

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

# **Einfluss der bakteriellen *Cag*-Pathogenitätsinsel auf die *Helicobacter pylori* induzierte innate und adaptive Immunität**

Susanne Schwendy

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. Ch. Prinz  
2. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker

Die Dissertation wurde am 10.10.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 24.01.2007 angenommen.

**Teile dieser Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:**

Hafsi N, Volland P, **Schwendy S**, Rad R, Reindl W, Gerhard M, Prinz C.  
Human dendritic cells respond to *Helicobacter pylori*, promoting NK cell and Th1-effector responses in vitro. *Journal of Immunology* 2004 Jul 15;173(2):1249-57.

Schmees C, Gerhard M, Treptau T, Volland P, **Schwendy S**, Rad R, Prinz C.  
VacA-Associated Inhibition of T-cell Function: Reviewed and Reconsidered. *Helicobacter* 2006 Jun;11(3):144-6.

Prinz C., Volland P., **Schwendy S**.  
*H.pylori* and gastric cancer-shifting the global burden.  
*World Journal of Gastroenterology* 2006

Roland Rad, Lena Brenner, Stefan Bauer, **Susanne Schwendy**, Laura Layland, Clarissa Prazeres da Costa, Wolfgang Reindl, Anar Dossumbekova, Mathias Friedrich, Dieter Saur, Hermann Wagner, Roland M Schmid, Christian Prinz  
CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> T cells regulate gastric inflammation and *Helicobacter pylori* colonisation *in vivo*.  
*Gastroenterology* 2006 (in press)

Roland Rad, Lena Brenner, Anar Dossumbekova, **Susanne Schwendy**, Wolfgang Reindl, Jörg Mages, Roland Lang, Hermann Wagner, Roland M. Schmid, Stefan Bauer, Christian Prinz.  
Toll-like Receptor-dependent activation of dendritic cells controls adaptive immunity to *Helicobacter pylori*.  
Eingereicht zur Publikation

Brenner L, **Schwendy S** (authors with equal contribution), Volland P, Lang R, Mages J, Schmid RM, Prinz C, Rad R  
The cellular plasticity of *Helicobacter pylori* sensing: implications for innate and adaptive immunity.  
Eingereicht zur Publikation

*Gewidmet meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungen</i> .....	6
<b>1. Einleitung</b> .....	10
<b>1.1 Die Entdeckung von <i>H. pylori</i> löste einen Paradigmenwechsel in der Medizin des Magens aus</b> .....	10
<b>1.1.1 Kolonisation des Magens durch das gramnegative Bakterium <i>Helicobacter pylori</i></b> ..	10
<b>1.1.2 Epidemiologie</b>	11
<b>1.1.3 Die klinische Relevanz von <i>H. pylori</i></b> .....	12
<b>1.1.4 Die Therapie der <i>H. pylori</i>-Infektion</b> .....	14
<b>1.2 Zentrale Rolle der durch <i>H. pylori</i> induzierten Inflammation bei der Karzinogenese</b> .....	15
<b>1.3 Inflammation und Immunantwort als Reaktion auf die Infektion mit <i>H. pylori</i></b> .....	16
<b>1.3.1 Allgemeine Mechanismen der innaten und spezifischen Immunität</b> .....	16
<b>1.3.1.1 Allgemeine Grundlagen der angeborenen (innaten) Immunantwort</b> .....	17
<b>1.3.1.2 Allgemeine Grundlagen der erworbenen (adaptiven) Immunantwort</b> .....	23
<b>1.3.2 Die Immunantwort auf <i>H. pylori</i></b> .....	29
<b>1.4 Bakterielle Virulenzfaktoren modulieren die Inflammation und die Immunantwort</b> .....	31
<b>1.4.1 Das Vakuolisierende Zytotoxin VacA</b> .....	31
<b>1.4.2 CagA und die <i>cag</i>-Pathogenitätsinsel (<i>cag-PAI</i>)</b> .....	32
<b>1.4.3 Das Blutgruppenantigen-bindende Adhäsin BabA</b> .....	34
<b>1.5 Ein Mausmodell der <i>H. pylori</i>-Infektion: eine Rekapitulation der humanen Inflammation</b> .....	34
<b>1.6 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	36

<b>2. Material und Methoden</b> .....	37
<b>2.1 Sammlung und Bearbeitung des humanen Untersuchungsmaterials</b> .....	37
<b>2.2 Isolation von Nukleinsäuren</b> .....	37
<b>2.2.1 DNA-Isolierung aus humanem und murinem Gewebe</b> .....	37
2.2.1.1 Materialien .....	37
2.2.1.2 Prinzip und Durchführung der DNA-Isolation .....	38
<b>2.2.2 RNA-Isolation aus humanem und murinem Gewebe</b> .....	38
2.2.2.1 Materialien .....	38
2.2.2.2 Prinzip und Durchführung der RNA-Isolation .....	38
<b>2.3 Umschreiben von RNA in cDNA (Reverse Transkription)</b> .....	39
2.3.1 Prinzip der Reversen Transkription .....	39
2.3.2 Reagenzien .....	40
2.3.3 Durchführung der Reversen Transkription .....	40
<b>2.4 Die Polymerase-Kettenreaktion</b> .....	41
2.4.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion .....	41
2.4.2 Materialien und Durchführung der PCR .....	42
<b>2.5 Genotypisierung von <i>H. pylori</i> mittels Polymerase-Kettenreaktion</b> .....	43
<b>2.6 Quantitative Genexpressionsanalyse mittels Real-Time TaqMan RT-PCR</b> .....	44
2.6.1 Prinzip der quantitativen RT-PCR .....	44
2.6.2 Reagenzien .....	45
2.6.3 Primer und Probes für die TaqMan-RT-PCR .....	46
2.6.4 Durchführung der TaqMan-RT-PCR .....	48
<b>2.7 Histopathologische Aufarbeitung von humanem und murinem Magengewebe</b> .....	48
2.7.1 Herstellung von Präparaten durch Einbettung in Paraffin .....	49
2.7.1.1 Reagenzien .....	49
2.7.1.2 Fixierung und Vorparaffinisierung .....	49
2.7.1.3 Einbettung der Präparate .....	50
2.7.1.4 Herstellung von Schnittpräparaten .....	51
2.7.1.5 Entparaffinierung der Schnittpräparate .....	51

<b>2.7.2 Herstellung von Kryopräparaten</b> .....	52
2.7.2.1 Reagenzien.....	52
2.7.2.2 Durchführung.....	53
2.7.2.3 Herstellung von Gefrierschnitten.....	53
2.7.2.4 Fixierung und Konservierung der Gefrierschnitte.....	53
<b>2.8 Hämatoxyllin-Eosin-(HE)-Färbung</b> .....	54
2.8.1 Reagenzien.....	54
2.8.2 Prinzip und Durchführung der HE-Färbung.....	54
2.8.3 Histopathologische Klassifikation gastraler Pathologien.....	55
<b>2.9 Immunhistochemische Färbungen muriner und humaner Magenschleimhaut</b> .....	56
2.9.1 Reagenzien.....	57
2.9.2 Prinzip der Immunhistochemie.....	59
2.9.3 Antigenmaskierung.....	60
2.9.4 Blockade der endogenen Enzymaktivität.....	61
2.9.5 Blockade mit Normalserum.....	61
2.9.6 Immunhistochemische Färbung Paraffin-eingebetteter Gewebeschnitte.....	62
2.9.7 Immunhistochemie an Gefrierschnitten.....	63
2.9.8 Semiquantitative Evaluation immunhistochemisch gefärbter leukozytärer Subpopulationen.....	64
<b>2.10 Enzymhistochemie: Naphtol AS-D Chlorazetatesterase-Färbung</b> .....	64
2.10.1 Reagenzien und Herstellung der Färbelösung.....	64
2.10.2 Prinzip und Durchführung der Färbung.....	65
<b>2.11 Kultur von <i>H. pylori</i></b> .....	65
2.11.1 Materialien und Durchführung.....	65
2.11.2 Kultur von <i>H. pylori</i> in Überschichtungskultur und Flüssigmedium.....	66
2.11.3 Langzeitlagerung von <i>H. pylori</i> .....	67
<b>2.12 Infektion der Maus mit <i>H. pylori</i></b> .....	67

<b>3. Ergebnisse</b> .....	69
<b>3.1 Dynamik der gastralen Inflammation nach <i>H. pylori</i>-Infektion im Mausmodell</b> .....	69
<b>3.2 Leukozytäre Subpopulationen in der <i>H. pylori</i> infizierten Magenschleimhaut der Maus</b> .....	71
3.2.1 Die T-Lymphozyten.....	72
3.2.2 Die B-Lymphozyten.....	73
3.2.3 Die Infiltration der Makrophagen in die murine Magenschleimhaut.....	73
3.2.4 Dendritische Zellen in der murinen Magenschleimhaut.....	74
3.2.5 Die granulozytäre Infiltration in die murine Magenschleimhaut.....	75
3.2.6 Die mukosale Zytokinexpression im murinen Magen.....	77
<b>3.3 Leukozytäre Subpopulationen in der humanen <i>H. pylori</i> infizierten Magenschleimhaut</b> .....	79
3.3.1 Die Zellen des innatens Immunsystems in der <i>H. pylori</i> infizierten Magenschleimhaut.....	80
3.3.2 Die Zellen des adaptiven Immunsystems in der <i>H. pylori</i> infizierten Magenschleimhaut.....	83
3.3.3 Die regulatorische T-Zell Antwort in der <i>H. pylori</i> infizierten Magenschleimhaut.....	86
<b>3.4 Abhängigkeit der leukozytären Subpopulationen und der Zytokin-/Chemokin-Expression vom <i>H. pylori</i> Stammtyp</b> .....	88
3.4.1 Die innate Immunantwort in Abhängigkeit vom infizierenden <i>H. pylori</i> Stammtyp.....	89
3.4.2 Einfluss des <i>H. pylori</i> -Stammtyps auf die adaptive Immunantwort.....	91
3.4.2.1 Einfluss des <i>H. pylori</i> Stammtyps auf die T-Helfer Zell Antwort.....	92
3.4.2.2 Einfluss des <i>H. pylori</i> Stammtyps auf die zytotoxischen T-Zellen.....	93
3.4.2.3 Einfluss des <i>H. pylori</i> Stammtyps auf die B-Zell-Antwort.....	94
3.4.2.4 Die regulatorische T-Zell Antwort in Abhängigkeit vom <i>H. pylori</i> Stammtyp.....	95
<b>4. Diskussion</b> .....	96
4.1 Die unspezifische Immunantwort auf <i>H. pylori</i> .....	96
4.2 Die spezifische Immunantwort auf <i>H. pylori</i> .....	97

4.3	Regulatorische T-Zellen spielen eine Schlüsselrolle bei der chronischen Persistenz von <i>H. pylori</i> .....	100
4.4	Vergleich der humanen und murinen <i>H. pylori</i> induzierten Immunantwort....	102
4.5	Abhängigkeit der Immunantwort vom <i>H. pylori</i> Stammtyp.....	103
4.6	Modell der <i>H. pylori</i> induzierten Immunantwort.....	105
5.	<i>Zusammenfassung</i> .....	110
6.	<i>Literaturverzeichnis</i> .....	113
	<i>Danksagung</i> .....	130



## Abkürzungen

AB-Komplex	Peroxidase markierter Streptavidin-Komplex
A-B-Block	Avidin-Biotin-Blockierlösung
Abb.	Abbildung
a.d.	aqua destillata
AE-Puffer	Elution Puffer
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AMV	Affen-Myeloblastosis-Virus
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	activator protein 1
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATL-Puffer	Tissue Lysis Puffer
BabA	Blood Group Antigen-binding Adhesin A
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Base Pairs
BSA	Bovine Serum Albumin
<i>cagA</i>	Cytotoxin Associated Gene A
<i>cagPAI</i>	Cag Pathogenitätsinsel
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementar Deoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CTLA-4	Zytotoxische T-Lymphozyten-assoziertes Antigen 4
DAB	Diaminobenzidin
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
DC	Dendritische Zelle
cCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHSG	European Helicobacter Study Group

ELISA	Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay
ENA-78	Epithelial-cell-derived Neutrophil-Activating peptide-78
FCS	Fetal Calf Serum
FET	Floureszenz-Energie-Transfer
Fla	Flagellinprotein
G1-G3	Grade der granulozytären Infiltration
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GC-Gehalt	Guanosin-Cytidin-Gehalt
GITR	Glucocorticoid-Induzierter Tumor Necrosis Faktor Rezeptor
GRO- $\alpha$	Growth-related Oncogene alfa
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxilin Eosin
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>H. pylori</i> strain SS1	<i>H. pylori</i> Sydney Stamm
HRP	Horse-Radish-Peroxidase
IDA	Iron deficiency anemia
IFN	Interferon
IFN- $\alpha$	Interferon Alfa
IFN- $\gamma$	Interferon Gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
<i>IL-1B</i>	IL-1 $\beta$ kodierendes Gen
<i>IL-1RN</i>	IL-1RA kodierendes Gen
IL-12R $\beta$ 2	Interleukin-12 Rezeptor $\beta$ 2 Kette
IM	Intestinale Metaplasie
IPC	Interferon- $\alpha$ -produzierende Zelle
ITP	Thromozytopenie
KC	Keratinozyten Chemokin
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
l	Liter
L1-L3	Grade der lymphozytären Infiltration
Le <sup>b</sup>	Lewis B

LiCl	Lithiumchlorid
LSAB	Labelled Streptavidin-Biotin
M	Molar
m	Milli
μ	Mikro
MM	Master Mix
MDC	Myeloide Dendritische Zellen
MgCl	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP	Macrophage inflammatory Protein
MMLV	Moloney-Maus-Leukämie-Virus
N	Normal
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NK-Zelle	Natürliche Killer Zellen
NF-κB	Nuclear Factor κB
NKS	Normal Kaninchen Serum
O	Sauerstoff
OR	Odds Ratio
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDC	Plasmazytoide Dendritische Zellen
PRR	Pattern Recognition Receptor
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RPM	Revolutions Per Minute
RT	Reverse Transcription
SEM	Standard Error of the Mean
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SHP-2	Src-Homolgy-Protein 2
SPF	Specific Pathogen Free

STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
T4SS	Typ IV Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TCR	T-Zell-Rezeptor
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Th-Zelle	T-Helfer
ThP	naiven T-Helfer Zelle
TI-Antigen	Thymus-independent-Antigen
TLR	Toll-Like Rezeptor
Tr1 Zellen	T-regulatory 1 cells
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor Alpha
UreI	Urease I
VacA	Vacuolating Cytotoxin
<i>vacA</i>	Vacuolating Cytotoxin Gen
WC-Agar	Wilkins Chalgren Agar
WHO	World Health Organisation

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Entdeckung von *H. pylori* löste einen Paradigmenwechsel in der Medizin des Magens aus

### 1.1.1 Kolonisation des Magens durch das gramnegative Bakterium *Helicobacter pylori*

J. R. Warren und B. Marshall, zwei australische Wissenschaftler, veröffentlichten 1983 im *Lancet* die Ergebnisse ihrer klinischen Studie, in der sie die Entdeckung, Isolierung und Kultivierung eines S-förmigen *Campylobacter*-ähnlichen Bakteriums im humanen Magen beschrieben. Die Infektion des Magens mit diesem Organismus war mit histologischen Veränderungen in Form einer Magenschleimhautentzündung assoziiert (Warren JR und Marshall BJ, 1983).

Später konnten die Wissenschaftler die Bedeutung des Keimes für die Entstehung von Magen- und Duodenalulzera zeigen (Marshall und Warren, 1984). Die Entdeckung von Warren und Marshall hat die Gastroenterologie in entscheidender Weise beeinflusst. Das bisherige Dogma der ausschließlich säureinduzierten Ulkuserkrankung wurde in Frage gestellt. Anfangs stieß die neue Theorie der bakteriell ausgelösten Krankheitsentstehung auf Skepsis und Ablehnung. Nach und nach wurde der ätiologische Zusammenhang zwischen der *H. pylori*-Infektion und der Entstehung peptischer Magen- und Duodenalulcera sowie Neoplasien des Magens bewiesen und wird heute als selbstverständlich erachtet.

Warren und Marshall nannten das neu entdeckte Bakterium *Campylobacter pyloridis*, da es Ähnlichkeit mit der bisher bekannten Spezies *Campylobacter* besaß (Warren JR und Marshall BJ, 1983). *Campylobacter* gehört zusammen mit *Wolinella* und *Flexispira* zu einer neuen Gruppe innerhalb der gramnegativen Bakterien, der rRNA Superfamilie VI (Owen, 1998). Nach genetischen und ultrastrukturellen Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, daß sich der Keim in mehreren Eigenschaften von den bisher bekannten *Campylobacteridaceae* unterschied (Owen, 1998). Man schuf also eine neue Spezies namens *Helicobacter pylori* (Goodwin und Armstrong, 1990).

*Helicobacter pylori* ist ein s-förmiges, gramnegatives Bakterium. Es besitzt eine Länge von 2,5-5,0 µm und ist bis zu 1,0 µm breit, was es unter dem Lichtmikroskop sichtbar macht.

Der Keim besitzt typischerweise fünf bis sechs Geißeln, sogenannte Flagellen, an einem Pol. Diese Flagellen bestehen aus je zwei strukturellen Untereinheiten, den Flagellinproteinen FlaA (53 kDa) und FlaB (54 kDa) (Leying et al., 1992; Labigne und de, 1996). Die Geißeln ermöglichen es *H. pylori* sich aktiv fortzubewegen und so einerseits der natürlichen Peristaltik des Magens entgegenzuwirken, andererseits unter die vor Säureeinwirkung schützende Mukusschicht auf den Epithelzellen zu gelangen. *H. pylori*-Stämme, die keine Flagellen besitzen, sind nicht in der Lage, den Magen von Versuchstieren dauerhaft zu besiedeln (Eaton et al., 1996), so daß die Geißeln wesentlich zur Kolonisationsfähigkeit von *H. pylori* beitragen.

*H. pylori* kann sich am besten bei einem periplasmatischen pH-Wert von über 6,1 vermehren (Sachs et al., 2000). Unter Kulturbedingungen benötigt er für ein optimales Wachstum auf einem Blut enthaltenden Medium eine Atmosphäre mit 5 % Sauerstoff und 5-10 % Kohlendioxid und ist somit microaerophil (Owen, 1998). Trotz seiner Fähigkeit, unter die schützende Mukusschicht der Magenepithelzellen zu gelangen, braucht *H. pylori* noch einen aktiven Mechanismus, um im sauren Milieu persistieren zu können.

Diese Aufgabe übernimmt das Enzym Urease, welches Harnstoff zu Ammoniak und Kohlendioxid spaltet (Sachs et al., 2003). Der entstandene Ammoniak gelangt in die Umgebung des Keimes und in das bakterielle Periplasma, wo er die Magensäure abpuffern kann. Ein Großteil des Enzyms liegt im Zellinneren, ein kleinerer Teil ist aber auch auf der Bakterienoberfläche zu finden (Hawtin et al., 1990; Sachs et al., 2000). Sobald sich der Keim in einer sauren Umgebung befindet, wird der pH-abhängige Harnstoffkanal (UreI) protoniert und somit geöffnet, was die Membranpermeabilität für Harnstoff um das bis zu 300-fache steigert (Weeks et al., 2000). Harnstoff gelangt in das bakterielle Zytoplasma, wird dort von Urease zu Kohlendioxid und Ammoniak katalysiert, welcher das saure Milieu neutralisiert.

Im Jahre 1989, als man das neue Genus *Helicobacter* definierte, waren lediglich *Helicobacter pylori* und *Helicobacter mustelae* bekannt. Inzwischen umfasst das Genus *Helicobacter* mehr als 20 Spezies (Owen, 1998).

### **1.1.2 Epidemiologie**

Die Infektion mit *H. pylori* ist weltweit verbreitet. Dennoch ist die Prävalenz der Infektion in verschiedenen Ländern und auch unter der Bevölkerung desselben Landes variabel (Feldman

et al., 1998; Suerbaum und Achtman, 2004) und korreliert stark mit sozioökonomischen Faktoren, wie Dichte des Zusammenwohnens, hygienische Verhältnisse, Bildungsstand und möglicherweise auch der genetischen Prädisposition (Malaty und Graham, 1994; Malaty und Nyren, 2003). Die Durchseuchung von Erwachsenen mittleren Alters mit *H. pylori* in Industrienationen liegt bei 25 bis 50 %. In Entwicklungsländern steigen diese Prozentzahlen auf bis zu über 80 % an (Malaty und Nyren, 2003). Je älter die untersuchte Bevölkerungsschicht ist, desto höher liegt die Infektionsrate, was einen Kohorteneffekt darstellt und nicht eine erhöhte Infektionsrate im Alter (Malaty und Nyren, 2003). Die Infektion mit *H. pylori* erfolgt hauptsächlich im Kindesalter und vor allem innerhalb der Familie auf oral-oralem oder fäkal-oralem Weg. Am häufigsten ist die Übertragung von der Mutter auf das Kind, gefolgt von der Übertragung unter Geschwistern. Seltener ist die Übertragung vom Vater auf das Kind (Megraud, 1995). In den letzten Jahrzehnten ist die Rate der neu erworbenen Infektion in Industrieländern kontinuierlich gesunken. Im Augenblick liegt die Infektionsrate bei Kindern in der Westlichen Welt bei < 10%, in Entwicklungsländern hingegen bei 40-83% (Malaty und Nyren, 2003). Nach erfolgreicher Eradikation beträgt die Reinfektionsrate bei Erwachsenen unter 1% pro Jahr (Megraud, 1995).

### **1.1.3 Die klinische Relevanz von *H. pylori***

Die bakterielle Infektion mit *H. pylori* ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten des Menschen. Der Magen des Menschen stellt neben dem von Primaten (Dubois et al., 1994) das einzige natürliche Reservoir dar, an das sich der säure-resistente Keim perfekt angepasst hat. Im Gegensatz zu anderen gastrointestinalen Keimen heilt die Infektion nicht spontan aus, sondern persistiert ohne adäquate Therapie ein Leben lang. *H. pylori* verharrt nicht in einem abgekapselten Zustand, wie es für Keime (z.B. *Mycobacterium tuberculosis*), die den Menschen über lange Zeit besiedeln, typisch ist, sondern er bleibt aktiv, woraus verschiedene Erkrankungen resultieren können (Israel und Peek, 2001). Das breit gefächerte Krankheitsspektrum erstreckt sich von der möglichen Entstehung peptischer Ulzera bis hin zum distalen Magenkarzinom und Magenlymphomen. Diese klinischen Folgen sind aber sehr variabel. Sie hängen von bakteriellen und wirtsspezifischen Faktoren ab und auch von dem Ort, an dem sich die Entzündung vorwiegend abspielt (Dixon, 2001).

Eine akute Infektion mit uncharakteristischem dyspeptischem Bild wird meistens nicht klinisch erfasst. Erst wenn sich aufgrund der chronischen Infektion Folgeerkrankungen ergeben, wird die Infektion klinisch auffällig (Koop, 2002).

Bei der initialen Infektion mit *H. pylori* werden Teile des Magens kolonisiert, die einen höheren pH-Wert haben, denn ein sehr saures Milieu hemmt das bakterielle Wachstum. Die häufigste Form der *H. pylori*-induzierten Gastritis ist eine chronische Entzündung der Magenschleimhaut im Antrumbereich des Magens (Antrumgastritis) (Suerbaum und Michetti, 2002). Gastritiden, die auf das Antrum begrenzt sind, sind mit Duodenalulzera und gleichzeitig mit einer hohen Säuresekretion assoziiert (El-Omar et al., 1995). Der Gastritisgrad ist erkennbar am Ausmaß der Schleimhautinfiltration mit Lymphozyten und Plasmazellen, der Grad der Aktivität am Ausmaß der Infiltration mit neutrophilen Granulozyten (Dixon et al., 1996).

