C.: *Helicobacter pylori* and TNF- α induced apoptosis in isolated parietal cells, Gut 47 (2000), A43-A43

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Apoptose	1
1.1.1	Ein Signalweg des aktiven Zelltods	1
1.1.2	Apoptose im Magen-Trakt	3
1.1.3	<i>Helicobacter pylori</i>	4
1.1.3.1	Epidemiologie und Pathogenese von <i>H.pylori</i>	4
1.1.3.2	Virulenzfaktoren von <i>H.pylori</i>	5
1.1.3.3	Immunreaktion des Wirtes	9
1.1.3.4	Der Signaltransduktionsweg über die Caspase 3	11
1.2	<i>H.pylori</i> und der Transkriptionsfaktor Nuclear factor <i>kappa</i> B	14
1.2.1	Struktur von NF- κ B	14
1.2.2	Aktivierung von NF- κ B	15
1.3	Die Parietalzelle – ein <i>in vitro</i> Modell der Atrophie	16
1.4	Aufgabenstellung dieser Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Versuchstiere	21
2.1.2	<i>Helicobacter pylori</i> und andere Keime	21
2.1.3	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	22
2.1.4	Oligonukleotide und Antikörper	24
2.1.5	Geräte	24
2.1.6	Auswertung	25
2.1.7	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	26
2.1.7.1	Isolation der Parietalzellen	26
2.1.7.2	Kultivierung der Parietalzellen	27
2.1.7.3	TUNEL-Reaktion	28
2.1.7.4	Präparation der Kernextrakte	28
2.1.7.5	Annealing der NF- κ B und SP-1 Oligonukleotide	29

2.1.7.6	Radioaktive Markierung der Oligonukleotide	29
2.1.7.7	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.1.7.8	Acrylamid-Gelelektrophorese für den EMSA	29
2.1.7.9	Auftragen der Proben des EMSA	30
2.2	Methoden	31
2.2.1	Isolation und Primärkultur der Parietalzellen	31
2.2.1.1	Isolation von Parietalzellen	31
2.2.2	Kultivierung der Parietalzellen	33
2.2.3	Stimulationen der Parietalzellen mit <i>Helicobacter pylori</i>	34
2.2.4	Nachweismethoden der Apoptose	37
2.2.4.1	TUNEL-Reaktion	37
2.2.4.2	Elektronenmikroskopie der Parietalzelle.....	39
2.2.5	Kolorimetrische Messung der Caspase 3 Aktivität	40
2.2.6	Nachweis des Transkriptionsfaktors NF- κ B.....	41
2.2.6.1	Der elektrophoretic mobility shift assay (EMSA).....	41
2.2.6.1.1	Präparation der Kernextrakte.....	42
2.2.6.1.2	Annealing der DNA-Fragmente	43
2.2.6.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	45
2.2.6.1.4	Acrylamid-Gelelektrophorese für den EMSA.....	46
2.2.6.1.5	Radioaktive Markierung	46
2.2.6.1.6	Auftragen der Proben und Auswertung	47
2.2.6.1.7	Spezifität der Banden.....	48
2.2.6.2	Transfektion der Parietalzellen.....	49
2.2.6.2.1	Transfektion der Antisense (AS)-und Missense (MS)-Oligonukleotide.....	49
2.2.6.2.2	Transfektion der Decoy-Oligonukleotide	50
2.2.6.3	Inkubation der Parietalzellen mit PSI.....	51
2.2.7	Inkubation der Parietalzellen mit L-NMMA	51
2.2.8	Statistische Auswertung.....	51
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Einfluss verschiedener Virulenzfaktoren auf die Apoptose	53
3.1.1	Qualitative Absicherung der Versuchsergebnisse	53
3.1.1.1	Färbung der Zellen mit der TUNEL-Reaktion und Trypanblau.....	53

3.1.1.2	Elektronenmikroskopie	54
3.1.2	Ermittlung der <i>H.pylori</i> -Konzentration.....	55
3.1.3	Ermittlung der Stimulationszeit	57
3.1.4	Spezifische Induktion der Apoptose durch <i>H.pylori</i>	58
3.1.5	Einfluss verschiedener Gene von <i>H.pylori</i> auf die Apoptose	59
3.1.6	Synergistische Effekte von <i>H.pylori</i> und TNF- α	61
3.2	Untersuchung der Caspase 3 Aktivität in den Parietalzellen	63
3.3	Bedeutung von NF- κ B in Parietalzellen	65
3.3.1	Nachweis einer NF- κ B-Aktivierung und Überprüfung der Bandenspezifität	66
3.3.2	Einfluss einzelner <i>cag</i> -PAI Gene auf die NF- κ B-Aktivierung	67
3.3.3	Hemmung der NF- κ B-Aktivierung durch p65-Antisense-Oligonukleotide.....	69
3.3.4	NF- κ B-p65-Antisense-Oligonukleotide und Apoptose	71
3.3.5	Einfluss der Decoy-Oligonukleotide auf NF- κ B	72
3.3.6	Die Decoy-Oligonukleotide und die zelluläre Apoptose	74
3.3.7	Einfluss von PSI auf die Apoptose	75
3.3.8	Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Apoptose	76
4	Diskussion	79
4.1	Primärkultur der Parietalzellen	79
4.2	<i>H.pylori</i> induziert Apoptose in Parietalzellen.....	80
4.3	Essentielle Virulenzfaktoren von <i>H.pylori</i>	81
4.4	Der Signaltransduktionsweg über TNFR1 und Caspase 3.....	84
4.5	<i>H.pylori</i> aktiviert NF- κ B in Parietalzellen.....	87
4.6	Stickstoffmonoxid und NF- κ B in Parietalzellen.....	89
4.7	Interleukin-8 und NF- κ B	90
4.8	NF- κ B und Apoptose	92
5	Zusammenfassung.....	97
6	Literatur	101

Abkürzungsverzeichnis

APS.....	Ammoniumpersulfat
APZ.....	Antigen-präsentierenden Zellen
AS.....	Anti-sense Oligonukleotide
Bouin-Lösung.....	Formaldehyd 9% (w/v)
BSA.....	Bovine serum albumin
cag.....	cytotoxin-associated gene
Caspase.....	Cysteinhaltige, aspartatspezifische Protease
<i>C.jejunii</i>	<i>Campylobacter jejunii</i>
cpm.....	counts per minute
DAB.....	3,3`-Diaminobenzidin
CASPASE.....	cysteinhaltige, aspartatspezifische Protease
DEVD.....	Asp-Glu-Val-Asp
DMEM.....	Dulbeccos modified eagles medium
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs.....	Deoxynukleotid
DTT.....	Dithiothreitol
ECL.....	Enterochromaffin like
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetatsäure
EGF.....	Epidermal growth factor
EGTA.....	Ethylen-glycol-bis(b-aminethyl-ether)N,N,N`,N`-tetraacetat
EM.....	Elektronenmikroskopie
EMSA.....	Elektrophoretic mobility shift assay
EtBr.....	Etidiumbromid
FAM 5`.....	5`-carboxyfluorescein-phosphoramid-markierte Oligonukleotide
$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP.....	$\gamma^{32}\text{P}$ -adenosintriphosphat
Hepes.....	N-2-hydroxymethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
<i>H.pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
iNOS.....	inducible Nitric Oxide Synthase
ITS.....	Insulin-Transferrin-Sodiumselenit
kDa.....	Kilodalton
kBp.....	Kilobasenpaare
KM.....	Kulturmedium
L-NMMA.....	N ^G -Methyl-l-Arginin

MALT-Lymphom.....	Mucosa Associated Lymphatic Tissue-Lymphom
MNA.....	Methylnorbonen-2,3-Dicarbonsäureanhydrid
MOI.....	Multiplicity of Infection
MS.....	Mis-sense Oligonukleotide
p65 und p50.....	Polyklonale Antikörper p65 und p50
PARP.....	Poly(ADP-ribose) Polymerase
PAI.....	Pathogenitätsinsel
PBS.....	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PIC.....	Protease-Inhibitor-Cocktail
PMSF.....	Phenylmethylsulfonylflorid
Poly-(dIdC).....	Poly-desoxyinosin-desoxycytitin
PSI.....	Cbz-Ile-Glu(O-t-Bu)-Ala-Leucinal
rpm.....	rounds per minute
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylokokkus aureus</i>
T4-PKN.....	T4-Polynukleotidkinase
TEMED.....	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS.....	Tris-(hydroxymethyl-aminomethan)
TUNEL.....	dTd-mediated-dUTP nick end labeling
WT.....	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Apoptose

1.1.1 Ein Signalweg des aktiven Zelltods

Das Wort Apoptose wird von dem altgriechischen Wort „apoptosis“ („Herabfallen“) abgeleitet. Die Apoptose ist ein aktives und energieverbrauchendes, genetisch kontrolliertes Suizidprogramm der einzelnen Zelle. Es ist ein ubiquitär vorkommender Prozess, der für die Regulation der Zellzahl in der Entwicklung, der Erhaltung und dem Altern mehrzelliger Organismen von Bedeutung ist (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980). Schon in der embryonalen Entwicklung eines Organismus, wo es zu einer ständigen Neu- und Umbildung von Organen, sowie Rückbildung ganzer Organsystemen kommt, spielt die Apoptose eine wichtige Rolle. Auch im adulten Organismus befinden sich bereits differenzierte Gewebe in ständigem Umbau und müssen in der Lage sein auf äußere Reize durch Neu- und Umstrukturierung zu reagieren. Eine derartige regulatorische Funktion der Apoptose wird im Immunsystem am Lebenszyklus der Lymphozyten deutlich, die in lymphatischen Organen in konstanter Zellzahl vorhanden sind. Bei Antigenkontakt kommt es zur Aktivierung und Proliferation immunkompetenter B- und T-Lymphozyten. Nach erfolgreicher Immunabwehr wird die Expansion der spezifischen Immunzellen beendet und die Zahl der Lymphozyten durch Apoptose reduziert, um den Ausgangswert wieder herzustellen (Osborne, 1998).

Störungen im Zelltodsystem können sich negativ auf den Organismus auswirken und spielen bei vielen Krankheiten eine Rolle. Experimentelle Versuche an Mäusen konnten aufzeigen, dass die Mäuse erhebliche Veränderungen in speziellen Organsystemen aufwiesen, wenn Gene, die in der Signalkaskade der Apoptose von Bedeutung sind, durch homologe Rekombination zerstört wurden. So starben die Mäuse ohne ein funktionelles bcl-x, ein Apoptose hemmendes Protein, bereits im embryonalen Stadium, infolge eines massiven Zelltods hämatopoetischer Zellen und Zellen des zentralen Nervensystems (Motoyama et. al., 1995). Weiterhin zeigten Mäuse ohne die Zelltod vermittelnde Protease Caspase 3 erhebliche Missbildungen.

gen im Bereich des Innenohres (Takahashi et al., 2001) und Missbildungen im zentralen Nervensystem (Kuida et al., 1996). Bei Menschen können neurologische Störungen wie die Alzheimerkrankheit mit vorzeitiger Apoptose von Neuronen in Verbindung gebracht werden und auch die Reduktion von T-Zellen bei AIDS lässt sich auf diesen Vorgang zurückführen (Faddeh et al., 1999; Thompson, 1995). Das ubiquitäre Vorkommen der Apoptose macht deutlich, dass dieses Zelltodsystem in verschiedenen Geweben eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellzahl unter physiologischen, wie auch unter pathologischen Bedingungen spielt.

In der betroffenen Zelle führt die Apoptose in ihrer späten Phase zum Auftreten charakteristischer morphologischer Phänomene. J. Kerr (1972) hat als erster diese Änderungen in der Zellmorphologie beschrieben. In der Leber von Ratten hatte er durch eine Unterbindung der Vena portae künstlich eine Ischämie hervorgerufen. Dies führte zu einer beträchtlichen Schrumpfung der Leberlappen, die durch einen massiven Zellverlust durch Apoptose hervorgerufen wurde.

Bei der Apoptose ist zu beobachten, dass die Zelle zunehmend schrumpft, Mikrovilli (Ausstülpungen der Zellmembran, die zur Oberflächenvergrößerung dienen) verschwinden und die Zelle ihre Eingliederung in den Zellverband verliert. Gleichzeitig kommt es zu einer Kondensation des Chromatins im Zellkern und zu einer Fragmentierung der DNA. Schließlich werden die Zellfragmente, vor allem die Chromatinanteile, von Membranen umhüllt und als apoptotische Körperchen an die Umgebung abgegeben. Da die Zellmembran zu diesem Zeitpunkt immer noch intakt ist wird eine Entzündungsreaktion in der Umgebung der Zelle verhindert. Die apoptotischen Körperchen werden anschließend von Makrophagen phagozytiert (Wyllie et al., 1980; Kerr et al., 1972).

Eine weitere Form des Zelltodes ist die Nekrose, die von dem aktiven Prozess der Apoptose abgegrenzt werden muss. Sie ist ein passiver Vorgang, der durch Gewebsverletzung, Gifteinwirkung und Nährstoffmangel hervorgerufen wird. Sie geht mit einem Anschwellen und nachfolgender Lyse der Zelle einher und führt durch die Freisetzung der Zellinhalte zu einer Entzündungsreaktion in der Umgebung (Harmon et al., 1991).

Das intrazelluläre Zelltodsystem ist ein komplexer Signaltransduktionsweg, der durch eine Vielzahl unterschiedlicher extrazellulärer Stimuli aktiviert werden kann. Stimuli der Apoptose sind etwa Zytostatika, Glukokortikoide, Röntgenstrahlen, Sauerstoffradikale, aber auch verschiedene Viren und Bakterien.

1.1.2 Apoptose im Magen-Trakt

Die gesunde Magenmukosa zeigt eine sehr hohe Regenerationsrate. Da Magen­zellen nur eine begrenzte Lebensdauer aufweisen, kommt es zu einer ständigen Abfolge von Zellreplikation, Zelldifferenzierung und Zelltod. Nur die im Halsstück der Magendrüsen lokalisierten Stammzellen, besitzen die Fähigkeit zur Replikation und Zelldifferenzierung und können durch zielgerichtete Wanderung Zellverluste ersetzen. Während der Migration an die Drüsenoberflächen oder in tiefere Bereiche der Magendrüsen differenzieren sich die Zellen in diejenigen Zellen, die ersetzt werden müssen, wie zum Beispiel in Epithelzellen, Haupt- oder Parietalzellen (Correa et al., 1998). Hall et al. (1994) konnten zeigen, dass hauptsächlich die Apoptose für den Zellverlust verantwortlich ist. So werden vorwiegend alte Zellen und Zellen mit DNA-Schäden durch Apoptose beseitigt. Sie besitzt daher eine Schlüsselrolle in der Erhaltung des Zellgleichgewichtes im Magen­trakt.

Wird das Gleichgewicht zwischen Zellproduktion und Apoptose gestört, führt das zur Entstehung von Krankheiten. Ist die Zellproduktion erhöht, verbunden mit einer verminderten Apoptoserate und einer reduzierten Zerstörung genetisch geschädigter Zellen, wird die Entstehung von Tumoren begünstigt (Que et al., 1996). Ist dagegen die Apoptose erhöht, kann das zur Atrophie der Magenmukosa führen. Es gibt verschiedene Ursachen die Entzündungen und erhöhte Epithelschäden der Magenmukosa hervorrufen und im Verlauf zu einer Atrophie der Magenmukosa führen (Thompson et al., 1995). Eine der häufigsten Ursachen ist die durch *Helicobacter pylori* hervorgerufene Gastritis. Weit weniger häufig ist die „chemisch-toxisch“ induzierte Gastritis, die vor allem durch die Einnahme medikamentöser Präparate wie NSAR oder ASS hervorgerufen wird. Selten ist die Autoimmungastritis die vor allem die Korpus­schleimhaut des Magens befällt. Hier liegt ein Autoimmunprozess vor, in dessen Verlauf Parietalzellantikörper gebildet werden, welche zunehmend die Parietalzellen zerstören und auf diese Weise zu einer Atrophie der Schleimhaut führen. Eine Studie konnte nachweisen, dass diese Autoantikörper vor allem bei einer nicht unerheblichen Zahl von *H.pylori* positiven Patienten auftritt (Faller et al., 1996).

Im Vergleich zur *H.pylori* induzierten Gastritis, die mit einer erhöhten zellulären Apoptoserate einhergeht, wird im Falle von M. Crohn die Apoptose der T_{H1}-Lymphozyten gehemmt. Auf diese Weise wird bei dieser entzündlichen Erkrankung der Darmschleimhaut der Entzündungsprozess aufrecht erhalten. Bei M. Crohn werden über noch unbekannte Auslöser vorwiegend T_{H1}-Lymphozyten aktiviert, die einen Defekt im Bereich der Signalkaskade der Apoptose auf Höhe des mitochondrialen Weges aufweisen (Ina et al., 1999; Peppelenbrosch et

al., 2004; siehe auch Einleitung 1.1.3.4). In diesem Zusammenhang konnten Ina et al. (1999) zeigen, dass es zu einem Ungleichgewicht zwischen dem anti-apoptotisch wirksamen Bcl-2 und dem pro-apoptotisch wirksamen Bax kommt. Sturm et al. (2004) wiesen eine reduzierte Caspase 3 Aktivität in T_{H1}-Lymphozyten nach. Therapeutisch werden daher beim M.Crohn Wirkstoffe angewandt, die Apoptose in T_{H1}-Lymphozyten induzieren (Peppelenbrosch et al., 2004)

1.1.3 *Helicobacter pylori*

1.1.3.1 Epidemiologie und Pathogenese von *H.pylori*

Lange Zeit blieb die Ursache für Magenbeschwerden, wie Gastritis und Ulkuserkrankungen unentdeckt. Im 17. Jahrhundert machte man nur die Luft oder äußere, mechanische Reize dafür verantwortlich. Erst Ende des 19. Jahrhunderts brachten erstmals Wissenschaftler auch Bakterien mit diesen Beschwerden in engeren Zusammenhang. Es waren spiralförmige Bakterien, die im Magen von Menschen beschrieben wurden. Ihre Pathogenität blieb aber bis auf weiteres reine Spekulation (Pantoflickova and Blum, 2001). 1983 gelang es dann erstmals zwei australischen Wissenschaftlern J. R. Warren und B. Marshall diese spiralförmigen Bakterien aus Magenbiopsien des Antrums zu isolieren und auf Agarplatten anzuzüchten. Sie nannten sie *Campylobacter pylori*, heute bekannt als *Helicobacter pylori* (Warren, 1983; Marshall, 1983).

Die Infektion mit *H.pylori* ist weltweit verbreitet. Während die Durchseuchung in den Industrienationen unter 50% liegt, steigen diese Prozentzahlen in den Entwicklungsländern bis über 80% an (Dunn et al., 1997). Besonders bei schlechten hygienischen Bedingungen erfolgt die Infektion mit *H.pylori* häufig auf fäkal-oralem Wege entweder direkt, oder indirekt über kontaminierte Speisen (Kayser et al., 1998). Die Infektion wird in den meisten Fällen in der frühen Kindheit erworben. Im Erwachsenenalter sind Neuinfektionen eher selten (Dunn et al., 1997)

Der menschliche Magen stellt, neben dem von Primaten (Dubois et al., 1994), das einzige natürliche Reservoir dar, an das sich der säure-tolerante Keim perfekt angepasst hat. Er besitzt einige Merkmale, die ihm die Kolonisation und das Überleben in diesem sauren Milieu ermöglichen. Mehr als 90% der chronischen Gastritiden werden durch *H.pylori* hervorgerufen und sie sind eine der häufigsten Infektionskrankheiten des Menschen. Diese bakterielle Infek-

tion heilt nicht spontan ab, sondern wirkt chronisch, ohne Therapie ein Leben lang, gewebsschädigend auf eines der größten menschlichen Hohlorgane, den Magen ein. Sie steht nachweislich mit lebensbedrohenden Folgeleiden, wie der Ulkuskrankheit, dem MALT-Lymphom und dem Magenkarzinom in engem Zusammenhang (Fan et al., 1998; Genta et al., 1997; Mannick et al., 1996; Moss et al., 1996; Steininger et al., 1998; Kohda et al., 1999). Daher wurde *H.pylori* als ein Karzinogen der Klasse I, ein sogenanntes „sicheres Karzinogen“ definiert (IARC, 1994). Die kanzerogene Wirkung konnte auch in einem Tiermodell nachhaltig bestätigt werden (Watanabe et al., 1998). Die chronische Entzündung der Magenmukosa geht mit einer deutlich gesteigerten Apoptoserate der Epithelzellen und der Zellen im Drüsenhalsbereich einher. *H.pylori* wird neben der Immunreaktion und Entzündungsreaktion des Wirtes für diese erhöhte Apoptose verantwortlich gemacht (Jones et al., 1997; Correa et al., 1998; Moss et al., 1996).

Eine Infektion mit *H.pylori* zeigt nicht bei jedem Wirtsorganismus denselben Krankheitsverlauf. Dementsprechend weisen verschiedene *H.pylori* Stämme bei einer Analyse ihrer Genomsequenzen Unterschiede auf, was wiederum Einfluss auf den Grad ihrer Toxizität auf den Wirt zu haben scheint. Durch die Entschlüsselung des gesamten Genoms eines repräsentativen *H.pylori*-Stammes, der aus dem Magen von Patienten mit einer *H.pylori* induzierter Gastritis isoliert wurde, konnten Gene identifiziert werden, die für die Ausbildung von Virulenzfaktoren kodieren (Tomb et al., 1997). Diese Virulenzfaktoren sind einerseits für gewebsschädigende Faktoren des Keimes verantwortlich, andererseits ermöglichen sie ihm auch das Überleben und seine Persistenz im Magen. „Als Virulenzfaktoren bezeichnet man die Eigenschaften eines pathogenen Bakteriums, die ihm die Fähigkeit geben, eine bestimmte ökologische Nische im Körper des Wirts zu kolonisieren und sich dort trotz der Immunantwort und der unspezifischen Abwehrmechanismen des Wirts zu vermehren“ (Suerbaum et al., 2000). Um die Virulenzfaktoren des Keimes und deren Auswirkungen auf den Wirt besser untersuchen zu können, wurden in den letzten Jahren einige Tiermodelle etabliert, darunter *H.pylori* Infektionen von Mäusen, Ratten, mongolischen Wüstenmäusen und jungen Schweinen und für *in vitro* Versuche verschiedene Zellmodelle entwickelt.

1.1.3.2 Virulenzfaktoren von *H.pylori*

H.pylori ist ein spiralförmiges, gram-negatives Bakterium. Es ist 2,5 bis 5,0µm lang, 0,5 bis 1,0µm breit und damit unter dem Lichtmikroskop erkennbar.

Im Magen ist der Keim einer Mikroumgebung aus Säure, schützender Mukusschicht der Epithelzellen, der Immunreaktion des Wirtes und einer sich ständig regenerierenden Magenmu-

kosa ausgesetzt. Damit der Keim in diesem Milieu überleben kann, ist er mit verschiedenen essentiellen Faktoren ausgestattet. Ein wichtiger Faktor für die Kolonisierung des Magens ist seine Fähigkeit Urease zu bilden. Das Enzym Urease ist ein 550 kDa schweres Protein, welches die Hydrolyse von Harnstoff in Ammoniak und Kohlenstoffdioxid katalysiert. Der Ammoniak dient zur Neutralisierung der unmittelbaren Umgebung des Bakteriums und ermöglicht den Keimen ein Überleben im sauren Magenmilieu bei pH-Werten um 1-2 (Mobley et al., 1997 und 2001). Der größte Anteil der Urease befindet sich im Zytoplasma des Bakteriums, ein weit geringerer Anteil außen auf der Zelloberfläche oder liegt als freie Urease vor. Es konnte gezeigt werden, dass die im Zytoplasma befindliche Urease für die Pufferwirkung zuständig ist. (Scott et al., 1998; Weeks et al., 2000, Athmann et al., 2000). Da bei einem nahezu neutralen Umgebungs-pH der entstehende Ammoniak eine schädliche Wirkung auf den Organismus des Keimes ausüben würde, ist ein gewisser pH-Wert im sauren Bereich für das Überleben des Keimes notwendig. Dies zeigt, dass das saure Magenmilieu einen wichtigen, natürlichen Lebensraum für *H.pylori* darstellt (Scott et al., 1998, Meyer-Rosberg et al., 1996). Die Säureprotektion sichert *H.pylori* aber nur wenige Stunden das Überleben im Magenlumen. Um unter die Mukusschicht an die Apikalseite der Epithelzellen zu gelangen, wo ein etwas höherer pH-Wert als im Magenlumen herrscht, ist *H.pylori* mit einem Bündel von 4 bis 6 Geißeln an einem Pol ausgestattet. Dies verleiht dem Bakterium einen hohen Grad an Beweglichkeit. Jedes Geißelfilament besteht aus zwei Flagellinproteinen FlaA und FlaB, die von gleichnamigen Genen flaA und flaB kodiert werden (Suerbaum et al. 1993). Angetrieben von seinen Geißeln und seiner chemotaktischen Fähigkeit geleitet, besiedelt der Keim vorzugsweise den Antrumbereich der Magenmukosa. Dort hält sich das Bakterium vorwiegend im Bereich von Tight junctions, in sehr engem Kontakt zu den Magenepithelzellen auf (Noach et al., 1994). Nicht bewegliche *H.pylori* Stämme, bei denen ein oder beide Gene der Geißelfilamente mutiert vorliegen, sind nicht in der Lage die Magenschleimhaut permanent zu besiedeln. Dies unterstreichen auch Tierexperimente von Eaton et al. (1992), die an keimfrei gezüchteten Ferkeln zeigen konnten, dass diese Mutanten nicht zu einer Kolonisierung der Magenschleimhaut fähig waren.

Ultrastrukturelle Untersuchungen einer mit *H.pylori* infizierten Magenmukosa konnten zeigen, dass sich viele Bakterien in sehr engem Kontakt zu den Magenepithelzellen befinden. Dies weist darauf hin, dass *H.pylori* Adhäsine ausbildet, die eine spezifische und feste Bindung an Rezeptoren der Zellen herstellen können. Diese Fähigkeit stellt einen weiteren wichtigen Faktor des Bakteriums zur Adhärenz im Magen dar (Heczko et al., 2000; Su et al., 1999; Kirschner et al., 1995; Guruge et al., 1998). Diese These wird durch Versuche von Hyashi et

al. (1998) gestützt, in denen er zeigen konnte, dass nur adhärenente Stämme die ständige Epithel-erneuerung überleben und die Magenschleimhaut immer wieder neu besiedeln können.

Die Adhärenz der Keime ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Verschiedene Strukturen der Epithelzelle, wie Lipide, Ganglioside und Kohlenhydrate als Rezeptoren und verschiedene Adhäsine des Keimes stehen derzeit zur Diskussion (Namavar et al., 1998; Hirno et al., 1995; Appelmelk et al., 2000, Odenbreit et al., 1999).

In diesem Zusammenhang wurde ein bestimmtes Blutgruppenantigen, das Lewis B charakterisiert, das auf Epithelzellen, vorwiegend bei Menschen mit der Blutgruppe 0, gefunden wird. Es dient als Rezeptor für das Adhäsion BabA2, ein Protein, das auf der äußeren Bakterienmembran lokalisiert ist (Boren et al., 1993; Prinz et al., 2001). Das kann dazu beitragen, dass es eine sehr enge Beziehung bei *H.pylori* infizierten Menschen mit der Blutgruppe 0 und der Ausbildung einer Ulkuskrankheit gibt (Schepp et al., 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *H.pylori* auch an Laminin, ein extrazelluläres Glykoprotein der extrazellulären Matrix, über Lipopolysaccharide bindet (Valkonen et al., 1997). Lipopolysaccharide sind ein wichtiger Bestandteil der äußeren Membran der Zellwand von *H.pylori*, die in ihrem Aufbau dem typischen Muster gram-negativer Bakterien entspricht (Kayser, 1998, 147-150).

Ein entscheidender bakterieller Faktor in der Pathogenese des Keimes ist ein circa 37 kBp großer DNA-Abschnitt im Genom von *H.pylori*, die *cag*-(cytotoxin-associated gene) Pathogenitätsinsel, kurz *cag*-PAI genannt. Die Bedeutung der *cag*-PAI für die schwere der Gastritis und das Risiko eines Patienten, eine Komplikation der *H.pylori* Infektion zu entwickeln, ist mittlerweile gut belegt. In diesem Sinne induzieren *cag*-positive (Typ I) Stämme eine stärkere Gastritis, bewirken eine wesentlich stärkere Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie das IL-8 und sind signifikant häufiger mit der Ausbildung eines Karzinoms und MALT-Lymphoms assoziiert (Blaser et al., 1995; Peek et al., 1995). Die *cag*-PAI besteht aus mehr als 40 Genen, wobei das *cagA* Gen als wichtiges Marker-Gen der *cag*-PAI fungiert. Dementsprechend wurde das *cagA* Gen häufig bei Patienten mit atrophischer Gastritis, Ulkuserkrankungen und Magenkarzinomen isoliert (Kuipers et al., 1995; Covacci et al., 1993).

Untersuchungen zeigten, dass bei *cagA* negativen *H.pylori* Stämmen nicht nur das *cagA* Gen, sondern eine größere Gruppe von Genen aus der *cag*-PAI fehlt (Akyants et al., 1998; Censini et al., 1996; Audibert et al., 2001). Im Gegensatz zu Typ I Stämmen, weisen diese, auch als Typ II Stämme bezeichnet, eine sehr viel geringere Virulenz und einen leichteren Krankheitsverlauf bei einer Infektion auf (Marchetti et al., 1995; Moss et al., 2001; Rokkas et al., 1999).

In der Literatur gibt es zahlreiche Studien, die sich mit den Genen der *cag*-PAI und deren Funktion befassen. So konnten verschiedene Gene mit der Kodierung für ein spezielles Sekre-

tions- und Injektionssystem in Verbindung gebracht werden. Ein Teil dieser Gene, darunter auch das *cagE* Gen, kodiert für Proteine eines Typ IV Sekretionssystems gram-negativer Bakterien. Dabei nimmt das *cagE* Gen in diesem Sekretionsmechanismus eine wesentliche Rolle ein (Odenbreit et al., 2000). Weiterhin zeigt das CagE Protein signifikante Gemeinsamkeiten, zum einen mit dem VirB₄ Protein des VirB-Transportsystems von *Agrobacterium (A.) tumefaciens* und zum anderen mit dem Sekretionsprotein PtlC des Keuchhustenerregers *Bordetella (B.) pertussis* auf (Tummuru et al., 1995; Burns et al., 1999). Das in der Bakterienmembran lokalisierte Injektionssystem bildet, ähnlich der Konjugation bei Bakterien, ein pilusähnliches Sekretionssystem aus, welches dem Export von Makromolekülen dient. Bei *A. tumefaciens* wird über diesen Mechanismus eine einzelsträngige T-DNA in den Zellkern einer Zelle transportiert, wo sie in das Chromosom eingebaut wird und der Expression physiologisch wichtiger Gene dient. *B. pertussis* gibt auf diese Weise sein Toxin an seine Umgebung ab (Burns et al., 1999).

Bei *H. pylori* konnte gezeigt werden, dass nach seiner Bindung an die Epithelzelle das CagA Protein, ein 120 bis 140kDa schweres Protein, welches durch das *cagA* Gen kodiert wird, über das Typ IV Sekretionssystem in die Wirtszelle transloziert wird (Segal et al., 1999; Backert et al., 2000; Asahi et al., 2000; Covacci et al., 2000; Stein et al., 2000; Odenbreit et al., 2000). Dort wird das CagA Protein von einer Src ähnlichen Epithelzellkinase an seinen Tyrosinresten phosphoryliert (Selbach et al., 2001) und bindet an eine SHP-2 Phosphatase, was zu einer Deregulierung zellulärer Funktionen, besonders auf Signal-Transduktions-Ebene führt (Higashi et al., 2002). Das phosphorylierte CagA Protein ist bedeutend für die Induktion des „hummingbird“-Phänomens, einer strukturellen Veränderung der infizierten Zelle unterhalb der Anlagerungsstelle des Keimes. Dabei kommt es *in vitro* zu einer neuen Anordnung von Aktin und anderen Zytoskelettanteilen und zur Ausbildung von Ausstülpungen und podestartigen Zellauswüchsen, die sich dicht an das Bakterium anschmiegen (Segal et al., 1999; Stein et al., 2000; Backert et al., 2001; Higashi et al., 2002). Diese „Adhärenzplattformen“ könnten dem Keim dazu verhelfen, seine Bindung an die Zellen aufrecht zu erhalten (Gordon et al., 2000). Die genaue Wirkung des CagA Proteins auf die zelluläre Funktion ist immer noch nicht bekannt. Jedoch gibt die Arbeit von Higashi et al (Science, 2002) erste Hinweise auf eine mögliche pathologische Wirkung von CagA auf die Wirtszelle.

Das vakuolisierende Zytotoxin VacA ist ein 87kDa schweres Protein, das durch das *vacA* Gen kodiert und ebenfalls mit einer Schädigung des infizierten Magens in Zusammenhang gebracht wird. Dieses Gen ist in Typ I, sowie in Typ II Stämmen vorhanden. Daher ist die Proteinexpression des *vacA* Gens unabhängig von der *cag*-PAI und dem *cagA* Gen (Akopyants et

al., 1998; Mobley et al., 1997). Das VacA Protein wird zunächst durch einen aktiven Mechanismus als inaktives Protein aus der Bakterienzelle in das umgebende Milieu sezerniert. Erst in dem sauren Magenmilieu wird es aktiv und zugleich resistent gegen eine Verdauung durch die Magensäure. Dieses Zytotoxin kann eine Vakuolisierung in den Zellen und damit Zellschäden hervorrufen. Jedoch produzieren nicht alle *H.pylori* Stämme ein aktives Toxin. Dies wird auf genetische Unterschiede innerhalb des *vacA* Gens, genauer auf Unterschiede in den *vacA* Allelen, zurückgeführt. *H.pylori* Stämme die eine Allelkonstellation s1 m1 aufweisen, haben sich als besonders toxisch erwiesen. Sie wird in den meisten Fällen gleichzeitig mit dem *cagA* Gen angetroffen. Sowohl im Tierversuch (Ghiara et al., 1995) als auch durch Untersuchungen an menschlichen Biopsien (Atherton et al., 1997) konnte das VacA mit der Induktion von Epithelschäden in Zusammenhang gebracht werden (Ghiara et al., 1995; Atherton et al., 1997; Mégraud, 2001; Covacci, 1999, Mobley et al., 1997, Blaser et al., 1996). Es gibt aber auch experimentelle Befunde, die gegen eine wesentliche Rolle des VacA in der Pathogenese gastraler Epithelschäden sprechen (Weel et al., 1996; Ogura et al., 2000).

1.1.3.3 Immunreaktion des Wirtes

Wie bereits erwähnt sind nicht nur Virulenzfaktoren an der Pathogenität von *H.pylori* beteiligt, sondern auch die Entzündungsreaktion des Wirts auf den Keim spielt dabei eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, dass eine *H.pylori*-Infektion eine chronisch-aktive Entzündung auslöst und dabei sowohl das angeborene unspezifische Immunsystem, als auch das erworbene spezifische Immunsystem aktiviert.

Eine Adhäsion der Bakterien an die Magenepithelzellen führt in erster Linie zur Aktivierung einer sofortigen unspezifischen Immunantwort, die durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ), wie neutrophile Granulozyten, Monozyten und dendritische Zellen vermittelt wird. Vermutlich wird die Erkennung bakterieller Moleküle über Toll-like-Rezeptoren vermittelt, die auf den Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden. Diese Entzündungszellen (APZ) werden sowohl durch chemotaktische Faktoren des Keimes, als auch durch bestimmte Chemokine angelockt, die von den Magenepithelzellen nach Kontakt mit *H.pylori* gebildet werden. Am Entzündungsherd findet ihre Ausdifferenzierung zu Makrophagen statt (Prinz et al., 2003). Als solche sind sie in der Lage Zytokine, wie IL-8, IL-1 β , IL-6 und TNF- α zu sezernieren (Crabtree et al., 2001; Noach et al., 1994; Bodger et al., 1997). In Versuchen von Brzozowski et al. (1999), in denen Ratten mit *H.pylori* Typ I Stämmen infiziert wurden,

konnte entsprechend eine erhöhte Produktion von TNF- α und IL-1 β in der Rattenmukosa nachgewiesen werden.

Weiterhin sind Makrophagen an der Produktion weiterer entzündungsfördernder Faktoren, darunter oxidativer Metaboliten beteiligt, wie beispielsweise freie Sauerstoffradikale und Superoxidanionen, die wiederum zu Hydrogenperoxid und Hydroxylradikalen reduziert werden (Davies et al., 1994; Jones-Blackett et al., 1999). Diese Metaboliten dienen der Verteidigung des Wirtes, führen aber auch zur Zerstörung der Magenmukosa und zu Schäden in der DNA. Diese DNA-Schäden werden in Form von Mutationen und Einzelstrangbrüchen vorwiegend bei Patienten mit atrophischer Gastritis beobachtet (Farinati et al., 1998). Darüber hinaus bilden Makrophagen Stickstoffmonoxid, das mit Superoxiden zu Peroxynitrit reagieren kann. Peroxynitrit kann ebenfalls zu DNA-Schäden und damit zur Apoptose der Magenzellen führen (Lindahl et al., 1972; Lim et al., 2001; Watanabe et al., 2000; Mizuki et al., 2000).

Das Chemokin Interleukin 8 (IL-8), das auch von den Epithelzellen nach Kontakt mit *H.pylori* gebildet wird, regt die Entzündungszellen zusätzlich zur Migration an den Ort der Infektion an (Sharma et al., 1995; Aihara et al., 1997; Yamaoka et al., 1999). Untersuchungen an Biopsien des Magenantrums von Ando et al (1996) wiesen in diesem Kontext einen Zusammenhang zwischen der Bakteriendichte, der Höhe an IL-8 Produktion der Epithelzellen und der Aktivität der Gastritis auf. Die Aktivierung von IL-8 in Epithelzellen wird nur von *H.pylori* Typ I Stämmen induziert (Censini et al., 1996; Akopyants et al., 1998). Versuche mit *H.pylori*-Mutanten, denen verschiedene Gene aus der *cag*-PAI fehlen, konnten das *cagE* Gen, als ein Schlüssel-Gen in der IL-8 Aktivierung, nachweisen (Tummuru et al., 1995; Censini et al. 1996).

Weiterhin spielt bei einer *H.pylori* Infektion auch die spezifische Immunantwort eine bedeutende Rolle. T_{H1}-Lymphozyten (T-Helferzellen; CD4⁺-Zellen) vermitteln die spezifische Immunantwort. Ein wichtiges Zytokin ist das IL-12, das vor allem von Antigen-präsentierenden Zellen sezerniert wird und naive CD4⁺-Zellen aktiviert (Prinz et al., 2003; Smythies et al., 2000). Die aktivierten CD4⁺-Zellen produzieren vor allem IFN- γ und TNF- α und induzieren eine T_{H1}-vermittelte Immunantwort (Mohammadi et al., 1996). Diese zeichnet sich weiterhin durch eine erhöhte Phagozytoseaktivität der Makrophagen und eine gesteigerte Antikörperproduktion aus (Prinz et al., 2003; Smythies et al., 2000). Neben der Induktion einer T_{H1}-Immunantwort kann IFN- γ (Fan et al., 1998), wie auch TNF- α und IL-1 β im experimentellen Versuch auch alleine Apoptose in den Zellen auslösen (Hasumi et al., 2002; Mahr et al., 2000; Crabtree et al., 2001). Die Schädigung der Magenmukosa ist demnach nicht allein eine Folge der direkten Einwirkung von *H.pylori*, sondern entsteht auch durch die Infiltration der Muko-

sa mit Entzündungszellen und einer damit verbundenen Gewebsdestruktion (Shimoyama et al., 1998)

Betrachtet man diesen Keim in seinem Gesamtbild, so lässt sich erkennen, dass *H.pylori* eine Vielzahl von Mechanismen induziert, die zur Schädigung der Magenmukosa und dadurch zu Erkrankungen führt. Trotz der komplexen Immunabwehr der Magenmukosa ist *H.pylori* jedoch in der Lage im Magen zu persistieren und dort eine chronische Entzündung zu unterhalten. Als Antwort darauf wird zum einen eine Modulation der Wirtsantwort durch *H.pylori* diskutiert, die eine effektive Immunantwort mit einer Elimination der Keime verhindern soll (Appelmek et al., 1997; Spiegelhalder et al., 1993). Zum anderen könnte die Entzündung durch eine erhöhte Freisetzung von Nährstoffen aus der Mukosa eine wichtige Voraussetzung für das Überleben der Bakterien sein (Smythies et al., 2000).

1.1.3.4 Der Signaltransduktionsweg über die Caspase 3

Apoptose ist ein genetisch kontrollierter, aktiver Prozess der einzelnen Zelle, in welchem extrazelluläre Signale eine Folge von Reaktionen aktivieren, die zur Selbstelimination der Zelle führen.

In Hinblick auf *H.pylori* konnten bisher verschiedene Signaltransduktionswege aufgezeigt werden, die alle zum Tod der Zellen führen. Daher ist die Suche nach einer definitiven Abfolge von Reaktionsschritten, dem Transport von „Todessignalen“ in den Zellkern und dem genetischen Suizidprogramm der Zelle immer noch Gegenstand intensiver Forschung.

In Zusammenhang mit *H.pylori* wurde bisher eine große Anzahl von Apoptose auslösenden Faktoren identifiziert. Hierzu zählen Virulenzfaktoren und Kolonisationsfaktoren des Keimes, Störungen des Zellzyklus und DNA-Schäden der infizierten Zelle, oxidativer Stress, Stickstoffoxide, Entzündungsmediatoren und die Aktivierung von spezifischen Todeszellrezeptoren (Wagner et al., 1997; Mehmet et al., 2000; Nagata et al., 1995; Fan et al., 2000; Adams et al., 1998; Vaux et al., 1999; Ashkenazi et al., 1998; Green et al., 1998).

Aus der Fülle an Veröffentlichungen über den Apoptoseweg von *H.pylori*, zeichnen sich unter anderem zwei Wege ab, die beide in die Aktivierung einer Caspasen-Kaskade einmünden und zur Apoptose der Zellen führen. Die cysteinhaltigen, aspartatspezifischen Proteasen, kurz als Caspasen bezeichnet, gehören zur Familie der Proteasen und spielen eine zentrale Rolle im Apoptosesystem der Zelle (Cohen et al., 1997; Thornberry et al., 1998).