*H. pylori* ist für die Mehrheit der Duodenal- und Magenulzera verantwortlich. Ungefähr 90-95% der Duodenalulzera sowie 70-75% der Magenulzera entstehen auf dem Boden einer *H. pylori*-Infektion (Marshall et al., 1988). Das Lebenszeitrisiko einer mit *H. pylori*-infizierten Person, ein Ulkus pepticum zu entwickeln, rangiert im Bereich von 3 % in den USA, bis zu 25 % in Japan. Global gesehen entwickelt jeder zehnte mit *H. pylori*-infizierte Patient ein Ulkus pepticum (Schlemper et al., 1996; Feldman, 2001; Suerbaum und Michetti, 2002). Die Eradikation von *H. pylori* senkt die Wahrscheinlichkeit eines mit *H. pylori* assoziierten Ulkusrezidivs drastisch (Marshall et al., 1988).

Bei Patienten mit geringer Säuresekretion ist das Bakterium in der Lage den Korpus zu besiedeln, wo es zu einer aggressiveren Gastritis führt und damit die Karzinomentwicklung fördert. Gleichzeitig kommt es hierbei durch den progredienten Verlust von Parietalzellen zu einer weiteren Hemmung der Säurebildung und damit zum verminderten Risiko der Entstehung von Duodenalulzera (El-Omar, 2001).

Bei Patienten, die an einem Magenkarzinom erkrankt sind, kann in 90 % der Fälle eine aktuelle oder stattgehabte Infektion mit *H. pylori* nachgewiesen werden. Eine chronische Infektion mit *H. pylori* ist mit einem bis zu 30-fach erhöhten Risiko zur Entstehung eines Magenkarzinoms assoziiert (Brenner et al., 2004). Die eindeutige Assoziation der *H. pylori*-Infektion mit sowohl dem intestinalen, als auch dem diffusen Typ des Magenkarzinoms (Forman et al., 1991; Uemura et al., 2001; Peek, Jr. und Blaser, 2002) veranlasste letztlich auch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Jahr 1994, *H. pylori* als ein Karzinogen der Klasse I, ein sogenanntes "sicheres Karzinogen" zu definieren (Ernst und Gold, 2000). Eine chronische Gastritis in der Corpusregion des Magen ist mit der Entwicklung eines



Magenkarzinoms vom intestinalen Typ assoziiert (El-Omar, 2001). Fast immer gehen diesem Karzinomtyp histologische Veränderungen wie Atrophie, intestinaler Metaplasie und Dysplasie voraus (Correa und Chen, 1994). Die kanzerogene Wirkung von *H. pylori* konnte auch im Tiermodell nachhaltig bestätigt werden, da eine chronische *H. pylori*-Infektion mongolischer Wüstenrennmäuse mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung eines Magenkarzinoms assoziiert war (Watanabe et al., 1998). Die Eradikation von *H. pylori* resultiert in einer Abnahme des Karzinomrisikos und wirkt protektiv gegen das Wiederauftreten resezierter Frühkarzinome (Uemura und Okamoto, 2000; Uemura et al., 2001).

Die Inzidenz des Magenkarzinoms in entwickelten Ländern ist in den letzten Jahrzehnten mit der abnehmenden Prävalenz der *H. pylori*-Infektion immer weiter gesunken. Dagegen ist in Ländern mit hoher Infektionsrate wie Asien und Lateinamerika die Wahrscheinlichkeit an einem Magenkarzinom zu erkranken immer noch sehr hoch (Ernst und Gold, 2000).

Ein anderes Folgeleiden der *H. pylori*-Infektion ist das MALT-Lymphom. 72-80 % der Patienten mit MALT-Lymphom sind mit *H. pylori* infiziert (Wotherspoon et al., 1991; Parsonnet et al., 1994; Wotherspoon, 1998; Zucca et al., 1998; Zucca et al., 2000). Das MALT-Lymphom ist eine lymphoproliferative Erkrankung, bei der *H. pylori* als Antigen die monoklonale Proliferation der B-Lymphozyten stimuliert. Die Eradikation von *H. pylori* bewirkt eine Regression der MALT-Lymphome in 70-80 % der Fälle (Bayerdorffer et al., 1995).

#### **1.1.4 Die Therapie der *H. pylori*-Infektion**

Das Ziel der *H. pylori* Behandlung ist die vollständige Eliminierung des Keimes. Ist dies einmal erreicht, sind die Reinfektionsraten sehr klein und der Behandlungsnutzen dauerhaft (Megraud, 1995). Da das saure Milieu im Magenlumen die Wirksamkeit vieler antimikrobieller Substanzen beeinträchtigt, werden sie mit Protonenpumpenhemmern kombiniert. Die empfohlene „first-line“ Therapie ist die Tripeltherapie, eine Kombinationsbehandlung mit einem PPI, Amoxicillin und Clarithromycin über sieben Tage, alternativ zu Clarithromycin kann Metronidazol angewendet werden. Bei Therapieversagen kommt als „second-line Therapie“ eine Quadrupeltherapie aus PPI, Bismuthsalizylat, Metronidazol und Tetrazyklin über 14 Tage zum Einsatz. Nach Therapieversagen sollte, wenn möglich, eine Antibiotika-Resistenztestung erfolgen. Therapiert werden sollten Patienten mit peptischem Ulkus (akut und anamnestisch) oder Magenfrühkarzinom (Z. n. Resektion),

Verwandte ersten Grades von Magenkarzinom-Patienten, Patienten mit MALT-Lymphom, bei Verdacht auf Riesenfaltengastritis und Patienten mit langfristiger PPI-Therapie und Corpusatrophie. Im letzten Jahr wurde von der European Helicobacter pylori Study Group (EHSYG) die Eradikation bei unklarer Eisenmangel-Anämie (IDA) und idiopathischer Thrombozytopenie (ITP) empfohlen. Diese neuen Indikationen zur Eradikation wurden aufgrund der zunehmenden Evidenz eines Zusammenhangs der IDA und ITP mit *H. pylori* gestellt.

Den Eradikationserfolg überprüft man sechs bis acht Wochen nach der Behandlung (z.B. mittels Urease-Schnelltest im Rahmen einer Gastroskopie oder nicht-invasive Methoden, wie z. B. Urease-Atemtest) (Maastricht-3-Consensus-Report-2005; <http://www.helicobacter.org>).

## **1.2 Zentrale Rolle der durch *H. pylori* induzierten Inflammation bei der Karzinogenese**

Die Infektion mit *H. pylori* zeigt nicht bei jedem Menschen den gleichen Krankheitsverlauf. Eine Infektion verursacht zu Beginn eine akute Entzündungsreaktion und eine messbare Immunantwort. Es gibt große individuelle Unterschiede in dem Ausmaß der Entzündung bei den mit *H. pylori*-infizierten Patienten, und nur ein kleiner Teil der Patienten entwickelt klinisch fassbare Folgeleiden (Dooley et al., 1989; Israel und Peek, 2001). Die akute Entzündungsreaktion wird zu einer chronischen, da der Keim nicht von der angelaufenen Immunantwort eliminiert wird (Del und Michetti, 2004) und so die Magenschleimhaut dauerhaft kolonisiert. Die durch *H. pylori* induzierte Entzündung und die daraufhin eingeleitete Immunantwort spielt für die Entstehung gastraler Pathologien und wahrscheinlich für die Karzinogenese eine entscheidende Rolle (Fox et al., 2000). Im murinen Modell konnte gezeigt werden, daß die T-Zell-vermittelte Immunantwort der essentielle Mediator der *H. pylori*-assoziierten pathologischen Veränderungen im Magen ist (Eaton et al., 1999; Roth et al., 1999). T-Zell defiziente Mäuse entwickeln im Gegensatz zu Wildtyp C57Bl/6 Mäusen keine gastrale Entzündung und auch keine präkanzerösen Läsionen infolge einer Infektion mit *Helicobacter felis* (Roth et al., 1999). IFN- $\gamma$ -knock-out-Mäuse können keine angemessene Th1-Antwort nach *H. pylori*-Infektion generieren. Dies resultiert in einer schwächeren Entzündung der Magenschleimhaut, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Mohammadi et al.,

1996; Sawai et al., 1999; Smythies et al., 2000). Passend zu diesen Ergebnissen ergaben weitere Untersuchungen, daß die Hemmung der Th1-Antwort vor der Entwicklung von Atrophie, intestinaler Metaplasie und invasivem Magenkarzinom schützt. So konnte z.B. in einem murinen Infektionsmodell gezeigt werden, daß die durch *Helicobacter felis* induzierte gastrale Th1-Antwort durch gleichzeitige Darminfektion mit dem Parasit *Heligmosomoides polygyrus* herunterreguliert und mehr in Richtung Th2-Antwort gepolt wurde. Als Folge konnten eine reduzierte Entzündungsreaktion und ein vermindertes Vorkommen präkanzeröser Läsionen, wie Atrophie und intestinale Metaplasie beobachtet werden (Fox et al., 2000). Ebenso resultierte eine Mutation im p53 Tumor-Suppressorgens in einer Abschwächung der Th-1-Antwort, was einen protektiven Effekt gegen die Entwicklung von präkanzerösen Läsionen hatte (Fox et al., 2002). All diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die durch *H. pylori* hervorgerufene Inflammation eine bedeutende Rolle für Entstehung von gastraler Pathologie und für die Karzinogenese spielt.

### **1.3 Inflammation und Immunantwort als Reaktion auf die Infektion mit *H. pylori***

#### **1.3.1 Allgemeine Mechanismen der innaten und spezifischen Immunität**

Der menschliche Organismus ist ständig mit zahllosen Erregern, Noxen und anderen körperfremden Stoffen konfrontiert, die er zur Wahrung seiner Individualität wirksam bekämpfen muss. Zu diesem Zweck stehen ihm spezifische und unspezifische Abwehrmechanismen, bzw. die angeborene und erworbene Immunität zur Verfügung. Innerhalb des Immunsystems unterscheidet man ein humorales von einem zellulären Abwehrsystem und eine "unspezifische" (angeborene) Komponente von einer "spezifischen" (adaptiven). Zum humoralen Immunsystem gehören Mediatoren wie Zytokine und das Komplementsystem sowie spezifische Antikörper, die von aktivierten Plasmazellen nach Antigenkontakt und klonaler Expansion produziert wurden. Bestandteile der zellulären Immunität sind Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen sowie die antigenspezifischen T-Zellen der adaptiven Immunantwort (Janeway, 2005; Basset et al., 2003).

### **1.3.1.1 Allgemeine Grundlagen der angeborenen (innaten) Immunantwort**

Die innate Immunantwort ist charakterisiert durch die angeborene Spezifität für "Nicht-Selbst". Sie kann ohne Induktionsphase als "erste Verteidigungslinie" eine beginnende Infektion sofort bekämpfen und schützt den Körper als erste Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene.

Unter der ungeheuer großen Zahl der Pathogene werden aber nur solche wirksam bekämpft, die bestimmte molekulare Muster (PAMP = *Pathogen-associated molecular pattern*) besitzen und von bestimmten Rezeptoren (PRR = *Pattern recognition receptors*) erkannt werden. Manche Bakterien können diesem "Erkennungsdienst" entkommen, indem sie ihre Oberfläche und damit auch die PAMPs mit einer schützenden Kapsel umgeben oder die PAMPs verändern. Die angeborene Immunantwort ist nicht in der Lage Zellen hervorzubringen, die eine Reinfektion erkennen können. Dennoch spielt das innate Immunsystem eine wichtige Rolle bei der richtungsweisenden Initiierung der nachfolgenden adaptiven Immunantwort. Die innate Immunantwort ist in der Initialphase einer Infektion von großer Bedeutung weil die adaptive Immunität erst frühestens nach 5-7 Tagen ihre vollständige Effektivität erlangt (Janeway, 2005; Basset et al., 2003).

#### ***Pattern Recognition Rezeptoren als Erkennungsmechanismen der angeborenen Immunität***

Als "Erkennungsrezeptoren" des angeborenen Immunsystems dienen die *Pattern Recognition Rezeptoren* (PRR) (Basset et al., 2003). PRRs werden insbesondere von Antigen-Präsentierenden Zellen, wie Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen und B-Zellen, exprimiert. Diese erkennen mikrobielle Moleküle, auch Pathogen-assoziierte Muster (PAMP = *Pathogen-associated molecular pattern*) genannt, als Gefahrensignal einer beginnenden mikrobiellen Infektion. Als Konsequenz wird eine adaptive Immunantwort gegen den vorliegenden Pathogentyp initiiert. Verschiedene PRRs konnten auf unterschiedlichen Zellen des angeborenen Immunsystems gefunden werden, darunter Scavenger-Rezeptoren, Mannose-Rezeptoren und Complement-Rezeptoren auf Makrophagen (Peiser et al., 2002; Basset et al., 2003) sowie Formyl-Peptid-Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten (Le et al., 2002; Basset et al., 2003). Zu den wichtigsten PRRs gehören jedoch die Toll-like Rezeptoren (TLR).

Auf der Suche nach Erkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems im Menschen identifizierte die Arbeitsgruppe von Charles Janeway ein Protein, welches strukturelle Homologien zu einem Rezeptor der Drosophila-Fliege, den Drosophila Toll, aufwies (Medzhitov et al., 1997). Drosophila-Fliegen besitzen ausschließlich ein innates Immunsystem und im Bezug auf den Drosophila Toll konnte gezeigt werden, daß er ein evolutionär hoch-konserviertes Typ-I-Transmembran-Protein (Hashimoto et al., 1988) ist und eine essentielle Rolle in der Immunabwehr der Fruchtfliege spielt (Lemaitre et al., 1996). Desweiteren kontrolliert er die dorsoventrale Ausrichtung in der Embryonalentwicklung der Drosophila-Fliege (Hashimoto et al., 1988; Belvin und Anderson, 1996; Anderson, 2000). Aufgrund der Strukturhomologie wurde der neu entdeckte Rezeptor im humanen Immunsystem Toll-like-Rezeptor 4 (TLR 4) genannt (Medzhitov et al., 1997). TLR 4 wird unter anderem von Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert und erkennt bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) aus der Zellwand gram-negativer Bakterien. In den vergangenen Jahren wurden weitere TLR und ihre Liganden identifiziert, so daß die Familie der transmembranären TLR bis dato elf Mitglieder umfasst (Medzhitov, 2001). Neben LPS werden durch TLRs Lipoproteine, Flagellin und Peptidoglykane von Bakterien, Zymosan von Hefepilzen, bakterielle CpG-DNA und Doppelstrang-RNA von Viren erkannt (Medzhitov, 2001; Takeda und Akira, 2001). An Erkennungsmechanismen, Signalweiterleitung und Funktionen der einzelnen TLR wird derzeit intensiv geforscht. Es ist anzunehmen, daß in den kommenden Jahren weitere Erkenntnisse über die Funktion der TLR gewonnen sowie neue TLR-Mitglieder und TLR-Liganden identifiziert werden.

### **Epithelzellen: erste Verteidigungslinie**

Neben der Haut verhindern die Epithelien der Schleimhautoberflächen von Respirations-, Verdauungs- und Urogenitaltrakt das direkte Eindringen von Pathogenen in den Körper und dienen dadurch als einfache physikalische Barriere. Diese Oberflächen besitzen aber zusätzlich noch andere Verteidigungsmechanismen, die von Trakt zu Trakt wegen der unterschiedlichen Keimexposition verschieden sind. Im Respirationstrakt übernimmt die Bewegung der Zilien auf den Epithelzellen eine Art säubernde Aufgabe, die eingedrungenen Mikroorganismen zu beseitigen. Im Gastrointestinaltrakt schützt eine Schleimschicht die epithelialen Oberflächen. Der Mucus hält das Epithel feucht und schließt Mikroben ein, was sie daran hindert in Kontakt mit dem darunter liegenden Epithel zu treten. Schafft es ein Pathogen dennoch die Mucus-Barriere zu überwinden, können Epithelzellen potentielle Eindringlinge durch Erkennungsmechanismen an der apikalen und basolateralen Oberfläche

erkennen und verschiedene Mediatoren ausschütten. Diese Chemokine und Zytokine, wie IL-8, vermitteln das Homing und die Aktivierung von anderen Zellen des angeborenen Immunsystems, im Besonderen phagozytierenden Zellen (Hedges et al., 1995; Pitman und Blumberg, 2000). Desweiteren sezernieren Epithelzellen Peptide und Enzyme, wie Defensine, Lysozym oder Lactoferrin die Bakterien vernichten können (Gallo et al., 2002).

### **Phagozytierende Zellen: neutrophile Granulozyten und Makrophagen**

Phagozytierende Zellen sind wichtige Effektorzellen des innate Immunsystems, da sie zum einen eindringende Pathogene eliminieren und zum anderen die Entstehung der adaptiven Immunantwort zum Beispiel durch Ausschüttung von Mediatoren oder Antigenpräsentation fördern. Makrophagen reifen kontinuierlich aus Monozyten heran, die die Blutbahn verlassen haben, um in das umliegende Gewebe zu wandern (Janeway, 2005). Makrophagen sind mit einem Durchmesser von etwa 20 µm ausgesprochen voluminös. Sie tragen tentakelförmige Pseudopodien und hackenförmige Zytoplasmaausstülpungen (Gordon und Taylor, 2005). "Ortsansässige", residierende Makrophagen treten als erstes in Aktion. Nachfolgend kommt es, wenn nötig zu einer Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus dem Blut (Zhang et al., 2000). Die reichlich im Blut vorhandenen neutrophilen Granulozyten sind kurzlebige Zellen und normalerweise in gesundem Gewebe nicht anzutreffen. Erst durch chemotaktische Reize angelockt, wandern sie in das Gewebe ein und beteiligen sich mit ihren phagozytotischen Eigenschaften an der Keimbeseitigung (Janeway, 2005). Residierende Makrophagen und Neutrophile besitzen mehrere PRRs, die es ihnen ermöglichen, eine beginnende mikrobielle Invasion sofort zu erkennen (Burg und Pillinger, 2001; Basset et al., 2003). Die mikrobiellen Eindringlinge werden nach ihrer Entdeckung in ein Phagosom internalisiert, welches über Verschmelzung mit einem Endosom schließlich zu einem Phagolysosom wird (Burg und Pillinger, 2001). In dem Phagolysosom werden die Mikroben mit Hilfe von oxidativen und nicht-oxidativen Mechanismen eliminiert.

### **Dendritische Zellen**

Von den unter den Begriff der Antigen-Präsentierenden Zellen (APC) zusammengefassten Zelltypen (Monozyten, B-Zellen oder dendritische Zellen) stellen dendritische Zellen (DC) bei weitem die bedeutsamste Gruppe dar. DCs entwickeln sich aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und haben eine sternförmige Zellstruktur. Erstmals wurden DCs von Ralph Steinman im Jahr 1973 beschrieben (Steinman und Cohn, 1973). Im Mittelpunkt des immunologischen Interesses stehen DCs, seitdem man weiß, daß sie als einzige Zellen in der

Lage sind, Antigene aus der Peripherie aufzunehmen und diese in sekundäre Lymphorgane zu transportieren, wo sie naive T-Zellen Antigen-spezifisch aktivieren. Die DC sind somit Bindeglieder zwischen unspezifischer und spezifischer Immunität (Kapsenberg, 2003).

Unreife dendritische Zellen befinden sich vor allem im peripheren Gewebe auf der Suche nach möglichen Pathogenen und Infektionsherden. Sie sind spezialisiert auf Antigen-(Ag-) Aufnahme und Prozessierung. Entsprechend ihrer Funktion weisen unreife dendritische Zellen eine starke Expression von Endozytose-Rezeptoren und hohe Phagozytoseaktivität auf, exprimieren aber nur in geringem Maß Ag-präsentierende und kostimulatorische Moleküle. Nach Ag-Aufnahme wandern die DCs in umliegende Lymphknoten, verlieren gleichzeitig ihre Phagozytosefähigkeit und verändern ihren Phänotyp. Sie zeigen nun eine starke Expression an MHC-I- und MHC-II-Molekülen, die sie zur Präsentation der aufgenommenen Fremdpeptide befähigen. Außerdem exprimieren sie kostimulatorische B7-Moleküle (CD80, CD86), über die sie in direkten Zellkontakt mit T-Zellen treten können. Die Wanderung der DC aus dem peripheren Gewebe in die Lymphknoten, sowie ihre funktionelle Differenzierung (sogenannte Reifung) werden durch Gefahrensignale initiiert. Gefahren- bzw. Reifungssignale sind beispielsweise inflammatorische Zytokine (z.B. von Makrophagen ausgeschüttetes IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ ), der direkte Zellkontakt zwischen DC und T-Zelle (z.B. CD40/CD40L-, B7/CD28-Interaktion) oder die PRR-vermittelte Erkennung eines eindringenden Pathogens (z.B. LPS, bakterielle DNA, dsRNA). Erfahren unreife DCs nach Ag-Aufnahme und -Prozessierung keine Ausreifung, kommt es zu einer Toleranzinduktion durch diese DCs. Reife DCs sind dagegen auf die Ag-Präsentation und Ag-spezifische Aktivierung naiver T-Zellen spezialisiert, sogenanntes *Priming*. In den Lymphknoten treffen die reifen DC auf naive T-Lymphozyten und präsentieren diesen Antigene (Signal 1). Zusätzlich vermitteln DC durch ihre Bindung von B7-Molekülen an CD28-Moleküle bzw. die Bindung von CD40-Molekülen an CD40L auf den T-Zellen ein zweites, kostimulatorisches Signal (Signal 2), das die antigenspezifische klonale Expansion der T-Zellen initiiert (Janeway, 2005). Dementsprechend kontrollieren die dendritischen Zellen die Entstehung einer spezifischen T-Zell-Immunität und sind somit das entscheidende Bindeglied zwischen angeborenem (unspezifischen) und erworbenen (spezifischen) Immunsystem (Steinman, 1991; Banchereau et al., 2000)

Basierend auf verschiedenen Merkmalen, wie Abstammung, Oberflächenmarker, Vorkommen und teilweise ihrer Funktion, unterscheidet man im humanen System drei verschiedene DC-Subpopulationen: 1) Langerhans-Zellen; 2) Interstitielle DC oder Myeloide DC (MDC); 3) Plasmazytoide DC (PDC). Wahrscheinlich stammen alle DC-Subpopulationen ursprünglich

von CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen des Knochmarks ab, die sich im weiteren Verlauf zu CD34<sup>+</sup> myeloiden und CD34<sup>+</sup> lymphoiden Vorläuferzellen differenzieren. Die CD34<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> myeloiden Vorläuferzellen reifen zu interstitiellen oder myeloiden DC bzw. den Langerhans-Zellen der Haut heran, während die CD34<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup> lymphoiden Vorläuferzellen zu plasmazytoiden DC differenzieren (Banchereau et al., 2000; Liu, 2001; Shortman und Liu, 2002).

Myeloide dendritische Zellen (MDC) verfügen über mehrere Rezeptoren, mit denen sie Ag aufnehmen können, i.e. Mannose-Rezeptoren, DC-SIGN und Fc-Rezeptoren (Colonna et al., 2002). Nach Wechselwirkung mit aktivierten T-Zellen initiieren MDC die klonale Expansion spezifischer T-Zellen und produzieren beispielsweise IL-12, wodurch eine Differenzierung naiver T-Zellen in Richtung Th1 Antwort gefördert wird. Die MDC unterscheiden sich von plasmazytoiden DC (PDC) im Wesentlichen in ihrer TLR-Expression, z.B. exprimieren MDC kein TLR9, wodurch MDC andere mikrobielle Bestandteile erkennen als PDC (Krug et al., 2001).

PDC sind identisch mit der seit längerem bekannten, jedoch ungenau charakterisierten Interferon- $\alpha$ - (IFN $\alpha$ -) produzierende Zelle (IPC), die als Hauptproduzent von IFN- $\alpha$  in der frühen Phase einer viralen Infektion beschrieben wurde (Fitzgerald-Bocarsly, 1993; Cella et al., 1999; Siegal et al., 1999). Neben Typ-I-Interferonen wie IFN- $\alpha$  oder IFN- $\beta$ , können PDC eine Reihe anderer inflammatorischer Zytokine und Chemokine produzieren, z.B. IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 oder Interferon-inducible protein 10 (IP-10) (Bauer et al., 2001). Nach Erkennung bestimmter mikrobieller Stimuli kann man eine Ausreifung zur PDC beobachten, die durch morphologische Veränderungen, wie Entwicklung von Ausläufern (Dendriten) oder erhöhte Expression von MHC-Molekülen (Hartmann et al., 1999) gekennzeichnet ist. PDC besitzen neben der typischen dendritischen Morphologie potente T-Zell-stimulatorische Fähigkeiten (Grouard et al., 1997; Cella et al., 2000).

### **Natürliche Killer (NK) Zellen:**

Natürliche Killerzellen entwickeln sich im Knochenmark aus lymphatischen Vorläuferzellen und zirkulieren im Blut. Sie sind größer als T- und B-Lymphozyten, haben unterschiedliche zytoplasmatische Granulas und die Fähigkeit, bestimmte lymphoide Tumorzell-Linien *in vitro* ohne vorherige Aktivierung zu zerstören. Der Zerstörungsmechanismus der NK-Zellen gleicht dem der zytotoxischen T-Zellen in der adaptiven Immunantwort. Nach der Bindung von NK-Zellen an ihre Zielzellen kommt es zur Degranulation von zytotoxischen Granula. Die darin enthaltenen Effektorproteine wie Perforine und Granzyme penetrieren in die Zielzelle und



induzieren in dieser den programmierten Zelltod (Apoptose) (Janeway, 2005 ; Middleton et al., 2002). NK-Zellen werden durch ihre Bindung an dendritische Zellen, durch Interferone oder Zytokine wie IL-12, das aus Makrophagen oder dendritischen Zellen stammt aktiviert (Raulet, 2004). Ebenso können aktivierte NK-Zellen selbst immunmodulatorische Mediatoren wie Interferon-(IFN-)  $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sezernieren (Basset et al., 2003). Durch die Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  nehmen die NK-Zellen auch eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der adaptiven Immunantwort ein. TNF- $\alpha$  kann unreife dendritische Zellen aktivieren und deren Ausreifung induzieren. Die aktivierten DCs wandern daraufhin in die umliegenden Lymphknoten, um dort mit T-Lymphozyten zu interagieren (Moretta, 2002). Zwischen NK-Zellen und DC findet eine wechselseitige Aktivierung statt. DCs agieren in der Anfangsphase der NK-Zell-Aktivierung und aktivierte NK-Zellen können die Ausreifung und Zytokinproduktion von DCs vermitteln (Moretta, 2002). IFN- $\gamma$  ist ein entscheidender Mediator der Differenzierung von naiven T-Helfer-Zellen zu Th1 Zellen und somit ebenfalls Initiator der nachfolgenden adaptiven Immunantwort (Moser und Murphy, 2000). Im Unterschied zu den zytotoxischen T-Zellen, erkennen die NK-Zellen keine spezifischen Antigene, da ihr Rezeptor unspezifisch ist. Sie haben aber die Fähigkeit, schnell auf eindringende Pathogene zu reagieren, was sie somit zu einem wichtigen Teil der angeborenen Immunantwort macht (Basset et al., 2003).

### **Mastzellen**

Mastzellen entstehen aus einer myeloiden Vorläuferzelle im Knochenmark (Metcalf et al., 1997). In geringer Frequenz zirkulieren sie im Blut, sind aber hauptsächlich im Oberflächenbereich der Haut, des Respirations- und des Verdauungstraktes angesiedelt (Wedemeyer et al., 2000). Dort agieren sie sozusagen als "Frontkämpfer" gegen Pathogene, die versuchen, über die Epithelbarriere in den Körper zu gelangen. In ihrem Zellinneren befinden sich mehrere Granulas, die Enzyme (Tryptase, Chymase, Cathepsin G, Carboxypeptidase) und toxische Mediatoren (Histamin, Heparin) enthalten (Wedemeyer et al., 2000). Mastzellen leben ein bis sechs Monate und exprimieren auf ihrer Oberfläche verschiedene PRRs, wie TLR1, TLR2 oder TLR6, aber auch Rezeptoren für Immunglobuline, z. B. den IgE-bindenden Fc $\epsilon$ RI-Rezeptor (Marone et al., 2005). Binden die entsprechenden Liganden an diesen Rezeptoren, werden die Mastzellen aktiviert, und die gespeicherten Mediatoren und Enzyme werden freigesetzt. Ebenso synthetisieren und sezernieren die Mastzellen nach ihrer Aktivierung Chemokine, wie TNF- $\alpha$ , und Zytokine, wie IL-4, IL-6,

IL-13 und IFN- $\gamma$  (Marone et al., 2001; Basset et al., 2003). Der Hauptmediator der Mastzellen, das Histamin, stimuliert die Freisetzung von TNF- $\alpha$  aus Makrophagen und erhöht, zusammen mit anderen proinflammatorischen Substanzen, die Gefäßpermeabilität, wodurch es zu einer akuten Entzündungsreaktion beiträgt (Basset et al., 2003; Marone et al., 2005).

### **1.3.1.2 Allgemeine Grundlagen der erworbenen (adaptiven) Immunantwort**

Das innate Immunsystem bzw. die Aktivierung von dendritischen Zellen ist ein bedeutender Schritt bei der richtungsweisenden Initiierung der nachfolgenden adaptiven Immunantwort. Die adaptive Immunantwort erlangt ihre vollständige Effektivität nach 5-7 Tagen und kann durch eine zellvermittelte und humorale Komponente Pathogene wirksam bekämpfen und eliminieren.

#### **T-Lymphozyten**

Circa 80 % der Lymphozyten im peripheren Blut sind T (Thymus)-Lymphozyten, die zwar von einer Progenitorzelle des Knochenmarks abstammen, aber für ihre vollständige Entwicklung einen Reifungsprozess im Thymus durchlaufen. Mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors erkennen T-Zellen spezifisch auf MHC-II Molekülen präsentierte Antigene. Der aus zwei Ketten zusammengesetzte T-Zell-Rezeptor (TCR) ist das charakteristische Merkmal der T-Zellen. Die Vielfalt des antigen-spezifischen TCR-Repertoires im Immunsystem wird dadurch erzeugt, daß die Gene für die TCR-Ketten in jedem T-Lymphozyten einem somatischen Rekombinationsprozess unterworfen sind.

Der im Laufe der T-Lymphozyten-Differenzierung stattfindende Rekombinationsvorgang zur Generierung eines TCR führt zur Zusammensetzung von jeweils mehreren möglichen, entlang eines großen Genlocus verstreut liegenden V-(*variable*), D-(*diversity*), J-(*joining*) und C-(*constant*) Gensegmenten zu einem einzelnen, transkribierten Gen. T-Zellen enthalten vier solcher Genloci, die potentiell rearrangieren können und die wie ihre Genprodukte  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  benannt sind. Nach dem Reifungsprozess im Thymus tragen 95 % der T-Zellen einen aus einer  $\alpha$ -und  $\beta$ -Kette zusammengesetzten TCR, wodurch sie auch ihren Namen erhalten, nämlich  $\alpha/\beta$ -T-Zellen. Die restlichen, etwa 5 % der T-Zellen exprimieren einen aus einer  $\gamma$ -und  $\delta$ -Kette bestehenden TCR. Mit ihrem durch das Genarrangement jeweils einzigartigen TCR können  $\alpha/\beta$ -T-Zellen Antigene spezifisch erkennen. Daß die reifen  $\alpha/\beta$ -T-Zellen nur

Fremdpeptide und nicht körpereigene Peptide als "fremd" erkennen, ist die Folge eines Selektionsprozesses im Thymus, der nur  $\alpha/\beta$ -T-Zellen mit TCR zulässt, die mit geringer Affinität an die eigenen MHC-Moleküle binden (positive Selektion/MHC-Restriktion). Rezeptoren, die spezifisch für MHC/Selbst-Peptid-Komplexe sind, werden ausgeschlossen (negative Selektion). Die diesen Selektionsprozess überstehenden Zellen sind spezifisch für Fremdpeptide, die durch eigene MHC-Moleküle präsentiert werden (Janeway, 2005).

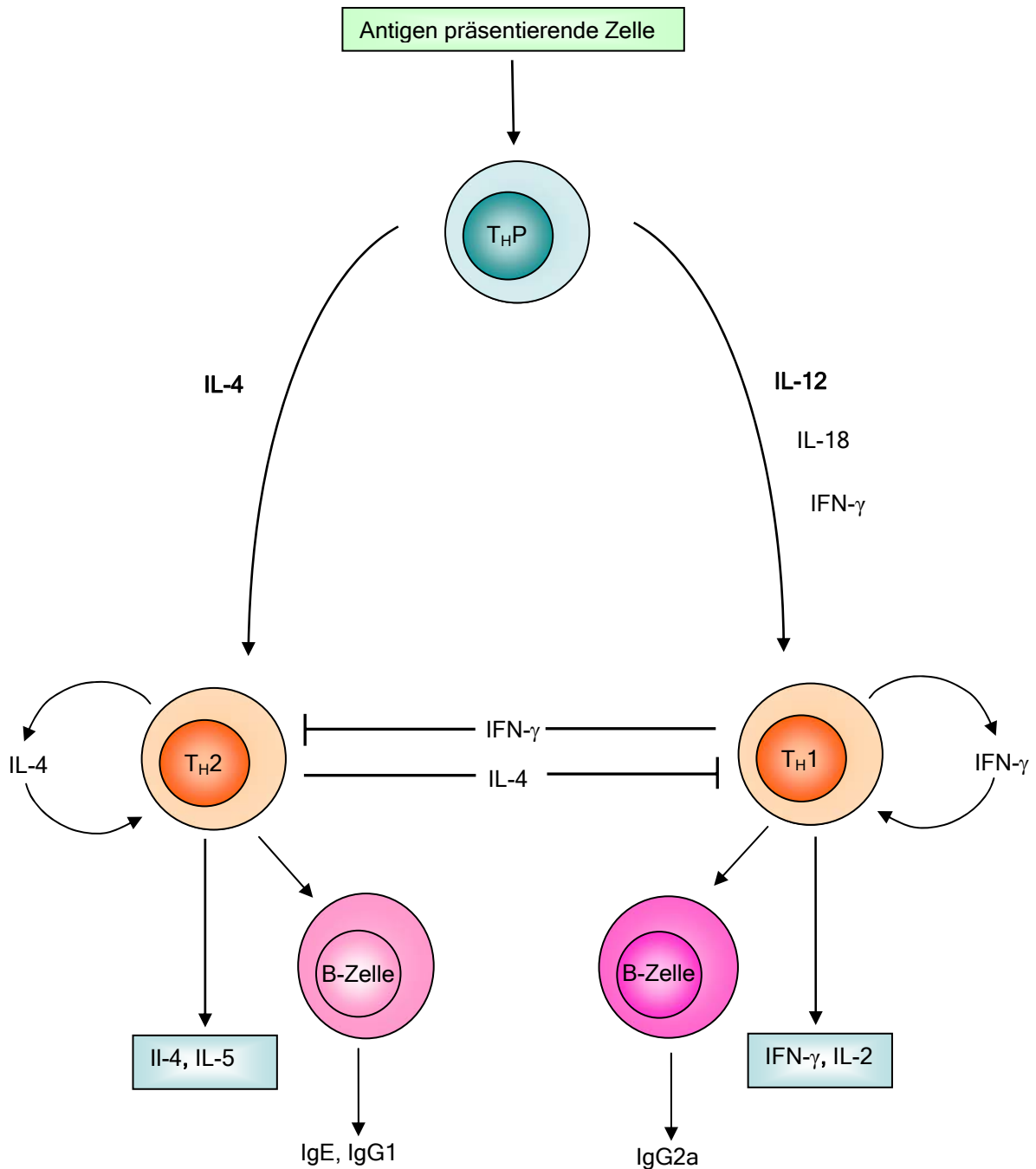
Im Lymphknoten treffen professionelle Antigen-Präsentierende Zellen, wie z. B. DCs, auf noch naive T-Zellen, die mit ihrem (für das präsentierte Antigen spezifischen) TCR an die DCs binden. Für eine vollständige Aktivierung benötigen naive T-Zellen neben der Erkennung eines spezifischen Antigens über ihren TCR (=Signal 1) gleichzeitig ein zweites, kostimulatorisches Signal (=Signal 2), vermittelt durch kostimulatorische Moleküle (z.B. B7, CD40) auf professionellen Antigen-Präsentierenden Zellen, die an bestimmte Oberflächenmoleküle auf T-Zellen (z.B. CD28, CD40L) binden. Nach diesem als *Priming* bezeichneten Vorgang der ersten Aktivierung naiver T-Zellen proliferiert die ursprüngliche einzelne T-Zelle (klonale Expansion) und differenziert zu Antigen-spezifischen Effektorzellen (Janeway, 2005).

Diese Effektorzellen kann man anhand oberflächlich exprimierter Korezeptoren in verschiedene Subpopulationen, zytotoxische T-Zellen, T-Helfer Zellen und T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften, einteilen.

Zellen, die den CD8-Korezeptor exprimieren ( $CD8^+$  T-Zellen) erkennen Fremdpeptide, die über MHC-I-Moleküle präsentiert werden und differenzieren zu **zytotoxischen T-Zellen**. Viren und einige intrazelluläre Bakterien, die körpereigene Zellen infizieren und sich anschließend im Zytosol replizieren, werden mit Hilfe von diesen  $CD8^+$  zytotoxischen T-Zellen beseitigt.

$CD4^+$  T-Zellen erkennen Fremdpeptide, die mittels MHC-II-Moleküle präsentiert werden.  $CD4^+$  T-Zellen werden als **T-Helfer Zellen** bezeichnet. Die  $CD4^+$  naive T-Helfer Zelle (ThP) proliferiert und entwickelt sich in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren, wie ausgeschüttete Zytokine, die Art der APC oder die Art der Kostimulation, in zwei verschiedene Effektorzellen, in Th1- und Th2-Zellen (Constant und Bottomly, 1997; O'Garra, 1998; Lane, 2000; Liu et al., 2001; Salomon und Bluestone, 2001; Sperling und Bluestone, 2001). Am wichtigsten für die Initiierung der naiven ThP-Zell-Differenzierung scheinen jedoch ausgeschüttete Zytokine zu sein. Die Zytokine IL-12 bzw. IL-4 bestimmen über die Transkriptionsfaktoren STAT4 bzw. STAT6 die Ausdifferenzierung der ThP-Zelle zu einer Th1-Zelle bzw. Th2-Zelle (Murphy und Reiner, 2002). IL-12-, IL-12-Rezeptor- oder STAT4-

defiziente Mäuse entwickeln keine robuste Th1-Antwort, während IL-4-, IL-4-Rezeptor- oder STAT6-defiziente Tiere keine Th2-Zellen bilden können (Magrath et al., 1996; Piccotti et al., 1998; Gessner und Rollinghoff, 2000; Wurster et al., 2000; Zhang et al., 2001). Unter dem Einfluss von IL-12 entwickelt sich die ThP-Zelle zu einer IFN- $\gamma$ -sezernierenden Th1-Zelle. IL-4 bewirkt die Ausdifferenzierung zu einer Th2-Zelle, welche wiederum selbst IL-4 produziert. IL-4 und IFN- $\gamma$  fungieren als autokrine Wachstumsfaktoren der jeweiligen T-Helfer Zellen und hemmen gleichzeitig die Ausdifferenzierung der anderen Subgruppe (Liew, 2002). Th1- bzw. Th2-Zellen schütten neben IFN- $\gamma$  bzw. IL-4 noch andere Zytokine wie TNF- $\alpha$  bzw. IL-5, IL-10 und IL-13 aus (Mosmann und Coffman, 1989; Paul und Seder, 1994). Th1-Zellen sind die Mediatoren für die Einleitung einer Th1-Immunantwort, die gegen intrazelluläre Pathogene gerichtet ist. Durch ihre ausgeschütteten Zytokine aktivieren sie einerseits Makrophagen, das von ihnen phagozytierte Pathogen zu töten, andererseits stimulieren sie B-Lymphozyten zur Produktion bestimmter antigenspezifischer Antikörper-Klassen (IgG2a). Die Th2-Immunantwort ist gegen (extrazelluläre) Pathogene, wie zum Beispiel Parasiten, gerichtet. Th2-Zellen aktivieren B-Zellen zur Produktion von Immunglobulinen und induzieren die Ausreifung und Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten (Mosmann und Coffman, 1989; Paul und Seder, 1994; Liew, 2002). Abbildung 1 zeigt schematisch die Differenzierungsmöglichkeiten einer naiven T-Helfer Zelle.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der T-Helfer Zell-Differenzierung:** Die naive T-Helfer Zelle ( $T_{HP}$ ) differenziert sich in Abhängigkeit von verschiedenen Zytokinen in eine Th1 ( $T_{H1}$ ) oder eine Th2 ( $T_{H2}$ ) Zelle. IL-12 und IL-4 bewirken die Ausdifferenzierung der  $T_{HP}$  zu einer IFN- $\gamma$ -sezernierenden  $T_{H1}$ - bzw. IL-4-sezernierenden  $T_{H2}$ -Zelle. IL-4 und IFN- $\gamma$  fungieren als autokrine Wachstumsfaktoren der jeweiligen T-Helfer Zellen und hemmen gleichzeitig die Ausdifferenzierung der anderen Subgruppe.  $T_{H1}$  Zellen induzieren in B-Zellen die Produktion von IgG2a,  $T_{H2}$  induzieren durch IL-4 die Produktion von IgG1 und IgE. Th1- bzw. Th2-Zellen schütten neben IFN- $\gamma$  bzw. IL-4 noch andere Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-2 bzw. IL-5, IL-10 und IL-13 aus (Mosmann und Coffman, 1989; Paul und Seder, 1994; Liew, 2002).

**CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften** haben die wichtige Aufgabe, die pathologische und die physiologische Immunantwort unter Kontrolle zu halten (Sakaguchi, 2004; Thompson und Powrie, 2004; O'Garra und Vieira, 2004). Sie sind für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz geradezu essentiell, und eine abnormale Funktion dieser Zellen verursacht eine schwere oder sogar fatale autoimmune Erkrankung (Sakaguchi, 2004; O'Garra und Vieira, 2004). Es existieren mehrere Untergruppen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften, darunter die Tr1 Zellen, die Th3-Zellen und die dem Thymus entstammenden CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Treg-Zellen (Thompson und Powrie, 2004). Die Tr1-Zellen produzieren IL-10, während Th3-Zellen eine große Menge an TGF- $\beta$  ausschütten. Ihre suppressiven Eigenschaften werden vornehmlich von diesen immunsuppressiven Zytokinen vermittelt und sind so unabhängig von Zellkontakten (Thompson und Powrie, 2004). Die am besten charakterisierten regulatorischen T-Zellen sind die CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T-(Treg-)Zellen, die ca. 5-10% der peripheren humanen und murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausmachen. Diese Zellen werden auch natürliche regulatorische T-Zellen genannt, da sie im Thymus während des natürlichen Lymphozyten-Reifungsprozesses entstehen und in der Peripherie als Treg-Zellen überleben. Ihr Repertoire an Antigen-spezifität entspricht dem der naiven T-Zellen, und sie sind in der Lage, Selbst und Nichtselbst zu unterscheiden. Sie können die Proliferation und Zytokinausschüttung der verschiedenen T-Effektorzellen durch verschiedene zellkontakt-vermittelte Mechanismen hemmen (Sakaguchi, 2004; Thompson und Powrie, 2004). Ein spezifischer Marker für CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) ist der „forkhead/winged“ Transkriptionsfaktor Foxp3. Foxp3 wird fast ausschließlich in CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert, nicht jedoch von anderen leukozytären Zellen. Für die Entwicklung und Funktion von CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen spielt dieser Transkriptionsfaktor eine bedeutende Rolle (Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003; Fontenot et al., 2003). Foxp3 Knockout-Mäuse entwickeln keine CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T-Zellen und leiden infolgedessen an verschiedenen Autoimmunerkrankungen. Die Entstehung von Autoimmunität kann in diesen Mäusen durch den Transfer von CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T-Zellen verhindert werden. Durch retrovirale Transduktion oder transgene Expression von Foxp3 in CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>-</sup> T-Zellen entstehen CD25<sup>+</sup> T-Zellen mit Suppressoreigenschaften. Foxp3-transduzierte CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>-</sup> T-Zellen sind in der Lage, die Proliferation von anderen T-Zellen *in vitro* und die Entstehung von Autoimmunerkrankungen *in vivo* zu hemmen (Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003; Fontenot et al., 2003). Zusätzlich wird in Foxp3-transduzierten Zellen die Expression von Treg assoziierten Molekülen, wie CD25 (Interleukin-2 Rezeptor  $\alpha$  Kette), zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen 4 (CTLA-4) und Glucocorticoid-

induzierter Tumor Necrosis Faktor Rezeptor (GITR), hochreguliert (Hori et al., 2003). Foxp3 fungiert also als "Hauptkontrollgen" für die Entwicklung und Funktion von  $CD4^+/CD25^+$  T-Zellen.

In Bezug auf mikrobielle Infektionskrankheiten existieren nur wenige Informationen über die Rolle der regulatorischen T-Zellen und in welcher Weise diese die Immunantwort kontrollieren. Dennoch konnten in erst kürzlich veröffentlichten Studien die regulatorischen T-Zellen mit der Aufrechterhaltung der Immunantwort auf mikrobielle Pathogene in Verbindung gebracht werden (Rouse und Suvas, 2004; Mittrucker und Kaufmann, 2004). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß Pathogen-spezifische Treg-Zellen die Th1-Antwort auf *Bordetella pertussis* und *Leishmania major* hemmen, was zu einer Verhinderung oder Verzögerung der Pathogen-Eradikation führte (McGuirk et al., 2002; Belkaid et al., 2002). Über die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen im *H. pylori*-infizierten Magen existierten bis vor kurzem noch keine Berichte. Drei neuere Untersuchungen zeigen jedoch *H. pylori*-spezifische  $CD4^+CD25^+$  regulatorische T-Zellen im peripheren Blut und im Magen von infizierten Patienten (Lundgren et al., 2003; Raghavan et al., 2004; Lundgren et al., 2005). Welche Rolle die  $CD4^+CD25^+$  regulatorischen T-Zellen bei der *H. pylori*-induzierten Entzündungsreaktion im Magen spielen, ist bis dato noch nicht geklärt.

Die Anzahl der Antigen-spezifischen T-Zellen steigt während einer Infektion sehr stark an und fällt nach Abklingen der Infektion erneut ab - unter Umständen auf ein Hundertstel des Maximalwertes während der Infektion. Die verbleibenden T-Zellen sind langlebige voraktivierte T-Zellen, die charakteristische Aktivierungsmarker, z. B. CD45RO, exprimieren. Auf Restimulation mit dem entsprechenden Antigen reagieren diese Zellen sensitiver als naive T-Zellen und übernehmen schnell und effektiv Effektorfunktionen. Man bezeichnet diese voraktivierten T-Zellen daher als Memory-T-Zellen. Aufgrund ihrer im Vergleich zu naiven T-Zellen höheren Frequenz und leichteren Aktivierbarkeit machen sie den Organismus gegenüber einer Infektion mit demselben Erreger resistent.

## **B-Lymphozyten**

B-(Bone) Lymphozyten entwickeln sich aus einer lymphoiden Vorläuferzelle vollständig im Knochenmark. Die Hauptfunktion der B-Zellen ist die Produktion von Antikörpern, welche Antigene erkennen und binden. In der Entwicklung der B-Zellen unterlaufen die Gene der Immunglobuline einen Gen-Rekombinationsprozess ähnlich dem der T-Lymphozyten, so daß eine große Vielfalt an verschiedenen Antigen-spezifischen Immunglobulinen zustande

kommt. Jede einzelne B-Zelle produziert also ein Immunglobulin mit einer einzigartigen Spezifität für ein Antigen.