Bild 1.1 zeigt schematisch die Zusammenhänge und Abläufe dieser beiden Wege. Einer dieser Wege [1] wird über *Todesrezeptoren*, wie den CD95/Fas-Rezeptor vermittelt, der zur Superfamilie der TNF-Rezeptoren gehört. Todesrezeptoren sind zellständige Oberflächenrezeptoren, die Signale von Todesliganden empfangen und über Adapterproteine an die Zelle weitergeben können (Ashkenazi et al., 1998). Unter physiologischen Bedingungen reguliert das Fas-System die Immunantwort, indem es aktivierte Lymphozyten eliminiert (Leonardo, 1996). Eine Infektion mit *H.pylori* kann das CD95/Fas-System *in vivo* und *in vitro* direkt, oder indirekt über Entzündungsmediatoren, wie TNF- α und IFN- γ , in erhöhtem Maße aktivieren (Rudi et al., 1998; Wang et al., 2000; Jones et al., 1999; Noach et al., 1994). Dies führt zu einer erhöhten Expression des CD95/Fas-Rezeptors auf Epithelzellen und des CD95/Fas-Liganden auf T-Lymphozyten. Die synergistische Wirkung von *H.pylori* sowie den Entzündungsmediatoren auf die Fas-Expression und daran anschließend die Interaktion des Liganden mit dem Rezeptor führt nachweislich zu einer erhöhten Apoptoserate der Zellen (Wang et al., 2000). Ferner wurde in *H.pylori* infizierten Magenbiopsien eine erhöhte Expression des TNFR1-Rezeptors festgestellt, einen wichtigen Rezeptor über den TNF- α Apoptose vermittelt (Hasumi et al., 2002; Houghton et al., 2000; Neu et al., 2003). Die Rezeptoren TNFR1, wie auch CD95/Fas fungieren unabhängig voneinander. Dabei bindet das Adapterprotein FADD an den CD95/Fas-Rezeptor und das Adapterprotein TRADD an den TNFR1-Rezeptor. Die Adapterproteine aktivieren beide die Caspase 8 über eine sogenannte „death effector domain“ (DED). Die Caspase 8 ist eine Initiator-Caspase der Caspasen-Kaskade, über die nachweislich Apoptose in den Zellen ausgelöst wird (Wong et al., 1994; Potthoff et al., 2002; Ashkenazi et al., 1998; Hasumi et al., 2002).

Ein anderer Apoptoseweg [2] wird über Mitochondrien induziert, die für den oxidativen Energiestoffwechsel der Zellen eine wichtige Rolle spielen (Green et al., 1998). *H.pylori* kann indirekt via BID und direkt durch zellulären Stress zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma der Zelle führen (Potthoff et al., 2002; Maeda et al., 2002; Shibayama et al., 2001). Dort bindet das Cytochrom c an Apaf-1 (Zou et al., 1999), die zusammen einen Komplex bilden, der als „Apoptosom“ bezeichnet wird, der ebenfalls über eine Initiator-Caspase, Caspase 9, die Kaskade der Caspasen aktivieren kann (Green et al., 1998).

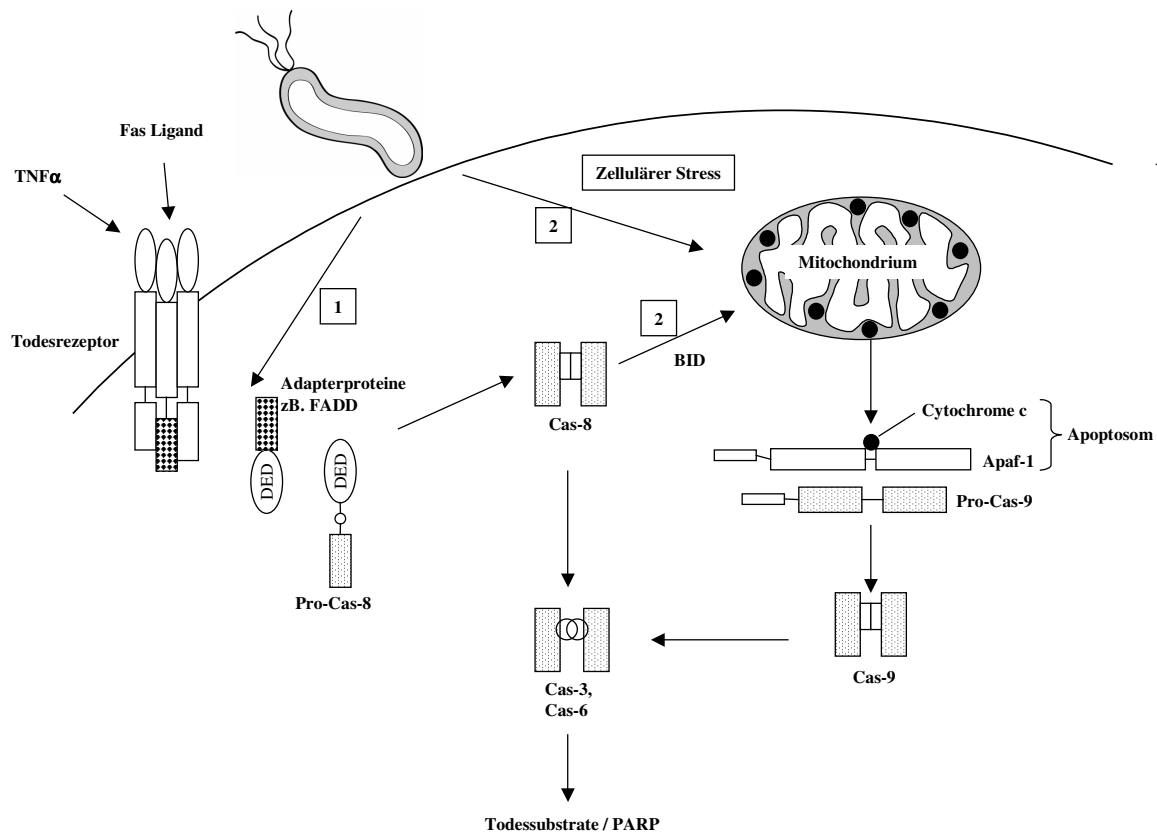


Bild 1.1. Schematische Darstellung der beiden Apoptosewege, im Text mit [1] und [2] gekennzeichnet, die beide die Caspasekaskade aktivieren. Die eigentlich unabhängigen Todesrezeptoren in Weg [1], TNFR1 und CD95/Fas, sind der Übersicht wegen in einem Rezeptor zusammengefasst (modifiziert nach Potthoff et al. (2002), S. 375).

Die menschlichen Caspasen lassen sich in drei Gruppen einteilen (Green et al., 1998). Gruppe I besteht aus den Caspasen 1, 4 und 5, die vermutlich vorwiegend an Entzündungsreaktionen beteiligt sind (Komiyama et al., 1994; Thornberry et al., 1998). Gruppe II besteht aus den Caspasen 2, 3 und 7. Sie sind Haupteffektor-Caspasen der Apoptose und werden von Caspasen der Gruppe III, den sogenannten Initiator-Caspasen gespalten (Caspasen 6, 8, 9 und 10). Die Caspasen liegen im unstimulierten Zustand der Zelle in Form inaktiver Procaspasen im Zytoplasma der Zellen vor und werden auf einen Stimulus hin proteolytisch aktiviert. Die proteolytische Aktivierung erfolgt durch eine Spaltung der Peptidketten nach Aspartatresten durch die Initiator-Caspasen, die wiederum, wie oben bereits erwähnt, durch Adaptermoleküle oder Apoptosome aktiviert werden (Green et al., 1998; Thornberry et al., 1998).

Die Caspase 3 ist eine wichtige Haupteffektor-Caspase, die für die proteolytische Spaltung einiger zelltodinduzierender Substrate im komplexen Ablauf der Apoptose, wie beispielsweise des nukleären Enzym poly(ADP-ribose)polymerase (PARP), verantwortlich ist (Cohen et al., 1997; Kim et al., 2000; Ashktorab et al., 2002; Simbulan-Rosenthal et al., 1998). PARP ist

an der Reparatur der DNA und an der Regulation des Zellzyklus wesentlich beteiligt. Durch seine Spaltung fungiert PARP als wichtiger Auslöser der Apoptose und wird mit der Fragmentierung der DNA im Zellkern in enge Verbindung gebracht (Simbulan-Rosenthal et al., 1998; D'Amours et al., 1998; Ashktorab et al., 2002).

1.2 *H.pylori* und der Transkriptionsfaktor Nuclear factor *kappa*B

1.2.1 Struktur von NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wurde 1986 zum ersten Mal in ausdifferenzierten B-Lymphozyten, als DNS-Bindungsaktivität beschrieben, die spezifisch von dem Enhancer der leichten κ -Ketten der Immunglobuline gebunden wurde (Sen and Baltimore, 1986). Dieser Transkriptionsfaktor konnte jedoch auch in vielen anderen Zelltypen nachgewiesen werden. Er besteht aus verschiedenen Untereinheiten, die sich untereinander zu Homo- und Heterodimeren verbinden können. Die Bildung von Dimeren ist wichtig für die spätere Bindung an DNA-Sequenzen (Bressler et al., 1993). Es wurden verschiedene Untereinheiten identifiziert, die alle zur Familie der Rel-Proteine gehören. Diese sind p50, p65, p52, RelB, ν -rel und das c-Rel, wobei sie alle eine mehr oder weniger identische Rel-Homologie-Domäne (RHD) besitzen. Diese besteht aus 300 Aminosäuren und reguliert die Bildung von Dimeren, sowie die Bindung an I- κ B-Proteine und an κ B-Sequenzen der DNA. Am C-terminalen Ende der RHD-Domäne liegt eine aus basischen Aminosäuren bestehende nukleäre Signal-Sequenz, die wesentlich für den aktiven Transport von NF- κ B in den Zellkern verantwortlich ist (Grimm et al., 1993; Siebenlist et al., 1994).

NF- κ B besteht vorwiegend aus dem p50/p65 Heterodimer. Das Molekulargewicht von p65 beträgt 65kDa und das von p50 105kDa. Es hat sich gezeigt, dass das p50/p65-Heterodimer im Vergleich zu anderen Dimeren, auf ein Signal hin schneller in den Zellkern gelangt, eine höhere Affinität zur spezifischen DNA-Bindesequenz besitzt und damit schneller die Transkription der entsprechenden Zielgene aktivieren kann (Zabel et al., 1991). Die Untereinheit p50 besitzt selbst kein Transaktivierungspotential und dient offenbar nur dazu die Bindungsaktivität an die DNA zu steigern (Grimm et al., 1993). Im nicht stimulierten Zustand ist NF- κ B im Zytoplasma der Zelle lokalisiert. Es ist dort an ein Inhibitorprotein, das I- κ B, über

eine nicht-kovalente Bindung gebunden, das eine Aufnahme in den Zellkern verhindert, indem es Kerntranslokationssignale maskiert. Auch das I- κ B-Protein besteht aus verschiedenen Isoformen, die unterschiedliche Affinitäten gegenüber den Untereinheiten des NF- κ B besitzen. Diese sind I- κ B- α , I- κ B- β , I- κ B- ϵ , p105, p100 und Bcl-3. Von diesen bindet vor allem das I- κ B- α an Dimere, die eine p65-Untereinheit besitzen (Siebenlist et al., 1994; Neurath et al., 1998).

1.2.2 Aktivierung von NF- κ B

Die NF- κ B-Aktivierung in der Zelle ist ein Symptom für Zellstress. Zu den NF- κ B Aktivatoren zählen vor allem Entzündungsmediatoren, wie TNF- α , IL-1 β , Viren, Bakterien, Sauerstoffradikale und physikalischer Stress, wie UV-Licht.

Auch *H.pylori* stimuliert NF- κ B in einer infizierten Zelle. Dabei aktiviert *H.pylori* über einen noch unbekanntem Mechanismus direkt oder indirekt die beiden Adapterproteine TRAF2 und TRAF6 in der Zelle, die beide zur Aktivierung der NF- κ B aktivierenden Kinase (NIK) führen, die ein Mitglied der MAP/MEKK Familie ist (Peek et al., 2001). NIK aktiviert die beiden Kinasen I- κ B Kinase- α (IKK- α) und β (IKK- β), was in einem weiteren Schritt die Phosphorylierung des I- κ B- α stimuliert. Das führt anschließend zu einer über Proteosomen (26S) vermittelten Degradation des phosphorylierten I- κ B- α . Dadurch wird die Bindung von NF- κ B gelöst und das freie NF- κ B transloziert in den Zellkern (Maeda et al., 2000, Peek et al., 2001). Im Zellkern bindet es an eine spezifische DNA-Consensussequenz, 5'-GGG RNN YYC C-3' (R=Purin, Y=Pyrimidin, N=Nukleotide), welche in der Promotor-, und Enhancerregion vieler Gene gefunden wird (Zabel et al., 1991; Siebenlist et al., 1994).

Im Zellkern gebunden reguliert NF- κ B die Transkription zahlreicher Gene, die Abwehrfunktionen in der Zelle oder im Gesamtorganismus übernehmen (Peek et al., 2001). Zielgene sind unter anderem Gene, die für Entzündungsmediatoren wie das IL-8, IL-6 und IFN- γ kodieren oder aber Gene, die für die Ausbildung von Immunrezeptoren wie MHC-Klasse I und II Rezeptoren, oder Akutephase-Proteine verantwortlich sind (Baeuerle et al., 1994; Schreck et al., 1991; Griffin et al., 1989; Schmid et al., 1991). Die regulierende Rolle von NF- κ B ist nicht auf Entzündungsmediatoren und Immunrezeptoren beschränkt. So ist NF- κ B auch an der Transkription von iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) beteiligt, einer Synthase, die die

Produktion von Stickstoffmonoxid katalysiert, das in Verbindung mit Superoxiden zu Zellschäden führen kann (Lindahl et al., 1972; Lim et al., 2001; Watanabe et al., 2000; Mizuki et al., 2000; Galla et al., 1993).

Weiterhin greift NF- κ B auch regulierend in das Zellwachstum und den Zelltod ein (Baichwal et al., 1997). Bild 1.2 zeigt die schematische Darstellung des Signalweges von NF- κ B, das nach einem Schema von Peek et al. (2001) modifiziert wurde. Im Vergleich zu *H.pylori* aktivieren TNF- α und IL-1 β diese Signalkaskade über spezifische Rezeptoren. Dabei bindet TNF- α an den TNFR1 Rezeptor, der unter anderem via TRADD, TRAF2 und in Folge NF- κ B aktiviert (Hsu et al., 1995). IL-1 β bindet ebenfalls an einen spezifischen Rezeptor, den IL-1 Rezeptor und aktiviert NF- κ B über TRAF6 (Cao et al., 1996).

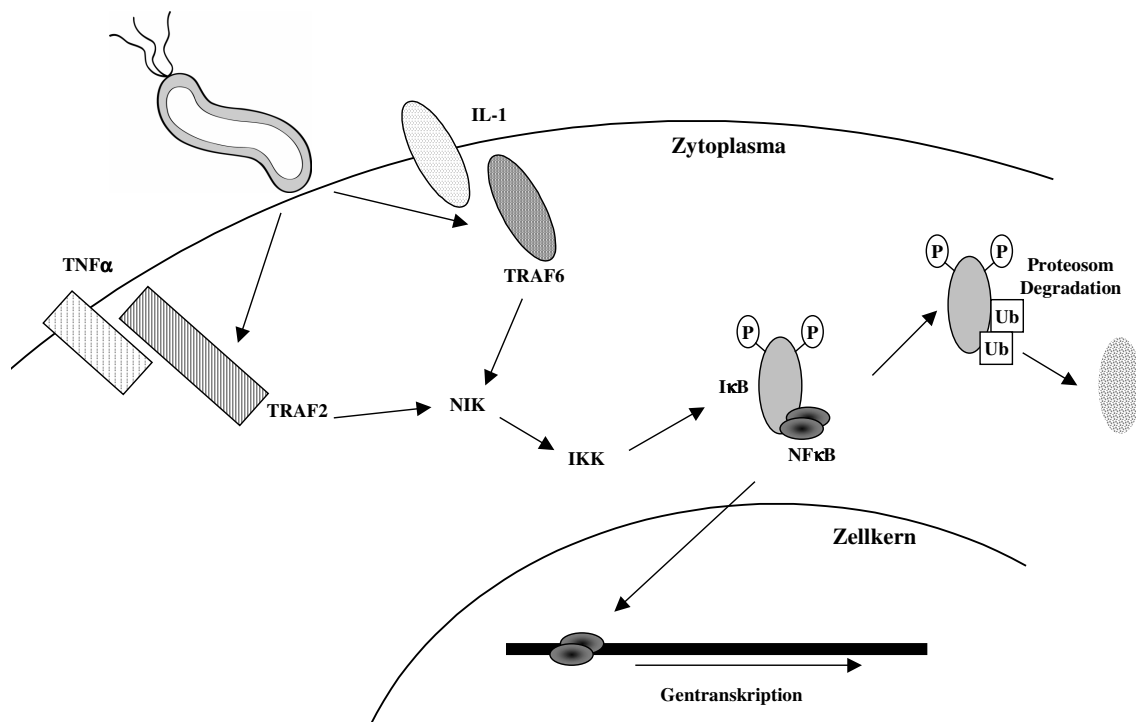


Bild 1.2. Schematische Darstellung der Signaltransduktionskette von NF- κ B (modifiziert nach Peek et al. (2001); S. G526)

1.3 Die Parietalzelle – ein *in vitro* Modell der Atrophie

H.pylori besiedelt bevorzugt die Bereiche des Magenantrums mit einem etwas höher gelegenen pH-Wert und nur selten die Bereiche des Magenkorpus und des Magenfundus. Hauptursache dafür mag in erster Linie sein, dass die Ureaseaktivität des Keimes nicht ausreicht die

Säure, die durch die unmittelbare Produktion und Sekretion der Parietalzellen in der Korpusregion in höherer Konzentration vorliegt, durch den entstehenden Ammoniak abzupuffern. Darüber hinaus hemmt ein sehr saures Milieu das bakterielle Wachstum (Logan et al., 1995; Blaser et al., 1998).

Im Initialstadium führt *H.pylori* außerdem zu einer fast vollständigen Achlorhydrie des Magens, die den Keimen die Kolonisation der antralen Mukosa zusätzlich erleichtert. Ursache hierfür ist eine temporäre Hemmung der Säuresekretion der Parietalzellen, die offenbar zum einen durch eine Keim-Zell-Interaktion durch keimspezifische Faktoren, zum anderen durch die bei der Immunantwort des Wirtes freigesetzten Entzündungsmediatoren herbei geführt wird (El-Omar et al., 1997; McColl et al., 1998).

In diesem Kontext konnten *in vitro* Versuche von M. Gööz et al. (2000) zeigen, dass *H.pylori* die H^+/K^+ ATPase, die wesentliche Bedeutung für die Säuresekretion der Parietalzellen besitzt, über intrazelluläre Proteinkinasen hemmt. Weiterhin konnte Jaup et al. (2001) bei einer Riesenfaltengastritis im Magenkorpus und Fundus beobachten, dass die Parietalzellen während einer *H.pylori* Infektion, sowohl morphologischen, als auch sekretorischen Veränderungen unterworfen waren. Auslöser hierfür waren vermutlich Entzündungsmediatoren, wie das IL-1 β , die zu dilatierten Canaliculi und zu einer reduzierten Säuresekretion der Parietalzellen führten (Jaup et al., 2001; Schepp et al., 1998). Im Verlauf kehrt bei antrumbetonter Gastritis die Säuresekretion zurück. Dabei entwickelt sich im infizierten Wirtsorganismus eine Hypergastrinämie, die zu einer gesteigerten Säureproduktion der Parietalzellen führt (El-Omar et al., 1995; Moss et al., 1993). Dabei scheint eine hohe Säuresekretion der Parietalzellen vor einer Kolonisation des Magenkorpus mit *H.pylori* zu schützen (Gillen et al., 1998; Rad et al., 2003).

Die Parietalzelle ist verantwortlich für die Produktion der Magensäure und ist in den Magendrüsen der Korpus- und Fundusregion lokalisiert. Hier befindet sie sich vorwiegend in der Halsregion und der mittleren Region der Drüsen. Mit einem Durchmesser von 16 bis 20 μm sind die Parietalzellen die größten Zellen der Magenschleimhaut und ragen häufig in die Lamina propria und in das Drüsenlumen vor. Sie besitzen einen großen mittelständigen Zellkern, zahlreiche Mitochondrien, sowie ein ausgeprägtes Netz an intrazellulären Canaliculi und Tubulovesikel. Die Lipidmembran der Canaliculi enthält das Enzym H^+/K^+ ATPase, das H^+ -Ionen im Austausch gegen K^+ -Ionen in die Canaliculi der Parietalzelle ausschleust und somit der Motor für die Säureproduktion der Zelle ist. Im aktiven Zustand der Zelle öffnen sich die Canaliculi zum Drüsenlumen hin. Die Oberfläche der Parietalzelle besteht aus zahlreichen

Mikrovilli, welche die Oberfläche der Zelle vergrößern und den aktiven und funktionellen Zustand der Zelle widerspiegeln (Schepp et al, 1989).

Bild 1.3 zeigt die elektronenmikroskopische Abbildung einer funktionsfähigen Parietalzelle.

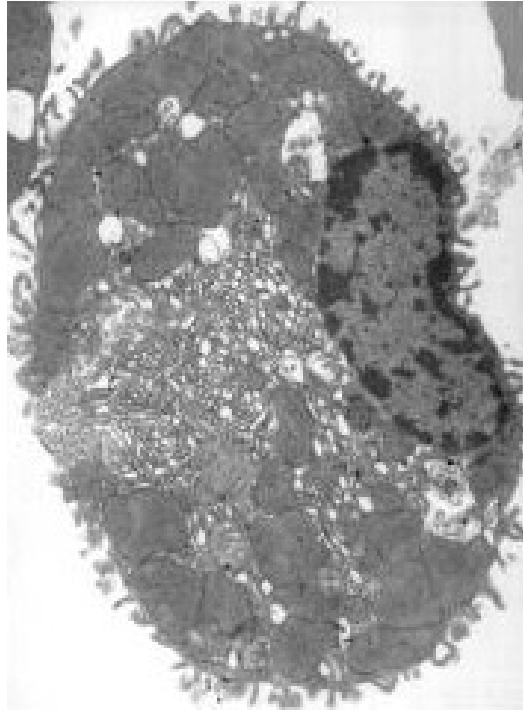


Bild 1.3. Elektronenmikroskopisches Bild einer funktionsfähigen Parietalzelle; Zelldurchmesser ca. 16 bis 20µm; Vergrößerung 5700fach

Bei Patienten mit einer primär niedrigen Säuresekretion ist das Bakterium fähig die Korpusregionen zu besiedeln. Eine Gastritis im Magenkorpus führt häufig zu einer progressiven Atrophie mit Verlust von Parietalzellen und einer weiteren Abnahme der Säurebildung. Damit sinkt das Risiko von Duodenalulzera, aber das Risiko ein Magenkarzinom zu entwickeln steigt (El-Omar, 2001). Ursache einer primär geringeren Säuresekretion wird in der IL-1 β -Expression gesehen, die bei manchen Patienten während der *H.pylori* Infektion hochreguliert wird (Brzozowski et al., 1999; Rad et al., 2003). IL-1 β wirkt dabei direkt über IL-1 Rezeptoren auf die Parietalzellen und hemmt die Säureproduktion (Schepp et al., 1998). In diesem Zusammenhang haben Studien eine Assoziation zwischen IL-1 Polymorphismen mit hoher IL-1 β Sekretion und Hypochlorhydrie sowie Magenkarzinomen gefunden (El-Omar et al., 2001; Rad et al., 2003).

Ein weiterer Mechanismus eine korpusdominante atrophische Gastritis zu entwickeln wird in einer Therapie mit H⁺/K⁺ Inhibitoren gesehen. Eine Therapie mit H⁺/K⁺ Inhibitoren hemmt ebenfalls die Säureproduktion der Parietalzellen und führt dadurch insgesamt zu einer Erhö-

hung des pH-Wertes im Magen. Da sich auch der pH-Wert im Korpus- und Fundusbereich erhöht, verlagert sich die *H.pylori* Infektion unter diesen Bedingungen aus dem Antrum in Korpus- und Fundusbereiche (Scott et al., 1998). Das Überleben des Keimes, der ein gewisses saures Milieu benötigt, könnte in diesem Stadium der Atrophie nur durch einen Rückzug in tiefere, noch vorhandene Drüsenabschnitte gewährleistet sein. Hier besteht nun auch eine große Wahrscheinlichkeit, dass der Keim einen direkten Kontakt mit den Parietalzellen aufbauen kann.

Bild 1.4 zeigt mehrere *H.pylori* Bakterien in einer Magendrüse, nahe der sekretorischen Canaliculi der Parietalzelle, nach einer Behandlung mit Pantoprazol, einem H^+/K^+ Inhibitor. Dies könnte den gerade beschriebenen Rückzug der Bakterien nachhaltig unterstreichen.

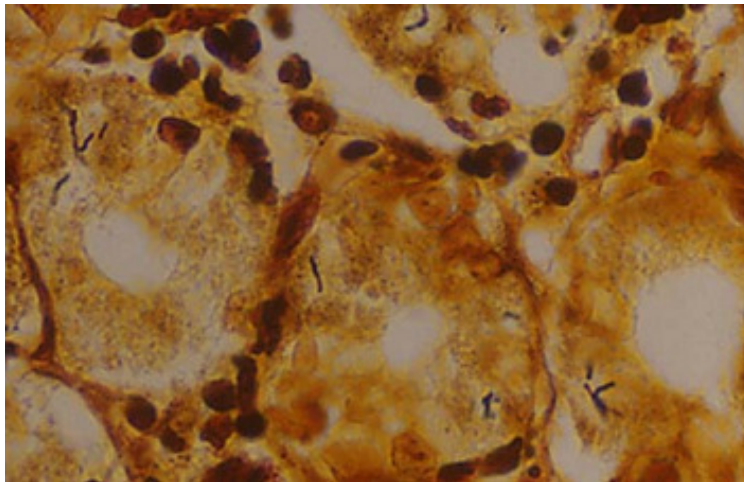


Bild 1.4. Schnittbild von *H.pylori* infizierten Magendrüsen;
zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Stolte, Institut für Pathologie, Bayreuth

Es wird deutlich, dass sowohl eine akute, wie auch chronische Infektion mit *H.pylori* einen Einfluss auf die Parietalzelle und ihre Säureproduktion nimmt. Daher ist es in der vorliegenden Arbeit ein besonderes Interesse, den direkten Effekt des Keimes *in vitro* auf die Parietalzelle zu untersuchen.

Das in diesen Versuchen verwendete Parietalzellmodell könnte ein spätes Stadium einer *H.pylori* induzierten Korpusatrophie darstellen. Auf diese Weise können die Ergebnisse der Untersuchungen zu einem besseren Verständnis der atrophischen Gastritis und der Karzinogenese des Keimes *in vivo* beitragen.

1.4 Aufgabenstellung dieser Arbeit

Eine Infektion mit *Helicobacter pylori* führt zu einer chronischen Gastritis, die im Verlauf zu einer Atrophie der Magenmukosa führt. Die Atrophie ist durch den Verlust von Drüsengewebe, vorwiegend durch Apoptose, gekennzeichnet. Die Parietalzellen sind spezialisierte Epithelzellen, die ca. 40% aller Epithelzellen ausmachen und für die Säureproduktion verantwortlich sind.

Da der Keim sowohl bei einer akuten, wie auch chronischen Infektion einen Einfluss auf die Parietalzellen nimmt, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, wie sich *H.pylori* *in vitro* auf diese Zellpopulation auswirkt und auf welche Weise der Keim zu einem Verlust der Parietalzellen führt. Weiterhin sollten verschiedene Mechanismen der Apoptose-Induktion untersucht werden. Für die vorliegende Arbeit wurde daher ein *in vitro* Zellmodell bestehend aus Parietalzellen der Ratte gewählt.

Ein Ziel dieser Arbeit war mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und der TUNEL-Reaktion zu zeigen, ob *H.pylori* Apoptose in Parietalzellen der Ratte hervorruft. Weiterhin sollte die Auswirkung einzelner bakterieller Virulenzfaktoren und die Auswirkung des Zytokins TNF- α auf die Apoptose der Zellen mit der TUNEL-Reaktion quantifiziert werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war, den sehr komplexen Signalwege der Apoptose *in vitro* in den Parietalzellen näher zu untersuchen. Hierfür sollte mit einem ELISA eine mögliche Caspase 3 Aktivierung und damit der Apoptoseweg über die Caspasen nachgewiesen werden. Insbesondere sollte in diesem Zusammenhang auch der Nachweis über eine *H.pylori* induzierte Aktivierung von NF- κ B mittels eines EMSA erbracht werden und die Relevanz dieses Transkriptionsfaktors für die Apoptose in diesem Zellsystem untersucht werden. Von Interesse war zudem der Nachweis einer Apoptose induzierenden Stickstoffmonoxidproduktion, als mögliche Endreaktion in der Signaltransduktionskette der *H.pylori* induzierten Apoptose in Parietalzellen.

Diese Untersuchungen können möglicherweise zum besseren Verständnis der *H.pylori* induzierten Apoptose *in vivo* beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Für die Isolation der Parietalzellen wurden die Mägen von 6 Wochen alten, weiblichen Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht zwischen 180 bis 200g verwendet.

2.1.2 *Helicobacter pylori* und andere Keime

Für die Stimulationsversuche wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Bakterienstämme verwendet, die in der folgenden Tabelle zusammen mit ihrer Herkunft aufgelistet werden.

Stämme	Herkunft
Wildtyp (WT) G27	Eigene Laborstämme
Laborstamm Tx30	
Laborstamm 2808	
G27 Mutante cagA	Antonello Covacci, Italien
G27 Mutante cagE	
G27 Mutante cagF	
G27 Mutante cagN	
G27 Mutante cagH	
<i>S.aureus</i>	Mikrobiologie, Klinikum Rechts der Isar, München
<i>C.jejunii</i>	

Tabelle 2.1. Verwendete Keime

2.1.3 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

A/B	Bio-RAD, Deutschland
Agarose	Roth, Deutschland
ApoAlert Caspase-3 Assay Kit	Clontech, USA
Bestandteile des Kit:	
▪ Cell Lysis Buffer	
▪ 2x Reaction Buffer	
▪ DTT (1M)	
▪ Caspase-3 Substrate, DEVD-pNA (1mM)	
▪ Caspase-3 Inhibitor, DEVD-fmk (1mM)	
▪ pNA (100mM)	
APS (10%)	Sigma, Deutschland
BCA Protein Assay Kit	Pierce, USA
Bleicitrat (2,66%)	Reynolds, USA
Borsäure	Sigma, Deutschland
Bouin-Lösung	Sigma, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Deutschland
BSA (pH=7,0)	ICN Biomedicals, USA
Calciumchlorid	Merck, Deutschland
Camptothecin	Sigma, Deutschland
Cell Tak	Becton Dickinson, Bedford, USA
Chloroform	Merck, Deutschland
DAB Substrat Kit für Peroxidase	Vector Laboratories Inc., USA
DDSA	Merck, Deutschland
Deoxynukleotid-Mix (dNTPs)	Roche/Applied Biosystems, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Deutschland
DMEM/F ₁₂	GibcoBRL, Deutschland
DMP-30	Merck, Deutschland
DMSO	Sigma, Deutschland
DTT	AppliChem, Deutschland
EDTA/Titriplex III	Merck, Deutschland
EGF	Sigma, Deutschland
EGTA	Sigma, Deutschland
Eisessig (Essigsäure 100%)	Merck, Deutschland
Ethanol (70%)	Merck, Deutschland
Etidiumbromid	Merck, Deutschland
Ficoll™ 400	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
Gentamycin	Sigma, Deutschland
Glutaraldehyd (2,5%)	Serva, Deutschland
Glycerin (wasserfrei)	Merck, Deutschland
Glycidether	Merck, Deutschland

Hepes	Serva, Deutschland
Hydrocortison	Sigma, Deutschland
In Situ Cell Death Detection Kit, POD	Boehringer Mannheim, Deutschland
Isopropylalkohol	Merck, Deutschland
ITS	Sigma, Deutschland
Kaisers'Glyceringelatine	Merck, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Deutschland
L-NMMA	Sigma, Deutschland
Lipofectin	Life Technologies™, USA
Magermilchpulver	AppliChem, Deutschland
Magnesiumchlorid (25mM)	Roche/Applied Biosystems, Deutschland
Magnesiumsulfat	Merck, Deutschland
MasterMix	Qiagen, Deutschland
Matrigel	Becton Dickinson, Bedford, USA
2-Mercaptoethanol	Merck, Deutschland
Methanol	Merck, Deutschland
MNA	Merck, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Deutschland
Natriumbikarbonat	Merck, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Deutschland
Natriumcitrat	Merck, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Deutschland
NuSieve-Agarose	FMC Bio Products, USA
Osmium (1%)	Mikrotechnik, Deutschland
Percoll	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
PIC	Sigma, Deutschland
PMSF	Sigma, Deutschland
Poly-(dIdC)	Boehringer Mannheim, Deutschland
Pronase E (aus Streptomyces griseus)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
PSI	Sigma, Deutschland
Quickszint 2000 Scintillationscocktail	Zinnser Analytic, Deutschland
Random Primer (dN) ₆	GibcoBRL, Deutschland
Reaktionspuffer (5x)	GibcoBRL, Deutschland
Reverse Transkriptase, Superscrip™ II	GibcoBRL, Deutschland
RNase freies H ₂ O	Qiagen, Deutschland
RNase Inhibitor (20U/μl)	Roche/Applied Biosystems, Deutschland
Sucrose (Saccharose)	Merck, Deutschland
SuperFect ^R Transfektionsreagenz	Qiagen, Deutschland
T4- PKN	Boehringer Mannheim, Deutschland

T4-PKN-Puffer	Boehringer Mannheim, Deutschland
TEMED	Sigma, Deutschland
TNF- α	Sigma, Deutschland
TNF-R1-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, USA
TRIS ultrapure	Merck, Deutschland
Triton X-100	Bio-RAD, Deutschland
TRIZOL-Reagenz	GibcoBRL, Deutschland
Trypanblau	Seromed Biochrom, Deutschland
Trypsin-EDTA	GibcoBRL, Deutschland
Uranylacetat (2%)	Reynolds, USA
Wasserstoffperoxid 30%	Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland
Xylencyanol	Merck, Deutschland
$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP	NEN Life Science, Deutschland

2.1.4 Oligonukleotide und Antikörper

Antisense und Missense Oligonukleotide	Institut MWG-Biotech, Deutschland
Decoy-Oligonukleotide	Institut MWG-Biotech, Deutschland
FAM 5'-markierte Oligonukleotide	Institut MWG-Biotech, Deutschland
Polyklonale Antikörper p65 und p50 (EMSA)	Santa Cruz Biotechnology, USA

2.1.5 Geräte

β -Zähler LS 1801	Beckman, Deutschland
Blutagarplatten für <i>H.pylori</i> Kultivierung	Mikrobiologie, Klinikum rechts der Isar
Cellulose Acetat Filter, Porengröße 0,2 μm	Gelman Laboratory, USA
Densitometer ATB 1550	Bio Merieux Sa, Frankreich
Gegenstromelutriator:	
- J 2-21 M/E-Zentrifuge	Beckman Instruments, Deutschland
- Elutriationsrotor JE 6 B	Beckman Instruments, GB
- Elutriationstrennkammer	Beckman Instruments, Deutschland
- Masterflex-Pumpe Typ 7521	Cole Parmer Instruments Co., USA
- Pumpenkopf Typ 7014	Cole Parmer Instruments Co., USA
Gelelektrophoresesystem für Agarose-Gele	BioRAD, Deutschland
Gelelektrophorese für EMSA	Sigma, Deutschland
Glasobjektträger, Durchmesser 24 mm	Assistent, Schultheiß, Deutschland

Homogenisator	Braun, Deutschland
Kulturplatten:	
- 6-Well Platte	Becton Dickinson, Deutschland
- 96-Well Platte	
- Petrischalen	
Mastercycler 5330	Eppendorf, Deutschland
Mikroskope:	
- Lichtmikroskop	Zeiss, Deutschland
- Elektronenmikroskop-EM10A	Zeiss, Deutschland
Microplate Reader	BioRAD, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Deutschland
NICK™ Säulen mit Sephadex G-50 Gel	Pharmacia Biotech, USA
Phosphorimager™ Kassette	Molecular Dynamics, USA
Phosphorimager 445 SI Scanner	Molecular Dynamics, USA
Photometer DU 640 Spectrometer	Beckman, Deutschland
Power Supply; Model 500/1000	BioRAD, Deutschland
Ultraschallgerät/Branson Sonifier 250	Branson Schallkraft, Deutschland
Zentrifugen:	
- Rotenta/AP	Hettich, Deutschland
- Eppendorf 5415 C	Eppendorf, Deutschland
- Eppendorf Kühlzentrifuge 5403	Eppendorf, Deutschland

2.1.6 Auswertung

SPSS für Windows, Version 11.5	SPSS, Inc., USA
ImageQuaNT™ Computersoftware	Molecular Dynamics, USA
ONE-Dscan Programm, Version 1.2 (One-Dimensional-Gel-Analysis)	Scanalytic Inc., USA
Video-Dokumentationssystem	MWG-Biotech, Deutschland

2.1.7 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

2.1.7.1 Isolation der Parietalzellen

Stammlösungen:

Stocklösung I (10x):	NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	5mM
	Na ₂ HPO ₄ xH ₂ O	10mM
	NaHCO ₃	200mM
	NaCl	700mM
	KCL	50mM
	D(+)-Glucose	110mM
Hepes (10x):	Hepes	500mM
EDTA (100x):	Tritiplex III	200mM
Lösung IV (10x):	CaCl ₂	100mM
	MgCl ₂ x6 H ₂ O	150mM

Inkubationslösungen:

Lösung A:	Stocklösung I (10x)	100ml
	Hepes (10x)	100ml
	EDTA (100x)	3,5ml
	H ₂ O dest.	ad.1000 ml
	pH 7,8 mit 2N KOH	
	BSA	10g
Lösung B:	Stocklösung I (10x)	100ml
	Hepes (10x)	100ml
	Lösung IV (10x)	10ml
	H ₂ O dest.	ad.1000 ml
	pH 7,4 mit 2N KOH	
	BSA	5g
Pronase-Lösung:	Pronase E	1,3 mg/ml
	gelöst in Lösung A.	

Elutriationspuffer:

NaCl	140mM
MgSO ₄ x7 H ₂ O	1,2mM
CaCl ₂	1mM
Hepes	10mM
D(+)-Glucose	11,1mM
pH 7,4 mit KOH	2N
BSA	0,1%
DTT	0,01%

Dichtegradientenlösungen:

Stammlösung B:	MgSO ₄ x7 H ₂ O	12mM
	CaCl ₂	12mM
Stammlösung C:	NaCl	118mM
	Hepes	14mM
	TRIS (Ultrapure)	7mM
	KH ₂ PO ₄	3mM
	K ₂ HPO ₄	2mM
Percoll-Lösung:	Stammlösung C	7ml
	Percoll	60 ml
	BSA	1g
	DTT	0,01g
Puffer-Lösung:	Stammlösung B	10ml
	Stammlösung C	10ml
	H ₂ O dest. steril	80ml
	D (+) Glucose	0,4g
	Carbogen-Begasung 30 Minuten	
	pH 7,4 mit TRIS	1M

2.1.7.2 Kultivierung der Parietalzellen

Alle Kulturmedien wurden vor Gebrauch mit einem 0,2 µm Cellulose Acetat Filter steril filtriert.

Kulturmedium I (KM I):

DMEM	15,57g/l
ITS	5,0ml/l
Gentamycin (100µg/ml)	1ml/l
Hydrocortison (10µg/ml)	100µl/l
BSA	2g/l
pH 7,4 mit TRIS	1M
EGF (25ng/ml)	25µl/50ml KM
Kurz vor der Kultivierung	

Kulturmedium II (KM II):

DMEM	15,57g/l
pH 7,4 mit TRIS	1M

0,5M PBS:

NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	1,44g
KH ₂ PO ₄	0,2g
H ₂ O dest. steril	ad.1000 ml
pH 7,4	

2.1.7.3 TUNEL-Reaktion

Fixierungslösung:

Bouin	9,5ml
Eisessig	0,5ml

Blockierungslösung:

H ₂ O ₂	0,5ml
Methanol	49,5ml

Lysierungslösung:

Nacitrat	0,1g
H ₂ O	100ml
Triton X-100	100µl

TRIS-Puffer:

TRIS	1,21g
NaCl	0,58g
H ₂ O dest.	100ml
pH 7,5 mit HCl	5N
Magermilchpulver	1g

2.1.7.4 Präparation der Kernextrakte

Puffer 1:

NaCl	15mM
Mercaptoethanol	15mM
TRIS-HCl	15mM
pH 7,4 mit KOH	2N
PIC	2 Vol. %
PMSF	1mM
Kurz vor dem Versuch	

Puffer 2:

Puffer 1	
EDTA	2mM
EGTA	0,5mM
Sucrose	0,34mM

Puffer 3:

Puffer1	
EDTA	1mM
EGTA	0,25mM
Sucrose	1,37M

Bindungspuffer (BP) (10x):

Hepes	250mM
EDTA	5mM
DTT	20mM
Glycerin	40% (v/v)
NaCl	1M
H ₂ O dest.	32 ml (auf 100 ml)

2.1.7.5 Annealing der NF- κ B und SP-1 OligonukleotideAnnealing-Puffer:

NaCl	100mM
pH 8,0 mit TRIS	10mM
EDTA	0,1mM

2.1.7.6 Radioaktive Markierung der OligonukleotideTE-Puffer:

pH 7,5 mit TRIS-HCl	10mM
EDTA	1mM

2.1.7.7 Agarose-GelelektrophoreseTAE-Puffer (50x):

TRIS	2,0M
Eisessig	1,0M
EDTA	0,1M
pH 8,5	

Laufpuffer (6x):

Ficoll	25%
EDTA	50mM
Bromphenolblau	0,25%
Xylencyanol	0,25%

2.1.7.8 Acrylamid-Gelelektrophorese für den EMSATBE-Puffer (Laufpuffer):

TRIS	108g/l
Borsäure	50g/l
EDTA	5,8g/l
pH 8,3 mit Borsäurekristallen	

Abdichtungsgel:

A/B	2ml
APS	30 μ l
TEMED	30 μ l

Laufgel (7% iges Acrylamidgel):

A/B	5,8ml
Laufpuffer	18ml
TBE (10x)	175 μ l
APS	160 μ l
TEMED	60 μ l

2.1.7.9 Auftragen der Proben des EMSA

Bindungspuffer (10x): siehe unter 2.1.7.4

Ladepuffer (10x):

Ficoll	20%
Bromphenolblau	0,25%

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation und Primärkultur der Parietalzellen

2.2.1.1 Isolation der Parietalzellen

Die Stimulationsversuche für die vorliegende Arbeit wurden an hochdifferenzierten Parietalzellen der Ratte durchgeführt. Um die Parietalzellen von anderen Magenzellen isolieren und in größerer Menge anreichern zu können, wurde eine Methode verwendet, die von Schepp et al. (1989) entwickelt wurde.

Diese Methode erfordert eine Reihe von Arbeitsschritten, die nachfolgend aufgeführt werden.

Für eine Präparation wurden 5 weibliche Sprague-Dawley Ratten verwendet. Diese wurden ca. 3 Minuten mit CO₂ betäubt und durch Genickbruch getötet. Anschließend wurde ihnen der Magen entnommen. Nach Inversion der Mägen, wobei die Magenmukosa nach außen und die Magenserosa nach innen zu liegen kam, wurden die Mägen sackartig mit einem Bindfaden verschlossen. In die umgestülpten Mägen wurde 3 bis 4ml Pronaselösung E injiziert, um den Zellverband außen anzudauen. Die so präparierten Mägen, wurden dann zur enzymatischen Auflösung des Zellverbandes, abwechselnd in Lösung A (35 Minuten), in Lösung B (10 Minuten) und wieder in Lösung A (30 Minuten) unter ständiger Sauerstoffbegasung inkubiert. Lösung A enthielt EDTA, das durch Bildung von Kalziumchelatkomplexen intrazelluläre Bindungen, so genannte „tight junctions“, im Zellverband der Mukosa löst. Durch nachfolgendes, kräftiges Rühren in Lösung B für 8 Minuten wurde der erste Anteil an unfraktionierten Magenzellen gewonnen.

Dann wurden die Mägen erneut für 20 Minuten in Lösung A, ohne Sauerstoffbegasung inkubiert, und anschließendes noch einmal für 8 und 10 Minuten geschüttelt, um die letzten unfraktionierten Magenzellen zu gewinnen. Diese Magenzellfraktionen enthielten alle Typen von Magenzellen, wie ECL-Zellen, Hauptzellen und Parietalzellen, die alle eine unterschiedliche Größe besitzen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind die Parietalzellen mit einem Durchmesser von 16 bis 20µm die größten Zellen des Magenschleimhautepithels. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Trennung der Parietalzellen von anderen kleineren Zellen im sogenannten Gegenstromelutriator zu Nutze.

Der Gegenstromelutriator ist eine Zentrifuge mit einer integrierten Trennkammer, die von E-lutriationspuffer durchflossen wird. Die unfractionierten Zellen werden im Puffer gelöst und bei einer definierten Durchflussrate zunächst in die Trennkammer transportiert. Hier werden sie, durch die wirkende Zentrifugalkraft, an der Trennkammer sedimentiert. Dieser Vorgang wird durch das Stokeschen Gesetz beschrieben.

$$v = \frac{2r^2(\rho_1 - \rho_2)g}{9\eta} \quad (2.1)$$

Dabei sind:

v	Sedimentationsgeschwindigkeit
r	Teilchenradius
ρ_1	Dichte des Feststoffs
ρ_2	Dichte des Flüssigmediums
g	Erdbeschleunigung
η	Viskosität des Flüssigmediums

Gleichung 2.1 besagt, dass die Sedimentationsgeschwindigkeit quadratisch mit dem Zellradius zunimmt. Die Parietalzellen setzen sich damit zuerst an der Wand der Trennkammer ab, gefolgt von den kleineren Zellen. Durch eine Erhöhung der Durchflussgeschwindigkeit des Mediums können die unterschiedlichen Zelltypen aus der Trennkammer ausgewaschen und somit voneinander getrennt werden. Parietalzellen wurden bei einem Durchflussvolumen von 62ml/Minute und einer Rotationsgeschwindigkeit von 2000rpm gewonnen. Diese Parietalzellfraktion enthielt etwa 80% Parietalzellen und 20% andere Zellen. Um die Parietalzellfraktion weiter aufzureinigen, wurden sie vorsichtig auf einen Percoll-Dichtegradienten aufgetragen. Dieser besteht zu 60% aus einer Percoll-Lösung und zu 40% aus einer Puffer-Lösung. Der Gradient entstand durch Zentrifugieren der beiden Lösungen bei Raumtemperatur mit 11.000rpm für 65 Minuten in einer Eppendorfszentrifuge. Der Dichtegradient mit den aufgetragenen Parietalzellen wurde bei Raumtemperatur, mit 2000rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Durch diesen weiteren Reinigungsschritt erhielt man eine nahezu reine Parietalzellfraktion, die konstant bei 98% Parietalzellen lag. Die Anreicherung wurde durch eine Anfärbung der Zellen mit Giemsa bestätigt. Bei dieser Färbemethode färben sich die säureproduzierenden Parietalzellen rot, die pepsinbildenden Hauptzellen blau an. Das Überleben der hochangereicherten Parietalzellen wurde mit Trypanblau (1:10 verdünnt mit 0,5M PBS) vor jeder Kultivierung überprüft und lag bei 98%. Durch die Zugabe von Trypanblau auf die Zellen, färben sich die Zellkerne geschädigter Zellen blau an, gesunde Zellen färben sich nicht an, da hier die Zellwand noch intakt ist.

Abschließend wurden die Parietalzellen in Kulturmedium resuspendiert (siehe auch unter 2.2.2) und ihre Anzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Aus der Präparation von fünf Rattenmägen konnte zwischen $60 \cdot 10^6$ und $80 \cdot 10^6$ Parietalzellen gewonnen werden.

2.2.2 Kultivierung der Parietalzellen

Die Primärkultur von Parietalzellen aus der Magenmukosa von Hasen, wurde von Chew et al. im Detail beschrieben (Chew et al., 1994; Chew et al., 1989). Viele ihrer Methoden wurden auch für die Kultivierung der Parietalzellen der Ratte mit Erfolg verwendet.

Die Kultivierung erfolgte stets unter sterilen Bedingungen, in serumfreien Kulturmedium, da beobachtet wurde, dass Serum das Wachstum von Fibroblasten begünstigt und zusätzlich die Kultivierung der Parietalzellen beeinträchtigte (Chew et al., 1989).

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden die Parietalzellen auf runden Glasobjektträgern mit einem Durchmesser von 24mm kultiviert. Dafür wurden die Objektträger zweimal in Ethanol absolut getaucht und anschließend über einem Bunsenbrenner abgeflammt. Dann wurde je ein Objektträger in ein Well einer 6-Well Platte gelegt, mit einer spitzen, sterilen Pinzette etwas abgekratzt und mit Cell-Tak in einer 1:1 Verdünnung mit 0,5M NaCO_3 beschichtet. Das Abkratzen der Objektträger verbesserte das Anwachsen der Zellen erheblich. Die Objektträger wurden unter der Sterilbank getrocknet. Nach ca. 45 Minuten konnten sie mit den Zellen beschichtet werden, wobei etwa 4 bis $5 \cdot 10^5$ Zellen in 300 μl EGF-haltigem KM I mit einer Pipette auf die Objektträger gegeben wurde. Nachdem die Zellen so eine Stunde anwachsen konnten, wurde noch einmal 700 μl EGF-haltiges KM I vorsichtig hinzugegeben. EGF ist ein Wachstumsfaktor, der das Anwachsen der Parietalzellen unterstützt. In einer feuchten Kammer wurden sie bei 37°C im Brutschrank mindestens 8 Stunden kultiviert.

Zur Kultivierung größerer Mengen an Parietalzellen, zum Beispiel für die Gewinnung von nukleären Extrakten, bewährte sich im Laufe der Versuche die Verwendung von Petrischalen. Sie wurden mit je 250 μl Matrigel, 1:6 verdünnt mit destilliertem H_2O , auf Eis beschichtet und bei geöffnetem Deckel unter der Sterilbank getrocknet. Etwa 2 Stunden später konnten die Platten mit den Parietalzellen beschichtet werden. Hierfür wurden etwa 5 bis $6 \cdot 10^6$ Zellen gelöst in 6ml EGF-haltigem KM I auf die Platten gegeben und für mindestens 8 Stunden in einer

feuchten Kammer bei 37°C im Brutschrank kultiviert, um auf dem Boden der Petrischalen anwachsen zu können.

2.2.3 Stimulationen der Parietalzellen mit *Helicobacter pylori*

In der vorliegenden Arbeit wurde der direkte Einfluss von *Helicobacter pylori* auf die Apoptose der Parietalzelle der Ratte untersucht. Dabei war es wichtig zu untersuchen, wie sich bestimmte Virulenzfaktoren von *H.pylori* auf die Apoptose der Parietalzellen *in vitro* auswirken. Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit verschiedene *H.pylori* Stämme verwendet, die sich hinsichtlich einiger Virulenzfaktoren unterscheiden; folgende Tabelle fasst sie zusammen:

Bakterienstämme	cag-PAI	VacA s1m1	Beweglichkeit
Wildtyp-Stamm (WT) G27	vollständig	+	+
Laborstamm Tx30	-	-	+
Laborstamm 2808	vollständig	+	+
G27 Mutante cagA	CagA Gen defekt	+	+
G27 Mutante cagE	CagE Gen defekt	+	+
G27 Mutante cagF	CagF Gen defekt	+	+
G27 Mutante cagN	CagN Gen defekt	+	+
G27 Mutante cagH	CagH Gen defekt	+	+
<i>S.aureus</i>	-	-	-
<i>C.jejunii</i>	-	-	+

Tabelle 2.2. Verwendete Keime; ein + kennzeichnet das Vorhandensein und ein – das Fehlen eines Faktors

Die beiden *H.pylori*-Stämme G27 und 2808 verfügen beide über eine vollständige cag-PAI, das vacA Gen mit der Allelkonstellation s1m1 und Geißeln für die Fortbewegung. Der *H.pylori* Stamm Tx30 besitzt nur eine unvollständige cag-PAI, ohne das cagA Gen, eine nicht Toxin assoziierte Allelkonstellation s2m2 des vacA Gens und Geißeln für die Fortbewegung (Atherton et al., 1995).

Bei den *H.pylori* G27 Mutanten liegt das jeweilige Gen das in der Tabelle aufgeführt wird defekt vor. Sie sind aber beweglich und besitzen wie aus der Tabelle ersichtlich das vacA Gen mit der Allelkonstellation s1m1.

Bakterien anderer Spezies, wie das grampositive, toxinproduzierende Bakterium *Staphylokokkus aureus* (*S.aureus*) und das gram-negative, ebenfalls toxinproduzierende Bakterium *Cam-*

pylobacter jejunii (*C.jejunii*) wurden als Kontrollen verwendet, um die spezifische, toxische Wirkungen von *H.pylori* an den Parietalzellen zu unterstreichen.

Nachdem die Parietalzellen auf den Glasobjektträgern oder den Petrischalen angewachsen waren, wurden sie mit *H.pylori* und in einzelnen Versuchen auch mit *C.jejunii* und *S.aureus* und mit *H.pylori*-Überständen inkubiert. Vor jedem Stimulationsversuch wurde das KM I der Parietalzellen abgesaugt und 1ml KM II, das nur mit den notwendigsten Nährstoffe über das DMEM angereichert war, vorsichtig auf die Zellen gegeben.

Die Keime wurden auf WC-Blutagarplatten bei 37°C in einem mikroaerophilen Klima (90% N₂, 5% CO₂, 5% O₂) für 48 bis 72 Stunden kultiviert. Die Blutagarplatten für die *H.pylori*-WT-Stämme enthielten DENT, ein Gemisch aus verschiedenen Antibiotika (Vancomycin, Trimetoprim, Cefsulodin, AmphotericinB), gegen die *H.pylori* resistent ist und die eine Kontamination der *H.pylori*-Kultur mit anderen Keimen erschweren. Zusätzlich zu DENT war den Platten für die *H.pylori*-Mutanten noch Kanamycin beigefügt, da sich diese Mutanten durch eine zusätzliche Kanamycinresistenz auswiesen. Der Grund hierfür liegt darin, dass in den jeweiligen *cag* Locus der G27 Mutanten ein Kanamycin-Resistenzgen eingebaut wird, welches das Gen blockiert und seine Funktion ausschaltet.

Vor einer Stimulation der Parietalzellen wurde der Keim von der Blutagarplatte mit einem Wattepinsel abgenommen und in 0,5M PBS resuspendiert.

Da die Keime in den Stimulationsversuchen in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt wurden, musste die Keimzahl vor jedem Versuch bestimmt und die Keimsuspension entsprechend verdünnt werden. Für die Bestimmung der Keimzahl wurde ein Densitometer verwendet. Das Prinzip dieses Messgerätes beruht auf der Streuung eines Lichtstrahls an den in der Suspension gelösten Bakterien. Das transmittierte Licht und das gestreute Licht werden über zwei periphere und eine zentrale Photodiode empfangen. Das Verhältnis aus gestreutem Licht und transmittiertem Licht ist der Dichte der Keimsuspension und damit zur Bakterienkonzentration in der Suspension direkt proportional. Diese kann bei dem verwendeten Messgerät direkt an einer Skala abgelesen werden. Danach entspricht eine Einheit von 1, einer Bakterienkonzentration von $1,5 \cdot 10^8$ Keimen/ml. Von diesen Angaben ausgehend konnte nun die gewünschte Keimmenge in einem bestimmten Volumen errechnet werden. Die Keimmenge wurde in dieser Arbeit in der Bakterienkonzentration MOI angegeben. MOI ist das Verhältnis der eingesetzten Bakterien zur Anzahl der Zellen.

Vor jedem Versuch wurde die Beweglichkeit und damit der Lebenszustand der Bakterien unter einem Lichtmikroskop überprüft. Nur lebende Bakterien wurden in den Versuchen eingesetzt.

Um den Effekt weiterer Virulenzfaktoren wie Lipopolysaccharide und anderer Oberflächenproteine auf die Apoptose der Parietalzellen zu untersuchen, wurden in einigen Versuchen die Keime durch Ultraschallbehandlung und durch Hitzeeinwirkung (60°C für 30 Minuten) inaktiviert, um diese Strukturen zu zerstören. Weiterhin wurden die Keime mit 25µg/ml Chloramphenicol für 30 Minuten inkubiert, um die Proteinbiosynthese des Keimes zu hemmen und um damit zu überprüfen, ob eine de novo Proteinsynthese für die Induktion der Apoptose notwendig ist.

Darüber hinaus sollte der Einfluss des VacA Proteins auf die Apoptose der Zellen ermittelt werden. Zu diesem Zweck mussten *H.pylori*-Überstände gewonnen werden. Hierfür wurden die Keime wie oben 48 bis 72 Stunden auf Blutagarplatten kultiviert. Dann wurden sie in ein Flüssigmedium (15 ml Falkons mit Brucella broth, supplementiert mit 5%igem Kälberserum) überführt und die Keimkultur für einen weiteren Tag in mikroaerophilen Klima auf einem Schüttler fortgeführt. Die Keimsuspension wurde entsprechend verdünnt (siehe oben), die gewünschte Keimmenge in einem bestimmten Volumen entnommen (1 bis 2ml) und bei 3000rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Die auf diese Weise gewonnenen Überstände wurden abschließend durch einen 0,2µm Filter filtriert und für 8 Stunden auf die Zellen gegeben.

S.aureus und *C.jejunii* wurden ihren Ansprüchen entsprechend behandelt. Dabei wurde *C.jejunii* wie *H.pylori* in einem mikroaerophilen Klima und *S.aureus* in einem aerophilen Klima, jeweils bei 37°C kultiviert. Die Keimzahlbestimmung und die Verdünnung erfolgte wie bei *H.pylori*.

Co-Kultivierungsexperimente der Parietalzellen mit den Keimen wurde an die für die Parietalzellen optimalen Überlebensbedingungen angepasst. Das bedeutete eine Stimulation der Zellen mit den Keimen für maximal 12 Stunden in KM II der Parietalzellen und dem im Brutschrank vorherrschenden aerophilen Milieu, bei einer Temperatur von 37°C. Untersuchungen unter dem Lichtmikroskop zeigten jedoch, dass die Keime, die in KM II überführt wurden, bis maximal 20 Stunden Inkubationszeit Keimbewegungen zeigten und über diesen Zeitraum hinweg lebendig waren.

2.2.4 Nachweismethoden der Apoptose

Um die durch externe Stimuli ausgelöste Apoptose in Parietalzellen nachweisen zu können, wurden zwei unabhängige Methoden, die TUNEL-Reaktion und die Elektronenmikroskopie, verwendet.

2.2.4.1 TUNEL-Reaktion

Die TUNEL-Reaktion ist eine sensitive und spezifische Methode mit der Apoptose in eukaryotischen Zellen färberisch nachgewiesen werden kann. Die TUNEL-Reaktion macht sich dabei besonders die Veränderungen im apoptotischen Zellkern zu Nutze. Hier kommt es während der Apoptose zu den bereits erwähnten Einzelstrangbrüchen in der hochmolekularen DNA, sowie zu doppelsträngigen, niedermolekularen DNA-Fragmenten, die durch Spaltungen der DNA, mit Hilfe von Ca^{2+} -abhängigen Endonukleasen, entstehen. Diese DNA-Strangbrüche werden durch die Markierung der entstehenden freien 3'-OH-Enden mit modifizierten Nukleotiden in einer enzymatischen Reaktion identifiziert. Dafür wird das Enzym Terminale-deoxynukleotidyl-Transferase (TdT) verwendet, welches die Polymerisation dieser modifizierten Nukleotide, genauer gesagt sind es biotintragende Deoxy-Uridin-Triphosphate (dUTPs), an die freien 3'-OH-Enden der DNA katalysiert.

Dieser Vorgang gibt diesem Test auch seinen Namen TUNEL-Reaktion (TdT-mediated dUTP nick end labeling). Die dUTPs, welche die DNA-Strangbrüche markieren, enthalten Fluoreszin, das von an Peroxidase gekoppelten Antifluoreszin-Antikörpern erkannt wird. Diese Reaktion ist, nach einer Substratzugabe, welches an die Peroxidase bindet, unter dem Lichtmikroskop in Form einer braunen Färbung der Zellen sichtbar.

Für die Durchführung der TUNEL-Reaktion wurden die Parietalzellen auf Glasobjektträgern in KM I für mindestens 8 Stunden kultiviert. Nach KM-Wechsel und Zugabe von KM II, wurden die Parietalzellen mit den Keimen für 4 bis 12 Stunden stimuliert. Als Positivkontrolle wurde $\text{TNF-}\alpha$ (20ng/ml) und Camptothecin (4 μ g/ml) verwendet.

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellen vorsichtig mit 0,5M PBS gewaschen und anschließend in der Fixierungslösung für 15 Minuten unter dem Abzug fixiert. Nach der Fixierung wurden sie noch einmal kräftig mit 0,5M PBS gewaschen.

Grundsätzlich wurden die Zellen nach jedem Reaktionsschritt mit 0,5M PBS gewaschen. Weiterhin wurden die Zellen mit der Blockierungslösung bei Raumtemperatur für 30 Minuten

inkubiert, um endogene Peroxidasen zu blockieren. Daraufhin wurden die Zellen auf Eis gestellt und mit der Lysierungslösung für 2 Minuten permeabilisiert. Für die eigentliche TUNEL-Reaktion wurde ein Gemisch aus der Enzymlösung und der Markierungslösung hergestellt. Dafür wurden 50µl der Enzymlösung und 450µl der Markierungslösung miteinander vermischt und auf Eis gelagert. Mindestens 30µl dieses TUNEL-Gemisches wurde auf den Zellen gleichmäßig verteilt, die anschließend in einer feuchten Kammer bei 37°C in einen Brutschrank gestellt und mit diesem TUNEL-Gemisch für 60 Minuten inkubiert wurden. Bei dieser Reaktion wurden die DNA-Strangbrüche der Zellen mit den dUTPs markiert. Für eine Negativkontrolle wurden 30µl der Markierungslösung auf weiteren Zellen verteilt, die im Folgenden genauso wie die anderen Proben behandelt wurde.

Dann wurde ein Teil der Converter-POD-Lösung mit zwei Teilen Tris-Puffer verdünnt und wieder mindestens 30µl davon auf den Zellen gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden wie oben in einer feuchten Kammer bei 37°C für 30 Minuten in einen Brutschrank gestellt, wobei nun die Antifluoreszin-Antikörper mit dem Fluoreszin der dUTPs reagierten. Die Markierung wurde dann mit DAB, einem Substrat für die Peroxidase sichtbar gemacht. Hierfür wurde ein Lösungsgemisch nach der Anleitung des DAB-Kits hergestellt und damit die Zellen 6 Minuten lang auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Glasobjektträger mit den angefärbten Zellen mit Gelatine eingedeckt.

Die Auswertung der TUNEL-Färbung erfolgte durch das Auszählen der TUNEL-positiven Zellen. Als TUNEL-positiv zählen Zellen in denen der Zellkern dunkelbraun angefärbt ist oder komplett braune Zellen.

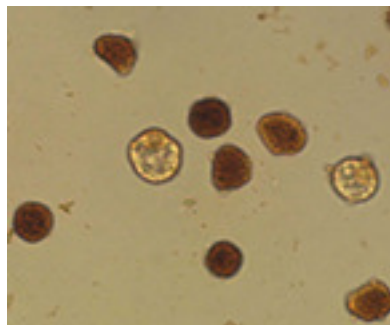


Bild 2.1. Mit der TUNEL-Reaktion angefärbte Parietalzellen; Zelldurchmesser ca. 16 bis 20µm; Vergrößerung 1.000fach.

In Bild 2.1 sind TUNEL-positive Parietalzellen dargestellt. Es wurden pro Objektträger mindestens 500 Zellen unter einem Lichtmikroskop in zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern doppelt blind ausgezählt.

In den Diagrammen im Ergebnisteil wurde der Anteil der apoptotischen Zellen der stimulierten Proben im Verhältnis zum Anteil der apoptotischen Zellen der basalen Probe in Prozent angegeben. Der formelmäßige Zusammenhang ist gegeben durch:

$$\text{Relative Apoptoserate} = \frac{\text{stimulierte Apoptoserate}}{\text{basale Apoptoserate}} \cdot 100\% \quad (2.2)$$

2.2.4.2 Elektronenmikroskopie der Parietalzelle

Als weitere wichtige Nachweismethode der Apoptose wurden elektronenmikroskopische Bilder der Parietalzellen angefertigt. Hierfür wurden die Parietalzellen auf Petrischalen kultiviert und mit *H.pylori* G27 (MOI=10) in KM II für 8 Stunden stimuliert. Als Positivkontrolle diente TNF- α (20ng/ml). Als Negativkontrolle wurden unstimulierte Zellen verwendet, die 8 Stunden ausschließlich in KM II kultiviert wurden.

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde das KM auf den Zellen vorsichtig abgesaugt und 2ml gekühlte Fixierlösung, bestehend aus 2,5% Glutaraldehyd in 10mM PBS, auf die Zellen gegeben. Nach 1 bis 2 Stunden wurden die Zellen in der Fixierlösung von den Platten gelöst, bei 4°C und 800rpm, für 5 Minuten abzentrifugiert und noch einmal etwa 1ml der Fixierlösung auf das entstandene Zellpellet gegeben. Auf diese Weise konserviert, konnte das Pellet etwa 1 Woche im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die weiteren Schritte bis zum Elektronenmikroskopiebild waren wie folgt:

1. Kontrastierung:

Nach dem Absaugen der Fixierungslösung wurden die Zellpellets mit 10mM PBS gewaschen und anschließend in 1% Osmium bidest 30 min bei 4°C kontrastiert. Nach diesem Reaktionsschritt wurden die Zellen erneut mit 10mM PBS gewaschen.

2. Entwässerung:

Nach dem Waschschrift wurden die Zellen in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 10 Minuten mit Ethanol 50%, 70%, 80 %, 95% und 3 mal in Ethanol 100 % behandelt und damit entwässert.

3. Einbettung in Epon:

Nach dem Entwässern wurden die Zellen mit einem 1:1 Gemisch aus Epon 100% (27,575ml Glycidether + 6,1g DDSA + 8,1g MNA + 0,375ml + DMP-30) und Ethanol 100% für 2 mal 20 Minuten inkubiert. Weiter wurden die Zellen für weitere 2 mal 20

Minuten mit Epon 100% behandelt und anschließend endgültig über Nacht in Epon 100% eingebettet. Die Polymerisation war nach 16 bis 24 Stunden bei 60°C beendet.

4. Herstellung von Ultradünnschnitten:

Nachdem der Epon mit den Zellen gut auspolymerisiert war, konnten Ultradünnschnitte (50 bis 80nm dick) hergestellt werden. Die entstandenen Schnitte wurden mit 2,66% Bleicitrat und 2% Uranylacetat nachkontrastiert.

Nach dieser letzten Prozedur konnten die Schnitte unter dem Elektronenmikroskop bei einer 2.070 bis 100.000fachen Vergrößerung angesehen und die Zellen fotografiert werden.

2.2.5 Kolorimetrische Messung der Caspase 3 Aktivität

Die Caspase 3 ist eine wichtige Haupteffektor-Caspase, die für die proteolytische Spaltung vieler Schlüsselproteine in dem komplexen Ablauf der Apoptose, wie zum Beispiel dem nukleären Enzym poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) verantwortlich ist (Cohen et al., 1997).

Mit dieser Methode wird die Aktivität der Caspase 3 durch die Spaltung des zellulären Enzyms PARP, nach der Aminosäuresequenz DEVD (Glu-Val-Asp) nachgewiesen (Nicholson et al., 1995). Hierfür wird das DEVD mit einem kolorimetrischen Molekül, dem pNA (p-nitroanalide) gekoppelt. Die Aktivität der Caspase 3 in der Zelle kann letztendlich durch die Menge an abgespaltenem pNA, über ein Photometer gemessen werden.

Für den Caspase 3 Assay wurden die Parietalzellen in 6-Well Platten, die mit 35 µl Matrigel pro Well beschichtet wurden, über Nacht in KM I kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit TNF-α (20ng/ml) und den *H.pylori* Stämmen Tx30, einem Typ II Stamm und G27, einem Typ I Stamm (MOI=2/5/10/25/50/100) in KM II für 1, 4, 8 und 12 Stunden stimuliert. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob die Caspase 3 tatsächlich in infizierten Parietalzellen aktiviert wird und ob es einen Unterschied zwischen *H.pylori* Typ I und Typ II Stämmen gibt. Für einen basalen Referenzwert, wurde ein Teil der Zellen nur in KM II, ebenfalls für 8 Stunden kultiviert. Insgesamt wurden etwa $2 \cdot 10^6$ Zellen pro Probe eingesetzt.

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde das KM II abgenommen, die Zellen mit 1xTrypsin EDTA von den Platten abgelöst und mit Hilfe eines Zellschabers vorsichtig abgekratzt. An-

schließlich wurden die Zellen bei 1.000rpm für 10 Minuten abzentrifugiert, die Überstände verworfen, die Zellpellets in je 1ml eiskaltem 0,5M PBS aufgenommen und in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden erneut bei 1.000rpm für 10 Minuten abzentrifugiert und in 50 μ l eisgekühltem Cell Lysis Buffer resuspendiert. Nach einer Inkubation auf Eis für 10 Minuten, wurden die Zellen bei 4°C bei 12.000rpm für 3 Minuten abzentrifugiert, die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und weiterhin auf Eis belassen. Den Proben wurde je 50 μ l Überstand, 50 μ l 2x Reaction Buffer, dem direkt vorher 10 μ l/ml einer 10mM/l DTT-Lösung zugesetzt wurde, zugegeben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von je 5 μ l des Caspase 3 Substrates DEVD-pNA (1mM) gestartet. Dabei wurden die Proben für 60 Minuten bei 37°C auf einem Schüttler im Wasserbad inkubiert.

Als Kontrolle der Reaktion wurden andere, basale und mit TNF- α und *H.pylori* stimulierte Proben vor der Substratzugabe mit je 0,5 μ l eines Caspase 3-Inhibitors (DEVD-fmk Inhibitor) für 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert.

Für die photometrische Messung wurden die Proben in eine 96-Well Platte überführt und die Emission bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen.

2.2.6 Nachweis des Transkriptionsfaktors NF- κ B

2.2.6.1 Der elektrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Der EMSA ist eine Technik, die dazu dient, Interaktionen von DNA-bindenden Proteinen mit ihrer entsprechenden DNA-Sequenz zu ermitteln. Zu diesen DNA-bindenden Proteinen zählt auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B. Hierfür wurden radioaktiv markierte einzel-, oder doppelsträngige DNA-Fragmente, die eine NF- κ B-Bindesequenz tragen, mit Proteinen oder Kernextrakten inkubiert in denen man NF- κ B vermutet. Dieses Gemisch aus DNA-Fragment und Protein wird auf einem Gel aufgetragen, an das eine bestimmte Spannung angelegt wird. Die aufgetragene Probe wandert vom Minuspol (oben) zum Pluspol (unten). Unspezifische DNA-Fragmente, die nicht an das Protein gebunden werden, wandern schneller als der DNA-Fragment/Protein-Komplex. Dies liegt daran, dass die Fragmente durch die Komplexbildung größer geworden sind und im Gel nicht so leicht wandern können. Dieser Komplex kann durch die radioaktiv markierten DNA-Fragmente, zum Beispiel über einen Röntgenfilm, als Bande sichtbar gemacht werden.

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte, von der Gewinnung der Kernextrakte bis hin zur Durchführung des EMSA, genau erklärt.

2.2.6.1.1 Präparation der Kernextrakte

Für die Durchführung des EMSA wurden Kernextrakte aus Parietalzellen gewonnen. Hierfür wurden die Zellen auf Petrischalen über Nacht in KM I kultiviert und anschließend mit *H.pylori* (8 Stunden; MOI=10) in KM II stimuliert. Für einen basalen Referenzwert, wurde ein Teil der Zellen nur in KM II, ebenfalls für 8 Stunden kultiviert. Insgesamt wurden etwa 6 bis $8 \cdot 10^6$ Zellen pro Probe eingesetzt.

Für die Präparation der Kernextrakt wurde ein von Dr. Puschmann etabliertes Protokoll verwendet, der die Kernpräparation nach Burgoyne et al. (1970) für die Parietalzellen etablieren konnte.

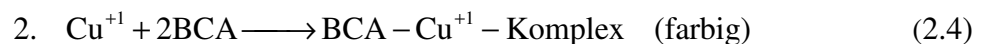
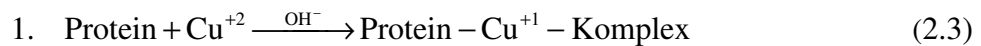
Nach Ablauf der Stimulationszeit, wurden die Parietalzellen mit 1xTrypsin EDTA abgelöst und mit einem Zellschaber vorsichtig abgeschabt, dann in Reaktionsgefäße überführt und sofort auf Eis gestellt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten entweder auf Eis oder im Kühlraum. Die verwendeten Lösungen wurden ebenfalls vorgekühlt. Die Zugabe von PMSF und den Proteininhibitoren zu Puffer 1 sollte verhindern, dass endogene Enzyme freierwerden und das entstehende Kernprotein abbauen.

Die Zellen wurden für 3 Minuten bei 1.000rpm abzentrifugiert und in je 1ml Puffer-1 resuspendiert. Sie wurden noch einmal für 5 Minuten bei 6.000rpm abzentrifugiert, ein weiteres Mal für 30 Minuten in Puffer-1 aufgenommen. Puffer-1 ist ein hypotoner Puffer, der zum Anschwellen der Zellen und eventuell auch zu einer Ruptur der Zellmembranen führt. Anschließend wurden die Zellen erneut für 5 Minuten, bei 6.000rpm abzentrifugiert und in 1ml Puffer-2 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 5ml Glasröhrchen gefüllt und etwa 11 Minuten lang mit Hilfe eines Homogenisators kräftig gerührt. Bei diesem Versuchsschritt kam es durch Scherkräfte, die durch den Homogenisator erzeugt wurden, zu sichtbaren Schäden der Zellmembran. Um den Erfolg dieses Verfahrens zu kontrollieren, wurde ein kleiner Anteil des Homogenisates mit Trypanblau angefärbt und unter einem Lichtmikroskop betrachtet. Im Idealfall konnte man rupturierte Zellmembrane, jedoch intakte, blau angefärbte Zellkerne sehen. Dann wurde das Homogenisat vorsichtig über 333µl von Puffer-3 geschichtet und für 15 Minuten, bei 13.000rpm abzentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt war eine Art Dichtezentrifugation, die dazu führte, dass die Zellkerne von den Zytoplasmaresten getrennt und somit aufgereinigt werden konnten. Der Überstand mit den Zytoplasmaresten wurde verworfen und das

Pellet, bestehend aus den Zellkernen, in 500µl 1xBP resuspendiert und für 5 Minuten, bei 6.000rpm in einem 2ml Eppendorf-Röhrchen abzentrifugiert. Das Pellet wurde wieder in 70 bis 100µl 1xBP, je nach Größe des Pellets, aufgenommen. Daraufhin wurden die Zellkerne unter ständiger Kühlung mit einem Ultraschallgerät gesticated (10 bis 12 Stößen). Durch die Einwirkung des Ultraschalls wurde die Kernmembrane geschädigt und der Inhalt der Zellkerne freigelegt. Die auf diesem Weg gewonnenen Kernextrakte wurden aliquotiert und sofort bei -80°C eingefroren.

Die Proteinkonzentration der Kernextrakte, wurde mit dem BCA Protein Kit gemessen. Der Kit basiert auf einer kolorimetrischen Messung und Quantifizierung des Gesamtproteins mit Bicin Chonin Säure (BCA). Dabei werden durch das Protein Cu^{+2} -Ionen zu Cu^{+1} -Ionen reduziert und es bildet sich ein Protein- Cu^{+1} -Komplex. Die Cu^{+1} -Ionen reagieren wiederum mit 2 Molekülen BCA, was zur Bildung eines farbigen Reaktionsproduktes führt.

Reaktionsschema:



Dieser Komplex zeigt eine starke Absorbtion bei einer Wellenlänge von 562nm. Die Proteinnmessung wurde nach Anleitung und mit den Lösungen aus dem Test durchgeführt und die Lichtabsorbtion in einer 96-Well-Platte im Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda=562\text{nm}$ bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand eines BSA-Standards und unter Berücksichtigung eines Leerwertes bestimmt. Für den Leerwert wurde die Absorbtion des Mediums gemessen, in dem die zu messenden Proteine gelöst waren (1xBP). Die Proteinkonzentration der Kernextrakt lag zwischen 2,5 und 5,5µg/µl.

2.2.6.1.2 Annealing der DNA-Fragmente

Annealing der NF-κB- und Sp-1-Oligonukleotide

Wie beschrieben, wurden für den EMSA DNA-Fragmente verwendet, auch bezeichnet als Oligonukleotide, die ein Bindungsmotiv, einmal für NF-κB, aber auch für SP-1 besitzen. Der Transkriptionsfaktor NF-κB wurde in der Einleitung schon ausführlich beschrieben. Das SP-1 ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der in allen lebenden menschlichen Zellen zu finden ist (Latchmann, 1995). Er bindet an die Promotor- oder Enhancerregion vieler Gene, unter ande-

rem an viele „housekeeper“-Gene (Muraoka et al., 1996). In diesem Versuch wurde das SP-1 als quantitative Kontrolle der eingesetzten Menge an Kernextraktprotein verwendet (Brand et al., 1996).

Die DNA-Oligonukleotide wurden in Form zweier Einzelsträngen, einem Sense- und einem Antisense-Strang, geliefert und besitzen folgende Sequenzen:

1.NF- κ B: Sense-Strang 5'-GAT CGA **GGG GAC TTT CCC** TAG C-3'. Er enthält die NF- κ B Bindungssequenz (dick unterstrichen), die der Enhancerregion des HIV gleicht. Der Antisense-Strang verhält sich komplementär zu dem Sense-Strang.

2.SP-1: Sense-Strang 5'-GAT CGA TCG **GGG CGG** GGC GAT C-3'. Die unterstrichene Region bezeichnet die SP-1 Bindungssequenz. Der Antisense-Strang verhält sich komplementär zu dem Sense-Strang.

Für die NF- κ B-Oligonukleotide und die SP-1-Oligonukleotide wurde das selbe Annealing-Protokoll angewendet. Die beiden komplementären Einzelstränge wurden im Prozess des „Annealing“ zu einem Doppelstrang verbunden. Dafür wurde ein Reaktionsansatz bestehend aus einer aequimolaren Menge an Sense- und Antisense-Strang (je 2 μ g; Konzentration 1 μ g/ μ l), 35 μ l H₂O und 5 μ l Annealing-Puffer hergestellt.

Das Reaktionsgemisch wurde für 10 Minuten bei 95°C in einem Heizblock erhitzt, dann im Heizblock stehend langsam auf 37°C abgekühlt. Anschließend wurde es für 30 Minuten auf Eis gestellt und dann bei -20°C eingefroren. Zur Kontrolle des Annealing wurden sowohl die beiden Einzelstränge getrennt (je etwa 300ng) als auch der annealte Doppelstrang (etwa 600ng) auf einem 4% Agarose-Gel aufgetragen.

Es zeigte sich, dass durch die Zugabe des Annealing-Puffers die Bindung zum Doppelstrang deutlich verbessert wurde, als ohne Annealing-Puffer und weiterhin auch die Banden im EMSA an Intensivität zunahmen.

Annealing der Decoy-Oligonukleotide

Auch hier wurden jeweils zwei Einzelstränge geliefert, einen Sense- und einen Antisense-Strang, die im Folgenden ebenfalls zu einem Doppelstrang verbunden werden mussten (siehe oben). Näheres über die Decoy-Oligonukleotide siehe unter 2.2.6.2.2.

1. Sense-Strang: 5'-AGA GTG GGA ATT TCC ACT CA-3'. Diese Sequenz wurde aus der IκB-Bindungssequenz der menschlichen MCP-1 Promotorregion hergeleitet. Der Antisense -Strang verhält sich komplementär zum Sense-Strang.

2. Eine mutierte Form der IκB-Bindungssequenz wurde als Negativkontrolle verwendet. Sie hatte folgende Sequenz: Sense-Strang: 5'-AGA GTG GTC CTT TCC ACT CA-3'. Der Antisense -Strang verhält sich komplementär zum Sense-Strang.

In diesem Annealingprozess ergaben sich jedoch einige Veränderungen, die kurz erläutert werden. Für den Reaktionsansatz wurden aequimolare Mengen an Sense- und Antisense-Strang (Konzentration 100pmol/μl) in einer 0,5M NaCl-Lösung in einem 2 ml Eppendorfröhrchen vermischt. Das Reaktionsgemisch wurde für 90 Minuten bei 80°C in einem Heizblock erhitzt und dann wie bei den NF-κB- und SP-1-Oligonukleotiden, abgekühlt und zur Kontrolle auf einem 4% Agarose-Gel aufgetragen.

2.2.6.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Um den Erfolg des „Annealings“ der Oligonukleotide zu überprüfen, wurde das Produkt auf einem Agarose-Gel aufgetragen und die DNA-Fragmente der Größe nach in der Gelelektrophorese aufgetrennt.

Für die Herstellung eines Agarose-Gels sollte die Konzentration der Agarose an die Größe der zu trennenden DNA-Fragmente angepasst sein. Hochprozentige Gele bis zu 4% eignen sich für die Auftrennung von sehr kleinen Fragmenten, während umgekehrt geringe Konzentrationen bei sehr großen Fragmenten verwendet werden. In dieser Arbeit wurden 4% Gele aus NuSieve Agarose für die Oligonukleotide der EMSAs verwendet.

Die entsprechende Menge an Agarose wurde in 50ml 1xTAE-Puffer durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen auf etwa 40°C wurde 2,5μl EtBr hinzugefügt und das Gel in eine entsprechende Form gegossen. Durch das Einsetzen eines Kammes wurden die Taschen für das Auftragen der Proben ausgespart.

Die zu untersuchende DNA wurde mit dem Laufpuffer (etwa 1/5 des Gesamtvolumens) vermischt. Das gefestigte Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gestellt, die mit 1xTAE-Puffer gefüllt war und die Proben in die Taschen des Gels pipettiert. An die Elektrophoresekammer wurde eine Spannung von 70 bis 80 V angelegt.

Durch das im Gel hinzugefügte EtBr konnten die DNA-Fragmente im UV-Licht, bei einer Wellenlänge von 254nm, sichtbar gemacht werden. Dies geschah mit Hilfe eines Transilluminators und wurde anschließend mit dem Video-Dokumentationssystem fotografiert

2.2.6.1.4 Acrylamid-Gelelektrophorese für den EMSA

Für die meisten Versuche wurden Gele mit einer Größe von 16,5x14 cm und einer Anzahl von 14 Taschen verwendet. Für die Herstellung des Gels wurden zwei Glasplatten aufeinander gelegt, zwischen die jeweils am Rand ein Spacer mit einer Breite von ca. 1,5mm gelegt wurde, um einen gewissen Raum für das Gel zu erhalten. Dann wurde zunächst das Abdichtungsgel zwischen die beiden Glasplatten pipettiert, welches sehr schnell auspolymerisierte. Auf das Abdichtungsgel wurde das Laufgel (7%) gegeben. Durch das Einsetzen eines Kammes an der Oberseite zwischen die Glasplatten, konnten die Taschen für das Auftragen der Proben im Gel ausgespart werden. Nach etwa 30 Minuten wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer hineingestellt, die mit 25% TBE-Puffer aufgefüllt wurde. Die Gelkammer wurde an ein Netzteil (Power Supply) angeschlossen und eine Spannung von 80V angelegt.

2.2.6.1.5 Radioaktive Markierung

Die doppelsträngigen NF- κ B- und SP-1-Oligonukleotide wurden für die Durchführung des EMSA mit radioaktivem $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP markiert. Dazu wurde ein Reaktionsansatz, bestehend aus 13 μl H₂O, 2 μl T4-PKN-Puffer, 25ng Oligonukleotide, 3 μl $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und 1 μl T4-PKN auf Eis zusammen pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C in einen Heizblock gestellt. Dabei wird die γ -Phosphatgruppe des ATP, katalysiert durch die T4-PKN, an das 5'-Ende der Oligonukleotide angehängt und diese somit radioaktiv markiert. Da in dieser Reaktion doppelsträngige Oligonukleotide verwendet wurden, konnte an jeweils beide 5'-Enden eine γ -Phosphatgruppe angehängt werden. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 μl 500mM EDTA gestoppt, die Proben wieder auf Eis gestellt und je 79 μl TE-Puffer hinzugegeben.

Die Auftrennung der radioaktiv markierten Oligonukleotide von ungebundenem $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, erfolgte in Sephadex-Säulen. Dazu wurde das Reaktionsgemisch mit den Oligonukleotiden auf eine mit TE-Puffer gewaschene Säule gegeben und 10 Fraktionen mit je 100 μl tropfenweise in Eppendorf-Röhrchen aufgefangen. Um die Radioaktivität der einzelnen Röhrchen messen zu können, wurden aus jedem Röhrchen je 3 μl Lösung entnommen und mit je 3ml einer Szinti-Lösung verdünnt. Dieses Lösungsgemisch wurde zur Messung der radioaktivmarkierten Oligonukleotide in eigens dafür hergestellte Gefäße gefüllt und in einem β -Zähler platziert und

ausgewertet. Für die Versuche wurden die Fraktionen weiter verwendet, in denen zwischen 100.000 und 150.000cpm/ μ l für NF- κ B und zwischen 40.000 und 100.000cpm/ μ l für SP-1 gemessen wurde.

2.2.6.1.6 Auftragen der Proben und Auswertung

Für die Proben, die auf das Gel aufgetragen wurden, wurde bei Raumtemperatur je 20 μ l des Reaktionsansatzes bestehend aus dem Kernextraktprotein, den markierten Oligonukleotiden, Bindungspuffer (BP) und Poly-(dIdC) hergestellt. Zuerst wurden 10 μ g des Kernextraktproteins mit 4 μ g Poly-(dIdC) und dem Bindungspuffer (1/10 des Gesamtvolumens) zusammen pipettiert. Dabei sollte das Poly-(dIdC) an unspezifische Proteinsequenzen des Kernextraktproteins binden.

Poly-(dIdC) ist ein einzelsträngiges Nukleotid, bestehend aus 20.000 Basenpaaren. Seine Struktur aus Inosin- und Cytosinresten hat wenig Ähnlichkeit mit der Struktur der verwendeten Transkriptionsfaktoren und kann daher nicht an diese spezifischen DNA-Sequenzen binden. Vielmehr kann es aber an eine Vielzahl anderer Proteine des Kernextraktes binden und dadurch verhindern, dass diese eine nichtspezifische Bindung mit dem Kernprotein eingehen, was wiederum zu unspezifischen Banden in der Auswertung führen würde.