Die fünf Hauptklassen der Immunglobuline sind Immunglobulin M (IgM), Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin D (IgD), Immunglobulin A (IgA) und Immunglobulin E (IgE). Das häufigste Immunglobulin, IgG, lässt sich nochmals in vier Untergruppen (IgG1, 2, 3 und 4), IgA in zwei Untergruppen (IgA1 und IgA2) unterteilen. IgA wird beispielsweise auf mukosalen Oberflächen sezerniert. Ein membran-gebundenes Immunglobulin an der B-Zell-Oberfläche, der B-Zell-Rezeptor (BCR), dient als Antigen-Rezeptor, der das spezifische Antigen erkennen kann. Bindet ein Antigen an den BCR, wird dieses in die B-Zelle internalisiert und dort degradiert. Anschließend werden Teile des Antigens wieder auf der B-Zell-Oberfläche mittels eines MHC-II-Moleküls präsentiert. Der MHC-II-Antigen-Komplex auf der B-Zell-Oberfläche wird dann von einer T-Helfer-Zelle, die einen spezifischen TCR für dieses Antigen besitzt, erkannt. Die T-Helfer-Zelle bindet mit ihrem TCR an den MHC-II-Antigen-Komplex (Signal 1) und mit dem kostimulatorischen Molekül CD40 Ligand an das CD40-Molekül der B-Zelle (Signal 2). Diese zwei Bindungen (Signale) aktivieren die T-Helfer-Zelle. Die aktivierte T-Helfer-Zelle produziert nun Zytokine (IL-4, IL-5 und IL-6), die ihrerseits die B-Zelle zur Proliferation und Ausdifferenzierung veranlassen. Terminal differenzierte B-Zellen, sogenannte Plasmazellen, produzieren Immunglobuline der gleichen Antigen-Spezifität, welche als Antikörper sezerniert werden. Antikörper haben zwei Hauptaufgaben: zum einen binden sie an Moleküle von eingedrungenen Pathogenen und markieren sie dadurch, zum anderen rekrutieren sie Effektorzellen wie zum Beispiel phagozytierende Zellen, die das Pathogen, an dem der Antikörper gebunden ist, zerstören (Janeway, 2005).

### **1.3.2 Die Immunantwort auf *H. pylori***

Eine Infektion mit *H. pylori* induziert sowohl eine angeborene (unspezifische) als auch eine erworbene (spezifische) Immunantwort (Prinz et al., 2003). Die Adhäsion des Keimes an die Magenepithelzellen führt in erster Linie zur Induktion der unspezifischen Immunantwort und somit zu einer deutlichen Infiltration der Magenmukosa mit neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Hierfür verantwortlich sind einerseits bestimmte Chemokine mit chemotaktischer Aktivität, die von Epithelzellen nach stattgehabtem Kontakt mit dem Keim ausgeschüttet werden, andererseits locken bestimmte chemotaktische Faktoren des Keimes selbst die Immunzellen an (Shimoyama und Crabtree, 1998; Ernst et al., 2001). Eine



bedeutende Rolle als chemoattraktiver Faktor für neutrophile Granulozyten spielt Interleukin 8 (IL-8). Es wird von Magenepithelzellen nach Kontakt mit *H. pylori* gebildet und bewirkt einerseits die Migration dieser Effektorzellen an den Ort der Infektion, andererseits deren Degranulierung (Sharma et al., 1995b; Aihara et al., 1997). Auf intrazellulärer Ebene spielen hier die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-(activator protein) 1 eine entscheidende Rolle (Suerbaum und Michetti, 2002). Die Freisetzung von Sauerstoffradikalen, NO und proteolytischen Enzymen führt zu einer Schädigung der epithelialen Integrität und der Induktion von Apoptose (Prinz et al., 2003). Neben IL-8 spielen auch weitere Chemokine der C-X-C-Familie bei der Vermittlung der granulozytären Antwort eine Rolle, z.B. GRO- $\alpha$  und ENA-78 (Epithelial-cell-derived neutrophil-activating peptide-78). Die angelockten Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten sezernieren wiederum ihrerseits Zytokine, wie IL-12 und IFN- $\gamma$ , die zum einen die nachfolgende adaptive Immunantwort direkt beeinflussen (Ernst et al., 2001), zum anderen Apoptose der Epithelzellen verursachen können und so zur entzündungsassoziierten Gewebedestruktion beitragen (Yamaoka et al., 1996). Die adaptive Immunantwort auf die *H. pylori*-Infektion ist von einer zellvermittelten und einer humoralen Komponente geprägt. Verschiedene Studien bestätigten, daß die gastrale T-Zell Antwort eine Th1-Ausrichtung aufweist. In der *H. pylori* infizierten Mukosa findet man eine erhöhte Expression von Th1-spezifischen Zytokinen, wie IFN- $\gamma$  und IL-12 (Yamaoka et al., 1996; Bamford et al., 1998). T-Zellen von infizierten Mäusen (Smythies et al., 2000), Rhesus Makaken (Mattapallil et al., 2000) und Menschen (Karttunen et al., 1997; Bamford et al., 1998) bilden hauptsächlich IFN- $\gamma$  und nicht IL-4. Darüber hinaus zeigt die Mehrzahl der *H. pylori* reaktiven T-Zell-Klone, die aus Antrumbiopsien von infizierten Patienten generiert wurden, nach Stimulation mit *H. pylori* Antigenen ein Th1-Zytokin-Profil (D'Elis et al., 1997b). Die Zytokine der Th1-Immunantwort vermitteln eine erhöhte Phagozytoseaktivität von Makrophagen und die Antikörperproduktion der Klasse IgG2a aus B-Zellen (Ho und Glimcher, 2002).

Desweiteren induziert die Infektion mit *H. pylori* eine deutliche humorale Immunität (Perez-Perez et al., 1988). *H. pylori* spezifische IgA, IgG und IgM Antikörper können mittels ELISA in einem Drittel der infizierten Patienten im Magensaft nachgewiesen werden (Crabtree et al., 1991). Darüber hinaus kann in mehr als 90 % der infizierten Patienten *H. pylori*-spezifisches IgG (sowohl IgG1 als auch IgG2) im Serum nachgewiesen werden (Kosunen et al., 1992). Die Antikörperproduktion führt aber nicht wie zu erwarten zu einer Eradikation der Infektion, sondern kann zu einem zusätzlichen Gewebeschaden beitragen (Negrini et al., 1997).

## **1.4 Bakterielle Virulenzfaktoren modulieren die Inflammation und die Immunantwort**

Genetische Studien an *H. pylori* haben ergeben, daß die Keime eine ungeheure genetische Diversität aufweisen. Nahezu jeder Patient ist mit einem einzigartigen Keim infiziert (Akopyanz et al., 1992; Go et al., 1996; van Doorn et al., 1998a; Achtman et al., 1999; Kuipers et al., 2000). Trotz dieser enormen Diversität unter den Bakterien, gelang es verschiedene Genloci auszumachen, darunter *cagA*, *vacA*, und *babA*, die zur Charakterisierung des Keimes beitragen können. Diese Genloci kodieren für bakterielle Faktoren, die dem Keim virulente Eigenschaften verleihen und so für unterschiedliche klinische Erscheinungsbilder verantwortlich sind.

### **1.4.1 Das Vakuolisierende Zytotoxin VacA**

Ein Virulenzfaktor von *H. pylori* ist das Vakuolisierende Zytotoxin VacA, ein 87 kDa schweres Protein, welches vom Gen *vacA* kodiert wird. Es konnte gezeigt werden, daß bestimmte *H. pylori*-Stämme die Bildung von Vakuolen in mehreren Zellkulturlinien verursachen (Leunk et al., 1988). Das *vacA* Gen kodiert zunächst für ein 140 kDa schweres Vorläuferprotein, welches nach Prozessierung zu dem 87 kDa schweren VacA Protein wird. Das Vorläuferprotein wird als noch inaktives Protein aus der Bakterienzelle heraustransportiert, wobei es zur Abspaltung zweier Signalsequenzen kommt. Das verbleibende nun aktive Protein besteht aus zwei Untereinheiten, einer 37 kDa Einheit, auch p37 genannt, und der 58 kDa, p58 Einheit. Die p37 Domäne verursacht die Bildung von Vakuolen in den Epithelzellen, die p58 Einheit ist für die Bindung an der Zielzelle verantwortlich (Montecucco und de, 2003). Das *vacA* Gen ist in nahezu allen *H. pylori*-Stämmen vorhanden, dennoch produzieren nur manche Stämme ein aktives Protein (Cover et al., 1994; Atherton et al., 1995). Die zytotoxische Aktivität hängt von unterschiedlichen Allelen in der *vacA* Genregion ab, die für eine bestimmte Signalsequenz für den Transport aus der Zelle kodiert. Das s2-Allel kodiert ein defektes Signalpeptid und bedingt dadurch einen nur sehr geringen Export von VacA (Atherton et al., 1995). Stämme mit dem s1-Allel können hingegen große Mengen an Toxin exportieren, was Vakuolisierung und damit Zellschäden verursacht. Dementsprechend wurden die *vacAs1*-positiven Stämme mit einer verstärkten inflammatorischen Reaktion, mehr gastroduodenalen Ulcuserkrankungen und distalen

Magenkarzinomen assoziiert (Atherton et al., 1995; Atherton et al., 1997; Gunn et al., 1998; Stephens et al., 1998; Miehlke et al., 2000). In der mittleren Region des *vacA* Gens befindet sich eine weitere Variation, die Allele m1 und m2. Je nach Allel hat der Keim unterschiedliche Bindungseigenschaften an Zielzellen (Pagliaccia et al., 1998; Reytrat et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, daß Stämme, die das s1 und das m1 Allel besitzen, pathogener sind als Stämme, die das s2 und das m2 Allel besitzen (Atherton et al., 1995).

Das Vakuolisierende Zytotoxin hat wahrscheinlich neben der vakuolisierenden Aktivität noch andere Eigenschaften. Einige Studien konnten zeigen, daß VacA in Magenepithelzellen Apoptose induziert (Rudi et al., 1998; Peek, Jr. et al., 1999; Galmiche et al., 2000), andere Arbeitsgruppen wiesen nach, daß VacA die T-Zell Aktivierung hemmt und somit möglicherweise zur chronischen Persistenz des Keimes beiträgt (Segal et al., 1999a).

#### **1.4.2 CagA und die *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag-PAI*)**

Bald nach Beginn der Suche nach bakteriellen Virulenzfaktoren stand das CagA-Protein im Mittelpunkt, wobei seine Funktion noch ungeklärt war (Graham, 1997). Das Protein wurde bei toxischen (*VacA*<sup>+</sup>) Stämmen häufiger exprimiert als bei nicht-toxischen Stämmen, weshalb das kodierende Gen, cytotoxin-associated gene, kurz *cagA*, seinen Namen erhielt (Cover et al., 1990; Covacci et al., 1993). Nachfolgende Untersuchungen konnten das *cagA*-Gen als Bestandteil einer Pathogenitätsinsel identifizieren (Covacci et al., 1993). Initial wurde beobachtet, daß *cagA*-positive (*cagA*<sup>+</sup>) *H. pylori* Stämme signifikant häufiger bei Patienten mit Duodenalulzera vorhanden waren, als bei Patienten ohne gastroduodenale Ulkuserkrankung (Crabtree et al., 1991; van Doorn et al., 1998b). Zahlreiche weitere Studien konnten zeigen, daß *cagA*<sup>+</sup> Stämme auch mit einem signifikant höherem Risiko für schwere Gastritis, Atrophie und distalem Magenkarzinom assoziiert waren als *cagA*<sup>-</sup> Stämme (Cover et al., 1990; Crabtree et al., 1991; Blaser et al., 1995; Kuipers et al., 1995; Parsonnet et al., 1997; van Der Hulst et al., 1997).

Desweiteren konnten Studien an Tiermodellen zeigen, daß CagA der wichtigste krankheitsassoziierte Virulenzfaktor von *H. pylori* ist. Infektion von mongolischen Wüstenrennmäusen mit *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori* Stämmen führte im Gegensatz zur Infektion mit *cagA*-negativen Stämmen zur Entwicklung schwerer Gastritiden, Ulzera oder Magenkarzinomen (Ogura et al., 2000). Ähnlicherweise induzieren im Mausmodell Infektionen mit *cagA*<sup>-</sup> *H. pylori* Stämmen keine starken Entzündungsreaktionen, wohingegen

*cagA*<sup>+</sup> Stämme eine ausgeprägte Inflammation sowie mukosale Schäden hervorrufen (Marchetti et al., 1995; Israel et al., 2001).

Die *cag-PAI* ist ein circa 37 kb großer DNA-Abschnitt im *H. pylori* Genom und umfasst ungefähr 31 Gene, wobei *cagA* als wichtigstes Marker-Gen der *cag-PAI* fungiert (Covacci et al., 1993). Mehrere Gene der *cag-PAI* kodieren für Proteine, die Ähnlichkeit mit einem Typ IV Sekretionssystem (T4SS) gramnegativer Bakterien haben (Segal et al., 1999b). Mit Hilfe dieses Sekretionssystems wird das 120 kDa schwere CagA Protein nach Adhärenz des Keimes an der Wirtszelle in diese transloziert (Segal et al., 1999b; Odenbreit et al., 2000). In der Epithelzelle wird CagA von einer Src ähnlichen Epithelzellkinase an seinen Tyrosinresten phosphoryliert (Selbach et al., 2002) und bindet an eine SHP-2 Phosphatase, was zu einer Deregulierung zellulärer Funktionen, besonders auf Signaltransduktionsebene führt (Higashi et al., 2002). Zum einen ist das phosphorylierte CagA Protein bedeutend für die Induktion des sogenannten "hummingbird"-Phänotyps, einer strukturellen Veränderung unterhalb der Anlagerungsstelle des Keimes (Segal et al., 1999b). Diese Veränderungen beinhalten Zellstreckung, Pedastal-Bildung und Zelloberflächen-Remodeling, welche dem Bakterium helfen könnten, seine Bindung an die Epithelzellen aufrecht zu erhalten (Gordon, 2000). Zum anderen haben *in vitro* Experimente gezeigt, daß *cag-PAI* Gene die Expression bestimmter immunologisch relevanter Wirtsgene hochregulieren (Censini et al., 2001; Guillemin et al., 2002). Das wichtigste Beispiel hierfür ist die NFκB-abhängige Induktion der Interleukin (IL)-8 Sekretion aus Epithelzellen, einem potenten Chemokin für Neutrophile Granulozyten (Keates et al., 1997). Ergebnisse aus *in vitro*-Versuchen zeigten, daß *cagA*<sup>+</sup> Stämme in der Lage waren, IL-8 Produktion aus Epithelzellen stärker zu stimulieren als *cagA*<sup>-</sup> Stämme (Crabtree et al., 1994; Sharma et al., 1995a). Ähnliches bestätigten *in vivo* Beobachtungen, in denen Patienten mit *cagA*<sup>+</sup>-Stämmen eine erhöhte Expression von IL-8 in der Magenschleimhaut aufwiesen, was wiederum in einer verstärkten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, das heißt in einer stärkeren Entzündungsreaktion resultierte (Peek, Jr. et al., 1995; Yamaoka et al., 1996). Es konnte ebenso beobachtet werden, daß Patienten, die mit *cagA*-positiven Stämmen infiziert waren, auch eine stärkere gastrale lymphozytäre Entzündungsreaktion aufweisen als Patienten, die mit *cagA*-negativen Stämmen infiziert waren. Dennoch bleibt es bis heute unklar, welche Lymphozyten-Subpopulationen hiervon betroffen sind.

### **1.4.3 Das Blutgruppenantigen-bindende Adhäsion BabA**

Eine gute Adhärenz des Keimes an Magenepithelzellen ist von großer Bedeutung, um dauerhaft im Magen persistieren zu können (Kirschner und Blaser, 1995; Guruge et al., 1998; Heczko et al., 2000). Verschiedene *H. pylori*-Stämme unterscheiden sich in der Fähigkeit, an Epithelzellen zu binden, und nur adhärente Stämme sind in der Lage die ständige Epithelerneuerung zu überleben und die Magenschleimhaut immer wieder neu zu besiedeln (Hayashi et al., 1998). Der Keim bildet verschiedene Adhäsine aus, die an unterschiedlichen Strukturen auf Epithelzellen, wie zum Beispiel Lipide, Ganglioside oder Kohlenhydrate binden können (Israel und Peek, 2001). In diesem Zusammenhang konnte 1998 die Arbeitsgruppe von Boren einen wichtigen Adhärenzfaktor identifizieren, das blutgruppenantigen-bindende Adhäsion BabA (Ilver et al., 1998). BabA ist ein 78 kDa schweres Outer Membrane Protein (OMP), welches auf der Oberfläche eines Teils der *H. pylori* Stämme exprimiert wird. Das Protein bindet an difukosylierte Lewis<sup>b</sup> (Le<sup>b</sup>) Blutgruppenantigene, die auf humanen Magenepithelzellen exprimiert werden (Boren et al., 1993). In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß BabA die Schwere der durch *H. pylori* verursachten Erkrankungen beeinflusst. In einem transgenen Mausmodell kam es nach Infektion von transgenen Mäusen, die Le<sup>b</sup> Moleküle auf der Oberfläche von Magenepithelzellen exprimierten, zu einer stärker ausgeprägten Gastritis und erhöhtem Parietalzellverlust als in Wildtypmäusen (Falk et al., 1995; Guruge et al., 1998). Klinische Studien haben gezeigt, daß *babA2*-positive Stämme mit der Ulkuserkrankung und dem Magenkarzinom assoziiert sind und daß der Nachweis dieser Stämme wesentlich besser zwischen Ulzera und Gastritis bzw. Karzinom und Gastritis diskriminiert als der Nachweis des *cagA* oder *vacAs1* Gens alleine (Gerhard et al., 1999).

## **1.5 Ein Mausmodell der *H. pylori*-Infektion: eine Rekapitulation der humanen Inflammation**

Die Infektion mit *H. pylori* birgt ein erhöhtes Risiko, an Krebs zu erkranken, was auch die WHO letztendlich erkannte und *H. pylori* 1994 als ein Typ I Karzinogen klassifizierte (Ernst und Gold, 2000). Die Entwicklung von Tiermodellen der *H. pylori*-Infektion ist von besonderer Bedeutung, um die Abläufe der Karzinogenese besser zu verstehen.

Am besten dazu geeignet sind Nagetiere, speziell Mäuse, da diese nicht teuer, einfach zu halten und gut genetisch manipulierbar sind (Fox, 2000). Die Infektion der Maus mit *H. pylori* war schwierig zu etablieren, und man arbeitete zunächst mit dem schon seit längerer Zeit bekannten *H. felis*-Infektionsmodell. 1995 etablierten Marchetti et al. ein *H. pylori*-Infektionsmodell. Hierbei wurde der *H. pylori* Stamm SPM326 verwendet, welcher jedoch eine nur sehr geringe Inflammationsreaktion verursacht (Marchetti et al., 1995). Ein wesentlich besseres Modell ist die Infektion mit dem *H. pylori* Stamm SS1, welches eine stärkere Entzündungsantwort hervorruft und seit der Erstpublikation durch Lee et al im Jahr 1997 breite Anwendung findet (Lee et al., 1997). Je nachdem, was für einen Mausstamm mit *H. pylori* infiziert wird, können verschiedene histopathologische Veränderungen beobachtet werden. Mäuse des C57BL/6-Stammes zeigen nach Infektion mit *H. pylori* eine geringere Kolonisationsdichte als Mäuse des BALB/c-Stammes. C57BL/6-Mäuse entwickeln eine Th1-polarisierte gastrale Immunantwort mit starker Entzündung, Hyperplasie und gegebenenfalls Dysplasie der Magenschleimhaut. BALB/c-Mäuse reagieren auf die Infektion mit einer Th2-gerichteten Immunantwort und weisen geringere epitheliale Schäden auf (Rogers und Fox, 2004). Das Infektionsmodell mit den C57BL/6 Mäusen ist gut geeignet, die krankheitsverursachenden Abläufe einer *H. pylori*-Infektion zu untersuchen, da dieser Mausstamm eine dem Menschen ähnlichere gastrale Immunantwort an den Tag legt. Die Dynamik der Kolonisation und die histo-morphologischen Veränderungen in der Magenschleimhaut können gut beobachtet und mit verschiedenen Untersuchungen evaluiert werden. Ein systematischer Vergleich des Phänotyps der durch *H. pylori* induzierten murinen und humanen Immunantwort wurde jedoch bisher nicht unternommen.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist eine systematische Untersuchung von Mechanismen der *H. pylori* induzierten innate und adaptiven Immunität beim Menschen.

An einer vorhandenen Magenbiopsiebank, die im Rahmen dieser Doktorarbeit noch erweitert wurde, sollen histologische und molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden. Bei über 100 Patienten sollen mittels immunhistochemischer Färbungen leukozytäre Subpopulationen (T-Helfer-Zellen, zytotoxische T-Zellen, B-Lymphozyten, NK-Zellen, Makrophagen und regulatorische T Zellen) in der *H. pylori*-infizierten Magenmukosa charakterisiert werden. Außerdem sollen die für die einzelnen Effektorzellantworten charakteristischen Zytokinprofile durch TaqMan RT-PCR quantifiziert werden.

Weiterhin soll die Abhängigkeit der Immunantwort vom infizierenden *H. pylori* Stammtyp untersucht werden. Von besonderem Interesse ist hierbei die Rolle der bakteriellen Cag-Pathogenitätsinsel (*cagPAI*). Hierzu soll mittels PCR im Magengewebe aller Patienten überprüft werden, ob eine Infektion mit einem *cagPAI*-positiven Stamm vorliegt. In nachfolgenden Assoziationsstudien soll dann der Einfluss von bakteriellen Virulenzfaktoren auf die einzelnen Effektor- und Regulatorarme der spezifischen und unspezifischen Immunantwort untersucht werden.