Anschließend wurde eine errechnete Menge an radioaktiv markierten Oligonukleotiden hinzugefügt, wobei die radioaktiv markierten Oligonukleotide für die NF- κ B-Proben etwa 100.000cpm und für die SP-1-Proben etwa 20.000cpm aufweisen sollten. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurden die Proben auf Eis gestellt, je 2 μ l Ladepuffer hinzugefügt und anschließend vorsichtig auf dem Gel aufgetragen. Für jede NF- κ B-Probe wurde parallel eine SP-1-Kontrolle mit demselben Kernprotein durchgeführt.

Nach Ablauf des Versuchs wurde das Gel mit den Proben vorsichtig von den Glasplatten abgenommen, auf eine Schicht von Filterpapieren gelegt und mit einer Frischhaltefolie bedeckt. Das Gel wurde in einem Gelttrockner bei 80°C für etwa 60 Minuten getrocknet.

Anschließend wurde das Gel zur Auswertung für mindestens 48 Stunden in eine Phosphorimager-Kassette mit einer speziellen Platte gelegt. Diese Platte kann ähnlich eines Röntgenfilms die radioaktiv markierten Komplexe aufnehmen, die anschließend mit einem Laser des Phosphorimager-Scanners abgelesen und mit Hilfe des ImageQuant-Programmes ausgewertet werden können. Im Vergleich zu normalen Röntgenfilmen hat diese Methodik der Auswertung eine sehr viel höhere Auflösung und die Gefahr einer Überbelichtung ist sehr gering. Die radioaktiven Komplexe erscheinen auf dem Bild in Form von Banden, die aufgrund ihrer Hö-

he und mit Hilfe von Competition- und Supershift-Versuchen als spezifische NF- κ B- oder SP-1-Banden identifiziert werden konnten. Die Intensität der Banden wurde mit Hilfe des ONE-Scan-Programmes gemessen und ausgewertet

2.2.6.1.7 Spezifität der Banden

Die Spezifität der Komplexbildung kann durch einen Verdrängungsversuch, eine sogenannte Competition, überprüft werden. Dazu wurden unmarkierte NF- κ B-Oligonukleotide in einem relativen Überschuss (25ng) zu dem Reaktionsansatz, wie oben beschrieben, bestehend aus Kernprotein, BP und Poly-(dIdC) gegeben. Erst nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurden die markierten Oligonukleotide hinzugefügt. Die unmarkierten Oligonukleotide konkurrieren mit den markierten Oligonukleotiden um eine spezifische Bindung an der DNA-Sequenz. Werden alle spezifischen DNA-Sequenzen durch unmarkierte Oligonukleotide besetzt, so darf es in der Auswertung kein Signal geben, da auf der Höhe der Bande keine Radioaktivität zu messen ist. Die Bande scheint verdrängt worden zu sein. Daraus kann geschlossen werden, dass das Kernprotein spezifische DNA-Bindungsstellen für die zu untersuchenden Oligonukleotide besitzt.

Wie bereits erwähnt, besteht NF- κ B aus mehreren Untereinheiten, die sich zu Homo- und Heterodimeren zusammenschließen können. Diese Dimerenstruktur lässt sich durch die Zugabe von spezifischen Antikörpern, die gegen die p65 und p50 Untereinheit des NF- κ B gerichtet sind, überprüfen.

Bei Raumtemperatur wurden die p50 und p65-Antikörper getrennt, zu zwei Reaktionsansätzen dazugegeben. Die Antikörper binden an spezifische Bindungsstellen am Proteinkomplex. Nach einer Inkubation von 20 Minuten wurden erst die markierten Oligonukleotide hinzugefügt. Diese Größenzunahme der DNA/Proteinkomplexe zeichnet sich durch eine reduzierte Wandergeschwindigkeit im elektrischen Feld aus. Das Ergebnis ist eine höher gelegene Bande, die aus DNA/Proteinkomplexanteilen mit den spezifischen Bindungsstellen für den jeweiligen Antikörper besteht. Die Bande scheint nach oben verschoben zu sein und wird deshalb als „Supershift“ bezeichnet. Für die Durchführung dieser Supershifts wurden Gele mit einer Größe von 22·16,5cm verwendet, wodurch die Banden im Gel besser aufgetrennt werden konnten

2.2.6.2 Transfektion der Parietalzellen

Mit Hilfe der Transfektion kann heterologe DNA in Zellen eingeschleust werden. Obwohl der Mechanismus der Aufnahme noch nicht genau bekannt ist, geht man davon aus, dass die transfizierte DNA in das Zytoplasma der Zelle über Endozytose gelangt und in den Zellkern transportiert wird. Die DNA wird dort transkribiert und bindet an eine komplementäre Ziel-RNA.

2.2.6.2.1 Transfektion der Antisense (AS)-und Missense (MS)-Oligonukleotide

Die AS-Oligonukleotide sind kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, bestehend aus 15 bis 20 Basenpaaren. Sie werden von den Zielzellen aufgenommen und binden sequenzspezifisch an ihre komplementäre Ziel-mRNA (sense). Durch komplementäre Basenpaarung entsteht ein Doppelstrang. Diese Bindung führt zu einer Antisense-vermittelten Hemmung der Synthese des Zielproteins. Für diese Arbeit wurden AS-Oligonukleotide konstruiert, die komplementär zum 5'-Ende der NF- κ B-Untereinheit p65 sind. Diese gehen eine Bindung mit der Initialregion der mRNA ein, die für p65 kodiert, und verhindern dadurch die Translation und damit die Genexpression von NF- κ B (Hartmann et al., 1998; Branch, 1996).

1. Die AS-Oligonukleotide besaßen folgende Struktur: 5'-GGG GAA CAG TTC GTC CAT GGC-3'
2. Die MS-Form der Oligonukleotide enthielt dieselben Nukleotide, jedoch in veränderter Reihenfolge, 5'-GGG GCG ATG AGG CCT ACT ATC-3'. Sie waren damit nicht in der Lage an eine bestimmte Sequenz, wie der Initialregion von p65, zu binden. Diese Oligonukleotide dienten deshalb als Negativkontrolle.

Die Parietalzellen wurden für die Transfektion mit diesen Oligonukleotiden einmal auf Glasobjektträgern für die TUNEL-Reaktion und auf Petrischalen für Kernextrakte kultiviert. Dann wurden die Zellen in KM II für mindestens 8 Stunden mit 10 μ M/ml AS-, oder MS-Oligonukleotiden in Gegenwart von 10 μ g/ml Lipofektin inkubiert. Lipofektin ist ein Transfektionsreagenz und soll die Aufnahme der Oligonukleotide in die Zelle erleichtern. Anschließend wurden die transfizierten Zellen nach KM-Wechsel für weitere 8 Stunden mit *H.pylori* G27 stimuliert. Die Transfektionseffizienz der Oligonukleotide wurde durch die Kultivierung mit FAM 5'-markierten AS-Oligonukleotiden, überprüft.

2.2.6.2.2 Transfektion der Decoy-Oligonukleotide

Decoy-Oligonukleotide sind doppelsträngige Oligonukleotide, deren κ B-Sequenz der Promotorregion des MCP-1 Gens entspricht. Diese Oligonukleotide binden mit dieser Sequenz im Zytoplasma, wie auch im Zellkern an freies NF- κ B und verhindern dadurch die spezifische NF- κ B abhängige Transkription spezifischer Zielgene (Gawatz et al., 1998).

Die Parietalzellen wurden in gleicher Weise, wie für die Transfektion mit den p65 AS-Oligonukleotide, auf Glasobjektträgern für die TUNEL-Reaktion und auf Petrischalen für Kernextrakte kultiviert. Dann wurden die Zellen in KM II mit den Decoy-Oligonukleotide (100nM/ml) mit Hilfe von SuperFect (6,25 μ l/ml), transfeziert. Dabei hatte sich SuperFect als einziges, unter einigen ausgetesteten Transfektionsreagenzien (Transfectam, Lipofectamin), für die Transfektion dieser doppelsträngigen Oligonukleotide, bewährt. Die ausgetestete Menge der Decoy-Oligonukleotide mit 100nM erbrachte, im Gegensatz zu 50nM und 200nM, die besten Ergebnisse. Nach einer Transfektionszeit von maximal 2 ½ Stunden wurde das KM gewechselt und die Parietalzellen mit *H.pylori* G27 für weitere 8 Stunden stimuliert. Eine Transfektionszeit von maximal 2 ½ Stunden lieferte die beste Transfektionsrate der Parietalzellen. Kürzere Transfektionszeiten (1,0; 1,5, und 2,0 Stunden) lieferten deutlich niedrigere Transfektionsraten. Bei höheren Transfektionszeiten (3,0; 3,5 und 4,0 Stunden) erwies sich das Transfektionsreagenz als zu zelltoxisch. Die Parietalzellen verloren zunehmend ihre Bodenhaftung und konnten nicht mehr gewertet werden.

Die Transfektionseffizienz der Oligonukleotide wurde mit fluoreszenzmarkierten FAM 5'-Decoy-Oligonukleotiden, überprüft. Die eingesetzte Menge an FAM 5'-Decoy-Oligonukleotiden und Superfect, sowie die Ausführung der Transfektion, war mit dem oben beschriebenen Vorgang, identisch. Da die FAM 5'-markierten Decoy-Oligonukleotiden jedoch lichtempfindlich waren, wurde die gesamte Prozedur in einem abgedunkelten Raum ausgeführt.

Die Auswertung erfolgte, durch das Auszählen der grün-leuchtenden FAM markierten Parietalzellen. Dabei wurden wie bei der TUNEL-Färbung pro Objektträger mindestens 500 Zellen unter einem Mikroskop in zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern doppelt blind ausgezählt.

Die Transfektionsrate lag zwischen 70 und 80%.

Die Dokumentation erfolgte durch das Fotografieren der Zellen mit einer Belichtungszeit von 6 Sekunden und einer 1.000fachen Vergrößerung.

2.2.6.3 Inkubation der Parietalzellen mit PSI

PSI (Cbz-Ile-Glu(O-t-Bu)-Ala-Leucinal) ist ein NF- κ B Inhibitor. Seine Wirkung beruht auf einer Hemmung der Proteasomen. Damit wird die Degradation der I κ B-Proteine im Zytoplasma der Zellen gehemmt. NF- κ B wird auf diesem Wege daran gehindert in den Zellkern zu gelangen und als Transkriptionsfaktor die Expression bestimmter Gene in die Wege zu leiten.

Die Parietalzellen wurden mit 1mM PSI für eine Stunde in KM II vorinkubiert. Nach KM-Wechsel wurden die Zellen wieder in KM II für 8 Stunden mit *H.pylori* G27 (MOI=10) stimuliert.

2.2.7 Inkubation mit L-NMMA - Relevanz von Stickstoffmonoxid

L-NMMA ist ein Inhibitor der Stickstoffmonoxid-Synthase. Die Parietalzellen wurden mit 0,1mM L-NMMA für 4 Stunden vorinkubiert. Nach KM-Wechsel wurden die Zellen wieder in KM II für 8 Stunden mit *H.pylori* G27 (MOI=10) stimuliert.

2.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde in freundlicher Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie Rechts der Isar der TU München, Fr. Dipl.-Stat. Hollweck, durchgeführt. In den Diagrammen im Ergebnisteil wurden die Mittelwerte von mindestens 5 unabhängigen, repräsentativen Versuchen als Balken dargestellt. Die jeweils aufgesetzte Antenne [T] kennzeichnet die errechnete Standardabweichung vom Mittelwert.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des SPSS-Computerprogramms. Da bei durchschnittlich 5 Versuchen nicht mit Sicherheit von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen werden konnte und mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, wurde für die Auswertung der Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben verwendet. War dieser Test aussagekräftig, wurde diesem Test der Mann-Whitney-Test angeschlossen, der überprüfen sollte, ob sich zwei bestimmte Gruppen unterscheiden. Als signifikant galten Ergebnisse mit einem p-Werte kleiner als 0,05 (*p<0,05), die mit einem Stern über der An-

tenne versehen wurden. Als hochsignifikant galten Ergebnisse mit einem p-Werte kleiner als 0,01 (** $p < 0,01$), die mit zwei Sternen über der Antenne versehen wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss verschiedener Virulenzfaktoren auf die Apoptose

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass eine Stimulation der Zellen mit *H.pylori* Apoptose in den Parietalzellen auslöst. Weiterhin ließen sich durch die Stimulationsversuche einige wichtige Virulenzfaktoren des Keimes aufspüren, die bei der Aktivierung des aktiven Zelltodes in diesem *in vitro* Zellmodell von Bedeutung sind.

Pro Experiment wurden mindestens 5 unabhängige Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung wird in Kapitel 2.2.8 erläutert.

3.1.1 Qualitative Absicherung der Versuchsergebnisse

3.1.1.1 Färbung der Zellen mit der TUNEL-Reaktion und Trypanblau

Um die Nachweismethodik der Apoptose abzusichern wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Zunächst wurden unstimulierte und mit *H.pylori* infizierte Zelle mit Trypanblau oder mit der TUNEL-Reaktion angefärbt. Mit der Trypanblaufärbung wurde der Zelltod durch Nekrose ausgeschlossen (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Ergebnisse der TUNEL-Reaktion werden exemplarisch in Bild 3.1.dargestellt. Als TUNEL-positiv bzw. apoptotische zählen Zellen in denen der Zellkern dunkelbraun angefärbt ist oder auch komplett braun angefärbte Zellen.

Ein Vergleich der Bilder A und B zeigt deutlich, dass eine Inkubation der Zellen mit *H.pylori* WT-Stamm G27 (8 Stunden; MOI=10) vermehrt zu Strangbrüchen der DNA im Zellkern und somit zur Apoptose der Zellen führt (siehe auch Methoden 2.2.4.1).

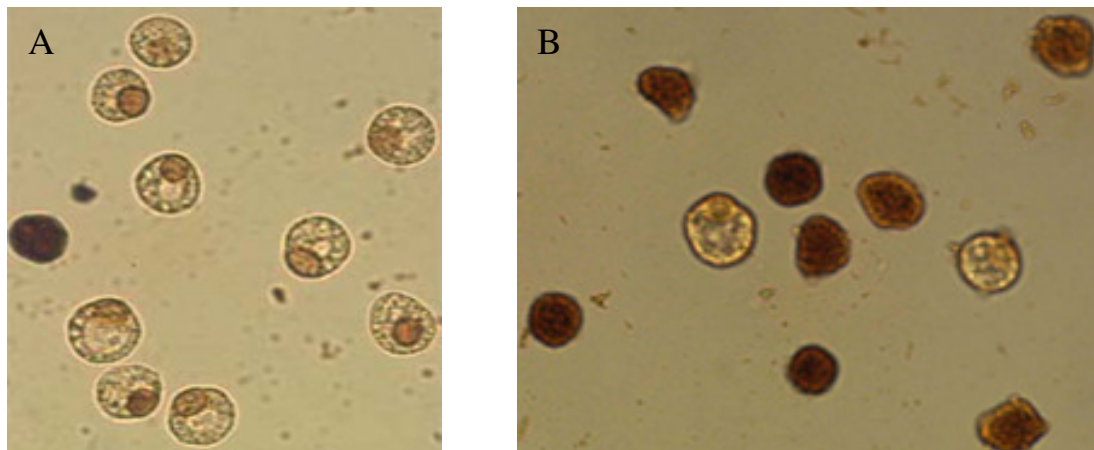


Bild 3.1. Färbung der Parietalzelle mit der TUNEL-Reaktion; **Bild A**: unstimulierte Parietalzellen. **Bild B**: mit *H.pylori* WT-Stamm G27 stimulierte Parietalzellen; Zelldurchmesser ca. 16 bis 20µm; Vergrößerung 1.000fach

Die Zellen wurden unter einem Lichtmikroskop fotografiert. Der Ausschnitt in Bild B zeigt dabei deutlich mehr angefärbte und damit apoptotische Zellen.

3.1.1.2 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde als qualitativer Nachweis zur Quantifizierung der TUNEL-Färbung verwendet. Dabei zeigt sie von allen Apoptosenachweisen am deutlichsten die morphologischen Veränderungen, die während des Prozesses der Apoptose im Zellkern vollzogen werden. Die Parietalzellen wurden wie oben unter basalen Bedingungen kultiviert, sowie mit *H.pylori* WT-Stamm G27 stimuliert (8 Stunden, MOI=10) und danach, wie unter 2.2.4.2 beschrieben, die elektronenmikroskopischen Bilder angefertigt. Die basale Zelle (Bild A) zeigt einen großen Zellkern mit dem Kernchromatin, zahlreiche Mitochondrien, sowie viele Mikrovilli auf der Zelloberfläche und in den Canaliculi. Die mit den Keimen stimulierten Zellen (Bild B und C) zeigen die, für die Apoptose der Zelle typischen strukturelle Veränderungen. Bild B zeigt erste apoptotische Veränderungen, die mit einer beginnenden Kondensation des Kernchromatins und einem zunehmenden Verlust der Mikrovilli einhergehen. Bild C zeigt ein schon fortgeschrittenes Stadium der Apoptose mit einer vollständigen Kondensation des Kernchromatins und Schrumpfung des Zellkerns, das völlige Verschwinden der Mikrovilli und die Abschnürung von apoptotischen Körperchen, wie man auch in diesem Bild sehen kann. Die elektronenmikroskopischen Schnitte, die von den mit *H.pylori* stimulierten Zellen angefertigt wurden, zeigten im Vergleich zu den Schnitten basaler Zellen deutlich mehr apoptotische Zellen. Der, durch die Stimulation der Parietalzellen mit *H.pylori*, ausgelöste Zelltod

konnte mit Hilfe der Elektronenmikroskopie eindeutig als Apoptose identifiziert werden. Über die im vorherigen Abschnitt beschriebene Färbemethode werden folglich eindeutig apoptotische Zellen nachgewiesen. Für die Bestimmung der Apoptoserate wurde daher in allen durchgeführten Versuchen die TUNEL-Färbung verwendet.

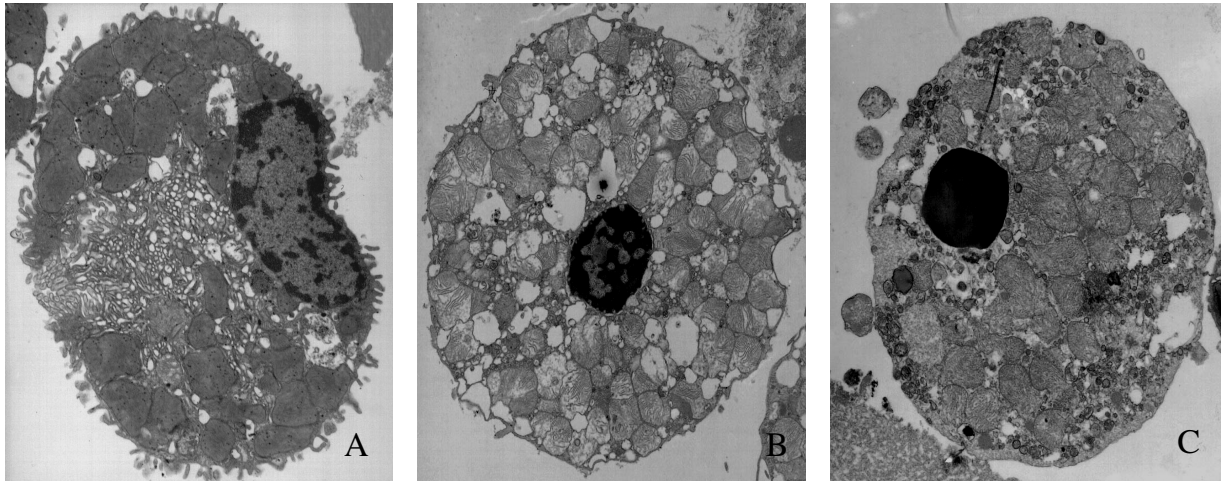


Bild 3.2. A-C. Elektronenmikroskopie der Parietalzelle. **Bild A:** basale Parietalzelle. **Bild B:** *H.pylori* infizierte Zelle mit beginnender Kondensation des Zellkerns. **Bild C:** *H.pylori* infizierte Zelle mit den typischen Zeichen eines schon fortgeschrittenen Apoptoseprozesses; Zelldurchmesser ca. 16 bis 20 μ m; Vergrößerung 5700fach

3.1.2 Ermittlung der *H.pylori*-Konzentration

Um die Bakterienkonzentration ermitteln zu können, die notwendig war, um eine Reaktion der Parietalzellen bzw. die Apoptose der Zellen auszulösen, wurden erste Versuche mit unterschiedlichen Keimkonzentrationen durchgeführt. Die Stimulationsdauer bei diesen ersten Experimenten wurde auf 5 Stunden festgesetzt. Bild 3.3 zeigt die Ergebnisse der Stimulation, wobei die Bakterienkonzentration in MOI angegeben wird.

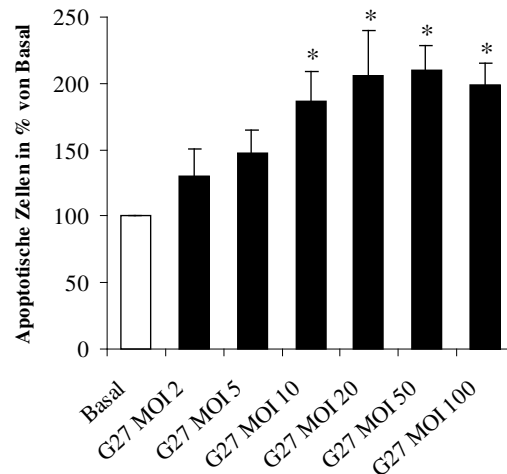


Bild 3.3. TUNEL-Reaktion: Stimulation der Parietalzellen mit verschiedenen *H. pylori* G27-Konzentrationen (n=5; *p<0,05 vs. Basal)

Es wurden Keimkonzentrationen MOI=2/5/10/20/50/100 gewählt. Die Apoptoserate wurde mit der TUNEL-Reaktion bestimmt. Dabei ergibt sich der Prozentsatz an apoptotischen Zellen aus dem Verhältnis der Anzahl der TUNEL-positiv gefärbten Zellen zur Gesamtzahl aller Zellen (siehe auch Methodenteil 2.2.4.1, Formel 2.2). In Bild 3.3, wie auch in allen folgenden Diagrammen sind die Mittelwerte über mindestens 5 Versuche auf der x-Achse aufgetragen. Die Standardabweichung wurde als Antenne gekennzeichnet. Ein Stern über dem T bezeichnet einen signifikanten Unterschied in der Stimulation im Vergleich zum basalen Wert (siehe auch Methodenteil, Kapitel 2.2.8)

Mit steigender Keimkonzentration nahm die Anzahl der TUNEL-positiv gefärbten Zellen und damit auch die Apoptose der Parietalzellen zu. Ein Anteil an apoptotischen Zellen wurde auch bei den unstimulierten, als „basal“ bezeichneten Zellen gefunden und lag in den verschiedenen Versuchen im Durchschnitt konstant zwischen 10 und 15%.

Eine signifikante Stimulation wurde bereits bei einer MOI=10 beobachtet und maximale Stimulationswerte wurden bei einer MOI=50 erreicht. Da signifikante Ergebnisse auch bei einer MOI=10 beobachtet wurden und 10 Keime pro Zelle mit den *in vivo* Bedingungen im menschlichen Magen vergleichbarer erschienen als höhere Konzentrationen, wurde für alle weiteren Experimente eine MOI=10 gewählt.

3.1.3 Ermittlung der Stimulationszeit

Des Weiteren wurde ein Zeitverlauf durchgeführt. Hier wurden die Parietalzellen für 4, 8 und 12 Stunden mit der oben ermittelten Keimkonzentration MOI=10, mit demselben *H.pylori* Typ I Stamm (G27), inkubiert.

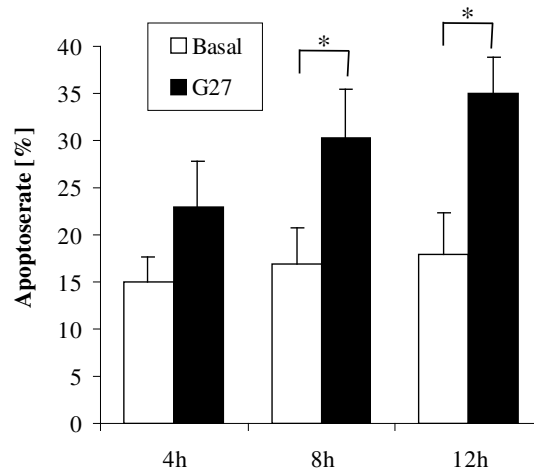


Bild 3.4. TUNEL-Reaktion: Zeitverlauf (n=5; *p<0,05)

Die Apoptose wurde wieder durch das Auszählen der TUNEL-positiven Zellen bestimmt. Hier wurde die Höhe der Apoptose der stimulierten Zellen, für jeden Zeitpunkt, direkt mit der Apoptose der basalen Zellen verglichen. Die basale Apoptoserate änderte sich in diesen gemessenen Zeitintervallen nur unwesentlich ($15 \pm 2\%$). Bei den stimulierten Proben wurde bereits bei einer Stimulationszeit von 4 Stunden eine erhöhte Apoptoserate beobachtet. Je länger die Zellen mit den Keimen stimuliert wurden, desto höher war die Apoptoserate der Zellen und erreichte bei 8 Stunden ($30 \pm 2\%$) und 12 Stunden ($35 \pm 3\%$) signifikante Werte.

Um den Anteil an eventuell nekrotischen Zellen zu untersuchen wurden die Parietalzellen in Kontrollversuchen mit Trypanblau angefärbt (siehe auch Methoden 2.2.1.1). Die Zellen wurden mit *H.pylori* G27 für 4, 8 und 12 Stunden stimuliert und jeweils nach Ablauf der Stimulationszeit mit Trypanblau angefärbt. Als Kontrolle wurden unstimulierte Zellen für dieselbe Zeitspanne inkubiert und ebenfalls mit Trypanblau angefärbt. Es wurden die blau angefärbten Zellen, mit den geschädigten Zellkernen, unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Bei einer Stimulationszeit bis zu 8 Stunden wurden keine „blauen“ Zellen nachgewiesen. Bei einer mehr als 12-stündigen Inkubationszeit häuften sich nekrotische, „blaue“ Zellen und nach Stimulationszeiten über 24 Stunden waren fast alle mit *H.pylori* stimulierten Zellen blau angefärbt. Hier konnte der Zelltod durch Nekrose nicht ausgeschlossen werden. Diese Versuche

haben gezeigt, dass bei einer Stimulationszeit von 8 Stunden und einer Keimkonzentration MOI=10, ein Zelltod durch Nekrose nahezu nicht auftrat. Daher wurden alle weiteren Experimente mit einer Stimulationszeit von 8 Stunden und einer Keimkonzentration MOI=10 durchgeführt.

3.1.4 Spezifische Induktion der Apoptose durch *H.pylori*

Um zu zeigen, dass die Induktion der Apoptose in Parietalzellen ein spezifischer Effekt von *H.pylori* ist und nicht etwa eine Spontanreaktion der Parietalzellen, wurden die Zellen mit Keimen anderer Spezies inkubiert. Hierfür wurde das gram-positive, toxinproduzierende Bakterium *S.aureus* und das gram-negative, ebenfalls toxinproduzierende Bakterium *C.jejunii* verwendet. Diese Bakterien wurden in derselben Konzentration wie *H.pylori* (MOI=10; 8 Stunden) auf die Parietalzellen gegeben. In diesen Versuchen wurde TNF- α (20ng/ml) als Positivkontrolle verwendet.

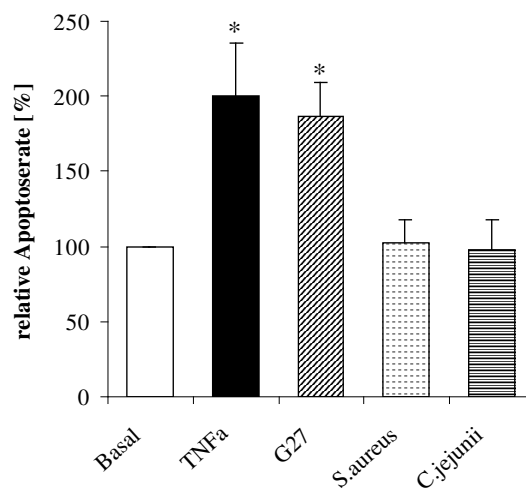


Bild 3.5. TUNEL-Reaktion: Spezifische Induktion der Apoptose durch *H.pylori* (n=7; *p<0,05 vs. Basal, vs. *S. aureus* und vs. *C. jejunii*)

Wie das Diagramm 3.5 deutlich zeigt, hatten *S.aureus* und *C.jejunii* keinen Einfluss auf die Apoptoserate der Parietalzelle, während *H.pylori* und TNF- α signifikante Effekte erzielten. Die relative Apoptoserate [%] berechnet sich nach Formel 2.2.

Um spezifische Eigenschaften von *H.pylori*, wie Beweglichkeit, Proteinbiosynthese und Integrität, als mitverantwortliche Faktoren für die zelluläre Apoptose zu untersuchen, wurden die Keime (*H.pylori* G27) über verschiedene Methoden inaktiviert. Die Keime wurden für 30 Minuten bei 60°C gekocht, Ultraschallwellen ausgesetzt (etwa 12 Stöße/Probe) oder mit Chloramphenicol (25µg/ml) für 30 Minuten behandelt.

Wie aus Bild 3.6 zu ersehen, konnten alle drei Maßnahmen die Apoptose der Zellen durch *H.pylori* eindeutig hemmen bzw. reduzieren. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass ein lebender und aktiver Keim, mit der Fähigkeit zur de novo Proteinbiosynthese, für die Induktion der Apoptose notwendig ist. Die relative Apoptoserate [%] berechnet sich nach Formel 2.2.

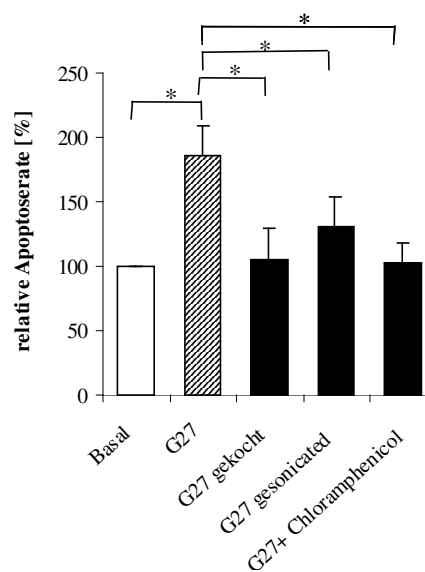


Bild 3.6. TUNEL-Reaktion: Inaktivierung von *H.pylori* (n=6; *p<0,05)

3.1.5 Einfluss verschiedener Gene von *H.pylori* auf die Apoptose

In der Einleitung wurden bereits einige Virulenzfaktoren von *H.pylori* besprochen, die für die Toxizität des Keimes verantwortlich gemacht werden. Zu diesen zählen auch einige Gene, wie das *vacA* Gen und die Gene der *cag*-PAI. Der Einfluss dieser Gene bzw. der Genprodukte auf die Apoptose wurde ebenfalls an den Parietalzellen der Ratte untersucht.

Hierfür wurden zwei *H.pylori* Typ I Stämme (G27 und 2808) und ein *H.pylori* Typ II Stamm (Tx30) verwendet. Um die Wirkung des VacA Proteins, eines sekretorischen Proteins, das von *H.pylori* an die Umgebung abgegeben wird (siehe Einleitung 1.1.3.2), auf die Apoptose

der Parietalzelle genauer zu untersuchen, wurden die Parietalzellen mit filtrierten Überständen des Typ I Stammes G27 (siehe Methodenteil 2.2.2) inkubiert.

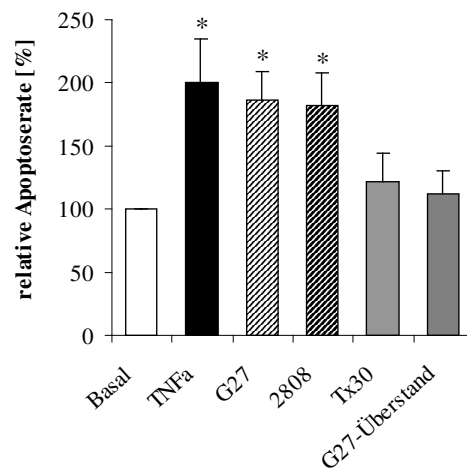


Bild 3.7. TUNEL-Reaktion: Die Wirkung verschiedener *H.pylori* Stämme und des G27-Überstands auf die zelluläre Apoptose (n=7; *p<0,05 vs. Basal, vs. Tx30 und vs. G27-Überstand)

TNF- α (20ng/ml) wurde wieder als Positivkontrolle verwendet. Die Typ I Stämme G27 und 2808 lösten eine fast doppelt so hohe Apoptoserate in den Parietalzellen aus, wie der Typ II Stamm Tx30. Wie aus dem Diagramm Bild 3.7 ersichtlich, hatte auch der *H.pylori* G27-Überstand und damit das VacA Protein keinen Einfluss auf die Apoptose der Parietalzellen. Die relative Apoptoserate [%] berechnet sich nach Formel 2.2.

Weiterhin wurden die Parietalzellen mit *H.pylori* G27-Mutanten inkubiert (siehe Methodenteil 2.2.3), in denen jeweils ein Gen der cag-PAI defekt vorliegt. Genauer waren das die Gene cagA, cagE, cagH, cagF und cagN. Hier war es von Interesse, den Einfluss der jeweils durch diese Gene kodierten Proteine bzw. die Auswirkung einer jeweils fehlenden Proteinexpression auf die Apoptose der Zellen zu untersuchen. Bild 3.8 zeigt die Ergebnisse:

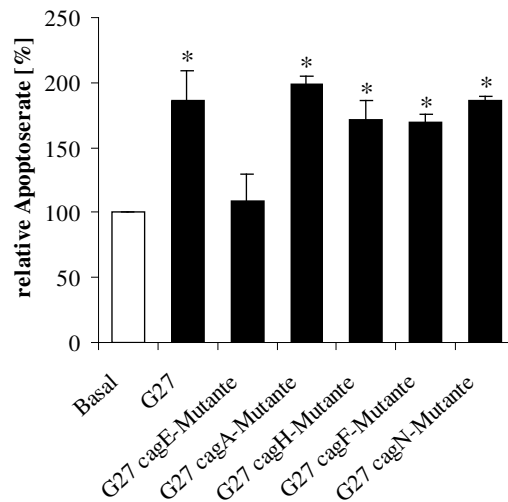


Bild 3.8. TUNEL-Reaktion: Verwendung verschiedener cag-PAI Mutanten (n=6; *p<0,05 vs. Basal und vs. G27 cagE-Mutante)

Die cag-PAI Mutanten mit den jeweils defekt vorliegenden Genen cagA, cagH, cagF und cagN lösten Apoptose in den Parietalzellen aus. Die Apoptoserate der Mutanten entspricht dabei in ihrer Höhe etwa der für *H.pylori* G27 ermittelten Rate. Untereinander zeigen die Mutanten keine signifikanten Unterschiede in ihrer Apoptoseaktivität.

Im Vergleich dazu löste die cagE Mutante nahezu keine Apoptose in den Zellen aus. Daraus wird deutlich, dass das CagE Protein für die Virulenz des Keimes eine wesentliche Rolle spielen muss. Alle anderen Gene hatten keinen Einfluss auf die Apoptose. Die relative Apoptoserate [%] berechnet sich nach Formel 2.2.

3.1.6 Synergistische Effekte von *H.pylori* und TNF- α

Eine Infektion mit *H.pylori* im menschlichen Magen, führt zu einer erhöhten Bildung von Zytokinen. Da gezeigt werden konnte, dass diese im Rahmen einer *H.pylori* Infektion die Apoptose der Magenepithelzellen auslösen und steigern können (siehe Einleitung 1.1.3.3), sollte dieser mögliche Effekt *in vitro* an den Parietalzellen untersucht werden. In den folgenden Experimenten wurden die Zellen sowohl mit *H.pylori* G27 (MOI=10), als auch mit TNF- α (20ng/ml) inkubiert. TNF- α bindet dabei spezifisch an TNFR1-Rezeptoren und löst über diese Rezeptoren Apoptose in den Zellen aus. TNFR1 ist ein Oberflächenrezeptor, der auch auf Parietalzellen der Ratte nachgewiesen werden konnte (Neu et al., 2003).

In diesem Versuch wurden TNFR1-Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet (1:500, 1:250, 1:166). Dazu wurden die Parietalzellen eine Stunde mit den TNFR1-Antikörpern vorinkubiert und nach KM-Wechsel mit *H.pylori* G27 (MOI=10) oder mit TNF- α (20ng/ml) für 8 Stunden stimuliert. Die TNFR1-Antikörper blockierten, wie aus Bild 3.9 ersichtlich, die TNFR1-Rezeptoren auf den Parietalzellen und konnten den apoptotischen Effekt von TNF- α bei einer Konzentration von 1:250 fast vollständig aufheben. Bei einer Co-Stimulation der Zellen mit *H.pylori* G27 und TNFR1-Antikörper, hatten die Antikörper jedoch keinen Einfluss auf die bakterielle Apoptoseaktivität. Das bedeutet, dass *H.pylori* Apoptose nicht über den TNFR1-Rezeptor auslöst. Die getrennte Stimulation der Parietalzellen mit TNF- α , sowie mit *H.pylori* G27 erhöhte die Apoptoserate der Zellen, im Vergleich zu der basalen Apoptoserate, signifikant. Die relative Apoptoserate [%] berechnet sich nach Formel 2.2.

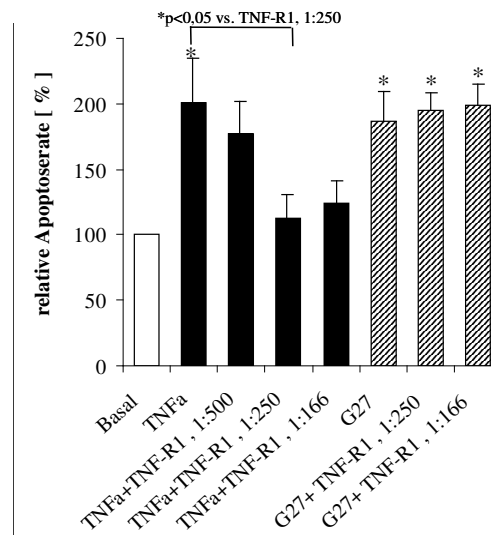


Bild 3.9. TUNEL-Reaktion: Verwendung von TNFR1-Antikörper in verschiedenen Konzentrationen, sowohl in Kombination mit TNF- α , als auch mit *H.pylori* G27 (n=6; *p<0,05 vs. Basal)

Bild 3.10 zeigt die Ergebnisse der Co-Stimulation der Parietalzellen mit *H.pylori* G27 und TNF- α für 8 Stunden. Diese Kombination führte zu einem noch stärkeren Anstieg der Apoptoserate in den Parietalzellen, als die alleinige Stimulation mit *H.pylori* oder TNF- α . In der Kombination hatten TNF- α und *H.pylori* eine nahezu additive Wirkung auf die Apoptose der Parietalzellen und wirken damit synergistisch auf den Zelltod. Die Apoptoserate im Vergleich zur basalen Apoptose ist hochsignifikant (**p<0,01). Das weist weiter darauf hin, dass für TNF- α und *H.pylori* unterschiedliche Apoptose-Signaltransduktionswege existieren müssen. Die relative Apoptoserate [%] berechnet sich nach Formel 2.2.

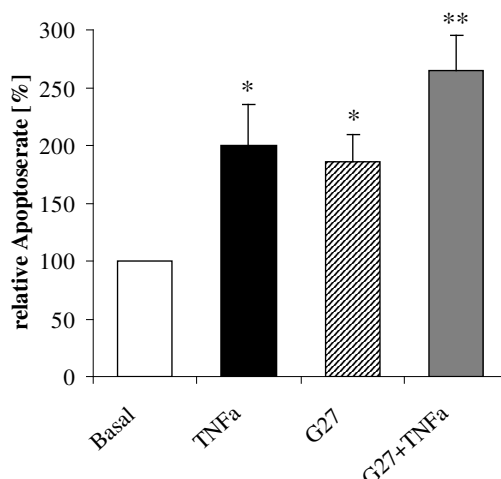


Bild 3.10. TUNEL-Reaktion: Synergismus von *H.pylori* und TNF- α (n=5; *p<0,05 vs. Basal und **p<0,01 vs. Basal)

3.2 Untersuchung der Caspase 3 Aktivität in den Parietalzellen

Der Aktivierung der Caspasen-Kaskade bei der *H.pylori* induzierten Apoptose wird in zahlreichen Veröffentlichungen große Bedeutung beigemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Caspase 3 eine wesentliche Aufgabe im Signaltransduktionsweg übernimmt (siehe auch Einleitung 1.1.3.4). Um die Aktivierung der Caspase 3 in den infizierten Parietalzellen zu untersuchen und den Apoptoseweg weiter aufzuzeigen, wurden unstimulierte und mit TNF- α (20ng/ml) und den *H.pylori* Stämmen Tx30 und G27 (MOI=100/50/25/10/5/2) stimulierte Zellen in KM II für mindestens 8 Stunden kultiviert und wie unter Kapitel 2.2.5 beschrieben mit dem Caspase 3 Substrat DEVD-pNA inkubiert. Um die Caspasenaktivierung absichern zu können, wurde ein spezifischer Caspase 3 Inhibitor (DEVD-fmk Inhibitor) verwendet.

Bild 3.11 fasst die Ergebnisse aus 7 unabhängigen Versuchen zusammen. Die Versuche zeigen, dass weder eine TNF- α - noch eine *H.pylori*-Stimulation der Zellen die Caspase 3 in Parietalzellen signifikant stimulieren konnten. Im Vergleich mit den basalen Zellen zeigen die stimulierten Zellen trotz der einzeln auftretenden hohen Standardabweichung, eine erkennbare Caspasenaktivität. Auch in den unstimulierten Zellen konnte bereits eine Caspase 3 Aktivität registriert werden.

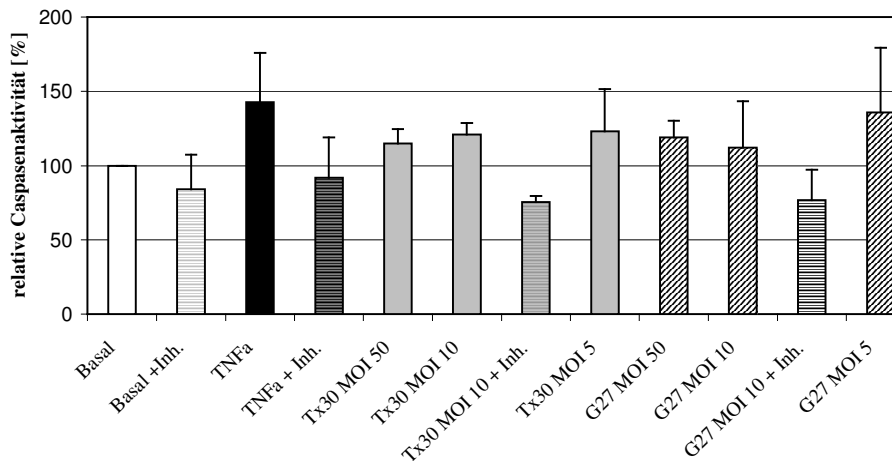


Bild 3.11. Messergebnisse der Caspase 3 Aktivität in Parietalzellen stimuliert mit TNF- α , und unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen von *H.pylori* Tx30 und G27; Einsatz des Inhibitors DEVD-fmk; (n=7)

Die Caspase 3 Aktivität in den Stimulationsversuchen war von der Art der einzelnen Stimuli (*H.pylori* und TNF- α) und von der Konzentration der einzelnen Stimuli unabhängig. Der besseren Übersicht wegen wurden nur die Keimkonzentrationen MOI=50/10/5 angegeben. Weiterhin kann auch festgestellt werden, dass es keinen Unterschied zwischen der Aktivität von *H.pylori* Typ I und Typ II Stämmen gab. Darüber hinaus ist zu verzeichnen, dass die Caspasenaktivität sowohl in basalen, wie auch in den TNF- α und *H.pylori* (MOI=10) stimulierten Zellen mit dem Inhibitor DEVD-fmk deutlich reduziert, jedoch nicht signifikant gehemmt werden konnte. Ein Zeitverlauf von 1, 4, 8 und 12 Stunden erbrachte keine weiterführenden Ergebnisse (Ergebnisse nicht dargestellt).

Als Positivkontrolle, wurden Parietalzellen in parallelen Ansätzen, aus derselben Zellcharge wie für den Caspase 3 Assay, mit TNF- α und den Keimen Tx30 und G27 in selbiger Konzentration stimuliert und die Apoptose mit der TUNEL-Reaktion untersucht.

Bild 3.12 A und B zeigt die Ergebnisse der TUNEL-Reaktion. Bild A zeigt die Stimulation der Zellen mit *H.pylori* Tx30. Die Verwendung der unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen von *H.pylori* Tx30 hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Zellapoptose. Bild B zeigt nahezu gleiche Ergebnisse wie Bild 3.3.

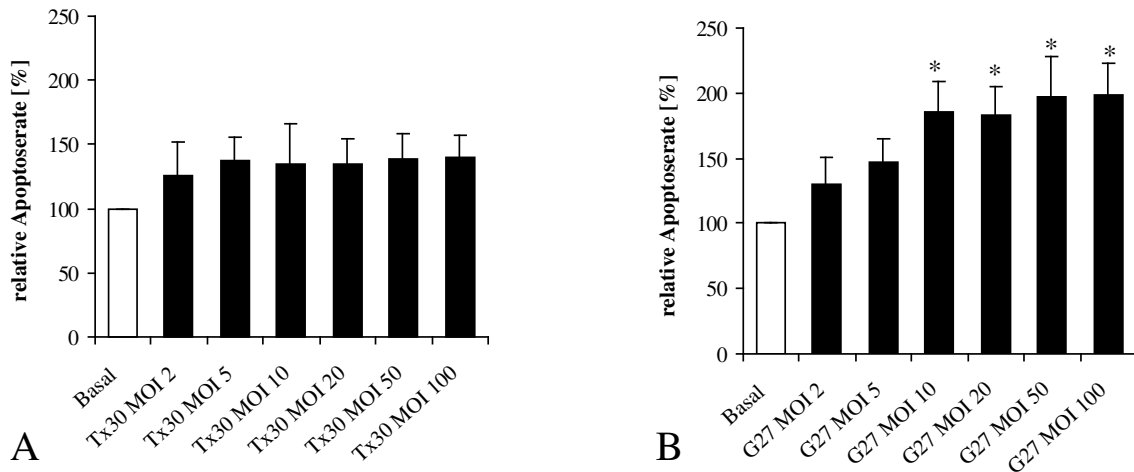


Bild 3.12. A und B. **Bild A:** TUNEL-Reaktion: Stimulation der Parietalzellen mit verschiedenen *H. pylori* Tx30-Konzentrationen **Bild B:** und verschiedenen *H. pylori* G27-Konzentrationen (n=7; *p<0,05 vs. Basal)

Vergleicht man die Ergebnisse aus Bild 3.11 und Bild 3.12, so erkennt man besonders anhand der Konzentrationsergebnisse von *H. pylori* G27 (Bild 3.12 B), dass eine signifikante Apoptoserate ab einer Bakterienkonzentration MOI=10 in den Parietalzellen induziert wurde. Stellt man nun die Apoptoserate der entsprechenden Caspase- Aktivität gegenüber, so lässt sich erkennen, dass die Caspase 3 im Signalweg der Parietalzellapoptose zwar aktiviert wird, sie aber dennoch eine untergeordnete Rolle spielt und die signifikante Apoptoserate nicht erklären kann. Es muss daher andere Wege in der komplexen Signalkaskade geben, die für die Apoptose der Zellen verantwortlich sind.

3.3 Bedeutung von NF- κ B in Parietalzellen

Bisher konnte mehrfach gezeigt werden, dass *H. pylori* den Transkriptionsfaktor NF- κ B vor allem in verschiedenen epithelialen Tumorzelllinien und in menschlichen Magenepithelzellen aktiviert (Münzenmaier et al., 1997; Keates et al., 1997)

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob NF- κ B auch in Parietalzellen der Ratte durch *H. pylori* aktiviert wird. Weiterhin sollte auch geprüft werden, ob dieser Transkriptionsfaktor für die zelluläre Apoptose eine Rolle spielt.

3.3.1 Nachweis einer NF- κ B-Aktivierung und Überprüfung der Bandenspezifität

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch *H.pylori* in Parietalzellen konnte im EMSA mehrfach nachgewiesen werden (Versuchsablauf siehe Methoden Abschnitt 2.2.6.1). Für jedes Experiment wurden mindestens drei unabhängige Versuche mit jeweils neuen Kernextrakten durchgeführt, die jeweils dasselbe Ergebnis erbracht haben.

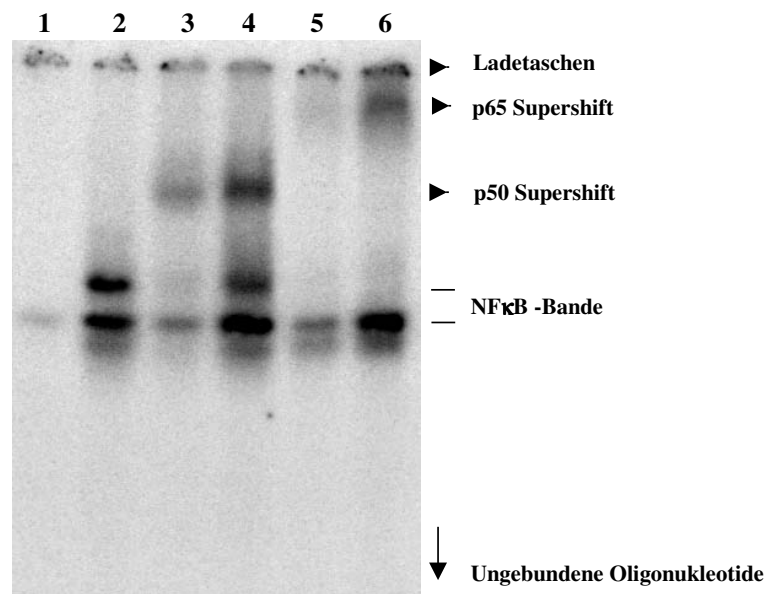


Bild 3.13. EMSA: *H.pylori* G27 aktiviert NF- κ B in Parietalzellen. Spezifizierung der NF- κ B-Banden durch p50 und p65 Supershift-Versuche

Bild 3.13 zeigt eines von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. **Spur 1** enthält das Kernprotein von unstimulierten Parietalzellen, das eine nur sehr geringe NF- κ B-Aktivierung zeigt. In **Spur 2 bis 6** wurde das Kernprotein von mit *H.pylori* G27 (MOI=10) stimulierten Parietalzellen aufgetragen, wobei die Spur 2 ausschließlich das von *H.pylori* G27 stimulierte Kernprotein enthält. In **Spur 3 und 4** wurden die Kernextrakt mit dem anti-p50 Antikörper und in **Spur 5 und 6** mit dem anti-p65 Antikörper vorinkubiert (siehe 2.2.6.1.7). Wie die Spur 2 zeigt, wird NF- κ B durch *H.pylori* G27 deutlich, unter der Ausbildung von zwei unterschiedlich hohen Banden (Protein-Oligo-Komplexe), stimuliert. Um diese Banden näher untersuchen zu können und den verschiedenen NF- κ B Untereinheiten zuordnen zu können, wurden spezielle Antikörper gegen die häufig vorkommende p50 und p65 Untereinheit des NF- κ B verwendet. Spur 3 enthält 3 μ g und Spur 4 enthält 7,5 μ g des anti-p50 Antikörpers. Beide Antikörperkonzentrationen führten zur Ausbildung einer höher gelegenen Bande, bezeichnet als

p50 Supershift, wobei diese bei der Zugabe von 7,5 μ g an Stärke erkennbar zunahm. Eine densitometrische Messung der Banden macht zudem deutlich, dass die obere NF- κ B Bande in Spur 4 an Intensität abnimmt. In Spur 5 wurde 2 μ g und in Spur 6 wurde 4 μ g des anti-p65 Antikörpers zugegeben. Die höhere Konzentration des p65-Antikörpers in Spur 6 führte zur Ausbildung einer deutlicheren Bande, bezeichnet als p65-Supershift, als die etwas niedrigere Antikörperkonzentration in Spur 5. Die Zugabe der p65-Antikörper führte auch zu einer deutlich sichtbaren Intensitätsänderung der NF- κ B Bande, im Vergleich zur NF- κ B Bande in Spur 2. Wie das Bild 3.13 zeigt, ist die obere NF- κ B Bande in Spur 6 nahezu verschwunden. Die Ergebnisse machen deutlich, dass *H.pylori* G27 NF- κ B in Parietalzellen der Ratte aktiviert und dass die obere NF- κ B-Bande vor allem aus p50/p65 Heterodimeren (siehe Spur 6) gebildet wird. Für diesen Antikörperversuch wurde ein großes Gel verwendet, damit die einzelnen Banden besser aufgetrennt werden konnten. Die gleichmäßige Verteilung der ungebundenen Oligonukleotide am unteren Bildrand werden nicht gezeigt.

3.3.2 Einfluss einzelner cag-PAI Gene auf die NF- κ B-Aktivierung

Für dieses, in Bild 3.14 exemplarisch dargestellte Experiment, wurden die Zellen mit denselben *H.pylori* G27-Mutanten inkubiert, die bereits für die TUNEL-Reaktion in Bild 3.8 verwendet wurden. Es sollte gezeigt werden, wie sich einzelne Gendefekte der cag-PAI auf die NF- κ B-Aktivierung in Parietalzelle auswirken.

Die **Spur 1** enthält wieder das Kernprotein unstimulierter Parietalzellen, welches nahezu keine NF- κ B-Aktivierung zeigt. In **Spur 2** und **8** wurde das Kernprotein von *H.pylori* G27 stimulierten Parietalzellen aufgetragen, wobei in Spur 8 die NF- κ B-Bande durch die Zugabe eines Überschusses an unmarkierten NF- κ B-Oligonukleotiden erfolgreich verdrängt wurde (siehe Methoden, Kapitel 2.2.6.1.7). Diese Verdrängung der NF- κ B-Bande sollte in diesem Experiment als Kontrolle dienen und die spezifische Höhe der NF- κ B-Banden zeigen. Die Spur 2 demonstriert deutlich die NF- κ B-Aktivierung durch *H.pylori* G27, im Gegensatz zur basalen Probe in Spur 1. In **Spur 3** wurde das durch die cagA Mutante, in **Spur 4** das durch die cagH Mutante, in **Spur 5** das durch die cagE Mutante, in **Spur 6** das durch die cagF Mutante und in **Spur 7** das durch die cagN Mutante stimulierte Kernprotein aufgetragen.

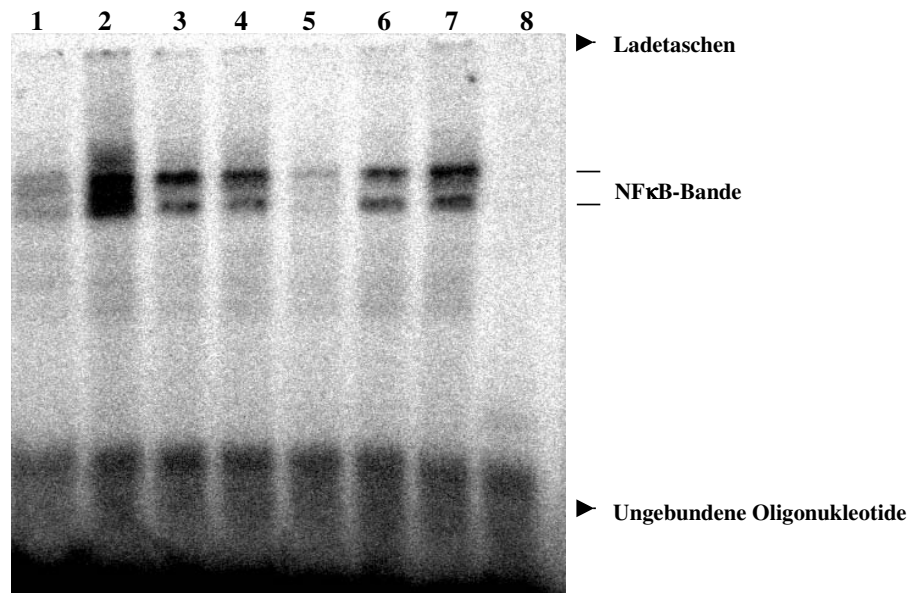


Bild 3.14. EMSA: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch verschiedene *H.pylori* G27 Mutanten

Es wird deutlich, dass die *cagE* Mutante den Transkriptionsfaktor NF- κ B nicht stimuliert. Alle anderen *cag*-PAI Mutanten stimulieren deutlich den Transkriptionsfaktor, im Vergleich mit dem WT-Stamm G27 jedoch etwas geringer. Das Ergebnis zeigt, dass das CagE Protein von großer Bedeutung für die NF- κ B-Aktivierung ist.

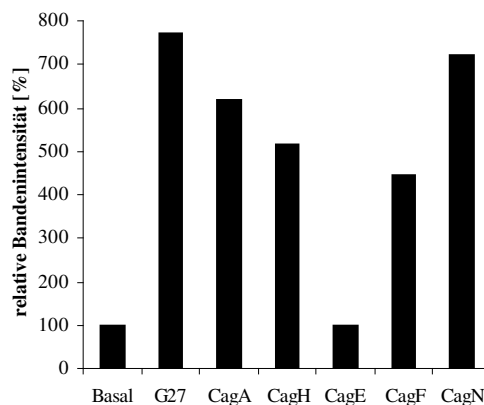


Bild 3.15. Densitometrische Vermessung der NF- κ B-Banden

Die Intensität der einzelnen NF- κ B-Banden aus Bild 3.14 und zwei weiteren vergleichbaren EMSA-Versuchen wurden densitometrisch vermessen. Die Mittelwerte der Ergebnisse aus den Versuchen wurden als relative Bandenintensität in [%] angegeben und im Diagramm Bild 3.15 in Form von Balken graphisch dargestellt.

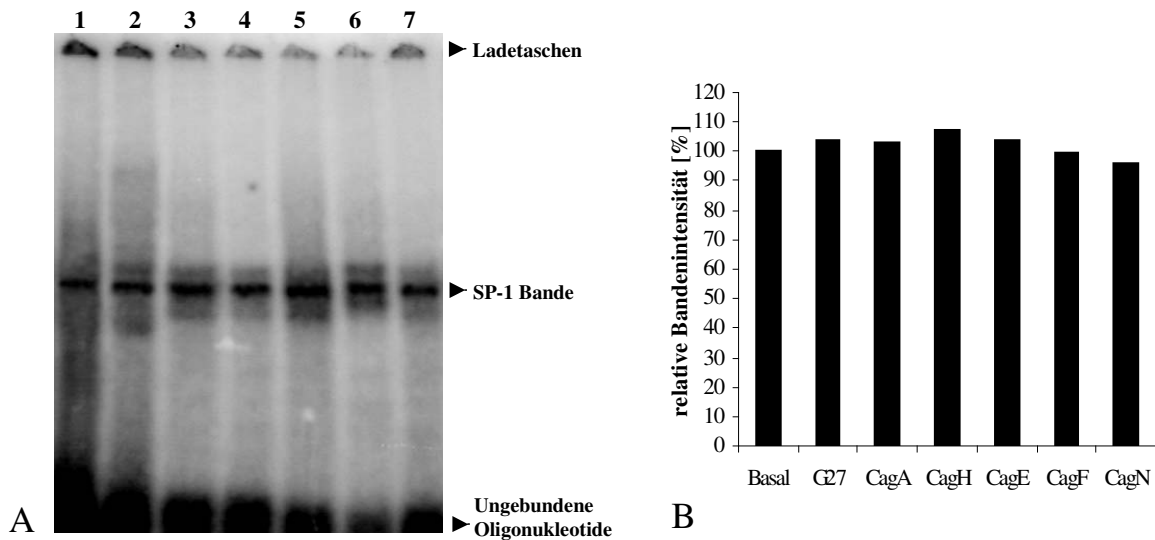


Bild 3.16.A und B. **Bild A:** EMSA: SP-1 Kontrolle. **Bild B:** Densitometrische Vermessung der SP-1 Banden

Als weitere Kontrolle wurde für jedes einzelne NF- κ B-Experiment, ein Versuch mit SP-1 Oligonukleotiden durchgeführt. Dafür wurden dieselben Kernproteine mit gleicher Proteinmenge wie für den NF- κ B-EMSA, als Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge, verwendet und mit markierten, doppelsträngigen SP-1 Oligonukleotiden inkubiert. Die Proben in Abbildung 3.16 Bild A wurden in derselben Reihenfolge wie in Bild 3.14 aufgetragen; in **Spur 1** die basale Probe, in **Spur 2** die Probe mit *H. pylori* G27, in **Spur 3** die Probe mit cagA Mutante, in **Spur 4** die Probe mit cagH Mutante, in **Spur 5** die Probe mit cagE Mutante, in **Spur 6** die Probe mit cagF Mutante und in **Spur 7** die Probe mit cagN Mutante. Alle SP-1-Banden der verschiedenen Proben zeigen nahezu dieselbe Intensität, was anzeigt, dass in jeder Spur dieselbe Proteinmenge aufgetragen wurde.

Die Bandenintensität der SP-1-Proben aus den Versuchen wurden ebenfalls densitometrisch vermessen und im Diagramm 3.14 B graphisch dargestellt. Alle Balken zeigen nahezu gleiche Höhe, was auch die vermeintlich dichtere Intensität in Spur 1 in Bild 3.16 A widerlegt.

3.3.3 Hemmung der NF- κ B-Aktivierung durch p65-Antisense-Oligonukleotide

Um zu untersuchen, ob die NF- κ B-Aktivierung eindeutig ist und damit auch spezifisch gehemmt werden kann, wurden die Parietalzellen mit p65 AS-Oligonukleotiden und als Negativkontrolle mit entsprechenden MS-Oligonukleotiden inkubiert. Hierfür wurden die Zellen

mit eben diesen Oligonukleotiden in der Gegenwart von Lipofektin transfeziert (siehe Kapitel 2.2.6.2.1). Die Transfektionsrate betrug zwischen 80 und 90%, was durch eine Kultivierung mit FAM 5'-markierten AS-Oligonukleotiden anhand einer Laserscan-Mikroskopie gezeigt werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt). Das Lipofektin alleine beeinträchtigte die Parietalzellen in Hinsicht auf eine NF- κ B-Aktivierung oder die Apoptose nicht.

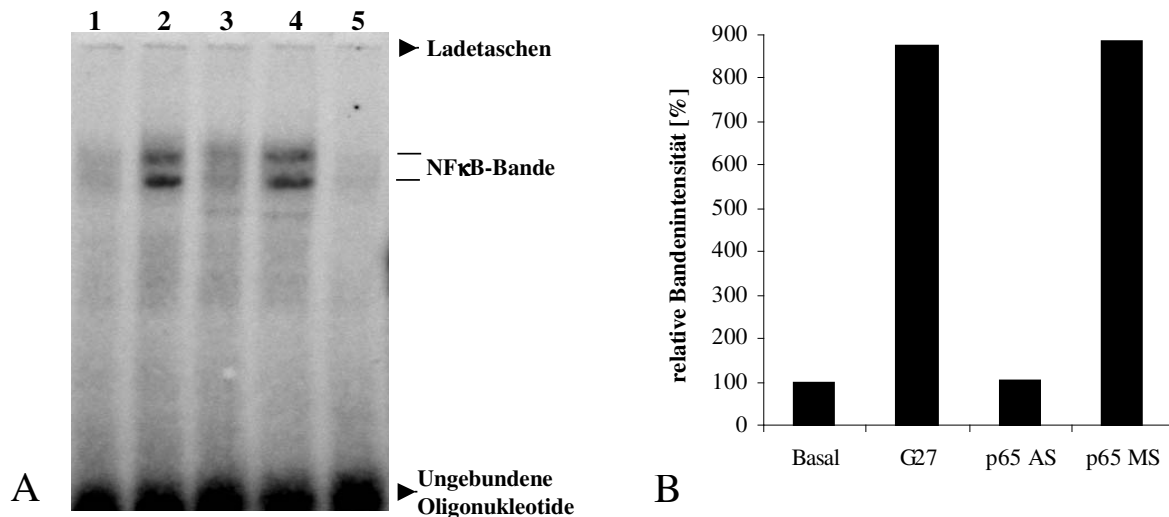


Bild 3.17. A und B. **Bild A** EMSA: Einfluss von p65 AS- und MS-Oligonukleotiden auf die Aktivierung von NF- κ B **Bild B**: Densitometrische Vermessung der NF- κ B-Banden

Der Einsatz von p65 AS-Oligonukleotide kann spezifisch die Aktivierung von NF- κ B hemmen (Bild 3.17 A). In **Spur 1** wurde das Kernprotein basal kultivierter Parietalzellen aufgetragen, welches eine nur sehr geringe NF- κ B-Aktivierung zeigt. In **Spur 2** und **5** wurde das Kernprotein von mit *H.pylori* G27 stimulierten Parietalzellen aufgetragen, wobei in Spur 5 die NF- κ B-Bande zur Kontrolle der spezifischen Bandenhöhe wieder durch die Zugabe eines Überschusses an unmarkierten NF- κ B-Oligonukleotiden verdrängt wurde. Wie bereits in den bisherigen Experimenten, zeigen die mit *H.pylori* G27 stimulierten Zellen in Spur 2 eine deutliche NF- κ B-Aktivierung. In **Spur 3** wurden die Zellen mit AS-Oligonukleotiden transfeziert, was zu einer signifikanten Hemmung der NF- κ B-Expression führte. Die Inkubation der Zellen mit den MS-Oligonukleotiden in **Spur 4** hatte dagegen keinen Einfluss auf eine NF- κ B-Aktivierung. Das macht deutlich, dass die Hemmung von NF- κ B durch die p65 AS-Oligonukleotide spezifisch war, da mit den MS-Oligonukleotiden keine Veränderungen beobachtet wurden.

Die Intensität der NF- κ B-Banden, aus drei Versuchen, wurden auch hier densitometrisch ausgemessen und im Diagramm Bild 3.17 B in Form von Balken graphisch dargestellt.

Als Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge des in Bild 3.17 dargestellten EMSA wurde auch hier jeweils ein Versuch mit SP-1 Oligonukleotiden durchgeführt. Dafür wurden dieselben Kernproteine mit gleicher Proteinmenge wie in Bild 3.17 verwendet und mit markierten, doppelsträngigen SP-1 Oligonukleotiden inkubiert (Bild 3.18).

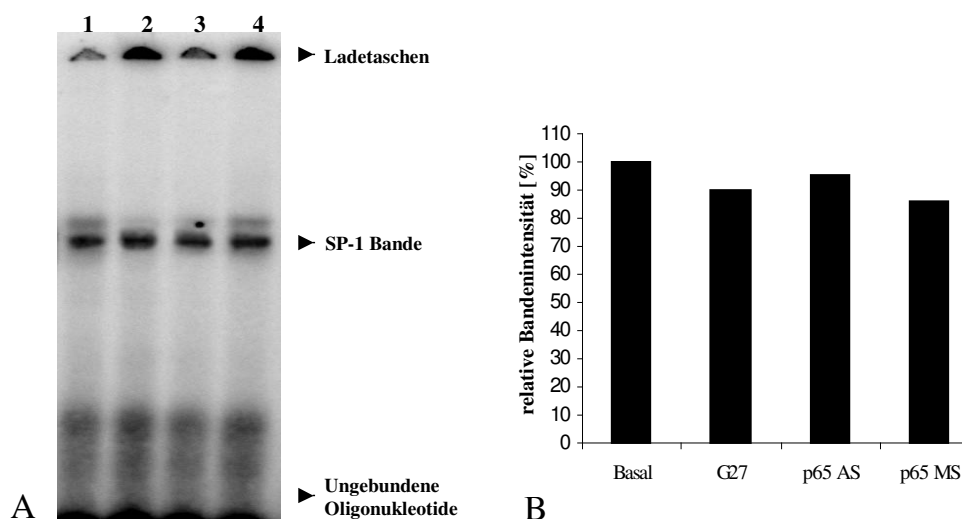


Bild 3.18. A und B **Bild A:** EMSA. SP-1 Kontrolle. **Bild B:** Densitometrische Vermessung der SP-1 Bande aus Bild 3.16 A und zwei weiteren unabhängigen Versuche

Die Proben in der Abbildung 3.16 A wurden in derselben Reihenfolge wie in Bild 3.15 A aufgetragen; in **Spur 1** die basale Probe, in **Spur 2** die Probe mit *H.pylori* G27, in **Spur 3** die Probe mit den p65 AS-Oligonukleotiden und in **Spur 4** die Probe mit den entsprechenden MS-Oligonukleotiden. Ein Vergleich der SP-1 Banden untereinander wies keine wesentlichen Unterschiede in der Bandenintensität auf. Dies bedeutet, dass in jeder Spur in etwa dieselbe Proteinmenge aufgetragen wurde. Des Weiteren ist zu beobachten, dass die AS- und MS-Oligonukleotide die SP-1 Bindung nicht unspezifisch beeinflussen.

3.3.4 NF- κ B-p65-Antisense-Oligonukleotide und Apoptose

In den folgenden Experimenten sollte der Einfluss der p65 AS-Oligonukleotide auf die Apoptose der Zellen untersucht werden. Dafür wurden die Parietalzellen mit den p65 AS- und MS-Oligonukleotiden (100 μ M/ml) mit Hilfe von Lipofektin transfiziert und anschließend mit *H.pylori* G27 (MOI=10; 8 Stunden) stimuliert. Die Transfektionsrate lag dabei zwischen 80 und 90%, wie mit FAM 5'-markierten Oligonukleotiden überprüft werden konnte. Die MS-

Oligonukleotide dienten als Negativkontrolle. Das Ergebnis aus 5 unabhängigen Stimulationsversuchen wurde mit der TUNEL-Reaktion bestimmt und in folgendem Diagramm Bild 3.19 dargestellt.

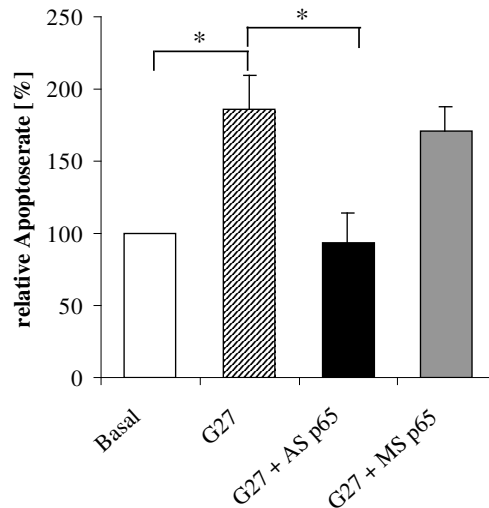


Bild 3.19. TUNEL-Reaktion: Inkubation der Parietalzellen mit p65 AS- und MS-Oligonukleotiden (n=5; *p<0,05)

Aus dem Diagramm wird deutlich, dass eine Transfektion der Parietalzellen mit p65 AS-Oligonukleotiden die Apoptose der Zellen signifikant hemmt. Die MS-Oligonukleotide hemmen die keiminduzierte Apoptose nicht. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die Hemmung von NF- κ B durch die p65 AS-Oligonukleotide die Apoptose der Parietalzellen hemmt und damit der Signaltransduktionsweg der Apoptose p65 und damit NF- κ B- abhängig ist. Die relative Apoptoserate [%] berechnet sich nach Formel 2.2.

3.3.5 Einfluss der Decoy-Oligonukleotide auf NF- κ B

In Versuchen von Gawatz et al. konnte bereits gezeigt werden, dass Decoy-Oligonukleotide NF- κ B hemmen (Gawatz et al., 1998). Diese Oligonukleotide binden, im Vergleich zu den p65 AS- Oligonukleotiden, an freies NF- κ B und verhindern dadurch die spezifische NF- κ B abhängige Transkription der Zielgene (Gawatz et al., 1998).

Daher wurden die Decoy-Oligonukleotide als zusätzliche Kontrolle der Ergebnisse in Bild 3.18 in diese Arbeit integriert. Für diese Versuche wurden die Parietalzellen mit den Decoy-Oligonukleotiden in Gegenwart von SuperFect transfeziert.

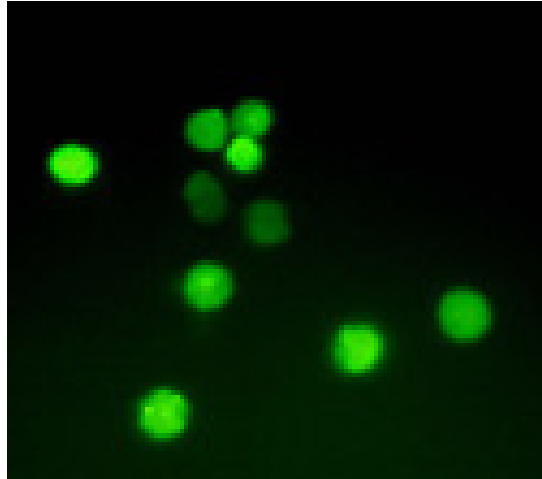


Bild 3.20. Transfektion der Parietalzelle mit FAM 5'-markierten Decoy-Oligonukleotide. Das Bild wurde unter einem Lichtmikroskop in der Dunkelkammer fotografiert. Zelldurchmesser ca. 16 bis 20 μ m; Vergrößerung 1.000fach

Die Transfektionseffizienz der Oligonukleotide wurde mit Hilfe von FAM 5'-markierten Decoy-Oligonukleotiden überprüft. Die Transfektionsrate betrug zwischen 70 und 80%, wobei die leuchtend grünen Zellen als FAM-positiv gewertet wurden (siehe Bild 3.20).

Die Transfektion der Parietalzellen mit den Decoy-Oligonukleotide war, im Gegensatz zu vielen anderen Transfektionsreagenzien, nur mit SuperFect erfolgreich. Da SuperFect für die Zellen toxisch ist, musste die Menge an SuperFect und die Transfektionsdauer genau bestimmt werden, um gute und reproduzierbare Resultate erzielen zu können. Schließlich lieferte eine Transfektion mit 6,25 μ l/ml SuperFect für 2 ½ Stunden die besten Ergebnisse.

Als Negativkontrolle wurde eine mutierte Form der κ B-Bindungssequenz, in ihrer Funktion ähnlich der MS-Oligonukleotide, verwendet.

Für den in Bild 3.19 A dargestellten EMSA wurden die Parietalzelle mit den Decoy-Oligonukleotiden vorinkubiert und anschließend mit *H.pylori* G27 kultiviert. In **Spur 1** wurde das Kernprotein unstimulierter Parietalzellen aufgetragen, welches nahezu keine NF- κ B-Aktivierung zeigt. Die **Spur 2** enthält das Kernprotein der mit *H.pylori* G27 stimulierten Probe. In **Spur 3** wurden die Parietalzellen mit den Decoy-Oligonukleotiden und in **Spur 4** mit der mutierten Form der Decoy-Oligonukleotide vorinkubiert. Ein Vergleich der Intensität der Banden in Spur 2 und Spur 3 zeigt, dass eine Inkubation der Zellen mit den Decoy-Oligonukleotiden die NF- κ B-Aktivierung deutlich reduzierte. Die mutierte Form in Spur 4 zeigt eine ähnliche Bandenintensität wie die stimulierte Probe in Spur 2. Das zeigt, dass die

mutierte Form der Decoy-Oligonukleotide keinen Einfluss auf die Hemmung von NF- κ B hatte und somit die Hemmung durch die Decoy-Oligonukleotide spezifisch ist.

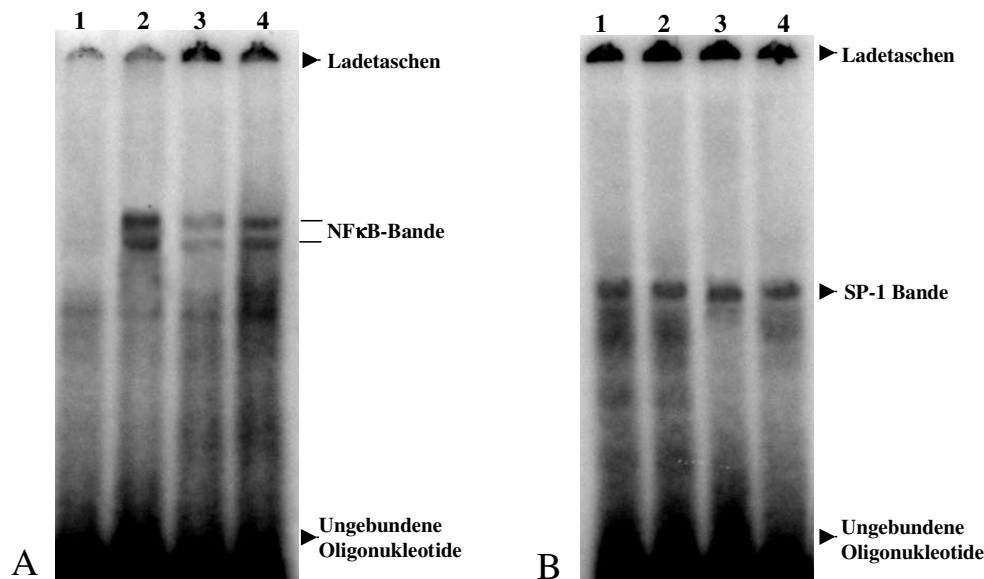


Bild 3.21. A und B. **Bild A:** EMSA: Effekt von Decoy-Oligonukleotiden auf die Aktivierung von NF- κ B. **Bild B:** SP-1 Kontrolle

Der EMSA Bild 3.21 B zeigt die dazugehörige SP-1 Kontrolle. Die Proben wurden in derselben Reihenfolge wie in Bild 3.21 A aufgetragen; in **Spur 1** die basale Probe, in **Spur 2** die Probe mit *H.pylori* G27, in **Spur 3** die Probe mit den Decoy-Oligonukleotiden und in **Spur 4** die Probe mit der mutierten Form der Decoy-Oligonukleotide. Ein Vergleich der SP-1 Banden miteinander zeigte keine wesentlichen Unterschiede in der Bandenintensität.

3.3.6 Die Decoy-Oligonukleotide und die zelluläre Apoptose

Wie für die p65 AS-Oligonukleotide, so wurde auch die Wirkung der Decoy-Oligonukleotide auf die Apoptose der Zellen untersucht. Dafür wurden die Parietalzellen wieder mit den Decoy-Oligonukleotiden transfiziert und mit *H.pylori* G27 stimuliert. Die mutierte Form der I κ B-Bindungssequenz wurde erneut als Negativkontrolle verwendet. Auch unstimulierte Parietalzellen wurden 2 ½ Stunden mit 3 μ l/ml SuperFect inkubiert, um eine rein toxisch induzierte Apoptose der Zellen auszuschließen. Die basale Apoptoserate war für diesen Zeitraum mit der bereits ermittelten basalen Apoptoserate unter 3.1.3 von $15 \pm 2\%$ vergleichbar.

Das Ergebnis aus 4 unabhängigen Stimulationsversuchen wurde mit der TUNEL-Reaktion bestimmt.

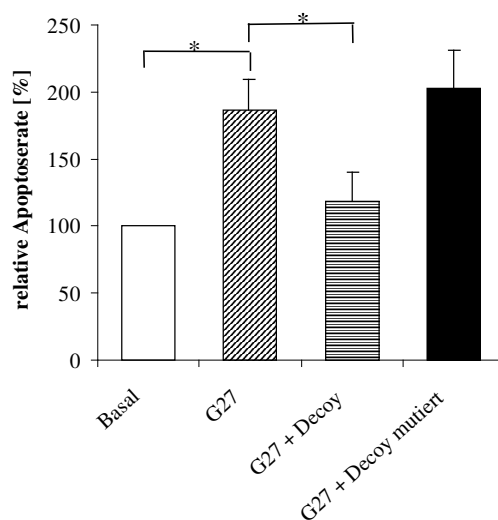


Bild 3.22. TUNEL-Reaktion: Transfektion der Parietalzellen mit Decoy-Oligonukleotiden und Stimulation mit *H.pylori* G27 (n=4; *p<0,05)

Im Vergleich zur *H.pylori* G27 stimulierten Apoptoserate, zeigte sich, dass die Decoy-Oligonukleotide die Apoptoserate in mit *H.pylori* 27 stimulierten Parietalzellen signifikant reduzieren. Die mutierte Form der Decoy-Oligonukleotide hatte ähnlich der p65 MS-Oligonukleotide keinen Einfluss auf die Apoptose. Dieses Ergebnis bestätigt, dass eine Hemmung von NF- κ B die Apoptose der Zellen hemmt. Die relative Apoptoserate [%] berechnet sich nach Formel 2.2.

3.3.7 Einfluss von PSI auf die Apoptose

Darüber hinaus wurde PSI, ein klassischer NF- κ B-Inhibitor, als weiteres Kontrollelement eingesetzt, der das NF- κ B noch früher in seiner Aktivierungskaskade hemmt, als die p65 Oligonukleotide oder Decoy-Oligonukleotide. Vielmehr hemmt es bereits die Degradation von I κ B und verhindert so die Aktivierung von NF- κ B im Zytoplasma der Zellen.

Die Parietalzellen wurden mit PSI stimuliert und anschließend mit *H.pylori* G27 inkubiert. Das Ergebnis aus 5 unabhängigen Stimulationsversuchen wurde mit der TUNEL-Reaktion bestimmt und wird in Bild 3.23 exemplarisch dargestellt.

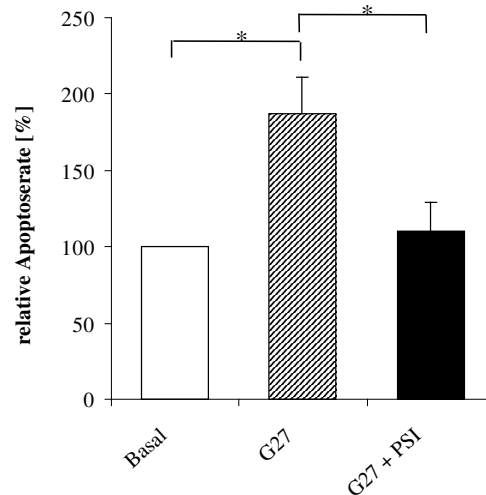


Bild 3.23. TUNEL-Reaktion: Effekt von PSI auf die Apoptose (n=5; *p<0,05)

Bild 3.23 zeigt, dass eine Co-Inkubation der Parietalzelle mit *H.pylori* G27 und PSI, die Apoptoserate der Zellen signifikant reduziert. Die relative Apoptoserate [%] berechnet sich nach Formel 2.2.

3.3.8 Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Apoptose

Einige Studien konnten bereits belegen, dass *H.pylori* die Stickstoffmonoxidproduktion positiv beeinflusst. Dieses sehr reaktive Gas fördert die Apoptose in Magenzellen (Albina et al., 1993; Lim et al., 2000; Watanabe et al., 2000). Stickstoffmonoxid entsteht im Organismus aus L-Arginin, in einer durch die iNO-Synthase katalysierten Reaktion. Es lag die Vermutung daher nahe, dass *H.pylori* auch in dem vorliegenden *in vitro* Modell über eine vermutlich NF- κ B vermittelte Stickstoffmonoxidproduktion Apoptose auslösen könnte. Um den Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Apoptose näher untersuchen zu können, wurden die Parietalzellen mit dem Stickstoffmonoxid-Synthasehemmer L-NMMA inkubiert und anschließend mit *H.pylori* G27 stimuliert. Das Ergebnis aus 6 unabhängigen Stimulationsversuchen wurde mit der TUNEL-Reaktion bestimmt.

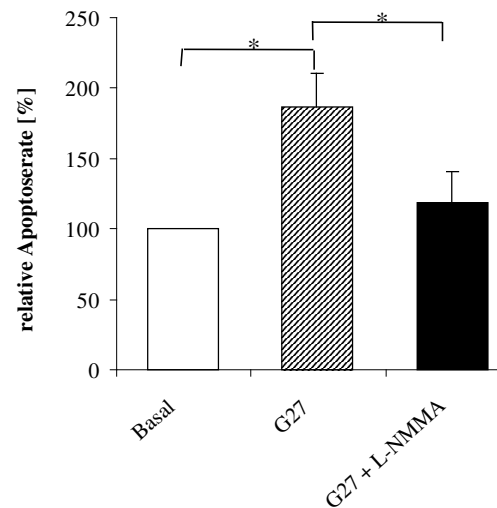


Bild 3.24. TUNEL-Reaktion: Einfluss von L-NMMA auf *H.pylori* stimulierte Parietalzellen (n=6; *p<0,05)

Die durch eine Stimulation mit *H.pylori* G27 erhöhte Apoptoserate konnte durch den Einsatz von L-NMMA signifikant reduziert werden. Dies weist darauf hin, dass Stickstoffmonoxid ein mögliches Endglied in der Signaltransduktionskette der *H.pylori* induzierten Apoptose der Parietalzellen ist.

4 Diskussion

4.1 Primärkultur der Parietalzellen

In bisherigen Veröffentlichungen gibt es kein *in vitro* Modell, das den direkten Einfluss von *H.pylori* und besonders den Einfluss keimspezifischer Virulenzfaktoren auf die Apoptose in isolierten Parietalzellen beschreibt und näher auf den Ablauf der Apoptose in dieser Zellpopulation eingeht.

Parietalzellen sind ausdifferenzierte, säureproduzierende Zellen, die von den Stammzellen in der Isthmusregion der Magendrüsen abstammen. Unter *in vivo* Bedingungen haben sie eine Lebensdauer von bis zu 54 Tagen (Karam et al., 1999). Alle Versuche in dieser Arbeit wurden an isolierten, hochangereicherten Primärkulturen der Parietalzellen durchgeführt. Vorteile dieses *in vitro* Zellmodells sind zum einen, dass ohne den Einfluss äußerer Störfaktoren, wie beispielsweise Entzündungsmediatoren, gezielte Stimulationsversuche unternommen werden und damit auch keimspezifische Faktoren besser untersucht werden können. Zum anderen stellen die isolierten Parietalzellen eine nicht-transformierte Zellepopulation dar, die im Gegensatz zu häufig verwendeten Tumorzelllinien, nicht mehr teilungsfähig ist und auch keine Tendenz zur Proliferation zeigt. Da die Parietalzellen der Ratte aus diesem Grunde als geeignetes Zellmodell befunden wurde, das besser als Tumorzelllinien die *in vivo* Bedingungen dieser Zellpopulation im *H.pylori* infizierten menschlichen Magen repräsentieren kann, wurde es für die Untersuchung der Zellaoptose in der vorliegenden Arbeit gewählt.