Abschließend soll die murine mit der humanen Immunantwort auf die Infektion mit *H. pylori* verglichen werden. Die Maus stellt einen wichtigen Modellorganismus für die Untersuchung der anti-mikrobiellen Immunantwort dar. Zum einen soll die zeitliche Dynamik der Inflammation auf zellulärer Ebene und auf Zytokinebene im Mausmodell analysiert werden. Hierzu sollen die zellulären Bestandteile der Immunantwort, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, mittels immunhistochemischer Färbungen dargestellt werden. Die Zytokinantwort soll über mehrere Monate nach der Infektion mittels quantitativer TaqMan RT-PCR analysiert werden. Zum anderen soll ein systematischer Vergleich der humanen mit der murinen Immunantwort im Magen erfolgen. Im Mittelpunkt steht hierbei die Frage, inwieweit die Immunität der Maus eine Rekapitulation der humanen Inflammation darstellt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Sammlung und Bearbeitung des humanen Untersuchungsmateriales**

Im Rahmen von Routineendoskopien wurden von 742 Patienten im Zeitraum zwischen 1996 und 2002 je 5 Biopsien aus dem Antrum und Corpus gesammelt. In die Studie eingeschlossen waren Patienten mit chronischer *H. pylori* assoziierter Gastritis. Aus der Studie ausgeschlossen wurden Patienten, die sich einer Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren, H2-Rezeptorantagonisten oder NSAR unterzogen, und solche mit endoskopisch gestellter Diagnose eines Ulcus ventriculi oder duodeni sowie Patienten mit Magenkarzinom. Das Gewebematerial wurde weiterverwendet für DNA- und RNA-Isolation sowie für die Herstellung von Schnitten für histologische und immunhistochemische Färbungen. Die Biopsien wurden an der Technischen Universität von München sowie am Akademischen Lehrkrankenhaus München-Bogenhausen gesammelt. Von jedem Patienten wurden 10 gastrale Biopsien entnommen (5 aus dem Corpus, 5 aus dem Antrum). Je zwei Corpus- und Antrumbiopsien wurden zur histologischen Untersuchung und zum *H. pylori* Nachweis in das Institut für Pathologie geschickt. Die restlichen sechs Biopsien wurden in Eppendorftubes aufgenommen und sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um eine Degradation von Nukleinsäuren zu vermeiden. Anschließend wurde das Biopsat gemörsert und entweder unverzüglich weiterverarbeitet (DNA- oder RNA-Isolierung) oder sofort wieder eingefroren und bis zur Weiterverwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **2.2 Isolation von Nukleinsäuren**

#### **2.2.1 DNA Isolierung aus humanen und murinen Gewebe**

##### **2.2.1.1 Materialien**

- QIAamp Tissue Kit (Quiagen, Hilden)
- 96% Ethanol (Merck, Darmstadt)
- Proteinase K (Sigma, Deisenhofen)



### **2.2.1.2 Prinzip und Durchführung der DNA-Isolation**

Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem QIAamp Tissue Kit. Der erste Schritt der DNA-Isolation umfaßt die Lyse des Gewebes. Hierbei wurden nach Mörsern der Biopsie 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K auf das Gewebe gegeben, geschüttelt und mindestens 3h bei 55°C inkubiert. Im zweiten Schritt wurde die DNA durch die Zugabe von 200 µl AL-Puffer und die anschließende 10 minütige Inkubation bei 70°C ausgefällt. Als nächstes folgte die Trennung der DNA von den restlichen Bestandteilen der Biopsie. Hierzu wurden der Lösung 210 µl 96%iges Ethanol) zugegeben, gut geschüttelt und die Mischung auf eine Säule aufgetragen. Bei der anschließenden Zentrifugation (6000 g, 1 Minute) wurde die DNA in der Silicamembran der Säule gebunden, während die restlichen Biopsiebestandteile im Sammeltube aufgefangen und verworfen wurden. Das Waschen der DNA erfolgte dann mit 500 µl AW-Puffer (Auftragung auf die Säule und Zentrifugation bei 6000 g für 1 Minute). Der Waschschrift wurde wiederholt, wobei nun das Zentrifugieren bei 10000 g und für 3 min erfolgte. Zuletzt wurde die DNA zweimal eluiert. Hierzu stellte man die Säule in ein Eppendorf-Tube, gab 200 µl AE-Puffer (auf 70°C vorgewärmt) auf die Säule und zentrifugierte diese bei 6000 g für eine Minute. Die aufgefangene DNA-Lösung wurde bis zur Weiterverwendung bei -20°C aufbewahrt.

## **2.2.2 RNA-Isolation aus humanem und murinem Gewebe**

### **2.2.2.1 Materialien**

- peqGOLDTrifast Reagenz (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- Chloroform (Merck)
- Isopropylalkohol (Merck)
- 70% Ethanol (Merck)
- RNase freies Wasser (Merck)

### **2.2.2.2 Prinzip und Durchführung der RNA-Isolation**

Die RNA-Isolierung erfolgte nach der von Chomczynski und Mitarbeitern entwickelten Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987). Der erste Schritt umfaßte die Zellyse. Hierbei

wurde die gemörserte Biopsie in 1 ml peqGOLDTrifast Reagenz aufgenommen und 30 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der anschließenden Phasenpräparation wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt, die Probe 15 Sekunden mit der Hand geschüttelt und 15 bis 30 Minuten, bis zur Bildung von zwei Phasen, auf Eis inkubiert. Die Probe wurde dann 30 Minuten bei 4°C mit 12000 g zentrifugiert (Eppendorf Kühlzentrifuge 5403). Im nächsten Schritt erfolgte die Phasenpräparation, wobei die wäßrige obere Phase, welche die RNA enthält, abgenommen und mit 500 µl Isopropanol vermischt wurde. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe bei 4°C und 12000 g für 45 Minuten zentrifugiert (Präzipitation). Der Überstand wurde dann abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde dann zwei Mal mit je 1 ml 75 % igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation mit 12000 g für jeweils 15 - 30 Minuten). Nach restloser Entfernung des Alkohols aus dem Tube wurde das Pellet 10 Minuten getrocknet und schließlich in 50 ml RNase freiem Wasser aufgenommen.

Da die erhaltene RNA Inhibitoren der cDNA-Synthese enthielt, wurde eine zusätzliche Aufreinigung mittels einer Lithiumchloridfällung notwendig. Hierzu wurde die RNA-Lösung in äquivalentem Volumen 8 M LiCl aufgenommen, geschüttelt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach einer drei stündigen Inkubation bei -4°C (oder -20°C über Nacht) wurde die Lösung für 30 Minuten bei 10000g und 4° C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet in einem weiteren Zentrifugationsschritt mit 70% igem Ethanol gewaschen. Zuletzt erfolgte die Auflösung der RNA in RNase freiem Wasser.

## **2.3 Umschreiben von RNA in cDNA (Reverse Transkription)**

### **2.3.1 Prinzip der Reversen Transkription**

Für eine PCR-Amplifikation müssen RNA Proben in cDNA umgeschrieben werden. Bei dieser Reversen Transkription wird RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in eine einzelsträngige DNA-Sequenz umgeschrieben. Die reverse Transkriptase stammt aus Viren, z.B. dem Affen-Myeloblastosis-Virus (AMV) oder dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV). Sie wird nach ihrem Produkt, der cDNA („complementar“ DNA) auch als cDNA-Synthese bezeichnet. Als Templates dienten die aus den Biopsien isolierten RNA-Proben. Die

aus der reversen Transkription resultierende cDNA kann in einer Polymerase-Ketten-Reaktion eingesetzt werden, um die Genexpression zu analysieren.

### 2.3.2 Reagenzien

In Tabelle 1 sind die Reagenzien, die für die Synthese von cDNA verwendet wurden, aufgelistet:

*Tabelle 1: Reagenzien für die reverse Transkription mit Multiscribe Reverse Transcriptase (TaqMan Reverse Transcription Reagents, Perkin Elmer, Weiterstadt)*

10x TaqMan Puffer 1	KCl	500 mM
	Tris-HCl	100 mM
	pH	8,3
dNTPs	dATP	je 2,5 mM
	dTTP	
	dCTP	
	dGTP	
Random Primer	[d(N) <sub>6</sub> ]	50 µM
MgCl <sub>2</sub>		25 mM
Reverse Transkriptase	MultiScribe	50 Üµl
RNase Inhibitor		20 U/µl

### 2.3.3 Durchführung der Reversen Transkription

Folgendes Arbeitsprotokoll wurde für die Synthese von 20 µl cDNA mit der Superscript Reversen Transkriptase angewendet:

Die cDNA-Synthese wurde mit dem TaqMan Reverse Transcription Reagents von Applied Biosystems (Darmstadt) durchgeführt.

Zur Synthese von 50 ml cDNA mit der Multiscribe Reversen Transkriptase wurde folgender Standardansatz erstellt:

5 µl	RNA
15µl	H <sub>2</sub> O dest.
11 µl	MgCl <sub>2</sub>
10 µl	dNTP-Mix
5 µl	RT-Puffer
2,5 µl	Random Primer
1 µl	RNAse Inhibitor
0,5 µl	Reverse Transkriptase

Das Reaktionsgemisch wurde dann im Thermocycler folgenden Reaktionsschritten ausgesetzt:

- 25°C 10 min (Primer-Annealing),
- 48°C 30 min (Gegenstrang-Synthese)
- 95°C 5 min (Denaturierung)

Die gewonnene cDNA wurde entweder direkt weiter für die quantitative RT-PCR eingesetzt oder bei -20°C aufbewahrt.

## 2.4 Die Polymerase-Kettenreaktion

### 2.4.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Mithilfe der PCR lässt sich ein spezifisches DNA-Stück aus einem komplexen Nukleinsäuregemisch amplifizieren. Die zu amplifizierende DNA-Matrize wird als *template* bezeichnet. Analog zur DNA-Replikation in eukaryotischen Zellen erfolgt die Amplifikation von DNA-Abschnitten bei der PCR mittels einer DNA-Polymerase. Diese thermostabile DNA-Polymerase benötigt ein sequenzspezifisches Oligonukleotid-Primerpaar, das den Enden des *templates* homolog ist. Die PCR durchläuft drei Schritte: 1.) Denaturierung der doppelsträngigen DNA, das heißt die beiden DNA-Matrizen-Stränge werden bei 9°C voneinander getrennt. 2.) Spezifische Hybridisierung der Primer an die

homologe Zielsequenz auf der DNA bei 37-65°C (Anlagerung). Die Anlagerungstemperatur richtet sich nach GC-Gehalt und Länge der verwendeten Primer. 3.) Von den Primern ausgehende DNA-Synthese durch die Polymerase bei 72°C (Elongation). Das neu-synthetisierte DNA-Fragment kann in der darauf folgenden Amplifikationsrunde selbst als Matrize dienen, wodurch in mehreren aufeinanderfolgenden Zyklen eine exponentielle Anreicherung des spezifischen DNA-Stücks möglich ist.

### 2.4.2 Materialien und Durchführung der PCR

Alle konventionellen PCRs wurden mit dem *Taq* PCR Master Mix Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Dieser enthält folgende Inhaltsstoffe: steriles H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> und einen Master Mix bestehend aus Reaktionspuffer, *Taq* Polymerase und dNTPs. Folgender Ansatz wurde für ein 25 µl Reaktionsgemisch mit Quiagen Master Mix angewandt:

Quiagen MM:	12,5 µl
H <sub>2</sub> O steril	9,0 µl
Primer 1	0,5 µl
Primer 2	0,5 µl
DNA	2,5 µl (ca. 100ng)

Der Reaktionsansatz wurde in einem Primus Thermo-Cycler 9600 (MWG Biotech, Ebersberg) amplifiziert. Amplifikationsprogramm:

1 Zyklus	Denaturierung:	94° C	5 min
	Anlagerung:	X° C	1 min
	Extension:	72° C	1 min
30 - 35 Zyklen	Denaturierung:	94° C	45 s
	Anlagerung:	X° C	55 s
	Extension:	72° C	1 min
	Extension:	72° C	10 min

X° C = Annealingtemperatur des jeweiligen Primerpaares.

## 2.5 Genotypisierung von *H. pylori* mittels Polymerase-Kettenreaktion

Das Vorhandensein des *cagA* Gens, welches als Markergen der Cag-Pathogenitätsinsel fungiert, wurde nach der Isolation der DNA aus den Biopsien mittels PCR überprüft. Primer, die sich in der mittleren Region des *cagA* Gens befinden, wurden mittels der Primerdesign Software Primer-Express erstellt. Die *cagA*-Primersequenzen sowie deren Schmelztemperatur sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Firma MWG-Biotech lieferte die Primer in lyophilisierter Form. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in sterilem Wasser aufgenommen, wobei jeweils eine Primerkonzentration von 25 pM erstellt wurde.

*Tabelle 2: Für die Genotypisierung von H. pylori verwendete Primersequenzen*

<b>PCR-Produkt</b>	<b><i>T<sub>m</sub></i><sup>a</sup></b>	<b>Primersequenzen</b>	
<b><i>cagA</i></b>	58°C	FP <sup>b</sup>	5'-GTATGGGGGCAATGGTGGTC-3'
		RP <sup>c</sup>	5'-GATTCTTGGAGGCGTTGGTGTAT-3

<sup>a</sup>Annealingtemperatur, <sup>b</sup>Vorwärtsprimer, <sup>c</sup>Rückwärtsprimer

Der Reaktionsansatz wurde in einem Primus Thermo-Cycler 9600 (MWG Biotech, Ebersberg) amplifiziert. Amplifikationsprogramm:

1 Zyklus	Denaturierung:	94° C	5 min
	Anlagerung:	59° C	30 s
	Extension:	72° C	45 s
30 Zyklen	Denaturierung:	94° C	30 s
	Anlagerung:	59° C	30 s
	Extension:	72° C	10 min

## 2.6 Quantitative Genexpressionsanalyse mittels Real-Time TaqMan RT-PCR

### 2.6.1 Prinzip der quantitativen RT-PCR

Die TaqMan-Real-Time (RT) PCR ermöglicht es, eine quantitative Aussage über die mRNA Expression bestimmter Proteine zu treffen. Diese Methode macht sich die 5'→3' Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA Polymerase zu Nutze. Sämtliche Schritte der herkömmlichen PCR laufen auch bei der TaqMan PCR in der gleichen Weise ab. Vor Beginn der PCR wird zu jeder Probe eine fluorogene Sonde hinzugegeben, die sich nur an die zu amplifizierende DNA-Matrize anlagert. Die Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, dessen Enden mit Farbstoffen markiert sind: das 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporterfarbstoff (Fluoreszeinderivat), das 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff (Rhodaminderivat). Während der PCR wird die fluorogene Sonde zusammen mit den Primern am Matrizenstrang hybridisiert. Solange die Sonde intakt ist, ist die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes sehr gering. Aufgrund der räumlichen Nähe der zwei Farbstoffe unterdrückt nämlich der Quencher die Reporterfluoreszenz. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz-Energie-Transfer (FET) bezeichnet. In der Elongationsphase trifft die Taq Polymerase nun auf die Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'→3' Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA Polymerase aktiviert und die Sonde abgeschnitten wird. Hierbei wird die räumliche Nähe – und damit auch die FET – zwischen den beiden Farbstoffen unterbrochen, was zu einer Zunahme der Reporterfluoreszenz führt. Da freie, nicht hybridisierte Sonde nicht gespalten wird, ist die Zunahme der Reporterfarbstofffluoreszenz zu jedem Zeitpunkt der PCR direkt proportional zur Konzentration der amplifizierten Zielsequenz. Nach jeder Elongation werden die Proben, die sich in Glaskapillaren befinden, mit einem Laser angeregt und emittieren also proportional zur gebildeten DNA-Menge ein Signal. Dieses Fluoreszenzsignal wird von einer entsprechenden Linse gemessen und von einem Computer gespeichert. Die Veränderung der Fluoreszenzen der verschiedenen Farbstoffe wurden mit Hilfe des 7700 ABI PRISM Sequence Detectors (Applied Biosystems) Zyklus für Zyklus erfasst. Hierbei ermittelt das Gerät für jede Probe den sogenannten Ct-Wert. Der Ct-Wert bezeichnet jene Zykluszahl, bei der zum ersten Mal die Reporterfluoreszenz das Baselinesignal meßbar überschreitet, das heißt, wenn zum ersten Mal die durch die PCR-Amplifikation entstandene Fluoreszenz detektierbar wird. Auf diese

Weise wird die Zunahme der Fluoreszenzintensität gegen die Zykluszahl aufgetragen. Mit geeigneten Referenzproben, deren Kopienzahl bekannt ist, lässt sich auf die ursprüngliche Kopienzahl der zu untersuchende Probe zurückschließen. Um letztlich eine quantitative Aussage über die mRNA-Expression eines bestimmten Gens zu erhalten, wird die gemessene Kopienzahl auf die Transkriptzahl eines sogenannten Referenzgens bezogen, welche in jeder Probe zusätzlich bestimmt wird. Das Referenzgen wird hierbei möglichst so gewählt, daß dessen Expression durch den Versuchsansatz möglichst nicht beeinflusst wird. Die Kopienzahlen der in dieser Arbeit detektierten Zielgene wurden auf das Referenzgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) normalisiert und als Kopienzahlen pro 100000 Kopien GAPDH angegeben.

### 2.6.2 Reagenzien

Bei der TaqMan-PCR wurde der TaqMan Universal Master Mix angewandt. Dessen Inhaltsstoffe sind in Tabelle 3 angegeben.

*Tabelle 3: Inhaltsstoffe des TaqMan Universal Master Mix Kits (Perkin Elmer, Weiterstadt).*

DNA-Polymerase	AmpliTaq Gold	5 U/µl
AmpErase UNG		1 U/µl
dNTPs	dATP	10 mM
	dCTP	10 mM
	dGTP	10 mM
	dUTP	10 mM
10 X TaqMan Buffer A	KCl	500 mM
	EDTA	0,1 mM
	Tris-HCl	100 mM
	passiver Referenzfarbstoff	600 nM
	ROX	
	pH	8,3
MgCl <sub>2</sub>		25 mM



### 2.6.3 Primer und Probes für die TaqMan-RT-PCR

Primer- und Probesequenzen wurden mittels der Primerdesign Software Primer-Express erstellt. Um die Amplifikation von genomischer DNA zu verhindern, wurden die Primer in unterschiedliche Exons gelegt. Die Primer wurden von der Firma MWG-Biotech in lyophilisierter Form geliefert. Die lyophilisierte DNA wurde in sterilem Wasser aufgenommen, wobei jeweils eine Primerkonzentration von 25 pM erstellt wurde. Ebenfalls in lyophilisierter Form wurden die fluorogenen Oligonukleotidsonden (Probes) geliefert. Bei der Auflösung in sterilem Wasser wurde eine Probekonzentration von 10 pM erstellt. Die Primer- und Probesequenzen mit den dazugehörigen Annealingtemperaturen sowie die Größe der jeweiligen cDNA sind in der nachfolgenden Tabelle 4 aufgeführt.

*Tabelle 4: Für die quantitative TaqMan RT-PCR verwendete Primer- und Probesequenzen.*

<i>PCR-Produkt</i>	<i>T<sub>m</sub><sup>a</sup></i>	<i>Primer- und Probesequenzen</i>	
<i>GAPDH human</i> 246 bp	58°C	FP <sup>b</sup>	5'- ACGGATTTGGTCGTATTGGGC -3'
		RP <sup>c</sup>	5'- TTGACGGTGCCATTGAATTTG -3'
		P <sup>d</sup>	5'- CCTGGTCACCAGGGCTGCTTTTAA-3'
<i>TNF-α human</i> 180 bp	58°C	FP	5'- GCCCAGGCAGTCAGATCATCTTC -3'
		RP	5'- TGAGGTACAGGCCCTCTGATGG -3'
		P	5'- CGAAACCCGAGTGACAAGCCTGTAGC-3'
<i>IFN-γ human</i> 150 bp	58°C	FP	5'- CCTGGCTTTTCAGCTCTGCATC -3'
		RP	5'- CTTCAAATGCCTAAGAAAAGAGTTCC -3'
		P	5'- TTGGGTTCTCTTGGCTGTTACTGCCA-3'
<i>IL-12Rβ<sub>2</sub> human</i> 192 bp	58°C	FP	5'- CACATACTTTTAGAGGATGCTCATTGG -3'
		RP	5'- CTTCAAATGCCTAAGAAAAGAGTTCC -3'
		P	5'- TTGGGTTCTCTTGGCTGTTACTGCCA-3'
<i>IL-4 human</i> 88 bp	58°C	FP	5'- CACAGGCACAAGCAGCTGAT -3'
		RP	5'- CCTTCACAGGACAGGAATTCAAG -3'
		P	5'- CGGCTCGACAGGAACCTCTGGG -3'

---

<b><i>L-8 human</i></b> 73 bp	58°C	FP	5'-GCCAACACAGAAATTATTGTAAAGCTT-3'
		RP	5'-AATTCTCAGCCCTCTTCAAAAACCTT-3'
		P	5'-AGAGCTCTGTCTGGACCCCAAGGAAAAC-3'
<b><i>Foxp3 human</i></b> 66 bp	58°C	FP	5'-ATGCCTCCTCTTCTTCCTTGAA-3'
		RP	5'-GGGCATCCACCGTTGAGA-3'
		P	5'-CCCATGCCACCATCGCAGCTG-3'
<b><i>TNF-<math>\alpha</math> Maus</i></b> 72 bp	58°C	FP	5'-CATCTTCTCAA AATTCGAGTGACAA-3'
		RP	5'-CCAGCTGCTCCTCCACTTG-3'
		P <sup>d</sup>	5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGCAAACCA-3'
<b><i>IFN-<math>\gamma</math> Maus</i></b> 72 bp	58°C	FP	5'-CAGCAACAGCAAGGCGAAA-3'
		RP	5'-CTGGACCTGTGGGTTGTTGAC-3'
		P	5'-AGGATGCATTCATGAGTATTGCCAAGTTTGA-3'
<b><i>IL-12R<math>\beta_2</math> Maus</i></b> 70 bp	58°C	FP	5'-ACCTGAGCTCTGCGAAATTCA-3'
		RP	5'-CCTGGGCTGTAGGCTGCTT-3'
		P	5'-TACCGACGCTCTCAAAACTCACATCCAA-3'
<b><i>IL-4 Maus</i></b> 70 bp	58°C	FP	5'-CGCCATGCACGGAGATG-3'
		RP	5'-CGAGCTCACTCTCTGTGGTGTGTT-3'
		P	5'-TGCCAAACGTCCTCACAGCAACG-3'
<b><i>Foxp3 Maus</i></b> 70 bp	58°C	FP	5'-TTCGAGGAGCCAGAAGAGTTTC-3'
		RP	5'-GGGCCTTGCCTTTCTCATC-3'
		P	5'-CAAGCACTGCCAAGCAGATCATCTCCT-3'

---

<sup>a</sup>Annealingtemperatur, <sup>b</sup>Vorwärtsprimer, <sup>c</sup>Rückwärtsprimer, <sup>d</sup>Probe

### 2.6.4 Durchführung der TaqMan-RT-PCR

Folgender Ansatz wurde für ein 30 µl Reaktionsgemisch mit Universal Master Mix (Perkin Elmer) angewandt:

Universal MM:	15 µl
H <sub>2</sub> O steril	8,2 µl
Primer 1	0,6 µl
Primer 2	0,6 µl
Probe	0,6 µl
cDNA	5 µl

Der Reaktionsansatz wurde in einem Sequence Detector 7700 amplifiziert.

Amplifikationsprogramm für alle PCR-Produkte:

1 Zyklus	AmpErase-Verdau	50°C	2 min
	Denaturierung:	95° C	10 min
	Anlagerung:	58° C	20 sec
	Extension:	72° C	30 min
2 - 40 Zyklus	Denaturierung:	94° C	15 sec
	Anlagerung:	58° C	20 sec
	Extension:	72° C	30 sec

## 2.7 Histopathologische Aufarbeitung von humanem und murinem Magengewebe

Prinzipiell bestehen zwei Möglichkeiten, Gewebe so zu behandeln, daß diese gefärbt werden können. Eine Möglichkeit ist es, das Gewebe zu fixieren und anschließend in Paraffin einzubetten. Die Morphologie der in Paraffin eingebetten Präparate bleibt gut erhalten.

Manche Antigene werden jedoch durch die vorher notwendige Formalinfixierung irreversibel durch Aldehyde vernetzt, d.h. "maskiert", was ein erhebliches Problem bei immunhistochemischen Färbungen darstellen kann. Die andere Möglichkeit besteht darin, das Gewebe umgehend einzufrieren, um sogenannte Kryopräparate herzustellen. Diese Methode ermöglicht einerseits eine schnelle Beurteilung des gefärbten Materials (schnelle Diagnosefindung) und Antigenstrukturen bzw. labile Antigene werden nicht maskiert oder zerstört. Andererseits ist die Morphologie der Kryopräparate schlechter als bei Präparaten, die in Paraffin eingebettet sind.

## 2.7.1 Herstellung von Präparaten durch Einbettung in Paraffin

Von den aus Routineendoskopien gewonnenen Antrum- und Corpusbiopsien und von aus der Maus herauspräparierten longitudinalen Magenstreifen wurden in Paraffin eingebettete Präparate hergestellt.

### 2.7.1.1 Reagenzien

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Reagenzien, die bei der Herstellung von Paraffin-eingebetteten Präparaten verwendet wurden:

*Tabelle 5: Zur Herstellung von Paraffin-eingebetteten Präparate verwendete Reagenzien*

Formalin 4%	Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH
Ethanol 70%	Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH
Ethanol 96%	Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH
Isopropanol 100%	Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH
Xylol	Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH
Paraffin (Histosec)	Merk
Aqua dest.	Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH

### 2.7.1.2 Fixierung und Vorparaffinisierung

Damit das frisch entnommene Gewebe in möglichst natürlichem Zustand erhalten bleibt und nicht durch autolytische Vorgänge zersetzt wird, muss es in wässrigem Fixierungsmedium fixiert werden. Das frische Gewebe wird in einem Fixierungs- und Einbettautomaten mit

Formalin fixiert, über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und gehärtet und über ein Intermedium (z.B. Xylol) in Paraffin überführt. Dieses Verfahren erlaubt eine gute Entwässerung, Härtung und Paraffinierung des Gewebes. Um die Diffusion der Flüssigkeiten ins Gewebe zu optimieren und so das Ergebnis wesentlich zu verbessern, können die Temperaturen der Einbettmedien erhöht werden.

Über Nacht wurden die Präparate in einem Fixierungsapparat („Pathcentre“; SHANDON) fixiert und vorparaffinisiert. Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden hierfür vollzogen und sind in Tabelle 6 dargestellt:

*Tabelle 6: Arbeitsprotokoll des Fixierungsapparates*

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Einwirkdauer</b>	<b>Temperatur</b>
1.	Formalin 4%	60 Minuten	40°C
2.	Formalin 4%	60 Minuten	40°C
3.	Ethanol 70%	60 Minuten	40°C
4.	Ethanol 70%	60 Minuten	40°C
5.	Ethanol 96%	45 Minuten	40°C
6.	Ethanol 96%	60 Minuten	40°C
7.	Isopropanol	45 Minuten	40°C
8.	Isopropanol	60 Minuten	40°C
9.	Xylol	60 Minuten	40°C
10.	Xylol	60 Minuten	40°C
11.	Paraffin	15 Minuten	60°C
12.	Paraffin	15 Minuten	60°C
13.	Paraffin	30 Minuten	60°C
14.	Paraffin	60 Minuten	60°C

### **2.7.1.3 Einbettung der Präparate**

Die Paraffineinbettung der Präparate in Paraffinblöcke erfolgte in 60°C warmen, flüssigen Paraffin (Histosec, Merk) in einer Einbettungsmaschine („TBS 88 Paraffin Embedding System: Thermal Unit, Cool Unit, Dispenser Unit“; MEDITE Medizintechnik, 31303 Burgdorf, Germany). Anschließend wurden die Paraffinblöcke auf einer Kühlplatte („Tissue Cool Plate COP 20“; MEDITE Medizintechnik, 31303 Burgdorf, Germany) abgekühlt, damit sie sich festigen und gut zu schneiden sind.

### 2.7.1.4 Herstellung von Schnittpräparaten

Am Rotationsmikrotom („Microm HM 335 E“; MICROM GmbH, 69190 Walldorf, Germany) wurden von den Paraffinblöcken 2 µm dicke Schnitte angefertigt. Pro Magenbiopsieblock wurden je sieben Schnitte erstellt. Ein Schnitt wurde jeweils für eine HE-Färbung gefertigt, um später eine Klassifizierung der *H. pylori*-induzierten Gastritis vorzunehmen. Die übrigen sechs Schnitte dienten der näheren Charakterisierung leukozytärer Subpopulationen (CD4, CD8, CD20, CD56, CD68, Foxp3) mittels immunhistochemischer Färbung. Die frisch geschnittenen Schnitte wurden in einem Paraffin-Streckbad („Paraffin Streckbad, TFB 35“; MEDITE Medizintechnik, 31303 Burgdorf, Germany), um Falten im Paraffinschnitt zu vermeiden, bei 50°C gestreckt. Das Aufziehen der Schnitte erfolgte auf „SuperFrost“ PLUS Objektträger (MENZEL-GLÄSER, Germany). Die Objektträger wurden danach ca. 30 Minuten auf einem Objektträger-Strecktisch („OTS 40“; MEDITE Medizintechnik, 31303 Burgdorf, Germany) bei 53°C getrocknet.

### 2.7.1.5 Entparaffinierung der Schnittpräparate

Vor einer Färbung müssen die Gewebeschnitte von ihrem Einbettmedium, dem Paraffin, befreit werden. Die Schnittpräparate wurden über Nacht im Brutschrank („Heraeus Function Line“; KENDRO LABORATORY PRODUCTS, 63450 Hanau, Germany) bei ca. 60°C inkubiert. Anschließend wurden sie mit Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe in Wasser überführt, da Färbungen in der Regel in wässrigen Lösungen erfolgen. Folgende Entparaffinierungsschritte wurden vor einer Hämatoxyllin-Eosin-Färbung angewendet und sind in Tabelle 7 aufgeführt:

*Tabelle 7: Arbeitsprotokoll für die Entparaffinierung vor H.E.-Färbungen*

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Einwirkdauer</b>
1.	Xylol	120 Sekunden
2.	Xylol	120 Sekunden
3.	Xylol	120 Sekunden
4.	Isopropanol	25 Sekunden
5.	Ethanol 96%	25 Sekunden
6.	Ethanol 96%	25 Sekunden
7.	Ethanol 70%	25 Sekunden
8.	Aqua dest.	25 Sekunden

Da die Entparaffinierung für die immunhistochemisch zu färbenden Schnitte variiert, sind die genauen Arbeitsschritte in Tabelle 8 aufgeführt:

*Tabelle 8: Arbeitsprotokoll für die Entparaffinierung vor immunhistochemischen Färbungen*

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Einwirkdauer</b>
1.	Xylol	10 Minuten
2.	Xylol	10 Minuten
3.	Isopropanol	5 Minuten
4.	Isopropanol	5 Minuten
5.	Ethanol 96%	5 Minuten
6.	Ethanol 70%	5 Minuten
7.	Aqua dest.	5 Minuten

## 2.7.1 Herstellung von Kryopräparaten

Von aus der Maus herauspräparierten longitudinalen Magenstreifen wurden Kryopäparate hergestellt.

### 2.7.2.1 Reagenzien

Folgende Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Reagenzien, die bei der Herstellung von Kryopräparaten verwendet wurden:

*Tabelle 9: Zur Herstellung von Kryopräparaten verwendete Reagenzien*

Tissue-Tek, O.C.T Compound	SAKURA, 23800 Zoeterwoude, Netherlands
Flüssiger Stickstoff	Linde
Aceton	MERK, Darmstadt, Germany

### **2.7.2.2 Durchführung**

Das frische Gewebe wurde in Kryogefäße (ecoLab-Kunststoff Dosen mit Schanierdeckel, NEOLAB Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, 69123 Heidelberg, Germany) in OCT-Medium aufgenommen und anschließend in flüssigen Stickstoff getaucht (Schockgefrierung). Diese Schockgefrierung bietet den Vorteil, daß das Gewebe innerhalb kürzester Zeit auf tiefe Temperaturen (-80°C) abgekühlt wird, wodurch Gefriertartefakte (z.B. durch zu langsames Herunterkühlen des Gewebes) vermieden werden. Die Kryopräparate wurden in einem Gefrierschrank bei -80°C aufbewahrt.

### **2.7.2.3 Herstellung von Gefrierschnitten**

Die schockgefrorenen Präparate wurden in ein Kryostat eingelegt. Bei einem Kryostat handelt es sich um ein Rotationsmikrotom, welches sich in einer Gefrierkammer befindet. Mikrotom und Gefrierkammer bilden ein abgeschlossenes System, um die Temperatur darin konstant zu halten. Mit dem Kryostat „Microm Hm 550“ (MICROM GmbH, 69190 Walldorf, Germany) wurden von den Kryopräparaten 5 µm dicke Gefrierschnitte hergestellt. Diese wurden auf „SuperFrost“ PLUS Objektträger (MENZEL-GLÄSER, Germany) aufgezogen. Die Schnitte wurden anschließend bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

### **2.7.2.4 Fixierung und Konservierung der Gefrierschnitte**

Die Gefrierschnitte wurden nach ihrer Trocknungsphase in 4°C kaltem Aceton fixiert. Die Aufbewahrung der fixierten Schnitte erfolgte in einem Gefrierschrank bei -80°C.



## 2.8 Hämatoxillin-Eosin-(HE)-Färbung

### 2.8.1 Reagenzien

In nachfolgender Tabelle 10 sind alle Reagenzien aufgeführt, die bei der Hämatoxillin-Eosin-Färbung verwendet wurden:

*Tabelle 10: Zur HE-Färbung verwendete Reagenzien*

Hämatoxillin nach Mayer	Apotheke des Klinikum Rechts der Isar
Ethanolische Eosinlösung 1%	Apotheke des Klinikum Rechts der Isar
Ethanol 70%	Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH
Ethanol 96%	Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH
Isopropanol 100%	Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH
Xylol	Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH
Aqua dest.	Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH
Histolab Covermount	Labonord, Germany

### 2.8.2 Prinzip und Durchführung der HE-Färbung

Die Hämatoxilin-Eosin-(HE)-Färbung ist die gebräuchlichste Übersichtsfärbung histologischer Schnitte und färbt Zellkerne, das Zytoplasma und von den extrazellulären Strukturen vor allem die kollagenen Fasern. Zellstrukturen, die sich mit basischen bzw. sauren Farbstoffen färben, nennt man basophil bzw. azidophil. Das Chromatin der Zellkerne nimmt auf Grund seines Nukleinsäuregehaltes den basischen Farbstoff Hämatoxilin an und färbt sich blau. Das Zytoplasma der Zellen ist azidophil und färbt sich mit dem sauren Eosin rot. Nach vorhergehender Entparaffinierung der Schnitte folgt die Färbung mit Hämatoxilin und anschließend mit Eosin. Nach dem Färbeschritt mit Eosin werden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Die HE-Färbungen wurden in einem HE-Färbeautomaten („H.E. TST 30“; MEDITE Medizintechnik, 31303 Burgdorf, Germany) durchgeführt. Folgende Färbeschritte wurden bei Raumtemperatur nach vorhergehender Entparaffinierung der Schnitte angewendet (Tabelle 11):

*Tabelle 11: Arbeitsprotokoll für die H.E.-Färbung*

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Einwirkdauer</b>
1.	Hämatoxilin	3 Minuten
2.	Hämatoxilin	3 Minuten
3.	Aqua dest.	2 Minuten
4.	Aqua dest.	2 Minuten
5.	Eosin	2 Minuten
6.	Ethanol 96%	30 Sekunden
7.	Isopropanol	25 Sekunden
8.	Isopropanol	25 Sekunden
9.	Xylol	1,5 Minuten
10.	Xylol	1,5 Minuten

Um den Schnittpräparaten Schutz zu bieten, wurden sie mit einem durchsichtigen Einschlussmedium durchtränkt und ein Deckglas aufgebracht. Das Eindecken der Präparate erfolgte im Eindeckautomaten („Promounter RCM 2000 Coverslipping machine“; MEDITE Medizintechnik, 31303 Burgdorf, Germany) mit dem Eindeckmedium Histolab Covermount; danach wurden die Schnitte getrocknet.

### **2.8.3 Histopathologische Klassifikation gastraler Pathologien**

Die histologische Beurteilung der HE-gefärbten humanen Gewebeschnitte in bezug auf gastrale Pathologien im Antrumbereich des Magens wurde im Institut für Pathologie der TU München durchgeführt. Eine Gastritis-Klassifizierung erfolgte entsprechend der "updated" Sydney-Klassifikation (Dixon et al., 1996). Sie beinhaltet eine Kombination von topographischen, morphologischen und ätiologischen Informationen und klassifiziert diese Veränderungen anhand endoskopischer und histologischer Kriterien. Hierbei wurden einerseits die verschiedenen Grade der granulozytären und lymphozytären Infiltration erfasst. Das Ausmaß der granulozytären Infiltration bestimmt die Aktivität der Gastritis. Verschiedene Stärken der neutrophilen Infiltration (G0 keine, G1 milde, G2 mäßige, G3 ausgeprägte granulozytäre Infiltration) lassen sich unterscheiden und bestimmen so die Aktivität der Gastritis von „nicht aktiv bzw. G0“, „geringgradig aktiv“ bzw. G1, „mäßiggradig aktiv“ bzw. G2, bis „hochgradig aktiv“ bzw. G3. Bei der Beurteilung der Chronizität der Gastritis unterscheidet man verschiedene Grade der Infiltration mit lymphozytären Zellen (CD4/CD8 positiven Lymphozyten, B-Lymphozyten, Plasmazellen,

Monozyten, Mastzellen). Je nach Infiltrationsgrad (L0 keine, L1 milde, L2 mäßige, L3 ausgeprägte lymphozytäre Infiltration) wird die Chronizität der Gastritis beurteilt.

Bei den Mäusen erfolgte die Beurteilung der mit zunehmender Infektionsdauer fortschreitenden Magenschleimhautentzündung aus Gründen der einheitlichen Evaluierbarkeit am Übergang von Antrum zu Corpus. Dieser Referenzbereich wurde ausgewählt, da er in den HE-gefärbten Schnitten gut zu erkennen ist. Im Corpusbereich des Magens sind viele Parietalzellen vorhanden, im Antrumbereich jedoch nicht. Die Parietalzellen färben sich aufgrund ihres Mitochondrienreichtums mit dem sauren Farbstoff Eosin kräftig an. Die leuchtend rot angefärbten Parietalzellen heben sich von den übrigen stark basophilen Drüsenzellen des Magens deutlich ab. Im Corpusbereich finden sich eben diese rot leuchtenden Zellen, am Übergang zum Antrumbereich werden diese Zellen immer weniger, bis sie letztendlich ganz verschwinden.

## 2.9 Immunhistochemische Färbungen muriner und humaner Magenschleimhaut

Anhand charakteristischer membranständiger und nukleärer Marker wurden die leukozytären Subpopulationen in der murinen und der humanen Magenschleimhaut charakterisiert. Im Nachfolgenden sind die spezifischen Marker der leukozytären Zellen aufgeführt.

<b>Leukozytäre Zellpopulation</b>	<b>Marker</b>
Humane T-Helfer Lymphozyten	CD4
Humane Zytotoxische T-Lymphozyten	CD8
Humane regulatorische T-Lymphozyten	Foxp3
Humane B-Lymphozyten	CD20
Humane Natürliche Killerzellen	CD56
Humane Makrophagen	CD68
Murine T-Lymphozyten	CD3
Murine B-Lymphozyten	CD45R/B220
Murine Makrophagen	F4/80
Murine Dendritische Zellen	CD11c

### 2.9.1 Reagenzien

Im Nachfolgenden sind die Reagenzien, die bei immunhistochemischen Färbung der murinen und humanen Magenschleimhaut verwendet wurden, tabellarisch zusammengefasst. In Tabelle 12 sind die verwendeten Reagenzien bei immunhistochemischen Färbungen an humanem Gewebe dargestellt. Tabelle 13 zeigt die bei immunhistochemischen Färbungen an murinem Gewebe verwendete Reagenzien.

*Tabelle 12: Reagenzien für Immunhistochemie an humanem Gewebe*

<b>Primärantikörper</b>	<i>IgG1 Monoklonaler Maus-anti-human CD4; Klon 4B14, (Novocastra)</i> <i>IgG1 Monoklonaler Maus-anti-human CD8; Klon C8/144b, (Dako)</i> <i>IgG1 Monoklonaler Maus-anti-human CD20, Klon L26, (Dako)</i> <i>IgG1 Monoklonaler Maus-anti-human CD68, Klon KP1, (Dako)</i> <i>IgG1 Monoklonaler Maus-anti-human CD56, Klon 1B6, (Novocastra)</i> <i>IgG1 Monoklonaler Maus-anti-human Foxp3, Klon 236A/E7, (Abcam)</i>
<b>Antikörper- verdünnungslösung</b>	Chem Mate Antikörperverdünnungslösung, S 2022, (Dako)
<b>Sekundärantikörper</b>	biotinylierter Ratte-anti-Maus-Antikörper, K5001, DAKO-LSAB-KITT, (Dako)
<b>Komplexlösung</b>	Streptavidin-Horse-Radish-Peroxidase-Komplex, K5001, DAKO-LSAB-KITT, (Dako)
<b>chromogene Substratlösung</b>	Diaminobenzidin, DAB, K5001, DAKO-LSAB-KITT, (Dako)
<b>Gegenfärbung</b>	Hämalaun nach Mayer, (Merk)
<b>Tris- Stammlösung (II)</b>	60,5 g Trizma Base T1503, (Sigma) in 700 ml aqua dest. Einstellung des pH-Werts auf pH 7,6 mit 2 N HCl, (Merk) Auffüllen mit aqua dest. auf 1000 ml, darin 90g NaCl (Merk) lösen Lagerung bei Raumtemperatur
<b>Tris-Puffer- Gebrauchslösung (II)</b>	100ml Tris-Puffer-Stammlösung auf 1000ml mit aqua dest. auffüllen (1: 10 Verdünnung der Stammlösung mit aqua dest.)

---

<b>Citratpuffer (10mMol, ph 6,0)</b>	2,1 g Citronensäuremonohydrat pro analysis, (Merk) in 1000ml a.d. lösen Einstellung des ph-Werts auf ph 6,0 mit 2 N NaOH, (Merk) Lagerung bei 4°C
<b>EDTA-Puffer (10mMol, ph 8,0)</b>	0,372 g EDTA (Sigma) in 1000 ml a.d. lösen Einstellung des ph-Werts auf ph 8,0 mit 1 N NaOH, (Merk)
<b>Alkoholische Lösungen</b>	Xylol (Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH) Isopropanol (Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH) Ethanol 96% (Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH) Ethanol 70% (Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH)
<b>Blockierlösungen</b>	Wasserstoffperoxid 30%, (Merk) 1: 20 in aqua dest. verdünnt Avidin-Biotin-Blocking Kit, SP 2001 (Vektor Laboratories)

---

*Tabelle 13: Reagenzien für Immunhistochemie an murinem Gewebe*

---

<b>Primärantikörper</b>	<i>IgG1 Rat-anti-mouse CD3; Klon CD3-12, (Linaris)</i> <i>IgG2a Rat-anti-mouse CD45R; Klon RA3-6B2b, (Linaris)</i> <i>IgG2b Rat-anti-mouse F4/80, Klon A3-1, (Serotec)</i> <i>IgG1 Hamster-anti-mouse CD11c, Klon HL3, (BD Bioscience)</i>
<b>Antikörper- verdünnungslösung</b>	Chem Mate Antikörperverdünnungslösung, S 2022, (Dako)
<b>Sekundärantikörper</b>	<i>biotinylierter Rabbit-anti-Rat-Antikörper, PK 6104, Vectastain ABC-KIT, (Vector Laboratories)</i> <i>IgG1 Maus-anti-Hamster-Antikörper, biotinyliert, Klon G70-204, (BD Bioscience)</i>
<b>Komplexlösung</b>	Avidin-Horse-Radish-Peroxidase-Komplex PK 6104, Vectastain ABC-KIT, (Vector Laboratories)
<b>chromogene Substratlösung</b>	Diaminobenzidin, DAB, K5001, DAKO-LSAB-KITT, (Dako)
<b>Gegenfärbung</b>	Hämalaun nach Mayer, (Merk)

---

---

<b>Tris- Stammlösung (1l)</b>	60,5 g Trizma Base T1503, (Sigma) in 700 ml aqua dest. Einstellung des ph-Werts auf ph 7,6 mit 2 N HCl, (Merk) Auffüllen mit aqua dest. auf 1000 ml, darin 90g NaCl (Merk) lösen Lagerung bei Raumtemperatur
<b>Tris-Puffer- Gebrauchslösung (1l)</b>	100ml Tris-Puffer-Stammlösung auf 1000ml mit aqua dest. auffüllen (1: 10 Verdünnung der Stammlösung mit aqua dest.)
<b>Citratpuffer (10mMol, ph 6,0)</b>	2,1 g Citronensäuremonohydrat pro analysis, (Merk) in 1000ml a.d. lösen Einstellung des ph-Werts auf ph 6,0 mit 2 N NaOH, (Merk) Lagerung bei 4°C
<b>EDTA-Puffer (10mMol, ph 8,0)</b>	0,372 g EDTA (Sigma) in 1000 ml a.d. lösen Einstellung des ph-Werts auf ph 8,0 mit 1 N NaOH, (Merk)
<b>Trypsin-Lösung 0,05%</b>	0,025 g Trypsin (Sigma) in 50 ml Tris-Puffer lösen
<b>Alkoholische Lösungen</b>	Xylol (Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH) Isopropanol (Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH) Ethanol 96% (Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH) Ethanol 70% (Staub & Co. Chemiehandelsgesellschaft mbH)
<b>Blockierlösungen</b>	Wasserstoffperoxid 30%, (Merk) 1: 20 in aqua dest. verdünnt Avidin-Biotin-Blocking Kit, SP 2001 (Vektor Laboratories) Normal-Rabbit-Serum, PK 6104, Vectastain ABC-KIT (Vector Laboratories)

---

### 2.9.2 Prinzip der Immunhistochemie

In der Immunhistochemie werden immunbiologische Erkenntnisse zur Identifizierung und zur histologischen und zytologischen Lokalisation bestimmter Proteine oder anderer antigen wirkender Stoffe verwandt. Grundlage der immunhistochemischen Anfärbung ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. In der vorliegenden Arbeit wurde für die immunhistochemischen Färbungen eine indirekte Nachweismethode, nämlich die Labelled Streptavidin-Biotin-(LSAB)-Methode, gewählt. Die LSAB-Methode bedient sich der Affinität des Avidin zum Biotin. Das Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein, das heute auf gentechnischen Weg erzeugt wird, um höhere Reinheit zu gewährleisten. Dieses „Streptavidin“ wird aus *Streptomyces avidinii* hergestellt und hat vier freie Bindungsstellen,

um an Biotin zu binden. Bei Biotin handelt es sich um Vitamin H, das sich gut an Sekundärantikörper koppeln lässt. Bei der indirekten Nachweismethode werden die Schnitte zunächst mit einem spezifischen, unkonjugierten Antikörper gegen das gesuchte Antigen beschichtet, welcher sich fest an das Antigen bindet (Antigen-Antikörper-Komplex). Nach Abspülen der Schnitte mit zum Beispiel Tris-Puffer wird eine zweite Lösung aufgetragen, die einen markierten biotinylierten Sekundärantikörper enthält. Der Sekundärantikörper bindet spezifisch an den Primärantikörper womit die Verbindung zum Antigen-Antikörper-Komplex hergestellt wird. Im dritten Schritt wird das direkt mit einem Enzym (Alkalische Phosphatase (AP) oder Horse-Radish-Peroxidase (HRP)) gebundene Streptavidin aufgebracht. Dieses hat vier freie Bindungsstellen für das an den Sekundärantikörper konjugierte Biotin. Aufgrund der hohen Affinität zu Biotin lagern sich mehrere Streptavidinmoleküle an den Sekundärantikörper an. Zum Schluss wird ein Substraten-Chromogenengemisch aufgetragen. Die Alkalische Phosphatase bzw. die Peroxidase spalten ihr zugehöriges Substrat. Die Spaltprodukte reagieren mit den farblosen Chromogensubstanzen und bilden so unlösliche Azofarbstoffe. Bei der Alkalischen Phosphatase entwickelt sich das Chromogen Fast Red rot, bei der Peroxidase reagiert das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) braun.

### **2.9.3 Antigendemaskierung**

Damit der Primärantikörper gut an das Antigen im Gewebe binden kann, ist meist eine Vorbehandlung der entparaffinierten Gewebeschnitte nötig, die das Antigen gut zugänglich macht. Diese Vorbehandlung wird auch „Demaskierung“ genannt. Hauptsächlich stehen zwei verschiedene Möglichkeiten der Antigen-Demaskierung zur Verfügung. Die enzymatische Andauung des Gewebes durch verschiedene Enzyme, unter anderen zum Beispiel Protease oder Trypsin, und die hitzeinduzierte Demaskierung durch Kochen der Schnitte, unter anderen im Dampfkochtopf oder in der Mikrowelle. In der vorliegenden Arbeit wurden bei allen immunhistochemischen Färbungen folgende verschiedene Antigen-Demaskierungsmethoden ausgetestet.