Dabei sei erwähnt, dass Studien zufolge, Ratten mit einem *H.pylori* Typ I Stamm infiziert wurden und bei den Tieren zwei Monate nach der Infektion eine chronische Gastritis und Magengeschwüre in der Antralregion diagnostiziert werden konnte. Weiterhin war diese Entzündung ebenfalls durch eine erhöhte Apoptoserate der Zellen und eine Immunantwort des Wirtes geprägt (Li et al., 1999 und 1998). Damit simuliert dieses Tiermodell den Verlauf der Infektion und die Pathologie der Infektion beim Menschen.

Ein Nachteil dieser Primärkulturen allerdings ist, dass sie, herausgerissen aus dem Zellverband, eine sehr viel kürzere Lebensdauer als die Zellen *in vivo* aufweisen. Aus diesem Grund

können zelluläre Veränderungen nur über einen relativ kurzen Zeitraum beobachtet werden. Die Überlebenszeit der Parietalzellen betrug unter den bereits beschriebenen Kulturbedingungen bis zu 48 Stunden.

4.2 *H.pylori* induziert Apoptose in Parietalzellen

In der Bevölkerung, vor allem in den Ländern der dritten Welt, ist eine Infektion mit *H.pylori* weit verbreitet. Er besiedelt chronisch die Magenmukosa und führt im Wirtsmagen zu einer chronischen Gastritis, die begleitet wird von einer erhöhten Apoptoserate der Epithelzellen, aber auch der Zellen der Magengrübchen und Magendrüsen (Moss et al., 1996; Genta et al., 1997). Eine Korpusgastritis oder eine medikamentös induzierte Verlagerung der bakteriellen Infektion in die Korpusregion des Magens im Zuge einer Veränderung des luminalen pH-Wertes führt im Verlauf zu einer Atrophie mit zunehmender Reduktion des Drüsengewebes. Das Überleben des Keimes kann in diesem Stadium der Atrophie nur durch einen Rückzug in tiefere, noch vorhandene Drüsenabschnitte gewährleistet sein. Hier besteht nun auch eine große Wahrscheinlichkeit, dass der Keim einen direkten Kontakt mit den Parietalzellen hat und mit diesen Zellen in Wechselwirkung treten kann. Bilder von Prof. Stolte stützen nachhaltig diese These des Rückzuges und der Kontaktaufnahme. Wie in Bild 1.4 dargestellt (Kapitel 1.3 der Einleitung) befinden sich nach einer Gabe von Pantoprazol *H.pylori* Bakterien in einer Magendrüse, nahe der sekretorischen Canaliculi der Parietalzellen. Da weitere Untersuchungen zeigen konnten, dass darüber hinaus sowohl eine akute wie auch eine chronische Infektion mit *H.pylori* einen Einfluss auf die Parietalzelle und ihre Säureproduktion nimmt (siehe Einleitung, Kapitel 1.3), sollte der direkte Effekt des Keimes in dieser Versuchskonstellation *in vitro* auf die Parietalzellen untersucht werden (El-Omar et al., 1997; Gööz et al., 2000; Jaup et al., 2001; El-Omar et al., 1995; Moss et al., 1993).

In vorliegender Arbeit wurden die Parietalzellen direkt mit *H.pylori* stimuliert. Dies führte bei Bakterienkonzentrationen zwischen MOI=10 und MOI=100 und Stimulationszeiten von 8 und 12 Stunden zu einer 2 bis 3-fach erhöhten Apoptoserate, im Vergleich zur basalen Apoptoserate unstimulierter Zellen. Die spontane, basale Apoptoserate von $15\pm 2\%$ ist relativ hoch, kann aber durch den komplexen und invasiven Vorgang der Zellisolation bzw. dem Herauslösen der einzelnen Zellen aus ihrem Zellverband erklärt werden. Die Versuche mit der Trypanblaufärbung haben weiter gezeigt, dass bei einer Stimulationszeit von 8 Stunden, Zelltod

durch Nekrose ausgeschlossen werden kann. Weiterhin konnte mit einer Keimkonzentration $MOI=10$, die den *in vivo* Bedingungen im menschlichen Magen vergleichbar erschien, signifikante und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Diesen Ergebnissen entsprechend wurden alle Versuche mit einer *H.pylori*-Konzentration $MOI=10$ und einer Stimulationsdauer von 8 Stunden durchgeführt. In anderen Untersuchungen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Infektion mit *H.pylori* sowohl in Tumorzelllinien des Magens *in vitro* (Chen et al., 1997; Fan et al., 1998), als auch in Magenzellen menschlicher Biopsien eine 2 bis 5-fach erhöhte Apoptoserate auslöst (Moss et al., 2001; Kohda et al., 1999; Rokkas et al., 1999). Eradikationsstudien zeigen in diesem Zusammenhang, dass unter einer therapeutischen Behandlung der *H.pylori*-Infektion, die gesteigerte Apoptoserate der Zellen wieder auf die physiologische Apoptoserate zurückgeht, Entzündungszellen verschwinden und sich sogar im einzelnen intestinale Metaplasien wieder zurückbilden (Hahm et al., 1997; Jones et al., 1997; Konturek et al., 1999; Bayerdörffer et al., 1995).

Weiterhin erwies sich der apoptotische Einfluss von *H.pylori* auf die Parietalzellen als spezifisch, da andere toxische Bakterien, wie *S.aureus* und *C.jejunii* keine Apoptose auslösen konnten. In Versuchen von Wagner et al. (1997) und Kim et al. (2000) konnte ein vergleichbares Verhalten von *C.jejunii* auf die Apoptose in Tumorzelllinien beobachtet werden.

Die Apoptose der Parietalzellen wurde im Rahmen der Arbeit über zwei unabhängige Methoden ermittelt. In der Elektronenmikroskopie konnten die typischen ultrastrukturellen Veränderungen der Apoptose gezeigt werden und somit ein qualitativer Nachweis erbracht werden. Über die TUNEL-Methode konnten die während der Apoptose stattfindenden DNA-Strangbrüche im Zellkern färberisch dargestellt werden. Sie ist eine Methode, die bereits andere Forschergruppen zum Nachweis der Apoptose verwendet haben (Konturek et al., 1999; Moss et al., 2001) und sich als quantitativer Nachweis der Apoptose etabliert hat.

4.3 Essentielle Virulenzfaktoren von *H.pylori*

Die klinische Manifestation einer *H.pylori*-Infektion ist das Resultat eines komplexen Zusammenspiels von Wirtsreaktionen und bakteriellen Faktoren. Um in vorliegender Arbeit bestimmte Strukturen der Keime auffindig zu machen, die unabhängig von der Immunantwort des Organismus *in vivo*, für die Aktivierung der Apoptose verantwortlich sein könnten, wurde der *H.pylori* Typ I Stamm G27 durch verschiedene Behandlungsmethoden inaktiviert. Da-

bei führte eine Ultraschall- und Hitzebehandlung der Keime zu einer deutlichen Hemmung der zellulären Apoptoserate. Das macht deutlich, dass ein aktiver und beweglicher Keim mit intakter Zellmembran für die Induktion des Zelltodes notwendig ist. Ein entsprechendes Ergebnis konnten auch Watanabe et al. (2000) beobachten. Weiterhin wurde in vorliegenden Versuchen die Bedeutung bakterieller Lipopolysaccharide und anderer Oberflächenstrukturen der Bakterienmembran für die zelluläre Apoptose untersucht. Lipopolysaccharide sind Oberflächenantigene, die auf der äußeren Bakterienmembran lokalisiert und sowohl hitzestabil sind, als auch durch Ultraschallwellen nur schwer zerstört werden können (Moran et al., 1996). In unseren Versuchen hatte eine Ultraschall- und Hitzebehandlung der Keime jedoch zu einer deutlichen Hemmung der Apoptose geführt. Dies zeigt, dass diese Strukturen für den Zelltod der Parietalzellen nicht verantwortlich sein können. Verglichen mit den Lipopolysacchariden anderer Bakterien, wie den von *Escherichia coli*, zeigen Lipopolysaccharide von *H.pylori* nur eine geringe Endotoxizität auf (Perez-Perez et al., 1995; Muotiala et al., 1992) und konnten auch in anderen Untersuchungen nicht mit dem aktiven Zelltod in Verbindung gebracht werden (Watanabe et al., 2000). Dagegen wurde den Lipopolysacchariden in Versuchen von Perez-Perez et al. (1995) und Valkonen et al. (1994) aber auch eine pathologische Rolle im Sinne einer schädigenden Wirkung auf das Magenepithel zugeschrieben.

Auch eine Behandlung der Bakterien mit dem bakteriostatisch wirksamen Antibiotikum Chloramphenicol konnte die Apoptose der Parietalzellen vollständig hemmen. Das macht deutlich, dass eine funktionierende Proteinbiosynthese des Keimes und einer damit verbundenen Proteinneusynthese für die Apoptose notwendig ist. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit einer Studie von Su et al. (1998), welche zeigen konnte, dass eine aktive Proteinbiosynthese für die Adhärenz der Bakterien an Epithelzelllinien von Bedeutung ist.

Die *cag*-PAI und das *VacA* werden in der Literatur häufig für die Virulenz von *H.pylori* und den damit verbundenen Folgen für die Zelle verantwortlich gemacht. So wurden in zahlreichen Studien besonders *cagA*⁺/*vacA*⁺ *H.pylori* Typ I Stämme mit einer erhöhten Toxizität und Virulenz in Verbindung gebracht (Peek et al., 1995; Le`Negrate et al., 2001; Moss et al., 2001; Sande et al., 2001; Sharma et al., 1995). In diesem Zusammenhang beobachteten Moss et al. (2001) an infizierten menschlichen Magenbiopsien eine signifikant erhöhte Apoptoserate in Zusammenhang mit *H.pylori* Typ I Stämmen.

In Versuchen dieser Arbeit konnte an Parietalzellen ein vergleichbarer Sachverhalt festgestellt werden. Somit erwiesen sich die beiden Typ I Stämme G27 und 2808 deutlich virulenter, als der Typ II Stamm Tx30 und konnten im Vergleich auch eine eindeutig höhere Apoptoserate der Zellen induzieren.

Weiterhin wurden die Parietalzellen mit filtrierten Überständen des *H.pylori* Typ I Stammes G27 inkubiert. Damit sollte untersucht werden, ob sezernierte Produkte des Keimes, die er in das umgebende Milieu abgibt, Apoptose in den Parietalzellen auslösen können. Die Ergebnisse zeigen, dass die Überstände keine Apoptose induzieren konnten. Daraus lässt sich schließen, dass sezernierte Produkte, wie das VacA Protein, nicht entscheidend sind für die Apoptose der Parietalzellen. Auch die oft beschriebene Vakuolisierung der Zellen (Weel et al., 1996; Papini et al. 1994) konnte in den elektronenmikroskopischen Bildern der infizierten Parietalzellen nicht bestätigt werden. Diese Versuche machen deutlich, dass nicht sezernierte Produkte, sondern ein direkter Kontakt des Bakteriums zu den Parietalzelle erforderlich ist, um Apoptose auszulösen (Smoot et al., 1997; Kohda et al., 1999; Guruge et al., 1998). Entsprechend hatten auch Ogura et al. (2000) in Langzeitversuchen die Auswirkungen von virulenten *H.pylori* Typ I Stämmen und *H.pylori* vacA-Mutanten an mongolischen Wüstenmäusen untersucht. In diesen Tierexperimenten führten beide *H.pylori* Stämme zu einer homologen Entzündungsreaktion im Magen der Tiere. Somit war auch in diesen Versuchen das vacA Gen nicht verantwortlich für die virulente Wirkung der Keime (Ghiara et al., 1995; Weel et al., 1996). Allerdings konnte in anderen vacA-Studien auch das Gegenteil gezeigt werden (Telford et al., 1994; Maeda et al., 1998) und damit bleibt die direkte Aufgabe des VacA Proteins weiterhin umstritten.

Defekte und Mutationen einzelner Gene der cag-PAI wirken sich in unterschiedlicher Form auf die Apoptose und die Produktion von Entzündungsmediatoren der infizierten Zellen aus (Censini et al., 1996; Akopyants et al., 1998; Ogura et al., 1998). Die cag-PAI ist, wie bereits in der Einleitung besprochen, eine Genstruktur, die für über 40 Bakterienproteine kodiert, die mit einer erhöhten Virulenz der Keime assoziiert sind. Tatsächlich hat man zeigen können, dass unter anderem das cagE Gen eine wichtige Rolle für die Ausbildung eines Typ IV Sekretionsapparates spielt, über den Moleküle, wie das CagA exportiert werden können und zu Veränderungen in der Wirtszelle führen (Segal et al., 1999; Backert et al., 2000; Covacci et al., 1999; Censini et al., 1996; Asahi et al., 2000; Stein et al., 2000; Odenbreit et al., 2000).

Eine bedeutende Funktion konnte dem cagE Gen auch in der vorliegenden Arbeit zugeschrieben werden. Stimulationsversuche, in denen verschiedene *H.pylori* G27-Mutanten verwendet wurden zeigten, dass das Produkt des cagE Gens wesentlich zur Induktion der Apoptose in Parietalzellen beiträgt, da die cagE-Mutante als einzige der Mutanten keine Apoptose in den Parietalzellen hervorrufen konnte.

Ähnliche Auswirkungen des cagE Gens hinsichtlich der Apoptose wurde auch in anderen Arbeiten beobachtet. So konnten Peek et al. (1999) an einer epithelialen Tumorzelllinie nach-

weisen, dass das *cagE* Gen an Veränderungen im Zellzyklus und an der Apoptose der Zellen erheblich beteiligt ist. Weiterhin zeigten Langzeitversuche mit keimfrei gezüchteten mongolische Wüstenmäusen, die mit *H.pylori* Typ I Stämmen und *H.pylori cagE*-Mutanten infiziert wurden, dass die *cagE*-Mutanten, im Gegensatz zu den virulenten Stämmen, nur eine milde Gastritis induzierten (Ogura et al., 2000).

Alle anderen *cag*-PAI Gene (*cagA*, *cagN*, *cagF*, *cagH*), die in dieser Arbeit untersucht wurden, haben sich für den Apoptoseprozess in Parietalzellen als nicht verantwortlich erwiesen.

In der Literatur konnte jedoch in Versuchen das *cagN* Gen, wie das *cagE* Gen, mit der CagA-Phosphorylierung und einer Aktivierung von IL-8 in Verbindung gebracht werden (Censini et al., 1996). Andere Gene, wie das *cagH* Gen, konnten bisher mit keiner Funktion assoziiert werden. Eine Ausnahme bildet hier das *cagF* Gen, das eine Rolle in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zu spielen scheint.

4.4 Der Signaltransduktionsweg über TNFR1 und Caspase 3

Die Infektion mit *H.pylori* ruft eine Entzündung der Magenschleimhaut hervor, die von einer Immunantwort des Wirtsorganismus und der Bildung von Entzündungsmediatoren begleitet wird. So konnte an menschlichen Biopsien des Antrums eine erhöhte Produktion von TNF- α und IL-1 β in Zusammenhang mit einer *H.pylori* assoziierten Gastritis nachgewiesen werden (Noach et al., 1994; Crabtree et al., 1991). *In vitro* Versuche mit verschiedenen Zellkulturen konnten ferner zeigen, dass sowohl TNF- α und IFN- γ , wie auch IL-1 β alleine Apoptose induzieren können (Mahr et al., 2000; Crabtree et al., 1996; Fan et al., 1998; Neu et al., 2003). In diesem Zusammenhang konnte auch beobachtet werden, dass die *H.pylori* induzierte Apoptose an Epithelzellen durch den Einfluss der Zytokine, insbesondere durch IFN- γ (Fan et al., 1998) und TNF- α (Wagner et al., 1997), deutlich erhöht war (siehe auch Einleitung, Kapitel 1.1.3.3).

In vorliegender Arbeit führte die getrennte Stimulation der Parietalzellen mit *H.pylori* G27 oder TNF- α in beiden Fällen zu einer signifikant erhöhten Apoptoserate der Zellen. Die kombinierte Stimulation der Zellen mit beiden Faktoren hatte einen nahezu additiven Effekt auf die Apoptose der Zellen. In ähnlicher Weise konnte auch Wagner et al. (1997) diesen Effekt an Tumorzellen aufzeigen. Demnach steht dieses Ergebnis im Einklang mit bereits veröffent-

lichten Daten, die zeigen konnten, dass Entzündungsmediatoren, wie das TNF- α sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* die *H.pylori* induzierte Apoptose der Zellen erhöhen.

TNF- α löst dabei Apoptose über den TNFR1-Rezeptor aus (siehe auch Einleitung, Kapitel 1.1.3.4), der auch auf Parietalzellen der Ratte nachgewiesen werden konnte (Neu et al., 2003). Wie bereits erwähnt, wurde in *H.pylori* infizierten Magenbiopsien eine erhöhte Expression des TNFR1-Rezeptors und eine erhöhte Produktion an Zytokinen, wie das TNF- α , ermittelt (Hasumi et al., 2002; Houghton et al., 2000; Brozowski et al., 1999). Das zeigt, dass unter *in vivo* Bedingungen auch die zytokinvermittelte Schädigung der Zellen zur Apoptoserate beiträgt (Hasumi et al., 2002).

In dieser Arbeit konnte die TNF- α induzierte Apoptose der Parietalzellen durch den Einsatz von speziellen TNFR1-Antikörpern vollständig blockiert werden. Diese Antikörper hatten dabei jedoch keinerlei Einfluss auf die *H.pylori* induzierte Apoptose der Zellen. Folglich konnte in dem vorliegenden *in vitro* Parietalzellmodell gezeigt werden, dass TNF- α die Apoptose der Zellen via TNFR1 erhöht, *H.pylori* die Apoptose der Zellen aber nicht über den TNFR1-Rezeptor, sondern über einen anderen Rezeptor bzw. einen anderen Mechanismus auslöst. Das zeigt, dass sich die beiden Apoptosewege von *H.pylori* und TNF- α unterscheiden. Entsprechende Ergebnisse wurden auch in anderen Studien erzielt (Hasumi et al., 2002; Thalmaier et al., 2002; Maeda et al., 2000; Wagner et al., 1997).

Neu et al. (2005) untersuchten einen weiteren Apoptose induzierenden Liganden TRAIL (TNF- α -related apoptosis-inducing ligand), der auch zur TNF-Familie gehört. Die ubiquitär vorkommenden TRAIL-Liganden binden an entsprechende TRAIL-Rezeptoren (R-1 und R-2) und lösen Apoptose vornehmlich über die Caspasen-Kaskade aus. Neu et al. (2005) konnten weiter zeigen, dass in der mit *H.pylori* infizierten menschlichen Magenmukosa die Expression des TRAIL-Liganden und der TRAIL-Rezeptoren R-1 und R-2 deutlich herunter reguliert war. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch TRAIL nicht für die *H.pylori* induzierte zelluläre Apoptose verantwortlich ist. Vielmehr wird postuliert, dass mit Hilfe von TRAIL die erhöhte Apoptose der Zellen während einer Infektion mit *H.pylori* Typ I Stämmen reduziert wird und auf diese Weise die Zellzahl im Gleichgewicht gehalten werden soll.

Weiterhin wurde in vorliegender Arbeit die Relevanz der Caspase 3 im Signaltransduktionsweg der Parietalzellen untersucht. Caspasen, die sich durch ihre strenge Aspartatspezifität ausweisen, bilden die ausführende Todesmaschinerie in vielen beschriebenen Apoptosemodellen (Green et al., 1998). Auch in Zusammenhang mit der *H.pylori* induzierten Apoptose wurde die Aktivierung der Caspasenkaskade bereits in einzelnen Studien beschrieben (Shi-

bayama et al., 2001; Maeda et al., 2002, Potthoff et al., 2002). Bisher konnten in Zusammenhang mit *H.pylori* infizierten epithelialen Tumorzellen unter anderem zwei Hauptwege beschrieben werden, die beide über eine Aktivierung von Caspasen zur Apoptose der Zellen führen (siehe auch Einleitung Kapitel 1.1.3.4). Maeda et al. (2002) konnten nach Infektion der Zellen mit *H.pylori* eine erhöhte Freisetzung von Cytochrom c messen und machten daher den mitochondrialen Apoptoseweg [2] (vgl. Einleitung, Kapitel 1.1.3.4) für den Zelltod verantwortlich. Ledig et al. (2004) berichteten von einer Aktivierung beider Apoptosewege [1] und [2] (vgl. Einleitung, Kapitel 1.1.3.4). Sie konnten einerseits die Aktivierung der Caspase 8 über den mitochondrialen Weg [2] und andererseits eine Expression des Fas-Rezeptors über den Signalweg der Todesrezeptoren [1] nachweisen.

Die Caspase 3 ist eine wichtige Haupteffektor-Caspase, die für die proteolytische Spaltung einiger zelltodinduzierender Substrate im komplexen Ablauf der Apoptose, wie beispielsweise des nukleären Enzym poly(ADP-ribose)polymerase (PARP), verantwortlich ist (Cohen et al., 1997; Kim et al., 2000; Ashktorab et al., 2002; Simbulan-Rosenthal et al., 1998). Die Caspase 3 hat als eines der letzten Glieder in der Signaltransduktionskette der Caspasenkaskade eine ausführende Funktion und beide Apoptosewege münden in die Caspase 3 ein (Bild 1.1., Einleitung 1.1.3.4).

In vorliegender Arbeit wurde die Aktivität der Caspase 3 in *H.pylori* stimulierten Parietalzelle untersucht. Die Ergebnisse der Versuche zeigen, dass in den mit TNF- α - und den mit *H.pylori* stimulierten Zellen eine Caspase 3 Aktivität nachgewiesen werden konnte. Weiterhin wurde eine vergleichsweise hohe Caspase 3 Aktivität in den basalen Proben festgestellt werden. Zieht man die bereits erwähnte basale Apoptoserate von $15\pm 2\%$ in Betracht, so könnten es diese apoptotischen Zellen sein, die diese basale Caspasenaktivität bewirken.

Im Vergleich zu den basalen Proben, zeigte sich in den stimulierten Proben dennoch eine messbare Zunahme der Caspase 3 Aktivität, die jedoch unabhängig von der Art der Stimuli (TNF- α oder *H.pylori* Typ I oder Typ II Stamm) und der eingesetzten Bakterienkonzentration war (MOI=100/50/25/10/5/2). Interessant war, dass die zu verzeichnende Caspasenaktivität sowohl in unstimulierten, als auch in den mit TNF- α und mit *H.pylori* (MOI=10) stimulierten Zellen mit dem Caspase 3-Inhibitor DEVD-fmk deutlich reduziert, aber nicht signifikant gehemmt werden konnte. Das lässt die Vermutung zu, dass in den Parietalzellen ein Caspase 3 abhängiger Weg existiert. Da die gemessene Caspasenaktivität der Caspase 3 die aus den entsprechenden Auszählversuchen der TUNEL-Färbung ermittelte Apoptoserate von $30\pm 2\%$ (*H.pylori* G27; MOI=10) aber nicht alleine erklären kann, spielt der Apoptoseweg über die Caspasen in Parietalzellen wohl nur eine untergeordnete Rolle.

In ECL-Zellen der Ratte konnte ähnlicher Sachverhalt beobachtet werden (Mahr et al., 2000). In Versuchen konnten Mahr et al. (2000) zeigen, dass der Einsatz des Caspase 3-Inhibitors DEVD die durch IL-1 β induzierte Apoptose der ECL-Zellen ebenfalls nicht signifikant hemmen konnte. Dennoch war auch in ECL-Zellen die Apoptoserate der Zellen durch den Einsatz des Caspase 3-Inhibitors DEVD erniedrigt. Das wurde darauf zurückgeführt, dass auch in ECL-Zellen ein nicht relevanter Apoptoseweg über die Caspase 3 vorhanden sein muss.

Weiterhin wurde in weiterführenden Versuchen innerhalb der gleichen Arbeitsgruppe mittels Western-Blots das Protein *H.pylori* (G27) stimulierter Parietalzellen auf die Caspase 3 hin untersucht (Stimulationszeiten: 3, 6, 9 Stunden). In allen Proteinproben (siehe Proben für den Caspase 3 Assay) konnte nur eine sehr schwache 32 kD-Bande der Pro-Caspase 3, aber nicht die 20 kD-Bande der aktivierten Caspase-3 detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Ashktorab et al. (2002) dagegen konnten in einer Tumorzelllinie (AGS-Zellen) die aktivierte Caspase 3 im Western-Blot bereits nach 3 Stunden und Potthoff et al. (2002) in AGS Zellen nach 5 Stunden nachweisen.

Es muss in Parietalzellen der Ratte daher einen anderen Hauptweg geben, über den die Signalkaskade der Apoptose initiiert wird.

4.5 *H.pylori* aktiviert NF- κ B in Parietalzellen

NF- κ B ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der durch zahlreiche Stimuli aktiviert wird und eine Vielzahl von Genen reguliert, die in die Immunantwort, die Proliferation und die Apoptose der Zellen involviert sind. In einigen Studien hat sich *H.pylori* als wichtiger Aktivator von NF- κ B in den Zellen erwiesen (Keates et al., 1997; Münzenmaier et al., 1997).

In dieser Arbeit konnten eine Reihe von EMSA-Versuchen zeigen, dass der *H.pylori* Typ I Stamm G27 den Transkriptionsfaktor NF- κ B auch in Parietalzellen deutlich stimuliert. Die unstimulierten Zellen zeigten dagegen eine nur sehr geringe bzw. keine NF- κ B-Aktivierung. Die Spezifität der NF- κ B-Banden wurde durch die Zugabe unmarkierter Oligonukleotide, in einem „Competition-Versuch“ überprüft. Weiterhin konnte in „Supershift-Versuchen“ gezeigt werden, dass das NF- κ B in den Kernextrakten hauptsächlich aus p65/p50 Heterodimeren und p50/p50 Homodimeren besteht. Dies steht auch im Einklang mit Ergebnissen anderer Untersuchungen (Keates et al., 1997; Münzenmaier et al., 1997; Aihara et al., 1997; Rokutan et al., 1997), die nachweisen konnten, dass in *H.pylori* infizierten Epithelzellen des Magens haupt-

sächlich diese NF- κ B-Dimere aktiviert und transloziert werden. Vor allem das p65/p50 Heterodimer gelangt auf ein Signal hin schnell in den Zellkern, bindet dort an die entsprechende DNA-Sequenz und aktiviert die Transkription entsprechender Zielgene (Zabel et al., 1991).

In dieser Arbeit wurde für jeden NF- κ B-EMSA ein Parallelansatz mit SP-1 durchgeführt. Das SP-1 ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der an die Promotor- oder Enhancerregion vieler Gene, unter anderem an viele „housekeeper“-Gene bindet (Muraoka et al., 1996). Darüber hinaus konnten Muraoka et al. (1996) in isolierten Parietalzellen aus Hundemägen das SP-1 als Co-Faktor für die Expression des Enzyms H⁺/K⁺ ATPase definieren. Da angenommen werden kann, dass das Enzym H⁺/K⁺ ATPase in Parietalzellen konstant vorhanden ist, muss auch SP-1 als stabile Größe vorhanden sein. Daher wurde SP-1 sowohl in dieser Arbeit, wie auch in anderen Studien, als Referenz für die Quantifizierung der Proteinmenge verwendet (Brand et al., 1996). Die SP-1 Banden der EMSA-Versuche (Bild 3.16 A und B, Bild 3.18 A und B, Bild 3.21 B), vor allem die zugehörige densitometrische Vermessung der Banden, zeigen nahezu gleiche Intensität und somit nahezu gleiche Proteinmenge pro Probe.

Bisher konnten verschiedene Stimuli mit einer NF- κ B-Aktivierung in Verbindung gebracht werden. Wie aus der Literatur ersichtlich, werden häufig die bakteriellen Lipopolysaccharide der Zellmembran mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Zusammenhang gebracht (Bäuerle et al., 1994; Clifton, 1998). Jedoch konnte gezeigt werden, dass *H.pylori* einen Lipopolysaccharid unabhängigen Mechanismus aufwendet, da Versuche mit gereinigtem *H.pylori*-Lipopolysaccharid keine NF- κ B-Aktivierung in den Zellen hervorrufen konnte (Münzenmaier et al., 1997). Dagegen wurden jedoch Gene der cag-PAI von *H.pylori* ermittelt, die für die NF- κ B-Aktivierung essentiell sind (Glocker et al., 1998).

Um die Bedeutung einiger Gene der cag-PAI für die NF- κ B-Aktivierung in den Parietalzellen in vorliegender Arbeit zu untersuchen, wurden die Zellen mit verschiedenen *H.pylori* G27-Mutanten kultiviert. EMSA-Versuche zeigten, dass die Gene cagA, cagH, cagF und cagN nahezu keine Rolle in der NF- κ B-Aktivierung in den Parietalzellen spielen. Bei allen Proben, die mit *H.pylori* Mutanten inkubiert wurden, konnte, bis auf eine Ausnahme, eine deutliche NF- κ B-Aktivierung in Form einer spezifischen NF- κ B-Bande im EMSA nachgewiesen werden. Die cagE Mutante dagegen konnte keine NF- κ B-Aktivierung bzw. NF- κ B-Bande auslösen. Dies macht deutlich, dass das cagE Gen nicht nur an der Induktion der Apoptose, sondern auch wesentlich an der NF- κ B-Aktivierung in Parietalzelle beteiligt ist. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Versuchen mit einer epithelialen Tumorzelllinie von Glocker et al. (1998) beschrieben. Nur in Bezug auf die cagF-Mutante erzielte er ein gegenteiliges Ergebnis, was auf Zellunterschiede in den Versuchen zurückgeführt werden kann.

4.6 Stickstoffmonoxid und NF-κB in Parietalzellen

NF-κB ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor, der in der menschlichen Magenmukosa (Van den Brink et al., 2000), sowie *in vitro* in verschiedenen Zellsystemen durch *H.pylori* aktiviert wird (Sharma et al., 1998; Keates et al., 1997; Münzenmaier et al., 1997).

NF-κB ist für die Transkription zahlreicher Gene verantwortlich. Diesen Genen ist gemeinsam, dass sie Abwehrfunktionen in der Zelle oder im Gesamtorganismus übernehmen.

Das iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) Gen ist eines der Gene, deren Expression durch NF-κB kontrolliert wird (Griscavage et al., 1996). In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass sowohl die Promotorregion des iNOS Gens des Menschen (Nunokawa et al. 1996), sowie die Promotorregion des iNOS Gens der Ratte (GenBank accession number D84101) an mehreren Positionen eine NF-κB-Sequenz (bp 71-79, 134-142, 888-896, 930-938) enthält.

Die iNOS-Expression durch NF-κB wurde bereits in verschiedenen Zelltypen, wie Gefäßmuskulzellen der Ratte (Zhang et al., 1999) und Hepatozyten der Ratte (De Vera et al., 1997) beobachtet. Eine erhöhte iNOS-Aktivität konnte auch in Makrophagen der Magenmukosa und in Magenbiopsien von Patienten nachgewiesen werden, die an *H.pylori* induzierten Ulzera erkrankt waren (Stachura et al., 1996; Mannick et al., 1996). Eine Infektion mit *H.pylori* erhöht die iNOS-Expression. Eine damit verbundene erhöhte Stickstoffmonoxidsynthese wurde *in vitro* in Tumorzellen mit einer erhöhten Apoptoserate in Verbindung gebracht (Lim et al., 2001; Watanabe et al., 2000; Mannick et al., 1996).

In vorliegender Arbeit konnte durch den Einsatz eines spezifischen Stickstoffmonoxid-Inhibitors (L-NMMA) die *H.pylori* induzierte Apoptose in Parietalzellen signifikant reduziert werden. Auch in anderen Zellsystemen, sowie auch in ECL-Zellen der Ratte konnte der Einsatz von L-NMMA die Apoptose der Zellen hemmen (Mahr et al., 2000; Marletta M.A., 1993; Marletta M.A., 1989). Die Hemmung der *H.pylori* induzierten Apoptose durch L-NMMA in dieser Arbeit zeigt, dass iNOS über die Produktion von Stickstoffmonoxid auch eine ausführende Funktion in der Signalkaskade der Apoptose in Parietalzellen darstellt.

Die iNO-Synthase katalysiert die Ca^{2+} -unabhängige Umsetzung von L-Arginin in L-Citrullin und es entsteht Stickstoffmonoxid. Die Art und Weise, wie Stickstoffmonoxid Apoptose auslösen kann, konnte noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es wurde aber gezeigt, dass das Stickstoffmonoxid mit Sauerstoffradikalen zu Peroxynitrit reagiert, welches Bausteine der DNA, wie Pyrimidine und Purine, desaminiert und zu DNA-Strangbrüchen und zur Apoptose der Zellen führt (Lindahl et al., 1972; Lim et al., 2001). Ein zweiter Weg über den Stickstoff-

monoxid zur Apoptose führen kann, ist die Spaltung des Enzyms PARP, das auch eine ausführende Funktion in der Apoptose besitzt (Messmer et al., 1996; Cohen et al., 1997; siehe auch Einleitung, Kapitel 1.1.3.4).

4.7 Interleukin-8 und NF- κ B

Bei *H.pylori* infizierten Patienten konnte weiter gezeigt werden, dass die Höhe der NF- κ B Aktivierung mit dem Grad der induzierten Gastritis korreliert (Van den Brink et al., 2000).

Dabei stimulieren vor allem Typ I *H.pylori* Stämme mit einem intakten *cagE* Gen den Transkriptionsfaktor NF- κ B und eine verstärkte Produktion von IL-8 durch die Epithelzellen der Magenmukosa konnte nachgewiesen werden (Akopyants et al., 1998; Tummuru et al., 1995; Censini et al., 1996; Glocker et al., 1998; Sharma et al., 1998). Die Induktion des Zytokins IL-8 ist dabei unabhängig von der *cagA*-Expression (Censini et al., 1996), aber abhängig vom Vorhandensein eines intakten Typ IV Sekretionssystems (Fischer et al., 2001; siehe auch Einleitung, Kapitel 1.1.3.2). Die Genexpression des IL-8-Gens wird ebenfalls durch NF- κ B auf Transkriptionsebene kontrolliert und reguliert (Sharma et al., 1998; Keates et al., 1997; Aihara et al., 1997; Münzenmaier et al., 1997).

Im Gegensatz zum Menschen besitzen Nagetiere, wie Ratten, keine Gensequenz, die für das IL-8 kodiert. Sie verfügen jedoch über eine dem IL-8 entsprechende Genstruktur, das CINC-1 (Cytokine-induced neutrophil chemoattractant) (Zagorski et al., 1997). In Zusatzversuchen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr explizit aufgeführt werden, wurde das CINC-1 in Überständen von *H.pylori* stimulierten Parietalzellen gemessen. Das CINC-1 konnte in stimulierten Blutmonozyten der Ratte nachgewiesen werden, nicht aber in den Überständen der unstimulierten und mit *H.pylori* stimulierten Parietalzellen ermittelt werden. Dieser Versuch zeigt, dass in *H.pylori* infizierten Parietalzellen keine NF- κ B vermittelte Transkription des IL-8-homologen Gens CINC-1 stattfindet.

Das Zytokin IL-8 wird nicht nur durch NF- κ B kontrolliert und aktiviert, sondern auch MAP-Kinasen wurden mit einer IL-8 Aktivierung in Verbindung gebracht. In diesem Zusammenhang beschrieben Keates et al. (1999) in *H.pylori* stimulierten epithelialen Tumorzellen (AGS-Zellen) einen NF- κ B unabhängigen Stimulationsweg für IL-8 über MAP-Kinasen. MAP-Kinasen bestehen im Wesentlichen aus drei Hauptgruppen, die sich aus der „extracellu-

lar signal-regulated kinase“ (ERK), der „c-Jun N-terminal kinase“ (JNK) und der p38 MAP-Kinase zusammensetzen. Sie regulieren verschiedene Transkriptionsfaktoren und sind auf diese Weise ebenfalls an einigen Funktionen der Zelle, wie Zellproliferation, Zelltod und an der Entzündungsreaktion der Zellen, beteiligt. Keates et al. (1999) verwendeten spezifische Inhibitoren und konnten zeigen, dass die beiden Signalmoleküle p38 und ERK für die *H.pylori* induzierte IL-8 Produktion wichtig waren. Beide Signalmoleküle erwiesen sich für die *H.pylori* induzierte NF- κ B Aktivierung jedoch als nicht essentiell.

In *H.pylori* stimulierten Parietalzellen konnte NF- κ B, jedoch kein CINC-1 nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass die beiden Kinasen, p38 und ERK, im Signalweg der Parietalzellen der Ratte fehlen und daher keine IL-8 Induktion stattfindet. Die JN-Kinasen-Kaskade ist dagegen mit der Signalkaskade des Transkriptionsfaktors NF- κ B über PAK-1 und MEKK-1 verbunden. Beide Kaskaden können gleichzeitig durch *H.pylori* aktiviert werden und zu einer IL-8-Induktion führen (Foryst-Ludwig et al., 2000; Peek et al., 2001; Sanchez-Perez et al., 2002; Aihara et al., 1997). Darüber hinaus konnte JNK über den Transkriptionsfaktor AP-1 auch mit der zellulären Apoptose in Tumorzellen (Jurkat-Zellen) in Verbindung gebracht werden (Faris et al., 1998).

In vorliegender Arbeit konnte die *cagE*-Mutante weder NF- κ B aktivieren, noch Apoptose in Parietalzellen auslösen. Keates et al. (1999) beobachteten gleichen Sachverhalt in Zusammenhang mit MAP-Kinasen und der *H.pylori cagE*-Mutante an epithelialen Tumorzellen. Die Versuche zeigten in diesen Zellen eine fehlende Aktivierung der JN-Kinase durch die *H.pylori cagE*-Mutante.

Weiterführende Versuche wären nötig, um eine mögliche Beteiligung und Wirkung der JN-Kinasen-Kaskade in der Aktivierung von NF- κ B und der Apoptose in *H.pylori* stimulierten Parietalzellen zu untersuchen.

Die IL-8-Produktion der Epithelzellen scheint durch *H.pylori* in jedem Fall über verschiedene Signalwege aktiviert zu werden. In Parietalzellen der Ratte könnte die fehlende CINC-1/IL-8-Aktivierung auf eine fehlende Aktivierung der p38 und ER-Kinasen zurückgeführt werden.

4.8 NF- κ B und Apoptose

Die im Zellkern befindliche doppelsträngige DNA enthält die genetische Information für alle Proteine. Bei der Transkription wird diese Information auf eine einzelsträngige Boten-RNA (mRNA) übertragen, die anschließend ins Zytoplasma gelangt und dort über den Mechanismus der Translation an den Ribosomen in Proteine umgesetzt wird (Proteinbiosynthese). NF- κ B ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor, der über verschiedene Signale stimuliert wird und die Genexpression und die Proteinbiosynthese der Zellen reguliert.

Eine Inkubation der Parietalzellen mit *H.pylori* löst Signalwege in der Zelle aus, die zu einer Aktivierung von NF- κ B führen. Weiterhin kann eine Stimulation der Zellen mit *H.pylori* die Apoptose signifikant steigern. Ob die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in weiterem Verlauf auch eine Auswirkungen auf die Apoptose der Zellen hat, wurde in vorliegender Arbeit näher untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Aktivierung von NF- κ B an verschiedenen Positionen seiner Aktivierung gehemmt.

Im Laufe der NF- κ B-Aktivierung löst sich der Transkriptionsfaktor von dem Inhibitorprotein I κ B und gelangt in den Zellkern (siehe Einleitung, Kapitel 1.2.2, Bild 1.2). Während des Aktivierungsprozesses wird das I κ B phosphoryliert und durch Proteasomen degradiert. Eine Hemmung der Degradation von I κ B durch Proteasomen-Inhibitoren verhindert die Aktivierung von NF- κ B und dessen Translokation in den Zellkern (Traenckner et al., 1994).

An dieser Stelle im Aktivierungsprozess konnte in Versuchen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Inkubation der *H.pylori* stimulierten Parietalzellen mit PSI, einem spezifisch wirksamen Proteasomen-Inhibitor, zu einer deutlichen Reduktion der *H.pylori* induzierten Apoptoserate führte.

Anders als die Proteasomen-Inhibitoren greifen die p65 AS-Oligonukleotide erst in die Translation der Proteinbiosynthese ein und verhindern damit eine NF- κ B induzierte Proteinsynthese (Branch et al., 1996). Dabei binden die p65 AS-Oligonukleotide durch komplementäre Basenpaarung an die Initialregion der mRNA des p65 Gens und verhindern eine Komplexbildung mit den Ribosomen und damit die Translation und Genexpression von NF- κ B bzw. der p65 Untereinheit (Hartmann et al., 1998; Branch et al., 1996).

In dieser Arbeit wurde in EMSAs gezeigt, dass eine Vorinkubation der mit *H.pylori* stimulierten Parietalzellen mit p65 AS-Oligonukleotiden eine NF- κ B-Komplexbildung eindeutig hemmen konnte. Dieser Effekt erwies sich als sequenzspezifisch, da entsprechende MS-Oligonukleotide die Komplexbildung nicht beeinträchtigten. Weiterhin konnte auch die

H.pylori vermittelte Apoptoserate der Parietalzellen durch den Einsatz der p65 AS-Oligonukleotide vollständig aufgehoben werden. Die Effektivität der NF- κ B AS-Oligonukleotide wurde bereits in einigen *in vitro* und *in vivo* Experimenten beschrieben und auch dort erfolgreich eingesetzt (Reuning et al., 1995; Hnatowich et al., 1999; Autieri et al., 1995; Neurath et al., 1996). In Versuchen von Schlaak et al. (2001) wurden Mäuse mit p65 AS-Oligonukleotiden behandelt und anschließend mit dem Bakterium *S.typhimurium* infiziert. Dieses Bakterium aktiviert ebenfalls NF- κ B, was in diesen Mäusen zu einer gesteigerten Immunreaktion und zur Ausbildung eines septischen Schocks geführt hatte. In denjenigen Mäusen, die mit den p65 AS-Oligonukleotiden behandelt wurden, wurde die Bildung von entzündlichen Faktoren, wie IL-6 und IFN- γ , reduziert und damit, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, die Ausbildung eines septischen Schocks verhindert. Dieses *in vivo* Tiermodell zeigt auf anschauliche Weise, wie die Auswirkungen von NF- κ B auf die Zelle und den gesamten Organismus durch AS-Oligonukleotide gehemmt werden kann.

Ein weiterer Ansatz die NF- κ B-Aktivität in *H.pylori* stimulierten Parietalzellen zu hemmen, bestand in der Verwendung von doppelsträngigen Decoy- κ B-Oligonukleotiden. Die Sequenz der hier verwendeten Decoy-Oligonukleotide entspricht der κ B-Sequenz der Promotorregion des MCP-1 Gens. Diese Oligonukleotide binden mit der κ B-Sequenz an freies NF- κ B, sowohl im Zytoplasma wie auch im Zellkern (Gawatz et al., 1998 und persönliche Information durch Hr. Dr. Gawatz; Deutsches Herzzentrum, München) und verhindern dadurch die Bindung des Transkriptionsfaktors an die Promotorregion und damit die Transkription der Zielgene (Sawa et al., 1997; Morishita et al., 1997).