Hitzeinduzierte Demaskierung des Antigens durch Kochen der Schnitte in Citratpuffer (10 mMol, pH 6,0) im handelsüblichen Dampfkochtopf für 7 Minuten

Hitzeinduzierte Demaskierung des Antigens durch Kochen der Schnitte in EDTA- Puffer (10 mMol, pH 8,0) in einer Mikrowelle (900Watt) für 20 Minuten

Enzymatische Demaskierung des Antigens in einer Inkubationskammer („VYSIS HYBrite“, Mediatec, Germany) bei 37°C durch Inkubation der Schnitte mit einer 0,05%-igen Trypsinlösung

#### **2.9.4 Blockade der endogenen Enzymaktivität**

Um unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden, wurden in allen zu färbenden Schnitten das endogen vorkommende Enzym Peroxidase und endogenes Biotin blockiert. Die Blockade der endogenen Peroxidasetätigkeit erfolgte mit 5% iger Wasserstoffperoxid-Lösung, endogenes Biotin wurde mit einer kommerziell erhältlichen Avidin-Biotin-Blockierlösung geblockt.

#### **2.9.5 Blockade mit Normalserum**

Es kann eventuell notwendig sein, elektrostatische Ladungen der Proteine im Untersuchungsgut abzusättigen, um unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden. Immunglobuline können unspezifisch durch hydrophobische Bindungen an Membranen oder Fettgewebe gebunden werden. Die Proteine des Normalserums binden an die unterschiedlichen Ladungen des Gewebes, so daß der nachfolgende Primärantikörper nur noch spezifische Bindungen mit dem Untersuchungsmaterial eingehen kann. Wichtig hierbei ist, das Normalserum nach der Inkubation vom Schnitt nur ablaufen zu lassen, da sonst der Ausgangszustand wieder hergestellt werden würde. Die Normalseren stammen in der Regel aus der gleichen Spezies wie der Sekundärantikörper. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Blockierungsmethode bei allen immunhistochemischen Färbungen an murinen Paraffin-eingebetteten Geweben durchgeführt.



### 2.9.6 Immunhistochemische Färbung Paraffin-eingebetteter Gewebeschnitte

Im Folgenden sind die Arbeitsschritte immunhistochemischer Färbungen mittels der LSAB-Nachweismethode an Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten protokollarisch aufgeführt.

1. Entparaffinierung der Gewebeschnitte
2. Spülen der Schnitte 3 x 1 Minute in Tris-Puffer
3. Antigendemaskierung:
4. Spülen der Schnitte 3 x 1 Minute in Tris-Puffer
5. Blockade der endogenen Peroxidasetätigkeit mit 5 prozentiger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung für 15 Minuten
6. Spülen der Schnitte 3 x 1 Minute in Tris-Puffer
7. Blockade des endogenen Biotins mittels einer Avidin-Biotin-Blockierlösungen für insgesamt 30 Minuten (15 min Avidin-Block, Spülen mit Tris-Puffer, 15 min Biotin-Block)
8. Abschütteln der Biotin-Blockierlösung (nicht spülen) und Einlegen der Schnitte in eine feuchte Kammer, um Austrocknung zu verhindern
9. wenn nötig: Absättigung elektrostatischer Ladungen der Proteine im Untersuchungsgut durch Normalserum für 60 Minuten
10. Auftragen von der vorher erstellten Primärantikörperverdünnung (Antikörper wird in Antikörper-Verdünnungslösung verdünnt) auf die gesamte Schnittfläche, Inkubationszeit bei Raumtemperatur 60 - 90 Minuten
11. Spülen der Schnitte 3 x 1 Minute in Tris-Puffer
12. Auftragen des biotinylierten Sekundärantikörpers, Inkubationszeit 25 Minuten
13. Spülen der Schnitte 3 x 1 Minute in Tris-Puffer
14. Auftragen des LSAB-Peroxidase-Komplexes, Inkubationszeit 25 Minuten
15. Spülen der Schnitte 3 x 1 Minute in Tris-Puffer
16. Inkubation des Enzym-Substrat-Chromogengemisches, Inkubation für 7 Minuten
17. Spülen der Schnitte 3 x 1 Minute in Tris-Puffer
18. Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun für 1 Minute
19. Spülen der Schnitte in lauwarmen Leitungswasser
20. Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis zu Xylol
21. Eindecken der Präparate in dem Eindeckautomaten („Promounter RCM 2000 Coverslipping machine“; MEDITE Medizintechnik, 31303 Burgdorf, Germany)

### 2.9.7 Immunhistochemie an Gefrierschnitten

Immunhistochemie an Gefrierschnitten kommt zum Einsatz, wenn es um einen Antigennachweis besonders labiler Antigene geht, welche z.B. bei der Formalinfixierung zerstört werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die immunhistochemische Färbung an Gefrierschnitten zum Nachweis des CD11c-Antigens auf Dendritischen Zellen angewandt. Die Arbeitsschritte bei immunhistochemischen Färbungen an Gefrierschnitten sind im Folgenden protokollarisch aufgeführt:

1. Trocknen der aus dem Gefrierschrank (-80°C) entnommen Gefrierschnitte
2. Spülen der Schnitte 3 x 1 Minute in Tris-Puffer
3. Blockade der endogenen Peroxidasetätigkeit mit 5 prozentiger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung für 15 Minuten
4. Auftragen von der vorher erstellten Primäantikörperverdünnung (Antikörper wird in Antikörper-Verdünnungslösung verdünnt) auf die gesamte Schnittfläche, Inkubationszeit bei Raumtemperatur 60 - 90 Minuten
5. Spülen der Schnitte 3 x 1 Minute in Tris-Puffer
6. Auftragen des biotinylierten Sekundäantikörpers, Inkubationszeit 25 - 30 Minuten
7. Spülen der Schnitte 3 x 1 Minute in Tris-Puffer
8. Auftragen des LSAB-Peroxidase-Komplexes, Inkubationszeit 25 - 30 Minuten
9. Spülen der Schnitte 3 x 1 Minute in Tris-Puffer
10. Inkubation des Enzym-Substrat-Chromogengemisches, Inkubation für 7 Minuten
11. Spülen der Schnitte 3 x 1 Minute in Tris-Puffer
12. Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun für 1 Minute
13. Spülen der Schnitte in lauwarmen Leitungswasser
14. Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis zu Xylol
15. Eindecken der Präparate in dem Eindeckautomaten („Promounter RCM 2000 Coverslipping machine“; MEDITE Medizintechnik, 31303 Burgdorf, Germany)

### 2.9.8 Semiquantitative Evaluation immunhistochemisch gefärbter leukozytärer Subpopulationen

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte erfolgte unter einem Mikroskop (Olympus BH-2, Olympus Deutschland GmbH) mit einer 1000-fachen Vergrößerung. Pro Magenbiopsie wurden die einzelnen Zellen der je gefärbten leukozytären Subpopulationen in sechs repräsentativen Gesichtsfeldern ausgezählt und die Anzahl der Zellen pro Quadratmillimeter bestimmt. Die Anzahl der pro Quadratmillimeter vorhandenen Zellen wurde wie folgt berechnet:

Der mit der 1000-fachen Vergrößerung zu sehende Ausschnitt besitzt einen Radius von 0,1 mm. Die Fläche lässt sich dann mit der Formel Fläche ist gleich Pi multipliziert mit dem Radius im Quadrat ( $A = \pi \times 0,1 \text{ mm}^2$ ) berechnen. Es ergibt sich eine Fläche von 0,031 mm<sup>2</sup> pro Gesichtsfeld. Somit entspricht die Fläche der 6 ausgezählten Felder 0,189 mm<sup>2</sup>. Um die Lymphozytenzahl pro mm<sup>2</sup> angeben zu können, wurden die Auszählungsergebnisse mit dem Faktor 5,3 multipliziert.

## 2.10 Enzymhistochemie: Naphtol AS-D Chloracetatesterase-Färbung

### 2.10.1 Reagenzien und Herstellung der Färbelösung

In nachfolgender Tabelle 14 sind die Reagenzien, die für die Naphtol AS-D Chloracetatesterase-Färbung verwendet wurden, aufgeführt.

*Tabelle 14: Arbeitsprotokoll für die Herstellung der Naphtol AS-D Chloracetatesterase-Färbelösung*

Naphtol AS-D	Sigma
Hexazonium	Merk
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Tris 5%-Puffer	5ml Tris-Stammlösung + 95 ml aqua dest
Natronlauge (NaOH) 1N	Merk
sauren Hämalau nach Mayer	Apotheke des Klinikum Rechts der Isar

Herstellung des Inkubationsmediums:

13 mg Naphtol AS-D werden mit 2 ml DMSO verrührt,

separat wird Hexazonium wird mit 100 ml 5 % Tris-Puffer verrührt

Vermischen der beiden Lösungen, ph-Einstellung zwischen ph 6,2 und 6,5 mit NaOH

### **2.10.2 Prinzip und Durchführung der Färbung**

Bei der Enzymhistochemie wird ein Enzym bzw. seine enzymatischen Aktivität im Gewebe oder in Zellen nachgewiesen. Durch Anbieten des geeigneten Substrats reagiert das Enzym und es entstehen Produkte, die bereits sichtbar sind oder sichtbar gemacht werden können.

Die NaphtolAS-D Chlorazetatesterase, auch als spezifische Esterase bezeichnet, ist ein Marker für neutrophile Granulozyten. Das Reaktionsprodukt ist rot.

In Gefrierschnitten des Magens von chronisch infizierten Mäusen wurden die neutrophilen Granulozyten mittels Naphtol AS-D Chlorazetatesterase-Färbung nachgewiesen. Die Schnitte wurden 30 Minuten getrocknet und anschließend mit der Inkubationslösung bei 60°C im Brutschrank für 90 Minuten inkubiert. Nach kurzem Abspülen der Schnitte folgte die Gegenfärbung des Gewebes mit saurem Hämalaun nach Mayer für 10 Minuten. Die Präparate wurden gebläut und anschließend in Einbettmedium eingebettet.

## **2.11 Kultur von *H. pylori***

### **2.11.1 Materialien und Durchführung**

Die Anzucht von *H. pylori* erfolgte in BHI-Medium (Brain heart infusion) oder auf WC-Agarplatten. Tabelle 15 und 16 faßt die hierfür nötigen Reagenzien zusammen. Bei der Herstellung von BHI-Medium wurden BHI und Hefeextrakt in 1000 ml destilliertem Wasser aufgenommen und vermischt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert. Bei Gebrauch des Flüssigmediums erfolgte die Zugabe von 10% FCS und Antibiotika. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Für die Herstellung von WC-Agarplatten wurden WC-Agar, Hefeextrakt und destilliertes Wasser vermischt und die Lösung autoklaviert. Nach anschließender Abkühlung

auf unter 50°C wurden 10% FCS und DENT-Supplement zugesetzt. Anschließend wurden die Platten ausgegossen. Bis zum Gebrauch wurden die Petrischalen umgedreht bei 4°C gelagert.

**Tabelle 15:** Reagenzien zur Herstellung von BHI-Medium (Brain Heart Infusion)

BHI (Sigma)	36g/l
Hefeextrakt (Sigma)	0,25%
Aqua dest	ad 1000 ml
FCS <sup>a</sup>	10%
DENT-Supplement (Oxoid) <sup>a</sup>	2 Röhrchen/1000ml
- Vancomycin 5mg	
- Trimethoprim Lactat 2,5 mg	
- Cefsulodin 2,5 mg	
- Amphotericin B 2,5 mg	

<sup>a</sup>Zugabe nach dem Autoklavieren bei maximal 56°C

**Tabelle 16:** Reagenzien zur Herstellung von WC-Agar-Platten (Wilkins Chalgren)

WC-(Wilkins Chalgren)-Agar (Oxoid)	43g/l
Hefeextrakt (Sigma)	0,25%
Aqua dest	ad 1l
FCS <sup>a</sup>	10%
DENT-Supplement (Oxoid) <sup>a</sup>	2 Röhrchen/1000ml

<sup>a</sup>Zugabe nach dem Autoklavieren bei maximal 56°C

### 2.11.2 Kultur von *H. pylori* in Überschichtungskultur und Flüssigmedium

In der gegenwärtigen Studie wurde der mausadaptierten *H. pylori* Sydney Stamm (*H. pylori* strain SS1) verwendet. Alle Arbeiten wurden deshalb unter der Sicherheitsbank in Laborräumen durchgeführt, die für Arbeiten mit S2-Status zugelassen sind. 100 µl einer Glycerinkultur (siehe unten) wurden in 500 µl BHI/10%FCS Medium aufgenommen und je 100 µl auf BHI-Agarplatten ausplattiert. Die Kultur erfolgte anschließend unter mikroaerophilen Bedingungen (10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> und 85% N<sub>2</sub>) bei 37°C im Brutschrank. Das Anwachsen der Kulturen benötigte bei dieser Animpfdichte ungefähr 3 Tage. Beim Ernten der Stämme wurde die Vitalität lichtmikroskopisch überprüft. Hierbei wurde besonders auf die Morphologie (helikal oder kokkoid) und auf die Beweglichkeit geachtet.

Für die Vermehrung von größeren *H. pylori* Mengen wurden Flüssigkulturen eingesetzt. Hierbei wurde das Medium mit *H. pylori* beimpft, bis eine OD<sub>578</sub> von 0,1-0,2 erreicht war. Anschließend erfolgte die Kultur in Zellkulturflaschen mit Membranverschluß unter mikroaerophilen Bedingungen (10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> und 85% N<sub>2</sub>) bei 37°C im Brutschrank. Die Kultur wurde hierbei auf einem Inkubationsschüttler mit 130 rpm geschüttelt. Nach ungefähr 24h erfolgte das Ernten der Stämme. Nach diesem Zeitraum wurde eine von OD<sub>578</sub> von 0,7-1 erreicht.

### **2.11.3 Langzeitlagerung von *H. pylori***

Für die Langzeitlagerung von *H. pylori* wurden Keime aus Überschichtungskulturen geerntet und in BHI aufgenommen. Zur Standardisierung wurde diese initiale Kultur auf eine OD<sub>578</sub> von 1,0 eingestellt. 10ml einer solchen Lösung wurden abzentrifugiert und anschließend in 1ml BHI mit 20% Glycerin und 10% FCS aufgenommen. Je 100µl wurden in 1,5 ml Eppendorfröhrchen bei -80°C eingefroren.

## **2.12 Infektion der Maus mit *H. pylori***

C57BL/6 Mäuse wurden von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) erworben und unter spezifischen keimfreien Bedingungen (SPF, specific pathogen free) gehalten. Alle Experimente wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und durch die Regierung von Oberbayern genehmigt. Die Zucht der Tiere erfolgte im S2-Tierstall des Instituts für medizinische Mikrobiologie/Immunologie/Hygiene der TU-München. Die Inokulationsexperimente mit Mäusen wurden mit dem mausadaptierten *H. pylori* Sydney Stamm (*H. pylori* strain SS1) durchgeführt. Dieser Bakterienstamm wurde von Dr. Richard Ferrero (Institute Pasteur, Paris) zur Verfügung gestellt. Die Bakterien wurden auf Agarplatten bei 37°C unter mikroaerophilen Bedingungen kultiviert. Nach 24 bis 48 Stunden Kultur, wurden die Keime direkt in Brucella-Broth Nährmedium (Oxoid) überführt. Die Morphologie und Beweglichkeit der Keime wurde lichtmikroskopisch (Vergrößerung 400x) geprüft. Da sich kokkoide und bewegungslose Keime nicht zur Infektion der Mäuse eignen,

wurden nur Bakteriensuspensionen zur Infektion verwendet, in denen die Rate der gut beweglichen, spiralförmigen Bakterien mindestens bei ca 90% lag. Sechs Wochen alte C57BL/6 Weibchen wurden mit dem mausadaptierten *H. pylori* Sydney Stamm (*H. pylori* strain SS1) infiziert. Die Infektion wurde nach zwei Tagen wiederholt. Die Tiere erhielten durch eine in den Magen eingeführte Fütterungsnadel die Bakteriensuspension (0,1 ml der Suspension mit einer OD<sub>590</sub> von 5). 0,1 ml der Suspension enthalten näherungsweise  $5 \times 10^8$  Organismen. Kontrollmäuse erhielten Nährmedium ohne Bakterien.

Nach 4, 6, 8, 12, 19 und 24 Wochen wurden die Mäuse nach kurzer Isofluran-Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Nach Aufschneiden der Abdominalhaut wurden die Mägen entnommen und in sterilem Wasser gewaschen. Ein longitudinaler Magenstreifen vom Duodenum bis zum Ösophagus wurde entlang der großen Kurvatur abpräpariert, über Nacht in 4%igem Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Von den Gewebelöcken wurden 2µm dicke Schnitte für histologische und immunhistochemische Färbungen angefertigt. Der restliche Magen wurde zweigeteilt. Ein Teil wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend gemörsert. Das Gewebe diente zur RNA-Isolation für anschließende Gen-Expressions-Analysen bestimmter Zytokine mittels quantitativer RT-PCR. Der restliche Magenanteil wurde in BHI-Medium aufgenommen und ca 5 min geschüttelt zum Auswaschen der Keime aus den Drüsen. Das bakterienenthaltende Medium wurde nun verdünnt (1:10; 1:100; 1:1000). 50 µl der verschiedenen Verdünnungsstufen wurden anschließend auf WC-DENT Platten ausplattiert. 5 Tage später wurde die Anzahl der Bakterienkolonien gezählt. Dies dient einerseits dem Nachweis der Infektion, andererseits zur Bestimmung der Infektionsstärke.

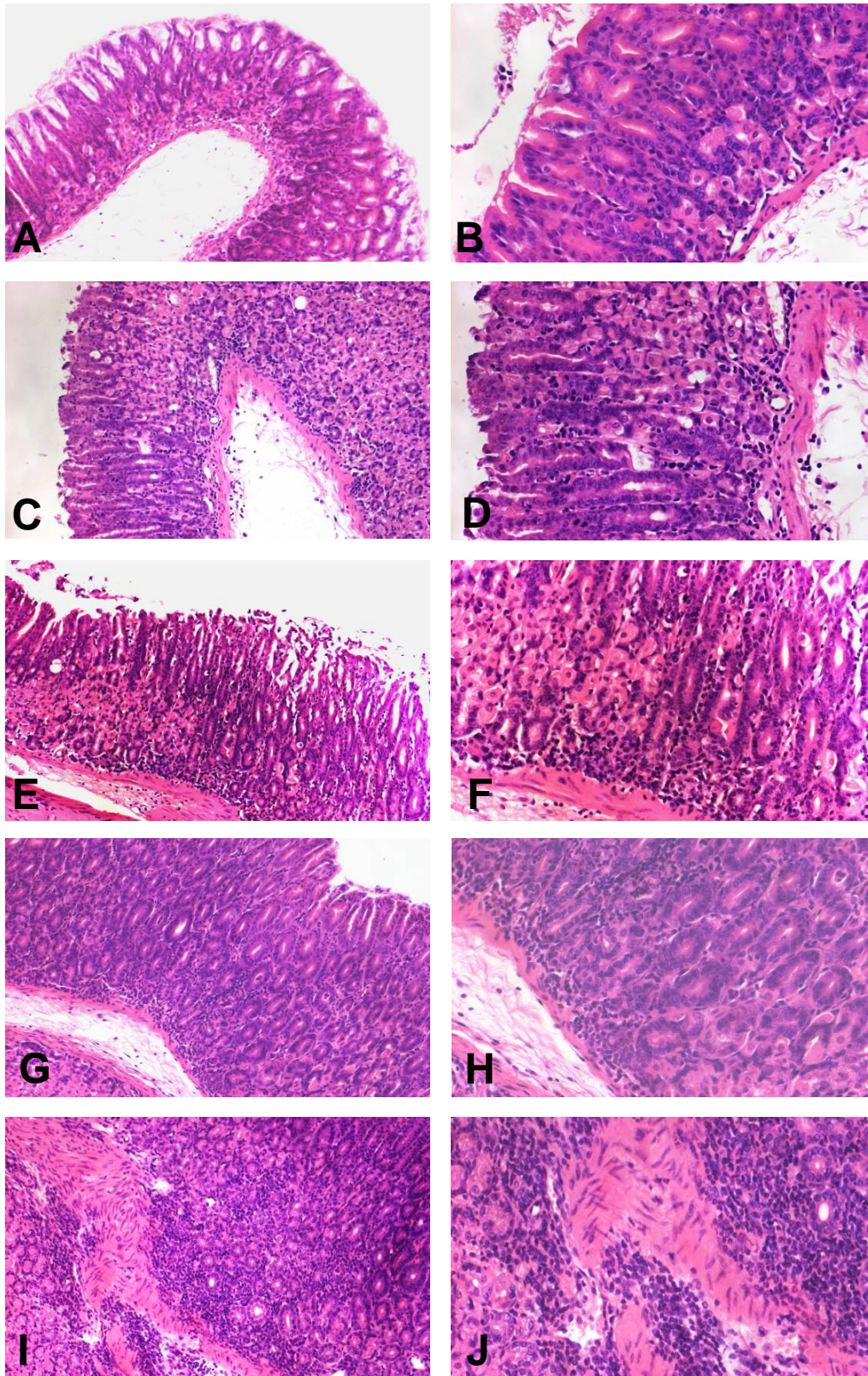
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Dynamik der gastralen Inflammation nach *H. pylori*-Infektion im Mausmodell

Die bakterielle Infektion mit *H. pylori* ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten des Menschen. Da eine Beobachtung der Infektionsdynamik im Menschen nicht möglich ist, wurde die zeitliche Dynamik der durch *H. pylori* verursachten Magenschleimhautentzündung anhand eines murinen Infektionsmodelles beobachtet.

Nach Infektion der Maus mit *H. pylori* kommt es wie auch bei Menschen zu einer Entzündungsreaktion, die durch das Einwandern von Entzündungszellen in die Magenschleimhaut charakterisiert ist. Um die Dynamik dieser Magenschleimhautentzündung darzustellen, wurden C57BL/6-Mäuse mit *H. pylori* infiziert und nach unterschiedlicher Infektionsdauer (1-6 Monate) getötet. Alle Experimente wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und durch die Regierung von Oberbayern genehmigt. Sechs Wochen alte C57BL/6 Weibchen wurden mit dem mausadaptierten *H. pylori* Sydney Stamm (*H. pylori* strain SS1) infiziert. Kontrollmäuse erhielten Nährmedium ohne Bakterien. Nach 4, 8, 12, 19 und 24 Wochen wurden die Mäuse euthanasiert. Die Mägen wurden entnommen und in sterilem Wasser gewaschen. Ein longitudinaler Magenstreifen vom Duodenum bis zum Ösophagus wurde entlang der großen Kurvatur abpräpariert und für histologische und immunhistochemische Färbungen benutzt. Ein Teil wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend gemörsert. Das Gewebe diente zur DNA- und RNA-Isolation. Der zweite Magenanteil wurde für den Nachweis der Infektion mittels Urease-Schnelltest benutzt. Die histologischen Schnitte des murinen Magenstreifens wurden einer Hämatoxylin/Eosin-Färbung unterzogen. Abbildung 2 zeigt die gastrale Inflammation jeweils am Übergang vom Antrum- zum Corpusbereich des Magens nach 4, 8, 12, 19 und 24 wöchiger Infektionsdauer. Der Antrum/Corpus-Übergang wurde aus Gründen der einheitlichen Evaluierung als Referenzbereich gewählt.





**Abbildung 2: Dynamik der gastralen Inflammation nach *H. pylori*-Infektion im Mausmodell: HE-Färbung des Antrum/Corpus-Übergangs nach (A, B) 4 Wochen Infektion, (C, D) 8 Wochen Infektion, (E, F) 12 Wochen Infektion, (G, H) 19 Wochen Infektion, (I, J) 24 Wochen Infektion. Vergrößerung 100x: A, C, E, G, I; Vergrößerung 200x: B, D, F, H, J;**

In Abbildung 2 ist die Dynamik der gastralen Inflammation gut ersichtlich. Nach 4 wöchiger Infektion der Mäuse mit *H. pylori* sind im Antrum/Corpus-Bereich kaum Entzündungszellen zu sehen. Mit zunehmender Infektionsdauer kommt es zu einer deutlichen Vermehrung des entzündlichen Infiltrats erst in basalen, später auch in allen Schichten der gesamten Mukosa. Nach 24 Wochen hat sich in der Magenschleimhaut eine chronische Gastritis entwickelt. Nach mehreren Monaten zeigt sich zudem eine zunehmende gastrale Hyperplasie mit deutlichem Verlust von Parietalzellen (gastrale Atrophie).