In Versuchen dieser Arbeit reduzierte die Vorinkubation der Parietalzellen mit den Decoy-Oligonukleotiden die NF- κ B-Komplexbildung im EMSA-Versuch und weiterhin auch die *H.pylori* vermittelte Apoptoserate der Parietalzellen in der TUNEL-Reaktion signifikant. Der Effekt der Decoy-Oligonukleotide war spezifisch, da die mutierte Form der Oligonukleotide, wie die MS Form der p65 AS-Oligonukleotide, keine Auswirkung auf die Apoptose der Zellen zeigte.

Vergleicht man die Ergebnisse aller NF- κ B-Hemmversuche, so zeigt sich, dass die *H.pylori* induzierte NF- κ B-Aktivierung erfolgreich gehemmt bzw. signifikant reduziert werden kann. Darüber hinaus konnte auch die *H.pylori* stimulierte Apoptose der Parietalzellen durch die Hemmung des Transkriptionsfaktors mittels des Proteosomen-Inhibitors PSI, sowie durch den Einsatz der p65 AS-Oligonukleotide und Decoy-Oligonukleotide gehemmt bzw. signifikant reduziert werden. Das zeigt, dass NF- κ B einen erheblichen Einfluss auf die Apoptose der Pa-

rietalzellen der Ratte hat und in diesen Prozess als pro-apoptotischer Übermittler direkt involviert ist.

Entgegen des pro-apoptotischen Einflusses von NF- κ B in den oben beschriebenen Untersuchungen, wird der Einfluss von NF- κ B auf die Apoptose in der Literatur widersprüchlich diskutiert (Aggarwal et al., 2000; Bours et al., 2000; Sonenshein et al., 1997). So zeigen bisher publizierte Studien, dass NF- κ B die Apoptose sowohl hemmen (Beg et al., 1996; Van Antwerp, 1996; Yanai et al., 2003) als auch auslösen kann (Grimm et al., 1996; Kasibhatla et al., 1998; Grilli et al., 1996). In Thymozyten von Mäusen konnte gezeigt werden, dass NF- κ B direkt an der durch T-Lymphozyten vermittelten Apoptose beteiligt war, indem es die Expression eines anti-apoptotisch wirkenden Genes, das *bcl-x_L*, herunterregulierte (Hettmann et al., 1999). Weiterhin konnte die pro-apoptotische Rolle des Transkriptionsfaktors an isolierten β -Zellen des Pankreas der Ratte nachgewiesen werden. In dieser Studie von Heimberg et al. (Heimberg et al., 2001) wurde gezeigt, dass eine durch IFN- γ und IL-1 β induzierte Apoptose der Zellen durch den Einsatz eines spezifischen NF- κ B-Inhibitors erfolgreich verhindert werden konnte. In Hinblick auf eine *H.pylori* vermittelte NF- κ B-Aktivierung und Stimulation der zellulären Apoptose, hat sich auch PPAR- γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma) als wichtiger Mediator erwiesen. PPAR- γ ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der ähnlich dem NF- κ B Zellfunktionen, wie Wachstum, Zelltod und die Immunantwort, reguliert und dabei auch in den Signalweg von NF- κ B eingreifen kann (Gupta et al., 2001). Versuche von Gupta et al. (2001) zeigen, dass eine Hemmung von NF- κ B durch PPAR- γ -Agonisten, auch den durch *H.pylori* vermittelten Apoptoseprozess in der Zelle reduzierte. Dies war in der Literatur einer der ersten Hinweise darauf, dass das gram-negative Bakterium *H.pylori* die Apoptose der Zellen über NF- κ B auslöst und NF- κ B auch in Zusammenhang mit *H.pylori* eine pro-apoptotische Wirkung besitzen könnte. Erklärt wird der unterschiedliche und widersprüchliche Einfluss von NF- κ B auf die Apoptose durch Unterschiede in den untersuchten Zellsystemen und den apoptoseauslösenden Stimuli (Baichwal et al., 1997; Aggarwal et al., 2000), jedoch ist die Ursache dieses Widerspruch bis heute nicht eindeutig geklärt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen deutlich, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B in die *H.pylori* induzierte Apoptosekaskade der Parietalzelle der Ratte involviert ist und eine Hauptrolle in diesem Prozess einnimmt. Weiterhin ist auch die bereits beschriebene signifikante Reduktion der Parietalzellapoptose mit dem Stickstoffmonoxid-Inhibitor L-NMMA von Bedeutung.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ein Apoptoseweg ableiten, der in Bild 4.1 graphisch dargestellt wird.

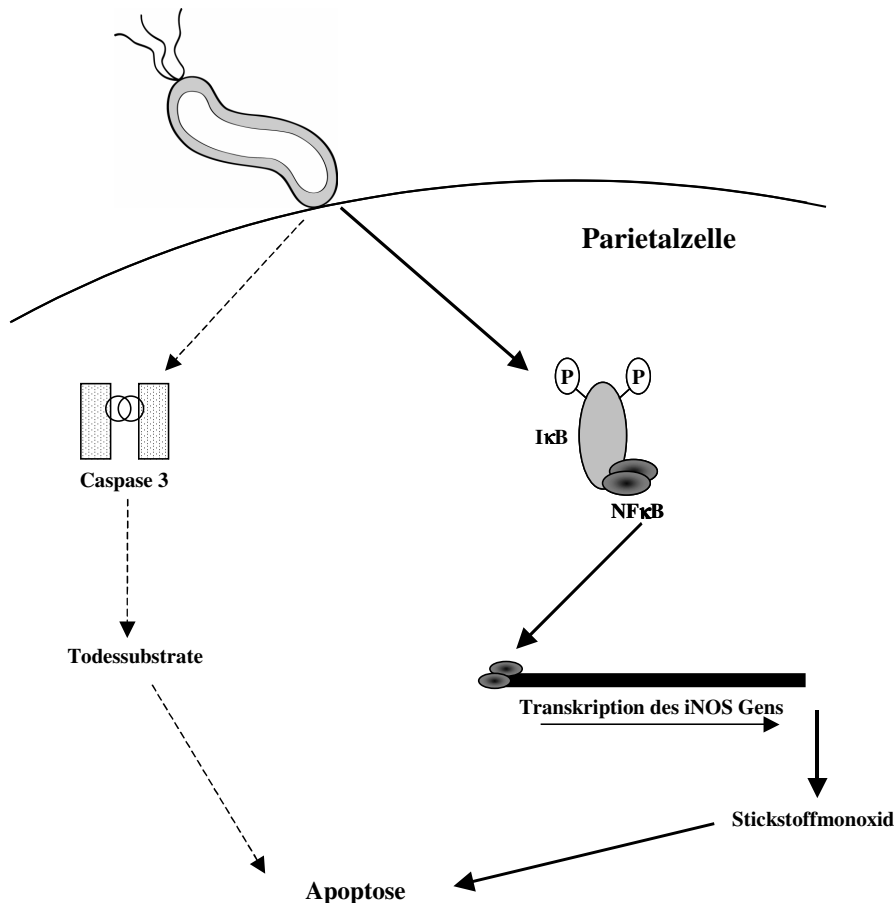


Bild 4.1. Apoptose in den Parietalzellen. Dicke Pfeile: Hauptweg der *H. pylori* induzierten Apoptose in Parietalzellen über NF-κB. Gestrichelte Pfeile: untergeordneter Apoptoseweg über die Caspase 3

Über einen noch nicht genau definierten Mechanismus nimmt *H. pylori* Kontakt mit der Parietalzelle auf und aktiviert den intrazellulären Transkriptionsfaktor NF-κB. NF-κB induziert die Transkription des iNOS Gens und führt über Stickstoffmonoxid zum programmierten Tod der Zellen. Dieses Ergebnis wird von einer Studie von Lim et al. (2001) unterstützt, die vergleichbare Zusammenhänge an *H. pylori* infizierten epithelialen Tumorzellen nachweisen konnte. Der Apoptoseweg über die Caspase 3 spielt in diesem Zellsystem nur eine untergeordnete Rolle.

Alle diese Ausführungen deuten auf eine vielgestaltige Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF-κB beim programmierten Zelltod hin. Daher sind wohl weitere Untersuchungen notwendig, welche die Bedeutung des Transkriptionsfaktors in Hinblick auf die Apoptose über dieses Zellsystem hinaus weiter untersuchen und mithelfen, die *H. pylori* induzierte Apoptose besser zu erklären, um auch therapeutische Möglichkeiten für den Menschen weiter verbessern zu können.

5 Zusammenfassung

Etwa 50% der Weltbevölkerung sind mit dem gram-negativen Bakterium *H.pylori* infiziert. Während in den Industrienationen die Infektionsrate zwischen 33% und 50% liegt, beträgt sie in den Entwicklungsländern über 80%. Die Infektion wird in den meisten Fällen in der frühen Kindheit erworben. Im Erwachsenenalter sind Neuinfektionen eher selten. *H.pylori* kolonisiert die Magenmukosa und persistiert dort über Jahre, wenn das Bakterium nicht durch eine antimikrobielle Therapie eradiziert wird. Die Kolonisierung des Magens mit *H.pylori* ist mit der Entwicklung spezifischer Krankheiten, wie Magen- und Duodenalulzera, MALT-Lymphomen und Adenokarzinomen des Magens assoziiert. Daher wurde *H.pylori* als ein Karzinogen der Klasse I, ein sogenanntes „sicheres Karzinogen“, definiert.

Eine durch *H.pylori* hervorgerufene chronische Entzündung der Korpusmukosa des Magens führt zu einem Umbau der Magenmukosa und im Verlauf zu einer intestinalen Metaplasie und Atrophie der Schleimhaut. Diese histologischen Veränderungen sind mit der Karzinomentstehung assoziiert worden. Die Atrophie ist gekennzeichnet durch eine zunehmende Schädigung des Drüsengewebes. Diese führt zu einem Verlust an Parietalzellen und damit zu einer gastralen Hypochlorhydrie. Als Ursache für den Verlust der Parietalzellen wird eine direkte Interaktion des Keimes oder der Entzündungsmediatoren mit den Parietalzellen diskutiert. An Epithelzellen konnte aufgezeigt werden, dass hauptsächlich Apoptose für den Zellverlust in der *H.pylori* infizierten Magenmukosa verantwortlich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden Parietalzellen der Ratte mit *H.pylori* inkubiert. Ziel war es zu untersuchen, ob *H.pylori in vitro* Apoptose in dieser Zellpopulation auslöst, welche keim-spezifischen Faktoren dafür verantwortlich sind und über welchen Apoptoseweg der Zelltod induziert wird.

Parietalzellen sind ausdifferenzierte, säureproduzierende Zellen, die in den Magendrüsen der Korpus- und Fundusregion lokalisiert sind. Sie wurden isoliert und mit dem gram-negativen Bakterium *H.pylori* inkubiert. Eine 8-stündige Inkubationszeit mit einer Bakterienkonzentration von MOI=10 führte zu einer spezifischen zellulären Apoptose. Die Apoptose der Zellen wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie eindeutig identifiziert und die quantitative Apoptoserate mit der TUNEL-Methode bestimmt.

Der pathogene Effekt von *H.pylori* auf die Magenschleimhaut ist geprägt durch eine direkte Wirkung keimspezifischer Virulenzfaktoren und indirekt durch die Induktion einer Entzündungsreaktion im Wirtsorganismus. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Wirkung einiger Virulenzfaktoren des Keimes für die Apoptose in Parietalzellen bedeutsam ist. Dementsprechend waren nur lebende $cagA^+$ -Keime mit einer intakten *cag*-PAI und einer aktiven Proteinbiosynthese in der Lage, Apoptose spezifisch auszulösen. Ferner konnten jedoch bakterielle Sekretionsprodukte wie das VacA und die Lipopolysaccharide als Auslöser der Apoptose ausgeschlossen werden, so dass ein direkter Kontakt des Keimes zur Zelle notwendig scheint. Weiterhin wurde mit Hilfe von *H.pylori*-Mutanten der Einfluss verschiedener Gene der bakteriellen *cag*-PAI auf das Apoptoseverhalten der Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass das Produkt des *cagE* Gens von wesentlicher Bedeutung für die Induktion der Apoptose in den Parietalzellen ist.

Als Folge der Infektion werden im infizierten Gewebe proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α , IL-8 und IL-1 β , durch Makrophagen gebildet. Diese Zytokine wirken zusätzlich schädigend auf das Magenepithel ein. Eine Co-Stimulation der Parietalzellen mit *H.pylori* und TNF- α zeigte eine nahezu additive Wirkung auf die Apoptose der Zellen. TNF- α bindet dabei spezifisch an TNFR1-Rezeptoren und löst über diese Rezeptoren Apoptose in den Zellen aus. TNFR1 ist ein Oberflächenrezeptor, der auch auf Parietalzellen der Ratte nachgewiesen werden konnte. Eine TNFR1-Rezeptor abhängige Apoptoseinduktion durch *H.pylori* hatte sich in vorliegenden Versuchen nicht bestätigt.

Apoptose ist ein genetisch kontrollierter, aktiver Prozess der einzelnen Zelle, in welchem extrazelluläre Signale eine Folge von Reaktionen aktivieren, die zur Selbstelimination der Zelle führen. In Hinblick auf *H.pylori* konnten bisher verschiedene Signaltransduktionswege aufgezeigt werden, die alle zum Tod der Zellen führen. Die Untersuchung des Signalweges der Apoptose in vorliegender Arbeit ergab, dass *H.pylori* in Parietalzellen zwei voneinander unabhängige Apoptosewege induziert. Eine eher untergeordnete Rolle spielt dabei der Apoptoseweg über die Caspase 3 und damit die Signalkaskade der Caspasen.

Eine wichtige Rolle im Apoptoseweg spielt dagegen die Signalkaskade über den Transkriptionsfaktor NF- κ B und Stickstoffmonoxid. Mit Hilfe des EMSA wurde gezeigt, dass *H.pylori* den Transkriptionsfaktor NF- κ B in Parietalzellen aktiviert. Dabei konnte festgestellt werden, dass das *cagE* Gen nicht nur für die keimspezifische Apoptose, sondern auch für die keiminduzierte NF- κ B-Aktivierung in Parietalzellen von großer Bedeutung ist. Durch den Einsatz verschiedener NF- κ B-Inhibitoren im EMSA, sowie in den Stimulationsversuchen konnte wei-

terhin nachgewiesen werden, dass die Apoptose der Zellen NF- κ B abhängig ist. Der Hauptweg der Apoptose läuft daher in diesem *in vitro* Zellmodell über die Signalkaskade des Transkriptionsfaktors NF- κ B ab. Dabei ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B nicht selbst als aktiver Auslöser des zellulären Apoptosevorgangs verantwortlich, sondern scheint über das Stickstoffmonoxid zu agieren. In diesem Zusammenhang konnten Studien nachweisen, dass NF- κ B an der Transkription von iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) beteiligt ist, einer Synthase, die die Produktion von Stickstoffmonoxid katalysiert und in Verbindung mit Superoxiden zum Zelltod führt. In vorliegender Arbeit konnte die *H.pylori* induzierte Apoptose durch den Einsatz des Stickstoffmonoxid-Synthasehemmers (L-NMMA) signifikant reduziert werden. Das weist darauf hin, dass Stickstoffmonoxid ein wichtiges Endglied in der *H.pylori* induzierten Apoptose in Parietalzellen ist.

Das in dieser Arbeit vorgestellte *in vitro* Parietalzellemodell zeigt, dass sowohl direkte keim-spezifische Virulenzfaktoren, sowie Zytokine für die Apoptose der Zellen wichtig sind. Die Apoptose von Parietalzellen ist auch *in vivo* von Bedeutung, da sich in Studien gezeigt hat, dass eine langjährige Korpusatrophie mit einer damit verbundenen Hypazidität, als Präkanzerose, die Entwicklung eines Magenkarzinoms begünstigt. Darüber hinaus tragen die Ergebnisse zum Verständnis des *H.pylori* induzierten Zelltodes als komplizierten Ablauf bei und regen zu neuen Forschungsansätzen an.

6 Literatur

- Achtmann, M.; Suerbaum, S.: *Helicobacter pylori*: Molecular and Cellular Biology, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. (2001)
- Adams, J.M.; Cory, S.: The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, *Science* 281 (1998), 1322-1326
- Aggarwal, B.B.: Apoptosis and NF- κ B: A tale of association and dissociation, *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000), 1033-1039
- Ahmed, A.; Smoot, D.; Littleton, G.; Tackey, R.; Walters, C.S.; Kashanchi, F.; Allen, C.R.; Ashktorab, H.: *Helicobacter pylori* inhibits gastric cell cycle progression, *Microbes and Infection* 2 (2000), 1159-1169
- Aihara, M.; Tsuchimoto, D.; Takizawa, H.; Azuma, A.; Wakebe, H.; Ohmoto, Y.; Imagawa, K.; Kikuchi, M.; Mukaida, N.; Matsushima, K Mechanism involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by gastric cancer cell line MKN45, *Infect. Immun.* 65 (1997), 3218-3224
- Akanuma, M.; Maeda, S.; Ogura, K.; Mitsuno, Y.; Hirata, Y.; Ikenoue, T.; Otsuka, M.; watanabe, T.; Yamaji, Y.; Yoshida, H.; Kaw The evaluation of putative virulence factors of *Helicobacter pylori* for gastroduodenal disease by use of a short-term mongolia J. *Infect. Dis.* 185 (2002), 341-7
- Akopyants, N.S.; Clifton, S.W.; Kersulyte, D.; Crabtree, J.E.; Youree, B.E.; Reece, A.; Bukanov, N.O.; Drazek, E.S.; Roe, B.A.: Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, *Mol. Microbiol.* 28 (1998), 37-53
- Albina, J.E.; Cui, S.; Mateo, R.B.; Reichner, J.S.: Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages, *J. Immunol.* 150 (1993), 5080-5
- Ando, T.; Kusugami, K.; Ohsuga, M.; Shinoda, M.; Sakakibara, M.; saito, H.; Fukatsu, A.; Ichiyama, S.; Ohta, M.: Interleukin-8 activity correlates with histological severity in *Helicobacter pylori*-associated antral gastritis, *Am. J. Gastroenterol.* 91 (1996), 1150-1156
- Andrutis, K.A.; Fox, J.G.; Schauer, D.B.; Marini, R.P.; Murphy, J.C.; Yan, L.; Solnick, J.V.: Inability of an isogenic urease-negative mutant strain of *Helicobacter pylori* mustelae to colonize the ferret stomach, *Infect. Immun.* 63 (1995), 3722-5
- Anti, M.; Armuzzi, A.; Gasbarrini, G.: Epithelial cell turnover and apoptosis, *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.* 30 (1998), 276-8
- Appelmelk, B.J.; Monteiro, M.A.; Martin, S.L.; Moran, A.P.; Vandenbroucke-Grauls, C.M.: Why *Helicobacter pylori* has Lewis antigens, *Trends Microbiol.* 8 (2000), 565-70
- Appelmelk, B.J.; Negrini, R.; Moran, A.P.; Kuipers, E.J.: Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host, *Trends Microbiol.* 5 (1997), 70-73
- Asahi, M.; Azuma, T.; Ito, S.; Ito, Y.; Suto, H.; Nagai, Y.; Tsubokawa, M.; Tohyama, Y.; Sasakawa, C.: *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells, *J. Exp. Med.* 191 (2000), 593-602
- Ashkenazi, A.; Dixit, V.M.: Death receptors: signaling and modulation, *Science* 281 (1998), 1305-1308
- Ashktorab, H.; Neapolitano, M.; Bomma, C.; Allen, C.; Ahmed, A.; Dubois, A.; Naab, T.; Smoot, D.T.: In vivo and in vitro activation of caspase-8 and -3 associated with *Helicobacter pylori* infection, *Microbes and Infection* 4 (2002), 713-722
- Atherton, J.C.: CagA: A role at last, *Gut* 47 (2000), 330-31
- Atherton, J.C.: *H.pylori* virulence factors, *British Med. Bulletin* 54 (1998), 105-120
- Atherton, J.C.; Cao, P.; Peek, R.M.; Tummuru, M.K.R.; Blaser, M.J.; Cover, T.L.: Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*, *J. Biol. Chem.* 270 (1995), 17771-17777

- Atherton, J.C.; Peek, R.M.; Tham, K.T.; Cover, T.L.; Blaser, M.J.: Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*, *Gastroenterology* 112 (1997), 92-99
- Athmann, C.; Zeng, N.; Kang, T.; Marcus, E.A.; Scott, D.R.; Rektorschek, M.; Buhmann, A.; Melchers, K.; Sachs, G.: Local pH elevation mediated by the intrabacterial urease of *Helicobacter pylori* cocultured with gastric cells, *J. Clin. Invest.* 106 (2000), 339-347
- Audibert, C.; Burucoa, C.; Janvier, B.; Fauchère, J.L.: Implication of the structure of the *Helicobacter pylori* *cag* Pathogenicity island in induction of Interleukin-8 secretion, *Infect. Immun.* 69 (2001), 1625-1629
- Autieri, M. V.; Yue, T.-L.; Ferstein, G.Z.; Ohlstein, E.: Antisense Oligonucleotides to the p65 subunit of NF- κ B inhibit Human vascular smooth muscle cell adherence and proliferation *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213 (1995), 827-836
- Backert, S.; Ziska, E.; Brinkmann, V.; Zimny-Arndt, U.; Fauconnier, A.; Jungblut, P.R.; Naumann, M.; Meyer, T.F.: Translocation of *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by type IV secretion apparatus, *Cell. Microbiol.* 2 (2000), 155-164
- Baeuerle, P. A.; Baltimore, D.: *I κ B*: A specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor, *Science* 242 (1988), 540-546
- Baeuerle, P. A.; Henkel, T.: Function and activation of NF- κ B in the immune system, *Annu. Rev. Immunol.* 12 (1994), 141-79
- Baichwal, V.R.; Baeuerle, P.A.: Apoptosis: Activate NF- κ B or die?, *Current Biology* 7 (1997), R94-R96
- Bayerdörffer, E.; Neubauer, A.; Rudolph, B.: Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue after cure of *Helicobacter pylori* infection, *Lancet* 345 (1995), 1591-1594
- Bazzoni, F.; Beutler, B.: The tumor necrosis factor ligand and receptor families, *New England J. Med.* 334 (1996), 1717-1725
- Beg, A.A.; Baltimore, D.: An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death, *Science* 274 (1996), 782-784
- Bielinska, A.; Shivdasani, R.A.; Zhang, L.; Nabel, G.J.: Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides, *Science* 250 (1990), 997-1000
- Blanco, F.J.; Ochs, R.L.; Schwarz, H.; Lotz, M.: Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide, *Am. J. Pathol.* 146 (1995), 75-85
- Blaser, M. J.: *Helicobacter pylori* and gastric diseases, *Br. Med. J.* 316 (1998), 1507-1510
- Blaser, M.J.: Role of *vacA* and the *cagA* locus of *Helicobacter pylori* in human disease, *Aliment Pharmacol. Ther.* 10 (1996), 73-77
- Blaser, M.J.; Perez-Perez, G.I.; Kleanthous, H.; Cover, T.L.; Peek, R.M.; Chy, P.H.; Stemmermann, G.N.; Nomura, A.: Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of *Cancer Res.* 55 (1995), 2111-5
- Bliss, C.M.; Golenbock, D.T.; Keates, S.; Linevsky, J.K.; Kelly, C.P.: *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating *Infect. Immun.* 66 (1998), 5357-63
- Bodger, J.; Wyatt, J.I.; Heatley, R.V.: Gastric mucosal secretion of interleukin-10: relation to histopathology, *Helicobacter pylori* status and tumor necrosis factor- α , *Gut* 40 (1997), 739-44
- Bodger, K.; Crabtree, J.E.: *Helicobacter pylori* and gastric inflammation, *British Medical Bulletin* 54 (1998), 139-150
- Boldin, M.P.; Goncharow, T.M.; Goltsev, Y.V.; Wallach, D.: Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in FAS/APO-1- and TNF receptor -inducing cell death, *Cell* 85 (1996), 803-815
- Boquet, P.; Ricc, V.; Galmiche, A.; Gauthier, N.C.: Gastric cell apoptosis and *H. pylori*: has the main function of VacA finally been identified?, *Trends in Microbiology* 11 (2003), 410-413
- Boren, T.; Falk, P.; Roth, K.A.; Larson, G.; Normark, S.: Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens, *Science* 17 (1993), 1892-5
- Bours, V.; Bentires-Alj, M.; Hellin, A.-C.; Viatour, P.; Robe, P.; Delhalle, S.; Benoit, V.; Merville, M.-P.: Nuclear factor - κ B, cancer and apoptosis, *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000), 1085-1090

- Branch, A.D.: A hitchhiker's guide to antisense and nonantisense biochemical pathways, *Hepatology* 24 (1996), 1517-1529
- Brand, K.; Page, S.; Rogler, A.; Barsch, R.; Brandl, R.; Knuechel, R.; Page, M.; Kaltschmidt, C.; Baeuerle, P.A.; Neumeier, D.: Activated transcription factor nuclear factor *-kappaB* is present in the atherosclerotic lesion, *J. Clin. Invest.* 97 (1996), 1715-1722
- Bressler, P.; Brown, K.; Timmer, W.; Bours, V.; Siebenlist, U.; Fauci, A.S.: Mutational analysis of the p50 subunit of NF-*kappaB* and inhibition of NF-*kappaB* activity by trans-dominant p50 mutants, *J. Virol.* 76 (1993), 288-93
- Brzozowski, T.; Konturek, P.C.; Konturek, S.J.; Kwiecien, S.; Pajdo, R.; Karczewaska, E.; Stachura, J.; Hahn, E.G.: Water extracts of *Helicobacter pylori* delay healing of chronic gastric ulcers in rats: role of cytokines and gastrin - somatostatin, *Digestion* 60 (1999), 22-33
- Burgoyne, L.A.; Waqar, M.A.; Atkinson, M.R.: Calcium-dependent priming of DNA synthesis in isolated rat liver nuclei, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39 (1970), 254-259
- Burns, D.L.: Biochemistry of type IV secretion, *Current Opinion in Microbiol.* 2 (1999), 25-29
- Cao, Z.; Xiong, J.; Takeuchi, M.; Kurama, T.; Goeddel, D.V.: TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1, *Nature* 383 (1996), 443-446
- Censini, S.; Lange, C.; Xiang, Z.; Crabtree, J.E.; Ghiara, P.; Borodovsky, M.; Rappuoli, R.; Covacci, A.: Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encodes type I-specific and disease-associated virulence factors, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (1996), 14648-14653
- Chen, G.; Sordillo, E.M.; Ramey, W.G.; Reidy, J.; Holt, P.R.; Krajewski, S.; Reed, J.C.; Blaser, M.J.; Moss, S.F.: Apoptosis in gastric epithelial cells is induced by *Helicobacter pylori* and accompanied by increased expression of BAK, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239 (1997), 626-632
- Chew, C.S.; Ljungström, M.; Smolka, A.; Brown, M.R.: Primary culture of secretagogue-responsive parietal cells from rabbit gastric mucosa, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 256 (1989), G254-G263
- Chew, C.S.; Nakamura, K.; Petropoulos, A.C.: Multiple actions of epidermal growth factor and TGF-*alpha* on rabbit gastric parietal cell function, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 267 (1994), G818-G826
- Clifton, D.R.; Goss, R.A.; Sahni, S.K.; Antwerp, D.; Baggs, R.B.; Marder, V.J.; Silverman, D.J.; Sporn, L.A.: NF-*kappaB*-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during rickettsia rickettsii infection, *Proc Natl. Acad. Sci.* 95 (1998), 4646-4651
- Clyne, M.; Drumm, B.: Adherence of *Helicobacter pylori* to primary human gastrointestinal cells, *Infect. Immun.* 61 (1993), 4051-4057
- Clyne, M.; Labigne, A.; Drumm, B.: *Helicobacter pylori* requires an acidic environment to survive the presence of urea, *Infect. Immun.* 63 (1995), 1669-73
- Cohen, G.M.: Caspases: the executioners of apoptosis, *Biochem. J.* 326 (1997), 1-16
- Correa, P.; Miller, M.J.S.: Carcinogenesis, apoptosis and cell proliferation, *British Med. Bulletin* 54 (1998), 151-162
- Covacci, A.; Censini, S.; Bugnoli, M.; Petracca, R.; Burroni, D.; Macchia, G.; Massone, A.; Papini, E.; Xiang, Z.; Figura, N.: Molecular characterisation of the 128-kDa immunodominant antigen of *H.pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 (1993), 5791-5795
- Covacci, A.; Rappuoli, R.: Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell, *J Exp. Med.* 191 (2000), 587-92
- Covacci, A.; Telford, J.T.; Del Giudice, G.; Parsonnet, J.; Rappuoli, R.: *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography, *Science* 284 (1999), 1328-1333
- Crabtree, J.E.: Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 10 (1996), 29-37
- Crabtree, J.E.; Achtmann, M.; Suerbaum, S.: Cytokine responses in *Helicobacter pylori* gastritis: *Helicobacter pylori*: Molecular and Cellular Biology, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. (2001), 63-82
- Crabtree, J.E.; Covacci, A.; Farmery, M.S.; Xiang, Z.; Tompkins, D.S.; Perry, S.; Lindley, I.J.D.; Rappuoli, R.: *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with cagA positive phenotype, *J. Clin. Pathol.* 48 (1995), 41-45

- Crabtree, J.E.; Farmery, S.M.; Lindley, I.J.D.; Figura, N.; Peichl, P.; Tompkins, D.S.: CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines, *J. Clin. Pathol.* 47 (1994), 945-50
- Crabtree, J.E.; Shallcross, T.M.; Heatley, R.V.; Wyatt, J.I.: Mucosal tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis, *Gut* 44 (1991), 768-71
- Crabtree, J.E.; Xiang, Z.; Lindley, I.J.D.; Tompkins, D.S.; Rappuoli, R.; Covacci, A.: Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a cagA negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*, *J. Clin. Pathol.* 48 (1995), 967-69
- D'Amours, D.; Germain, M.; Orth, K.; Dixit, V.M.; Poirier, G.G.: Proteolysis of poly(ADP-ribose) polymerase by caspase 3: kinetics of cleavage of mono(ADP-ribosyl)ated and DNA-bound substrates *Radiat. Res.* 150 (1998), 3-10
- Davies, G.R.; Banatvala, N.; Collins, C.E.; Sheaff, M.T.; Abdi, Y.; Clemets, L.; Rampton, D.S.: Relationship between infective load of *Helicobacter pylori* and reactive oxygen metabolite production in antral mucosa, *Scand. J. Gastroenterol.* 29 (1994), 419-424
- Davies, G.R.; Simmonds, D.S.; Stevens, M.T.; Sheaff, N.; Banatvala, I.F.; Laurenson, D.R.; Blake, D.R.; Rampton, D.S.: *Helicobacter pylori* stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production in vivo, *Gut* 35 (1994), 179-185
- De Vera, M.E.; Taylor, B.S.; Wang, Q.; Shapiro, R.A.; Billiar, T.R.; Geller, D.A.: Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by upregulating I- κ B α and inhibiting NF- κ B, *Am. J. Physiol.* 273 (1997), G1290-1296
- D'Elios, M.M.; Del Prete, G.; Achtmann, M.; Suerbaum, S.: Role of Th1/Th2 cells in *H.pylori*-induced gastric disease aus:*Helicobacter pylori*:Molecular and Cellular Biology, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. (2001), 85-98
- Dubois, A.; Fiala, N.; Herman-Ackah, L.M.; Drazek, E.S.; Tarnowski, A.; Fishbein, W.N.; Perez-Perez, G.I.; Blaser, M.J.: Natural gastric infection with *Helicobacter pylori* in monkeys: model for spiral bacteria infection in humans, *Gastroenterology* 106 (1994), 1405-17
- Dunn, B.E.; Cohen, H.; Blaser, M.J.: *Helicobacter pylori*, *Clinical Microbiology rev.* 10 (1997), 720-741
- Eaton, K.A.; Morgan, D.R.; Krakowka, S.: Motility as a factor in the colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*, *J. Med. Microbiol.* 37 (1992), 123-127
- El-Omar, E.; Penman, I.; Ardill, J.E.; Chittajallu, R.S.; Howie, C.; McColl, K.E.: *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease, *Gastroenterology* 109 (1995), 681-691
- El-Omar, E.M.; Oien, K.; El-Nujumi, A.; Gillen, D.; Wirz, A.; Dahill, S.; Williams, C.; Ardil, J.E.S.; McColl, K.E.L.: *Helicobacter pylori* infection and chronic gastric acid hyposecretion, *Gastroenterology* 113 (1997), 15-24
- El-Omar, E.M.; Oien, K.; Murray, L.S.; El-Nujumi, A.; Wirz, A.; Gillen, D.; Williams, C.; Fullarton, G.; McColl, K.E.: Increased prevalence of precancerous changes in relatives of gastric cancer patients: critical role of *H. pylori*, *Gastroenterology* 118 (2000), 22-30
- El-Omar, E.M.: The importance of interleukin-1 β in *Helicobacter pylori* associated disease, *Gut* 48 (2001), 743-747
- El-Omar, E.M.; Chow, W.-H.; Rabkin, C.S.: Gastric cancer and *H.pylori*: Host genetics open the way, *Gastroenterology* 121 (2001), 1002-1013
- Evan, G.; Littlewood, T.: A matter of life and cell death, *Science* 281 (1998), 1317-1321
- Fadeel, B.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B.: Apoptosis in human disease: A new skin for the old ceremony, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 266 (1999), 699-717
- Faller, G.; Steininger, M.; Eck, M.; Henser, J.; Halm, E.G.; Kirchner, T.: Antigastric autoantibodies in *Helicobacter pylori* gastritis, *Virch Arch.* 427 (1996), 483-486
- Fan, X.; Crowe, S.E.; Behar, S.; Gunasena, H.; Ye, G.; Haeberle, H.; Houten, N.Y.; Gourley, W.K.; Ernst, P.B.; Reyes, V.E.: The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of *Helicobacter pylori* and induction of apoptosis, *J. Exp. Med.* 187 (1998), 1659-1669
- Fan, Xuejun: *H.pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis, *J. Immunol.* 165 (2000), 1918-1924

- Farinati, F.; Cardin, R.; Degan, P.; Rugge, M.; Mario, F.D.; Bonvicini, P.; Naccarato, R.: Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis, *Gut* 42 (1998), 351-6
- Faris, M.; Kokot, N.; Latinis, K.; Kasighatla, S.; Green, D.R.; Koretzky, G.A.; Nel, A.: The cJun N-terminal kinase cascade plays a role in stress-induced apoptosis in jurkat cells by up-regulating Fas Ligand express, *J. Immunol.* 160 (1998), 134-144
- Fischer W.; Schwan, D.; Gerland, E.; Erlenfeld, G.E.; Odenbreit, S.; Haas, R.: Systemic mutagenesis of *H.pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in hosts cells and induction of interleukin-8, *Mol. Microbiol.* 42 (2001), 1337-1348
- Foryst-Ludwig, A.; Naumann, M.: p21-activated kinase 1 activates the NF-*kappa*B inducing kinase-*Ikappa*B kinases NF-*kappa*B pathway and proinflammatory cytokines *J. Biol. Chem.* 275 (2000), 39779-39785
- Fraser, A.; Evan, G.: A license to kill, *Cell* 85 (1996), 781-784
- Galla, H.-J.: Stickstoffmonoxid, Stickstoffmonoxid, ein intrazellulärer Botenstoff, *Angew. Chem.* 105 (1993), 399-402
- Garban H.J., : Nitric oxide disrupts H₂O₂-dependent Activation of nuclear Factor *kappa*B, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 8918-8923
- Gartner, A.; Hengartner, M.O.; Lockshin, R.A.; Zakeri, Z.; Tilly, J.L.: Genetic approaches to programmed cell death in *C.elegans* aus: When cells die, Wiley-Liss, NY, USA (1998), 131-146
- Gavrieli, Y.; Sherman, Y.; Ben-Sasson, S.A.: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J. Cell Biol.* 119 (1992), 493-501
- Gawatz, M.; Neumann, F.-J.; Dickfeld, T.; Koch, W.; Laugwitz, K.-L.; Adelsberger, H.; Lengenbrink, K.; Page, S.; Neumeier, D.: Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 *Circulation* 98 (1998), 1164-1171
- Genta, R.M.: *Helicobacter pylori*, inflammation, mucosal damage, and apoptosis: Pathogenesis and definition of gastric atrophy, *Gastroenterology* 113 (1997), S51-S55
- Ghiara, P.; Marchetti, M.; Blaser, M.J.; Tummuru, M.K.R.; Cover, T.L.; Segal, E.D.; Tompkins, L.S.; Rappuoli, R.: Role of the *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, CagA and urease in a mouse model of disease, *Infect. Immun.* 63 (1995), 4154-4160
- Gillen, D.; El-Omar, E.M.; Wirz, A.A.; Ardill, J.E.S.; McColl, K.E.L.: The acid response to gastrin distinguishes duodenal ulcer patients from *Helicobacter pylori*-infected healthy subjects, *Gastroenterology* 114 (1998), 50-57
- Glocker, E.; Lange, C.; Covacci, A.; Bereswill, S.; Kist, M.; Pahl, H.L.: Proteins encoded by the cag Pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for NF-*kappa*B activation, *Infect. Immun.* 66 (1998), 2346-2348
- Gobert, A.P.; McGee, D.J.; Akhtar, M.; Mendz, G.L.; Newton, J.C.; Cheng, Y.; Mobley, H.L.T.; Wilson, K.T.: *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: A strategy for bacterial survival, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (2001), 13844-13849
- Gööz, M.; Hammond, C.E.; Larson, K.; Mukhin, Y.V.: Inhibition of human gastric H⁺-K⁺-ATPase *alpha*-subunit gene expression by *Helicobacter pylori*, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278 (2000), G981-G991
- Gordon, D.: CagA protein from *Helicobacter pylori* is a trojan horse to epithelial cells, *Gastroenterology* 118 (2000), 817
- Grasl-Kraupp, B.; Ruttkay-Nedecky, B.; Koudela, H.; Bukowska, K.; Bursch, W.; Schulz-Hermann, R.: In situ detection of fragmented DNA (TUNEL Assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis and autolytical cell death, *Hepatology* 21 (1995), 1465-1468
- Green, D.R.: Apoptotic pathway: the roads to ruin, *Cell* 94 (1998), 695-698
- Green, D.R.; Reed, J.C.: Mitochondria and Apoptosis, *Science* 281 (1998), 1309-1312
- Griffin, G.E.; Leung, K.; Folks, T.M.; Kunkel, S.; Nabel, G.J.: Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF-*kappa*B, *Nature* 339 (1989), 70-73
- Grilli, M.; Pizzi, M.; Memo, M.; Spano, P.: Neuroprotection of aspirin and sodium salicylate through blockage of NF-*kappa*B, *Science* 274 (1996), 1383-1385

- Grimm, S., Baeuerle, P.A.: The inducible transcription factor NF-*kappa*B: Structure-function relationship of its protein subunits, *Biochem. J.* 290 (1993), 297-308
- Grimm, S.; Bauer, M.K.A.; Baeuerle, P.A.; Schulze-Osthoff, K.: Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-*kappa*B induced upon apoptosis, *J. Cell Biol.* 134 (1996), 13-23
- Griscavage, J.M.; Wilk, S.; Ignarro, L.J.: Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-*kappa*B, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (1996), 3308-3312
- Guillemin, K.; Salama, N.R.; Tompkins, L.S.; Falkow, S.: Cag pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002), 15136-15141
- Gupta, R.A.; Polk, D.B.; Krishna, U.; Israel, D.A.; Yan, F.; DuBois, R.N.; Peek, R.M.: Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses nuclear factor *kappa*B-mediated apoptosis induced by *H. pylori*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001), 31059-31066
- Guruge, J.L.; Falk, P.G.; Lorenz, R.G.; Dans, M.; Wirth, H.-P.; Blaser, M.J.; Berg, D.E.; Gordon, J.I.: Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (1998), 3925-3930
- Hahm, K.B.; Lee, K.J.; Choi, S.Y.; Kim, J.H.; Cho, S.W.; Yim, H.; Park, S.J.; Chung, M.H.: Possibility of chemoprevention by the eradication of *Helicobacter pylori*: Oxidative DNA damage and apoptosis in *H. pylori*, *Am. J. Gastroenterol.* 92 (1997), 1853-7
- Hall, J.L.; Wang, X.; Adamson, V.; Zhou, Y.; Gibbons, G.H.: Overexpression of Ref-1 inhibits hypoxia and Tumor necrosis factor-induced endothelial cell apoptosis through NF-*kappa*B independent, *Circulation research* 88 (2001), 1247-1253
- Hall, P.A.; Coates, P.J.; Ansari, B.; Hopwood, D.: Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: The importance of apoptosis, *J. Cell Sci.* 107 (1994), 3569-3577
- Handa, O.; Naito, Y.; Takagi, T.; Shimozaawa, M.; Kokura, S.; Yoshida, N.; Matsui, H.; Cepinskas, G.; Kviety, P.R.; Yoshikawa, T.: Tumor necrosis factor-*alpha*-induced cytokine induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) production by rat gastric epithelial cells: role of reactive oxygen species and nuclear factor-*kappa*B, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309 (2004), 670-676
- Harmon, B.V.; Corder, A.M.; Collins, R.J.; Gobe, G.C.; Allen, J.; Allan, D.J.; Kerr, J.F.: Cell death induced in a murine mastocytoma by 42-47 degrees C heating in vitro: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load, *Int. J. Rad. Biol.* 58 (1991), 845-858
- Harris, P.R.; Ernst, P.B.; Kawabata, S.; Kiyona, H.; Smith, P.D.: Recombinant *Helicobacter pylori* urease activates primary mucosal macrophages, *J. Infect. Dis.* 178 (1998), 1516-20
- Harris, P.R.; Mobley, H.L.; Perez-Perez, G.I.; Blaser, M.J.; Smith, P.D.: *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production, *Gastroenterology* 111 (1996), 419-25
- Hartmann, G.; Bidlingmaier, M.; Eigler, A.; Hacker, U.; Endres, S.: Nucleinsäuren zur gezielten Synthesehemmung krankheitsfördernder Proteine, *Deutsches Ärzteblatt* 95 (1998), 1524-30
- Hasumi, K.; Tanaka, K.; Saitoh, S.; Takagi, A.; Miwa, T.; Mine, T.; Koga, Y.: Roles of tumor necrosis factor-*alpha*-receptor type 1 and Fas in the *Helicobacter pylori*-induced apoptosis of gastric epithelial cells, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17 (2002), 651-8
- Hayashi, S.; Sugiyama, T.; Asaka, M.; Yokota, K.; Oguma, K.; Hirai, Y.: Modification of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric epithelial cells by antiadhesion agents, *Dig. Dis. Sci.* 43 (1998), 56S-60S
- Heczko, U.; Smith, V.C.; Meloche, R.M.; Buchan, A.M.J.; Finlay, B.B.: Characteristics of *Helicobacter pylori* attachment to human primary antral epithelial cells, *Microbes and Infection* 2 (2000), 1669-1676
- Heimberg, H.; Heresmann, Y.; Jobin, C.; Leemans, R.; Cardozo, K.; Darville, M.; Eizirik, D.L.: Inhibition of cytokine-induced NF-*kappa*B activation by adenovirus-mediated expression of a NF-*kappa*B super-repressor prevents, *Diabetes* 50 (2001), 2219-2224
- Hettmann, T.; DiDinato, J.; Karin, M.; Leiden, J.M.: An essential role for NF-*kappa*B in promoting double positive thymocyte apoptosis, *J. Exp. Med.* 189 (1999), 145-157
- Higashi, H.; Tsutsumi, R.; Muto, S.; Sugiyama, T.; Azuma, T.; Asaka, M.; Hatakeyama, M.: SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein, *Science* 295 (2002), 683-686

- Hirno, S.; Utt, m.; Ringner, M.; Wadstrom, T.: Inhibition of heparan sulphate and other glycosaminoglycans binding to *Helicobacter pylori* by various polysulphated carbohydrate FEMS Immunol. Med. Microbiol. 10 (1995), 301-6
- Hnatowich, D.J.: Antisense and nuclear Medicin, J.Nucl. Med. 40 (1999), 693-703
- Houghton, J.; Macera-Bloch, L.S.; Harison, L.; Kim, K.H.; Korah, R.M.: Tumor necrosis factor *alpha* and interleukin *1beta* up-regulate gastric mucosal Fas antigen expression in *Helicobacter pylori* infection, Infect. Immun. 68 (2000), 1189-1195
- Houghton, J.M.; Bloch, L.M.; Goldstein, M.; van Hegn, S.; Korah, R.M.: In vivo disruption of the Fas pathway abrogates gastric growth alterations secondary to *Helicobater pylori* infection, J. Infect. Dis. 182 (2000), 856-64
- Hsu, X.; Xiong, J.; Goeddel, D.: The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-*kappa*B activation, Cell 81 (1995), 495-504
- IARC, working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans: *Helicobacter pylori*. aus: Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*: views and expert opinions of an IARC working grou Lyon, IARC (1994), 177-240
- Ina, K.; Itho, J.; Fukushima, K.; Kusugami, K.; Yamaguchi, T.; Kyone, K.; Imada, A.; Binion, D.G.; Musso, A.; West, G.A.; Dobrea, G.M.; McCormick, T.S.; Lapetina, E.G.; Levine, A.D.; Ottaway, C.A.; Fiocchi, C.: Resistance of Crohn`s disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with Bcl-2/Bax mucosal imbalance, J. Immunol. 163 (1999), 1081-90
- Jaup, B.H.: *Helicobacter pylori* and altered parietal cell morphology and function, Helicobacter 6 (2001), 77-78
- Jones, N.L.; Day, A.S.; Jennings, H.A.; Sherman, P.M.: *Helicobacter pylori* induces gastric epithelial cell apoptosis in association with increased Fas receptor expression, Infect. Immun. 67 (1999), 4237-4242
- Jones, N.L.; Shannon, P.T.; Cutz, E.; Yeger, H.; Sherman, P.M.: Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial sells early in the natural history of *Helicobacter pylori* infection, Am. J. Pathol. 151 (1997), 1695-703
- Jones-Blackett, S.; Hull, M.A.; Davies, G.R.; Crabtree, J.E.: Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit *Helicobacter pylori*-induced human neutrophil reactive oxygen metabolite productio, Aliment. Pharmacol. Ther. 13 (1999), 1653-61
- Josenhans, C.; Achtmann, M.; Suerbaum, S.: *Helicobacter* motility and chemotaxis aus: *Helicobacter pylori*:Molecular and Cellular Biology, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. (2001), 172-184
- Josenhans, C.; Suerbaum, S.: The role of motility as a virulence factor in bacteria, Int. J. Med. Microbiol. 291 (2002), 605-14
- Karam, S.M.: Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut, Frontiers in Bioscience 4 (1999), 286-298
- Kasibhatla, S.; Brunner, T.; Genestier, L.; Echeverri, F.; Mahboudi, A.: DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-*kappa*B, Mol. Cell 1 (1998), 543-51
- Kayser, F.H.; Bienz, K.A.; Eckert, J.; Zinkernagel, R.M.: Medizinische Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York (1998), 307-8
- Keates, S.; Hitti, Y.S.; Upton, M.; Kelly, C.P.: *Helicobacter pylori* infection activates NF-*kappa*B in gastric epithelial cells, Gastroenterology 113 (1997), 1099-1109
- Keates, S.; Keates, A.C.; Warny, M.; Peek, R.M.; Murray, P.G.; Kelly, C.P.: Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by cagA+ and cagA - *Helicobacter pylori*, J. Immunol. 163 (1999), 5552-5559
- Kerr, J.F.R.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R.: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics, Br. J. Cancer 26 (1972), 239-256
- Kim, J.M.; Kim, J.S.; Jung, H.C.; Oh, Y.-K.; Chung, H.-Y.; Lee, C.-H.; Song, I.S.: Helicobacter pylori infection activates NF-*kappa*B signaling pathway to induce iNOS and protect human gastric epithelial cells f Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 285 (2003), G1171-G1180

- Kim, J.M.; Kim, J.S.; Jung, H.C.; Song, I.S.; Kim, C.Y.: Apoptosis of human gastric epithelial cells via caspase - 3 activation in response to *Helicobacter pylori* infection: Possible involvement of neutrophils through tumor necrosis factor *alpha* and soluble Fas ligand, *Scand. J. Gastroenterol.* 35 (2000), 40-48
- Kirschner, E.; Blaser, M.: The dynamics of *Helicobacter pylori* infection of the human stomach, *J. Theor. Biol.* 176 (1995), 281-290
- Kohda, K.; Tanaka, K.; Aiba, Y.; Yasuda, M.; Miwa, M.; Koga, Y.: Role of apoptosis induced by *Helicobacter pylori* infection in the development of duodenal ulcer, *Gut* 44 (1999), 456-62
- Komiyama, T.; Ray, C.A.; Pickup, D.J.; Howard, A.D.; Thornberry, N.A.; Peterson, E.P.; Salvesen, G.: Induction of cell surface peptidase activity: a global response to cell stress correlated with apoptosis, *J. Biol. Chem.* 269 (1994), 19331-19337
- Konturek, P.C.; Pierzchalski, P.; Konturek, S.J.; Meixner, H.; Faller, G.; Kirchner, T.; Hahn, E.G.: *Helicobacter pylori* induces apoptosis in gastric mucosa through an upregulation of Bax expression in humans, *Scand. J. Gastroenterol.* 34 (1999), 375-83
- Kuck, D.; Kolmerer, B.; Iking-Konert, C.; Krammer, P.H.; Stremmel, W.; Rudi, J.: Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS, *Inf. Immun.* 69 (2001), 5080-5087
- Kühnel, F.; Zender, L.; Paul, Y.; Tietze, M.K.; Trautwein, C.; Manns, M.; Kubicka, S.: NF-*kappa*B mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis, *J. Biol. Chem.* 275 (2000), 6421-6427
- Kuida, K.; Zheng, T.S.; Na, S.; Kuan, C.; Yang, D.; Karasuyama, H.; Rakic, P.; Flavell, R.A.: Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice, *Nature* 384 (1996), 368-72
- Kuipers, E.J.; Perez-Perez, G.I.; Meuwisser, S.G.; Blaser, M.J.: *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status, *J. Natl. Cancer Inst.* 87 (1995), 1777-80
- Kuipers, E.J.; Thijs, J.C.; Festen, H.P.: The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9 (1995), 59-69
- Ledig, S.; Wagner, S.; Manns, M.P.; Beil, W.; Athmann, C.: Role of Receptor-mediated Apoptosis in *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells, *Digestion* 70 (2004), 178-186
- Leonardo, M.J.: Fas and the art of lymphocyte maintenance, *J. Exp. Med.* 183 (1996), 721-24
- Li, H.; Andersson, E.M.; Helander, H.F.: Reactions from rat gastric mucosa during one year of *Helicobacter pylori* infection, *Dig. Dis. Sci.* 44 (1999), 116-24
- Li, K.I.; Mellgard, B.; Helander, H.F.: A rat model of chronic *Helicobacter pylori* infection. Studies of epithelial cell turnover and gastric ulcer healing, *Scand. J. Gastroenterol.* 4 (1998), 370-8
- Li, S.D.; Kersulyte, D.; Lindley, I.J.D.; Neelam, B.; Berg, D.E.; Crabtree, J.E.: Multiple genes in the left half of the *cag* Pathogenicity Island of *Helicobacter pylori* are required for tyrosine kinase-depende, *Infect. Immun.* 67 (1999), 3893-3899
- Li, X.; Stark, G.R.: NF-*kappa*B-dependent signaling pathway, *Exp. Hematol.* 30 (2002), 285-296
- Lim, J.W.; Kim, H.; Kim, K.H.: NF-*kappa*B, inducible nitric oxide synthase and apoptosis by *Helicobacter pylori* infection, *Free Radical Biology and Medicin* 31 (2001), 355-366
- Lin, K.I.; Lee, S.H.; Narayanan, R.; Baraban, J.M.; Hardwick, J.M., Ratan, R.: Thiol agents and Bcl-2 identify an alphavirus-induced apoptotic pathway that requires activation of the transcription factor NF-*kappa*B, *J. Cell. Biol.* 131 (1995), 1149-61
- Lindahl, T.; Andersson, A.: Rate of chain breakage at apurinic site in double stranded desoxyribonucleic acid, *Biochemistry* 11 (1972), 1054-1063
- Logan, R.P.H.: The chemotherapeutic effects of H⁺/ K⁺ Inhibitors in *Helicobacter pylori* infection, *Pharmacol. Ther.* 69 (1996), 79-83
- Logan, R.P.H.; Walker, M.; Misiewicz, J. Gummett, P.A.; Baron, J.H.: Changes in the intragastric distribution of *H.pylori* during treatment with omeprazol, *Gut* 36 (1995), 12-16
- Maeda, S.; Ogura, K.; Yoshida, H.; Kanai, F.; Ikenoue, T.; Kato, N.; Shiratori, M.: Major virulence factors, *vacA* and *cagA* are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan, *Gut* 42 (1998), 338-43

- Maeda, S.; Yoshida, H.; Mitsuno, Y.; Hirata, K.; Ogura, K.; Shiratori, Y.; Omata, M.: Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by *Helicobacter pylori*, *J. Clin. Pathol.* 55 (2002), 286-293
- Maeda, S.; Yoshida, H.; Ogura, K.; Mitsuno, Y.; Hirata, Y.; Yamaji, Y.; Akanuma, M.; Shiratori, Y.; Omata, M.: *H.pylori* activates NF- κ B through a signaling pathway involving IkappaB kinases, NF- κ B- inducing kinase, TRAF 2 and TRAF, *Gastroenterology* 119 (2000), 97-108
- Mahr, S.; Neumayer, N.; Gerhard, M.; Classen, M.; Prinz, C.: IL-1 β - induced apoptosis in rat gastric enterochromaffin-like cells is mediated by iNOS, NF- κ B and Bax protein., *Gastroenterology* 118 (2000), 515-524,
- Mannick, E.E.; Bravo, I.E.; Zarama, G.; Realpe, J.L.; Zhang, X.J.; Ruiz, B.; Fonham, E.T.; Mera, R.; Miller, M.J.; Correa, P.: Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis; effect of antibiotics and antioxidants, *Cancer Res.* 56 (1996), 3238-43
- Marchetti, M.; Arico, B.; Burrioni, B.; Figura, N.; Rappuoli, R.; Ghiara, P.: Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease, *Science* 267 (1995), 1655-1658
- Marletta, M.A.: Nitric oxide synthase structure and mechanism, *J. Biol. Chem.* 286 (1993), 12231-12234
- Marletta, M.A.: Nitric oxide: biosynthesis and biological significance, *Trends Biochem. Sci.* 14 (1989), 488-492
- Marshall, B.J.: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, *Lancet* (1983), 1273-75
- McCull, K.E.L.; El-Omar, E.; Gillen, D.: Interaction between *H.pylori* infection gastric acid secretion and anti-secretory therapy, *Br. Med. Bulletin* 54 (1998), 121-138
- Mégraud, F.: Impact of *Helicobacter pylori* virulence on the outcome of gastroduodenal diseases: Lessons from the microbiologist., *Dig. Dis.* 19 (2001), 99-103
- Mehmet, H.: Caspases find a new place to hide, *Nature* 403 (2000), 29-30
- Messmer, U.K.; Reimer, D.M.; Reed, J.C.; Brune, B.: Nitric oxide induced poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in RAW 246.7 macrophage apoptosis is blocked by Bcl-2, *FEBS Lett.* 384 (1996), 162-166
- Meyer- Rosberg, K.; Scott, D.R.; Rex, D.; Melchers, K.; Sachs, G.: The effect of environmental pH on proton motive force of *Helicobacter pylori*, *Gastroenterology* 111 (1996), 886-900
- Michalke, M.; Cariers, A.; Schliess, F.; Häussinger, D.: Hypoosmolarity influences the activity of transcription factor NF- κ B in rat H4IIE hepatoma cells, *FEBS Letters* 465 (2000), 64-68
- Mizuki, I.; Shimoyama, T.; Fukuda, S.; Liu, Q.; Nakaji, S.; Munakata, A.: Association of gastric epithelial apoptosis with the ability of *Helicobacter pylori* to induce a neutrophil oxidative burst, *J. Med. Microbiol.* 49 (2000), 521-524
- Mobley, H.L.T.: *Helicobacter pylori* factors associated with disease development, *Gastroenterology* 113 (1997), S21-S28
- Mobley, H.L.T.: *Helicobacter pylori* Urease: Molecular and Cellular Biology, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. (2001), 155-170
- Mohammadi, M.; Czinn, S.; Redline, R.; Nedrud, J.: Helicobacter-specific cell-mediated immune response display a predominant TH1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in stomachs of mice, *J. Immunol.* 156 (1996), 4729-4738
- Moran, A.P.: The role of lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* pathogenesis, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 10 (1996), 39-50
- Moran, A.P.; Achtmann, M.; Suerbaum, S.: *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharides aus: *Helicobacter pylori*: Molecular and Cellular Biology, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. (2001), 207-226
- Morishita, R.; Sugimoto, T.; Aoki, M.; Kida, I.; Tomita, N.; Moriguchi, A.; Maeda, K.; Sawa, Y.; Kaneda, Y.; Higaki, J.; Ogihara: In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor- κ B binding site prevents myocardial infarction, *Nature Med.* 3 (1997), 894-899
- Moss, S.F. ; Shirin, H.: *Helicobacter pylori* induced apoptosis, *Gut* 43 (1998), 592-594
- Moss, S.F.; Calam, J.: Acid secretion and sensitivity to gastrin in patients with duodenal ulcer: effect of eradication of *Helicobacter pylori*, *Gut* 4 (1993), 888-92
- Moss, S.F.; Calam, J.; Agarwal, B.; Wang, S.; Holt, P.R.: Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*, *Gut* 38 (1996), 498-501

- Moss, S.F.; Sordillo, E.M.; Abdalla, A.M.; Makarov, V.; Hanzely, Z.; Perez-Perez, G.I.; Blaser, M.J.; Holt, P.R.: Increased gastric epithelial cell Apoptosis associated with colonization with *cagA*⁺ *Helicobacter pylori* strains, *Cancer Research* 61 (2001), 1406-1411
- Motoyama, N.; Wang, R.; Roth, K.A.; Sawa, H.; Nakayama, K.; Negishi, I.; Senju, S.; Zhang, Q.; Fujii, S.: Mass cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice, *Science* 267 (1995), 1506-10
- Münzenmaier, A.; Lange, C.; Glocker, E.; Covacci, A.; Moran, A.; Bereswill, S.; Baeuerle, P.A.; Kist, M.; Pahl, H.L.: A secreted/shed product of *Helicobacter pylori* activates transcription factor nuclear factor- κ B, *J.Immunol.* 159 (1997), 6140-6147
- Muotiala, A.; Helander, I.M.; Pyhälä, L.; Kosunen, T.U.; Moran, A.P.: Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide, *Infect. Immun.* 60 (1992), 1714-1716
- Muraoka, A.; Kaise, M.; Guo, Y.J.; Yamada, J.; Song, I.; DelValle, J.; Todisco, A.; Yamada, T.: Canine H⁺/K⁺-ATPase *alpha*-subunit gene promoter: studies with canine parietal cells in primary culture, *Am. J. Physiol.* 271 (1996), G1104-G1113
- Murayama, Y.; Miyagawa, J.; Shinomura, Y.; Kanayama, S.; Yasunaga, Y.; Nishibayashi, H.; Yamamori, K.; Higashimoto, Y.; Matsuzaki: Morphological and functional restoration of parietal cells in *Helicobacter pylori* associated enlarged fold gastritis after eradication, *Gut* 45 (1999), 653-661
- Nagata, S.; Golstein, P.: The Fas death factor, *Science* 267 (1995), 1449-1456
- Namavar, F.; Sparrus, M.; Veerman, E.C.I.; Appelmek, B.J.: Neutrophil-activating protein mediates adhesion of *Helicobacter pylori* to sulfated carbohydrates on high-molecular-weight saliv, *Infect. Immun.* 66 (1998), 444-447
- Neu, B.; Puschmann, A.J.; Mayerhofer, A.; Hutzler, P.; Grossmann, J.; Lippl, F.; Schepp, W.; Prinz, C.: TNF- α induces apoptosis of parietal cells, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003), 1755-1760
- Neu, B.; Rad, R.; Reindl, W.; Neuhofer, M.; Gerhard, M.; Schepp, W.; Prinz, C.: Expression of Tumor Necrosis Faktor *alpha*- related Apoptosis-inducing Ligand and its proapoptotic Receptors is down-regulated during gastric infection with virulent *cagA*⁺/*vacAs*¹⁺ *Helicobacter pylori* strains, *J. Infect. Immun.* 191 (2005), 571-578
- Neurath, M.F.; Becker, C.; Barbulescu, K.: Role of NF- κ B in immune and inflammatory responses in the gut, *Gut* 43 (1998), 856-860
- Neurath, M.F.; Pettersson, S.; Meyer zum Buschenfelde, K.H.; Strober, W.: Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF- κ B abrogates established experimental colitis in mice, *Nat. Med.* 2 (1996), 998-1004
- Noach, L.A.; Bosma, N.B.; Jansen, J.; Hoek, F.J.; van Deventer, S.J.H.; Tytgat, G.N.: Mucosal tumor necrosis factor-*alpha*, interleukin-1 *beta* and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection, *Scand. J. Gastroenterol.* 29 (1994a), 425-429
- Noach, L.A.; Rolf, T.M.; Tytgat, G.N.J.: Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa, *J. Clin. Pathol.* 47 (1994b), 699-704
- Nunokawa, Y.; Oikawa, S.; Tanaka, S.: Human inducible nitric oxide synthase gene is transcriptionally regulated by nuclear factor- κ B dependent mechanism, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223 (1996), 347-352
- Odenbreit, S.; Püls, J.; Sedlmaier, B.; Gerland, E.; Fischer, W.; Haas, R.: Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion, *Science* 287 (2000), 1497-1500
- Odenbreit, S.; Till, M.; Hofreuter, D.; Faller, G.; Haas, R.: Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue, *Mol. Microbiol.* 31 (1999), 1537-48
- Ogura, K.; Maeda, S.; Nakao, M.; Watanabe, T.; Tada, M.; Kyutoku, T.; Yoshida, H.; Shiratori, Y.; Omata, M.: Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in mongolian gerbil, *J. Exp. Med.* 192 (2000), 1601-1609
- Osborne, B.A.; Lockshin, R.A.; Zakeri, Z.; Tilly, J.L.: Apoptotic signaling pathways in lymphocytes: Why cells die, Wiley-Liss, NY, USA (1998), 245-266
- Papini, E.; de Bernhard, M.; Milia, E.; Bugnoli, M.; Zearil, M.; Rappuoli, R.; Montecucco, C.: Cellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori* originated from endosomal compartments, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (1994), 9720-9724

- Pantoflickova, D.; Blum, A.L.: *Helicobacter pylori*: A historical overview, aus: *Helicobacter pylori*: Molecular and Cellular Biology, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. (2001), 1-14
- Parente, F.; Caselli, M.; Porro, G.B.: Gastric apoptosis and *Helicobacter pylori* infection: An intricate matter, *Scand. J. Gastroenterol.* 2 (2001), 113-115
- Peek, R. M.: Microbes and microbial toxins: Paradigms for microbial-mucosal interactions; IV. *Helicobacter pylori* strain-specific activation of signal transduction cascades related to gastric inflammation, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280 (2001), G525-G530
- Peek, R.M.; Blaser, M.J.; Mays, D.J.; Forsyth, M.H.; Cover, T.L.; Song, S.Y.; Krishna, U.; Pietenpol, J.A.: *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of gastric epithelial cell cycle, *Cancer Research* 59 (1999), 6124-6131
- Peek, R.M.; Miller, G.G.; Tham, K.T.; Perez-Perez, G.I.; Zhao, X.; Atherton, J.C.; Blaser, M.J.: Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to *cagA*⁺ *Helicobacter pylori* strains, *Lab. Invest.* 71 (1995), 760-770
- Peppelenbrosch, M.P.; Deventer, S.J.H.: T cell apoptosis and inflammatory bowel disease, *Gut* 53 (2004), 1556-1558
- Perez-Perez, G.I.; Sheperd, V.L.; Morrow, J.D.; Blaser, M.J.: Activation of human THP-1 cells and rat bone marrow-derived macrophages by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide, *Infect. Immun.* 63 (1995), 1183-1187
- Piotrowski, J.; Piotrowski, E.; Skrodzka, D.; Slomiany, A.; Slomiani, B.: Induction of acute gastritis and epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*, *Scand. J. Gastroenterol.* 32 (1997), 203-211
- Potthoff, A.; Ledig, S.; Martin, J.; Jandl, O.; Cornberg, M.; Obst, B.; Beil, W.; Manns, M.P.; Wagner, S.: Significance of the caspase family in *Helicobacter pylori* induced gastric epithelial apoptosis, *Helicobacter* 7 (2002), 367-377
- Prinz, C.; Schöninger, M.; Rad, R.; Becker, I.; Keiditsch, E.; Wagenpfeil, S.; Classen, M.; Rösch, T.; Schepp, W.; Gerhard, M. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation, *Cancer Research* 61 (2001), 1903-1909
- Prinz, C.; Hafsi, N.; Volland, P.: *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination, *Trends in Microbiology* 11 (2003), 134-138
- Que, F.G.; Gores, G.J.: Cell death by apoptosis: Basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist, *Gastroenterology* 110 (1996), 1238-1243
- Rachmilewits, D.; Karmeli, F.; Eliakim, R.: Enhanced gastric nitric oxide synthase activity in duodenal ulcer patients, *Gut* 35 (1994), 1394-7
- Rad, R.; Prinz, C.; Neu, B.; Neuhofer, M.; Zeitner, M.; Volland, P.; Becker, I.; Schepp, W.; Gerhard, M.: Synergistic effect of *Helicobacter pylori* virulence factors and interleukin-1 polymorphisms for the development of severe histological changes in the gastric mucosa, *J. Infect. Diseases* 188 (2003), 272-81
- Reuning, U.; Wilhelm, O.; Nishihuchi, T.; Guerrini, L.; Blasi, F.; Graeff, H.; Schmitt, M.: Inhibition of NF- κ B-Rel A expression by antisense oligodeoxynucleotides suppresses synthesis of urokinase-type plasminogen activator (uPA) but not its inhibitor PAI-1, *Nucleic. Acids Research* 23 (1995), 3887-3893
- Rokkas, T.; Ladas, S.; Liatsos, C.; Petridou, E.; Papatheodorou, G.; Theocharis, S.; Karameris, A.; Raptis, S.: Relationship of *Helicobacter pylori* *cagA* status to gastric cell proliferation and apoptosis, *Dig. Dis. Sci.* 44 (1999), 487-93
- Rokutan, K.; Teshima, S.; Miyoshi, M.; Nikawa, T.; Kishi, K.: Oxidant-induced activation of nuclear factor- κ B in culture guinea pig gastric epithelial cells, *Dig. Dis. Sci.* 42 (1997), 1880-9
- Rudi, J.; Kuck, D.; Strand, S.; von Herbay, A.; Mariani, S.M.; Krammer, P.H.; Galle, P.R.; Stremmel, W.: Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori* induced gastric epithelial apoptosis, *J. Clin. Invest.* 102 (1998), 1506-1514
- Sánchez-Pérez, I.; Benitah, S.A.; Martínez-Gomariz, M.; Lacal, J.C.; Perona, R.: Cell stress and MEKK1-mediated c-Jun activation modulates NF- κ B activity and cell viability, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002), 2933-2945
- Sande, N.; Nikulin, M.; Nilsson, I.; Wadström, T.; Laxén, F.; Härkönen, M.; Suovaniemi, O.; Sipponen, P.: Increased risk of development atrophic gastritis in patients infected with *cagA*⁺ *Helicobacter pylori*, *Scand. J. Gastroenterol.* 36 (2001), 928-933

- Sawa, Y.S.; Morishita, R.; Suzuki, K.; Kagisaki, K.; Kaneda, Y.; Maeda, K.; Kadoba, K.; Matsuda, H.: A novel strategy for myocardial protection using in vivo transfection of cis element "decoy" against NF- κ B binding site, *Circulation* 96 (1997), II-280-II-285
- Schepp, W.: Isolierte Parietalzellen: Ein experimentelles System zur Untersuchung physiologischer und pharmakologischer Regulationsmechanismen der Magensäure, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York, (1989), S. 3-23
- Schepp, W.; Classen, M.; Diehl, V.; Kochsiek, K.: Peptisches Ukus aus: Innere Medizin, Urban und Schwarzenberg Verlag, München (1998), 560-574
- Schepp, W.; Dehne, K.; Hermmuth, H.; Pfeffer, K.; Prinz, C.: Identification and functional importance of IL-1 receptors on rat parietal cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 275 (1998), G1094-G1105
- Schlaak, J.F.; Barreiros, A.P.; Pettersson, S.; Schirmacher, P.; Meyer zum Büschenfeld, K.-H.; Neurath, M.F.: Antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF- κ B abrogate fulminant septic shock induced by *S.typhimurium* in mice, *Scand. J. Immunol.* 54 (2001), 396-403
- Schmid, R.M.; Perkins, N.D.; Duckett, C.S.; Andrews, P.C.; Nabel, G.J.: Cloning of an NF- κ B subunit which stimulates HIV transcription in synergy with p65, *Nature* 352 (1991), 733-736
- Schreck, R.; Rieber, P.; Baeuerle, P.A.: Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1, *EMBO J.* 10 (1991), 2247-2258
- Scott, D.R.; Weeks, D.; Hong, C.; Postius, S.; Melchers, K.; Sachs, G.: The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*, *Gastroenterology* 114 (1998), 58-70
- Segal, E.D.; Lange, C.; Covacci, A.; Tompkins, L.S.; Falkow, S.: Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (1997), 7595-7599
- Segal, E.D.: Altered states: involvement of phosphorylated cagA in the induction of host cellular growth changes by *H.pylori*, *PNAS* 1999
- Selbach, M.; Moese, S.; Hauck, C.R.; Meyer, T.F.; Backert, S.: Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo, *J. Biol. Chem.* 277 (2002), 6775-6778
- Sen, R.; Baltimore, D.: Multiple factors interact with the immunoglobulin enhancer sequence, *Cell* 47 (1986), 705-716
- Sharma, S.A.; Tummuru, M.K.R.; Blaser, M.J.; Kerr, L.D.: Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor- κ B in gastric epithelial cells, *J. Immunol.* 160 (1998), 2401-2407
- Sharma, S.A.; Tummuru, M.K.R.; Miller, G.G.; Blaser, M.J.: Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro, *Infect Immun.* 63 (1995), 1681-1687
- Shibayama, K.; Doi, Y.; Shibata, N.; Yagi, T.; Nada, T.; Iinuma, Y.; Arakawa, Y.: Apoptotic signaling pathway activated pathway activated by *Helicobacter pylori* infection and increase of apoptosis-inducing activity under serum-starved conditions, *Infect. Immun.* 69 (2001), 3181-3189
- Shimoyama, T.; Crabtree, J.E.: Bacterial factors and immune pathogenesis in *Helicobacter pylori* infection, *Gut* 43 (1998), S1-S5
- Siebenlist, U.; Franzoso, G.; Brown, K.: Structure, regulation and function of NF- κ B, *Annu. Rev. Cell Biol.* 10 (1994); 405-55
- Simbulan-Rosenthal, C.M.; Rosenthal, D.S.; Iyer, S.; Boulares, A.H.: Transient Poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins and role of Poly(ADP-ribose) Polymerase in the early stages of apoptosis, *J. Biol. Chem.* 273 (1998), 13703-13712
- Smoot, D.T.: How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? Direct mechanism, *Gastroenterology* 113 (1997), S31-4
- Smythies, L.E.; Waites, K.B.; Lindsey, J.R.; Harris, P.R.; Ghiara, P.; Smith, P.D.: *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbation in IL-4 but not IFN- γ -deficient mice, *J. Immunol.* 165 (2000), 1022-1029
- Sonenshein, G.E.: Rel/ NF- κ B transcription factors and the control of apoptosis, *Cancer Biology* 8 (1997), 113-119
- Spiegelhalder, C.; Gerstenecker, B.; Kersten, A.; Schlitz, E.; Kist, M.: Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene, *Infect. Immun.* 61 (1993), 5315-5325

- Srinivasula, S.M.; Ahmad, M.; Fernandez-Alnemri, T.; Litwack, G.; Alnemri, E.S.: Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: The Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (1996), 14486-14491
- Stachura, J.; Konturek, J.W.; Karczewska, A.; Domschke, W.; Popiela, T.; Konturek, S.J.: *Helicobacter pylori* from duodenal ulcer patients expresses inducible nitric oxide synthase immunoreactivity in vivo and vitro, *J. Physiol. Pharmacol.* 47 (1996), 131-5
- Stein, M.; Rappuoli, R.; Covacci, A.: Tyrosine phosphorylation of *Helicobacter pylori* cagA antigen after cag-driven host cell translocation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (2000), 1263-1268
- Steininger, H.; Faller, G.; Dewald, E.; Brabletz, T.; Jung, A.; Kirchner, T.: Apoptosis in chronic gastritis and its correlation with antigastric autoantibodies, *Virchows Arch.* 433 (1998), 13-18
- Stolte, M.; Malfertheiner, P.: *Helicobacter pylori*- Von der Grundlage zur Therapie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York (2000), 45-58
- Stolte, M.; Meining, A.: *Helicobacter pylori* and gastric cancer, *Oncologist* 3 (1998), 24-128
- Sturm, A.; Leite, A.Z.; Danese, S.; Krivacic, K.A.; West, G.A.; Mohr, S.; Jacobberger, J.W.; Fiocchi, C.: Divergent cell cycle kinetics underlie the distinct functional capacity of mucosal T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis, *Gut* 53 (2004), 1624-31
- Su, B.; Hellström, P.M.; Rubio, C.; Celik, J.; Granström, M.; Normak, S.: Type I *Helicobacter pylori* shows lewis^b-independent adherence to gastric cell requiring de novo protein synthesis in both host and bacteria, *J. Infect. Dis.* 178 (1998); 1379-90
- Suerbaum, S.; Josenhans, C.; Labigne, A.: Cloning and genetic characterisation of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin genes and construction of *H. pylori* flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange, *J. Bacteriol.* 175 (1993), 3278-3288
- Suerbaum, S.; Malfertheiner, P.: *Helicobacter pylori*- Von der Grundlage zur Therapie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York (2000), 11-20
- Suerbaum, S.; Thiberge, J.M.; Kansau, I.; Ferrero, R.L.; Labigne, A.: *Helicobacter pylori* hspA-hspB heat-shock gene cluster: Nucleotide sequence expression, putative function and immunogenicity, *Mol. Microbiol.* 14 (1994), 959-74
- Takahashi, K.; Kamiya, K.; Urase, K.; Suga, M.; Takizawa, T.; Mori, H.; Yoshikawa, Y.; Ichimura, K.; Kuida, K.; Momio, T.: Caspase-3-deficiency induces hyperplasia of supporting cells and degeneration of sensory cells resulting in the hearing loss, *Brain Res.* 16 (2001), 359-67
- Telford, J.L.; Ghiara, P.; Dell'Orco, M.: Gene structure of *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease, *J. Exp. Med.* 179 (1994), 1653-58
- Thalmaier, U.; Lehn, N.; Pfeffer, K.; Stolte, M.; Vieth, M.; Schneider-Brachert, W.: Role of TNF α in *Helicobacter pylori* gastritis in tumor necrosis factor 1-deficient mice, *Infect. Immun.* 70 (2002), 3149-3155
- Thompson, C.B.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science* 267 (1995), 1456-62
- Thornberry, N.A.; Lazebnik, Y.: Caspases: Enemies within, *Science* 281 (1998), 1312-1316
- Tomb, J.F et al.: The complete genome sequenc of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*, *Nature* 388 (1997), 539-547
- Traenckner, E.B.; Wilk, S.; Baeuerle, P.A.: A proteasome inhibitor prevents activation of NF- κ B and stabilizes a newly phosphorylated form of I κ B- α that is still bound to NF- κ B., *EMBO J.* 13 (1994), 5433-5441
- Tsuji, S.; Kawano, S.; Tsujii, M.; Takei, Y.; Tanaka, M.; Sawaoka, H.; Nagano, K.; Fusamoto, H.; Kamada, T.: *Helicobacter pylori* extract stimulates inflammatory nitric oxide production, *Cancer Lett.* 108 (1996), 196-200
- Tummuru, M.K.R.; Sharma, S.A.; Blaser, M.J.: *Helicobacter pylori* pic B, a homolog of the *Bordatella pertussis* toxin secretory protein, is required for induction of Interleukin-8 in gastric epithelial cell line, *Mol. Microbiol.* 18 (1995), 867-876
- Uemura, N.; Okamoto, S.; Yamamoto, S.; Matsumura, N.; Yamaguchi, S.; Yamakido, M.; Taniyama, K.; Sasaki, N.; Schlemper, R.J.: *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer, *New Engl. J. Med.* 345 (2001), 784-789

- Valkonen, K.H.; Wadstrom, T.; Moran, A.P.: Interaction of lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* with basement membrane protein laminin, *Infect. Immun.* 62 (1994), 3640-8
- Valkonen, K.H.; Wadstrom, T.; Moran, A.P.: Identification of the N-acetylneuraminylactose-specific Laminin-binding protein of *Helicobacter pylori*, *Infect. Immun.* 65 (1997), 916-923
- Van Antwerp, D.; Martin, D.S.; Kafri, D.R.; Green, D.R.; Verma, I.M.: Suppression of TNF- α induced apoptosis by NF- κ B, *Science* 274 (1996), 787-789
- Van den Brink, G.R.; ten Kate, F.J.; Ponsioen, M.M.; Tytgat, G.N.; Rive, M.M.; van Deventer, S.J.; Peppelenbosch, M.P.: Expression and activation of NF- κ B in the antrum of the human stomach, *J. Immunol.* 146 (2000), 3353-3359
- Vaux, D.L., Strasser, A.: The molecular biology of apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (1996), 2239-2244
- Vaux, D.L.; Korsmeyer, S.J.: Cell death in development, *Cell* 96 (1999), 245-254
- Vos, I.H.; Govers, R.; Gröne, H.-J.; Kleij, L.; Schurink, M.; De Weger, R.A.; Goldschmeding, R.; Rabelink, T.J.: NF- κ B decoy oligonucleotides reduce monocyte infiltration in renal allografts, *FASEB J.* 14 (2000), 815-822
- Wagner, S.; Beil, W.; Achtmann, M.; Suerbaum, S.: *Helicobacter pylori* induced apoptosis aus: *Helicobacter pylori*: Molecular and Cellular Biology, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. (2001), 99-111
- Wagner, S.; Beil, W.; Westermann, J.; Logan, R.P.H.; Bock, C.T.; Trautwein, C.; Bleck, J.S.; Manns, M.P.: Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: Evidence for a major role of apoptosis, *Gastroenterology* 113 (1997), 1836-1847
- Wang, J.; Fan, X.; Lindholm, C.; Bennett, M.; O'Connell, J.; Shanahan, F.; Brooks, E.D.; Reyes, V.E.; Ernst, P.B.: *Helicobacter pylori* modulates lymphoepithelial cell interactions leading to epithelial cell damage through Fas/Fas ligand interactions, *Infect. Immun.* 68 (2000), 4303-4311
- Warren, J.R.: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, *Lancet* (1983), 1273
- Watanabe, S.; Takagi, A.; Koga, Y.; Kamiya, S.; Miwa, T.: *Helicobacter pylori* induces apoptosis in gastric epithelial cells through inducible nitric oxide, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15 (2000), 168-174
- Watanabe, T.; Tada, M.; Nagai, H.; Sasaki, S.; Nakao, M.: *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils, *Gastroenterology* 115 (1998), 642-8
- Weeks, D.L.; Eskandari, S.; Scott, D.R.; Sachs, G.: A H⁺-gated urea channel: The link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization, *Science* 287 (2000), 482-85
- Weel, J.F.L.; van der Hulst, R.W.M.; Gerrits, Y.; Roorda, P.; Feller, M.; Dankert, J.; Tytgat, G.N.J.; van der Ende, A.: The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin and *Helicobacter pylori*-related diseases, *J. Infect. Dis.* 173 (1996), 1171-5
- Wessler, S.; Höcker, M.; Fischer, W.; Wang, T.C.; Rosewicz, S.; Haas, R.; Wiedenmann, B.; Meyer, T.F.; Naumann, M.: *Helicobacter pylori* activates the histidine decarboxylase promoter through a mitogen-activated protein kinase pathway independent of Pathogenicity Island- encoded virulence factors, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 3629-3636
- Wilson, K.T.; Ramanujam, K.S.; Mobley, H.L.; Musselman, R.F.; James, S.P.: *Helicobacter pylori* stimulates inducible nitric oxide synthase expression and activity in murine macrophage cell line, *Gastroenterology* 111 (1996), 1524-33
- Wong, G.H.W.; Goeddel, D.V.: Fas antigen and p55 TNF receptor signal apoptosis through distinct pathways, *J. Immunol.* 152 (1994), 1751-5
- Wyllie, A.H.: Apoptosis: An overview, *British Med. Bulletin* 53 (1997), 451-465
- Wyllie, A.H.; Golstein, P.: More than one way to go, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (2001), 11-13
- Wyllie, A.H.; Kerr, J.F.; Currie, A.R.: Cell death: the significance of apoptosis, *Int. Rev. Cytol.* 68 (1980), 251-306
- Xu, X.-M.; Tang, J.-L.; Chen, X.; Wang, L.H.; Wu, K.K.-Y.: Involvement of two SP-1 elements in basal endothelial prostaglandin H synthase-1 promoter activity, *J. Biol. Chem.* 272 (1997), 6943-6950
- Yamaoka, Y.; Kodama, T.; Kita, M.; Imanishi, J.; Kashima, K.; Graham, D.Y.: Relation between clinical presentation, *Helicobacter pylori* density, IL-1 β and 8 production and cagA status, *Gut* 45 (1999), 804-811

-
- Yanai, A.; Hirata, Y.; Mitsuno, Y.; Maeda, S.; Shibata, W.; Akanuma, M.; Yoshida, H.; Kawabe, T.; Omata, M.: *Helicobacter pylori* induces antiapoptosis through Nuclear factor-*kappa*B activation, J. Inf. Dis. 188 (2003), 1741-51
- Zabel, U.; Schreck, R.; Baeuerle, P.A.: DNA binding of purified transcription factor NF-*kappa*B, J. Biol. Chem. 266 (1991), 252-260
- Zagorski, J.; Wahl, S.M.: Inhibition of acute peritoneal inflammation in rats by a cytokine-induced neutrophil chemoattractant receptor antagonist, J. Immunol. 159 (1997), 1059-1062
- Zhang, X.-J.; Ruiz, B.; Correa, P.; Miller, M.J.S.: Cellular dissociation of NF-*kappa*B and inducible nitric oxide synthase in *Helicobacter pylori* infection, Free Radical Biology and Medicine 29 (2000); 730-735
- Zheng, X.-L.; Gui, Y.; Sharkey, K.A.; Hollenberg, M.D.: Differential induction of nitric oxide synthase in rat gastric and vascular smooth muscle tissue: distinct tissue distribution and distinctive signaling pathways, J. Pharmacol. Exp. Ther. 289 (1999), 632-640
- Zou, H.; Henzel, W.J.; Liu, X.; Lutschg, A.; Wang, X.: Apaf-1, a human protein homologous to C.elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3, Cell 90 (1997), 405-13
- Zou, H.; Li, Y.; Liu, X.; Wang, X.: An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9, J. Biol. Chem. 274 (1999), 11549-11556

Lebenslauf

Name: Pamela Randlkofer
Geburtsdatum: 9 Februar 1976
Geburtsort: Tübingen

Schulausbildung:

1983-1989 Rudolf-Steiner-Schule in Gröbenzell bei München
1989-1996 Elsa-Brändström-Gymnasium in München mit Abschluss Abitur

Studium und Beruf:

1996-2003 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität in München

08/1998 Ärztliche Vorprüfung
08/1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

seit 2004 Ärztin im Praktikum und Assistenzärztin in der Kinderchirurgie, Kinderklinik Dritter Orden in München

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Classen, II Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, Herrn Prof. Dr. C. Prinz, II Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, Herrn Prof. Dr. Schepp, II Medizinische Abteilung, Städtisches Krankenhaus München-Bogenhausen und Herrn Prof. Dr. Gratzl, Direktor des Anatomischen Institutes der Technischen Universität in München, für die zur Verfügung gestellten Rahmenbedingungen.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Dr. B. Neu für die Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit, für die Gespräche und Diskussionen, sowie für die sorgfältige Durchsicht des Manuskriptes.

Bei Herrn Prof. Dr. Chr. Prinz möchte ich mich sehr herzlich bedanken, der durch seine fachliche Kompetenz und fortwährende Unterstützung, entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Hedda Herrmuth, Robert Zanner, Herrn Dr. M. Gerhard, Roland Rad und Petra Voland danke ich für die kompetente Einarbeitung in die Isolation der Parietalzellen und Einführung in die Welt des *Helicobacter pylori*.

Bei Agnes Pohlinger, Roland Rad, Sonja Bülau, Robert Zanner, Marco Zeitner, Vidar Stenset, Mathilde Neuhofer, Bettina Rössner und Christina Qingzheng danke ich für die netten und lustigen Stunden im Labor und manch netten Abend.

Besonderer Dank gilt auch meiner Schwester Melanie, meiner Mutter, meiner Großmutter und meinen besten Freundinnen Anette Bauer und Monika Schmid, die immer an mich geglaubt und mich unterstützt haben.

Der größte Dank gilt jedoch meinem Freund und Lebensgefährten Roland Heidt, der es auch über die lange und manchmal schwierige Zeit des Studiums und der Doktorarbeit mit mir ausgehalten hat und mich unermüdlich zum Durchhalten bewogen und angetrieben hat. Ich danke Dir Roland, dass Du immer für mich da gewesen bist. Weiterhin danke ich dir für deinen Einsatz und letztendlich für die strenge und kritische Erstkorrektur dieser Arbeit.