### **3.2 Leukozytäre Subpopulationen in der *H. pylori* infizierten Magenschleimhaut der Maus**

Um das leukozytäre Entzündungsinfiltrat genauer zu charakterisieren, wurden die in die murine Magenmukosa eingewanderten leukozytären Subpopulationen mittels immunhistochemischer Färbungen näher dargestellt. Die murinen Leukozyten wurden anhand ihrer CD-Oberflächenmarker gefärbt, wobei CD3 als Marker der T-Lymphozyten, CD45R/B220 als Marker der B-Lymphozyten fungierte. Zusätzlich wurden Makrophagen bzw. Dendritische Zellen anhand ihrer Oberflächenantigene F4/80 bzw. CD11c immunhistochemisch dargestellt. Tabelle 16 fasst die etablierten Färbeprotokolle für die einzelnen Oberflächenantigene zusammen. Die in Paraffin eingebetteten Schnitte wurden zuerst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert, anschließend wurden die Antigene mit der jeweiligen optimalen Antigenmaskierung demaskiert. Gefrierschnitte bedurften keiner Entparaffinierung oder Antigenmaskierung. Endogene Enzymaktivität und unspezifische Bindungsstellen im Gewebe wurden jeweils durch verschiedene Lösungen blockiert. Die Schnitte wurden anschließend mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach dem Primärantikörper folgte die Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers und des Peroxidase markierten Streptavidin-Komplexes (AB-Komplex) für jeweils 30 Minuten. Nach Zugabe des Substrat-Chromogengemisches wurden die jeweiligen Antigene mit Diaminobenzidin (DAB) gefärbt, die Gegenfärbung des Gewebes erfolgte durch Hämalaun.

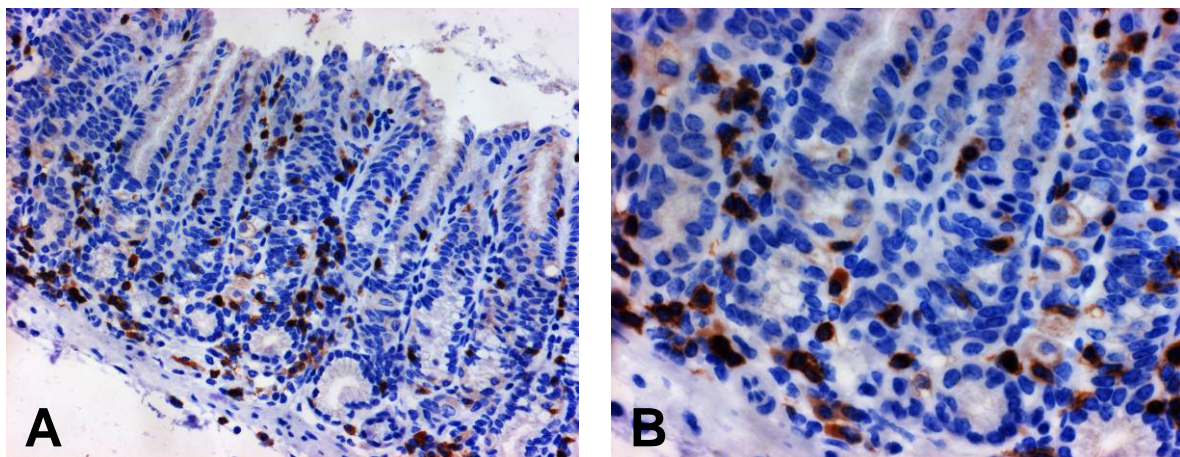
**Tabelle 16:** Etablierte Färbeprotokolle für die Oberflächenantigene CD3, CD45R, F4/80, CD11c

Antigen	S	Ag-Demaskierung	Blockierung	1. Antikörper	2. Antikörper
<b>CD3</b> T-Lymphozyten	P	20 min EDTA-Puffer (ph 8), Mikrowelle	5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 15 min A-B-Block 10 min NKS 60 min	IgG1 Ratte-anti-Maus 1:200, 60 min	biotinylierter Kaninchen-anti-Ratten-Ak
<b>CD45R</b> B-Lymphozyten	P	7 min Citratpuffer (ph 6), Dampfkochtopf	5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 15 min A-B-Block 10 min NKS 60 min	IgG2a Ratte-anti-Maus 1:50, 60 min	biotinylierter Kaninchen-anti-Ratten-Ak
<b>F4/80</b> Makrophagen	P	20 min Trypsinlg. (0,05%), Inkubationskammer bei 37°C	5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 15 min A-B-Block 10 min NKS 60 min	IgG2b Ratte-anti-Maus 1:10, 90 min	biotinylierter Kaninchen-anti-Ratten-Ak
<b>CD11c</b> Dendritische Zelle	G		5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 15 min	IgG1 Hamster-anti-Maus 1:10, 60 min	biotinylierter Maus-anti-Hamster-Ak

Abkürzungen: S: Schnitt, P: Paraffin, G: Gefrierschnitt; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Wasserstoffperoxid; Blockade der endogenen Peroxidase, A-B-Block: Avidin-Biotin-Blockierlösung; Blockierung des endogenen Biotins, NKS: Normal Kaninchen Serum; Blockade unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers an das Gewebe

### 3.2.1 Die T-Lymphozyten

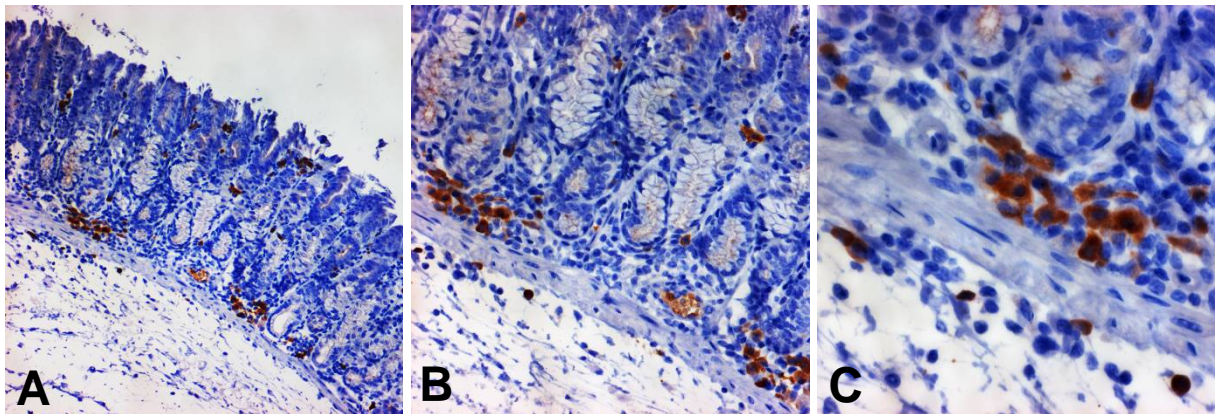
T-Lymphozyten wurden anhand ihres CD3 Oberflächenantigens gefärbt. Abbildung 3 zeigt CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die infolge der chronischen *H. pylori*-Infektion in die Magenschleimhaut der Maus eingewandert sind. Eine deutliche T-lymphozytäre Infiltration in die Mukosa lässt sich beobachten. Die T-Lymphozyten sind in allen Schichten der Schleimhaut vorhanden (transmurale Infiltration).



**Abbildung 3:** CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der murinen Magenschleimhaut am Antrum/Corpus Übergang. (A) Vergrößerung 200x, (B) Vergrößerung 400x

### 3.2.2 Die B-Lymphozyten

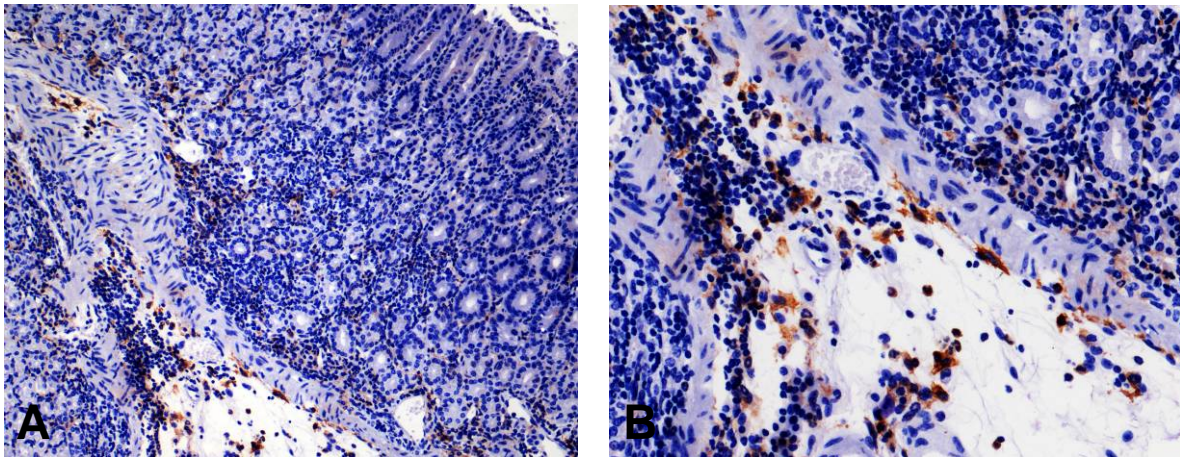
B-Lymphozyten wurden anhand ihres Oberflächenmarkers CD45R (B220) immunhistochemisch gefärbt. Abbildung 4 zeigt CD45R<sup>+</sup> B-Lymphozyten, die infolge der chronischen *H. pylori*-Infektion in die Magenschleimhaut der Maus eingewandert sind. Die B-Lymphozyten sind in allen Schichten der Schleimhaut vorhanden. Ein nestartiger Zusammenschluss der B-Lymphozyten zu kleineren Follikeln kann ebenso beobachtet werden. Insgesamt findet sich bei der Maus eine ungewöhnlich starke B-Zell-Antwort.



*Abbildung 4: CD45R<sup>+</sup> B-Lymphozyten in der murinen Magenschleimhaut am Antrum/Corpus Übergang. Vergrößerung 100x, (B) Vergrößerung 200x, (C) Vergrößerung 400x*

### 3.2.3 Die Infiltration der Makrophagen in die murine Magenschleimhaut

Die murinen Makrophagen wurden anhand ihres Oberflächenmarkers F4/80 immunhistochemisch gefärbt. Abbildung 5 zeigt F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, die infolge der chronischen *H. pylori*-Infektion in die Magenschleimhaut der Maus eingewandert sind. Insgesamt befinden sich nur wenige Makrophagen in der Magenschleimhaut. Die Zellen sind meist nur in den submukösen Schichten der Schleimhaut vorhanden.



*Abbildung 5: F4/80<sup>+</sup> Makrophagen in der murinen Magenschleimhaut am Antrum/Corpus Übergang. (A) Vergrößerung 100x, (B) Vergrößerung 200x*

### 3.2.4 Dendritische Zellen in der murinen Magenschleimhaut

Dendritische Zellen befinden sich vor allem im peripheren Gewebe auf der Suche nach möglichen Pathogenen und Infektionsherden. Sie sind spezialisiert auf Antigen- (Ag-) Aufnahme und Prozessierung. Mit ihren fühlertartigen Zellfortsätzen suchen sie das sie umgebende Gewebe kontinuierlich nach pathogenen Antigenen ab, um diese nach erfolgter Phagozytose naiven T-Zellen zu präsentieren. Dendritische Zellen im Gastrointestinaltrakt des Menschen spielen eine wichtige Rolle bei der Initiierung der angeborenen und adaptiven Immunität (Banchereau et al., 2000; Moser und Murphy, 2000). Die dendritischen Zellen in der murinen Mukosa wurden anhand ihres CD-Oberflächenmarkers CD11c immunhistochemisch gefärbt. In Abbildung 6 sind dendritische Zellen in der murinen Magenschleimhaut zu sehen. Die tentakelförmigen Ausläufer der Zelle, die in das Lumen einer Magendrüse zu ragen scheinen, sind gut zu erkennen. Es ist gezeigt worden, daß intestinale DCs epitheliale Tight-Junction Verbindungen öffnen können und ihre Dendriten in das Darmlumen aussenden können (Rescigno et al., 2001). Möglicherweise ist dieses Phänomen auch im Magen von Bedeutung.

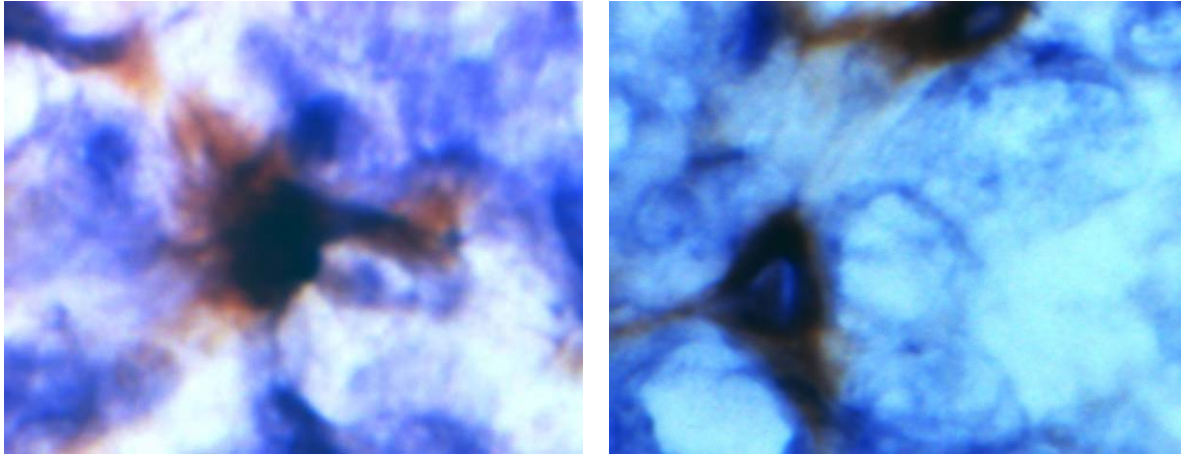


Abbildung 6:  $CD11c^+$  dendritische Zellen in der murinen Magenmukosa. (Vergrößerung 400x)

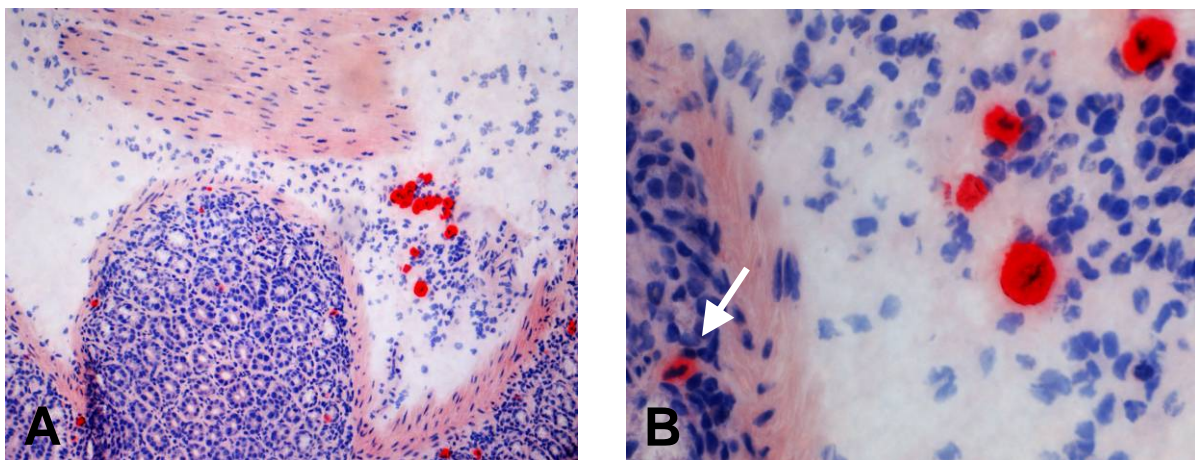
### 3.2.5 Die granulozytäre Infiltration in die murine Magenschleimhaut

Neutrophile Granulozyten sind als phagozytierende Zellen wichtige Effektorzellen des innaten Immunsystems. Sie können eindringende Pathogene eliminieren und die Entstehung der adaptiven Immunantwort zum Beispiel durch Ausschüttung von Mediatoren oder Antigenpräsentation fördern.

Der wichtigste Vermittler der granulozytären Infiltration in die humane Magenschleimhaut ist das Chemokin IL-8 (Baggiolini et al., 1989), welches nach der Infektion mit *H. pylori* in großen Mengen ausgeschüttet wird (Bodger und Crabtree, 1998). Im Genom der Maus ist das Gen dieses potenten Chemoattraktant jedoch nicht vorhanden, da es im Laufe der phylogenetischen Entwicklung der Mausspezies verloren gegangen ist (Modi und Yoshimura, 1999). Als funktionelle Homologa fungieren MIP-2 und das aus Keratinozyten stammende Chemokin KC, welche in der Lage sind, Neutrophile anzulocken (Watanabe et al., 1993; Rovai et al., 1998). Dennoch sind Mäuse nicht in der Lage, auf invasive Keime, wie zum Beispiel Shigellen, mit einer von neutrophiler Infiltration geprägten Entzündungsreaktion zu reagieren (Singer und Sansonetti, 2004). Um zu prüfen, ob bei einer chronischen Infektion mit *H. pylori* ein Einwandern von neutrophilen Granulozyten in die murine Mukosa stattfindet, wurde versucht, das Vorhandensein eines granulozytären Infiltrats in der murinen Magenschleimhaut nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden in Gefrierschnitten von chronisch infizierten Mäusen die Granulozyten mit Hilfe einer Chloracetatesterase-Färbung

gefärbt. Die Chloracetatesterase Färbung färbt neutrophile Granulozyten und Mastzellen spezifisch an (Li, 2001). Die Gefrierschnitte wurden nach 30 minütiger Trocknung für 90 Minuten mit der frisch angefertigten Chloracetatesterase-Färbelösung inkubiert. Die Gegenfärbung des Gewebes erfolgte mit Hämalaun.

Abbildung 7 zeigt eine Chloracetatesterase-gefärbte murine Magenschleimhaut. Bei den in der Submukosa vorhandenen Zellen handelt es sich um Mastzellen, die eindeutig durch ihre Größe und durch die im Zytoplasma vorhandenen Granula zu identifizieren sind. Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 7 **B** einen sich in der Mukosa befindlichen neutrophilen Granulozyt, der in Gegenüberstellung zu den Mastzellen deutlich kleiner ist.



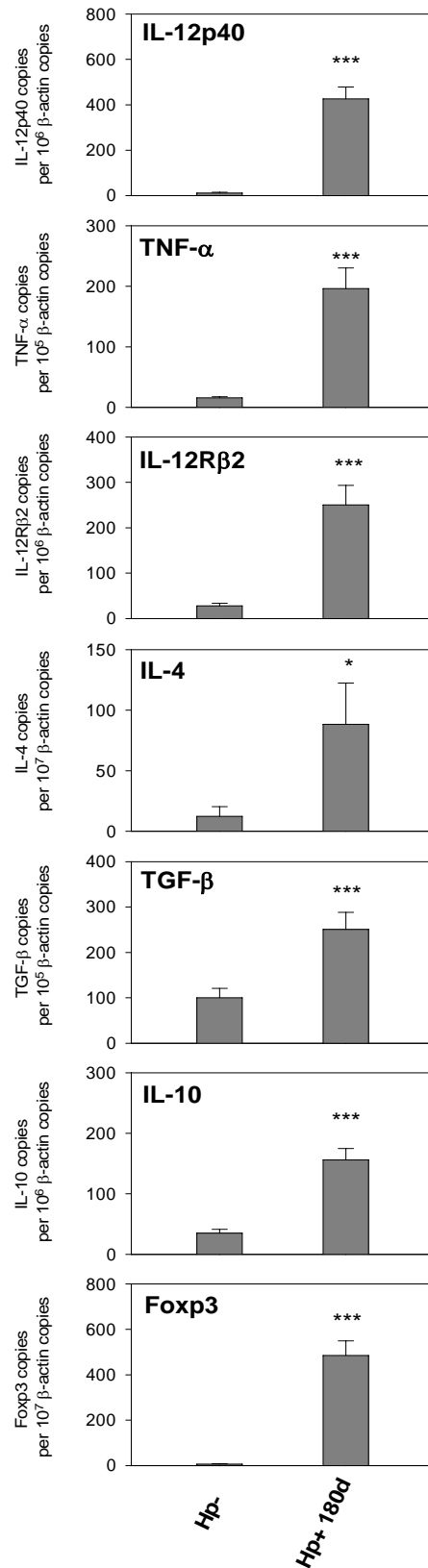
**Abbildung 7: Neutrophile Granulozyten in der mit *H. pylori* chronisch infizierten murinen Magenschleimhaut.** Chloracetatesterase-Färbung einer chronisch infizierten murinen Magenschleimhaut. (A) wenige Neutrophile Granulozyten in der Mukosa. Bei den in der Submukosa angefärbten Zellen handelt es sich um Mastzellen. (B) Neutrophiler Granulozyt (Pfeil) in Gegenüberstellung zu Mastzellen. (A) Vergrößerung 100x, (B) Vergrößerung 400x.

Wie aus Abbildung 7 ersichtlich wird, kommt es infolge der chronischen *H. pylori*-Infektion lediglich zu einer sehr schwachen Infiltration der Magenmukosa mit neutrophilen Granulozyten. Ein granulozytäres Infiltrat, das in irgendeiner Weise mit der granulozytären Entzündungsreaktion des Menschen vergleichbar wäre, ist praktisch nicht vorhanden.

### 3.2.6 Die mukosale Expression von Zytokinen und T-Zell-Markern im murinen Magen

Die chronische Infektion der Maus mit *H. pylori* verursacht eine chronisch aktive Entzündung der Magenschleimhaut. Das entzündliche Infiltrat besteht hauptsächlich aus B- und T-Lymphozyten und zeigt ein transmurales Verteilungsmuster. Um regulatorische, pro- und anti-inflammatorische Effektorzellantworten genauer zu untersuchen, wurden spezifische Marker dieser Effektorzellantworten mittels TaqMan RT-PCR in der infizierten Magenmukosa quantifiziert und deren Expression mit nicht infizierten Mäusen verglichen. Als Marker einer Th1-Antwort wurden IL12p40, IL12R $\beta$  und TNF- $\alpha$  bestimmt. Wie aus Abbildung 7 hervorgeht, infiltrieren hauptsächlich Th1-Zellen in die infizierte Mukosa, die Infiltration mit Th2-Zellen scheint sehr schwach zu sein. Schon in vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, daß es in der *H. pylori*-infizierten Mukosa im Rahmen einer stattfindenden Th1-Polarisierung zu einer vermehrten Ausschüttung von IFN- $\gamma$  kommt (Smythies et al., 2000). Unsere eigenen Untersuchungen bestätigten diese Beobachtung. Die Markergene für eine Th1-gewichtete Immunantwort IL-12R $\beta$ , IL-12p40 und TNF- $\alpha$  werden in der infizierten murinen Magenschleimhaut vermehrt exprimiert. Gleichzeitig werden nur geringe mRNA Kopienzahlen des Th2 Markergens IL-4 in der infizierten murinen Magenmukosa gefunden. Im Mittel finden sich in der infizierten Schleimhaut ca. 400 mRNA Kopien IL-12p40 pro eine Million  $\beta$ -Actin Kopien, dagegen sind ca. 8 mRNA Kopien IL-4 pro eine Millionen  $\beta$ -Actin Kopien vorhanden. Mechanismen der Immunregulation bzw. Immunsuppression wurden anhand spezifischer Marker regulatorischer T-Zellen näher evaluiert. Foxp3 ist ein spezifischer Marker CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Treg-Zellen, deren immunregulatorischer, supprimierender Effekt zellkontaktabhängig vermittelt wird. Zudem wurden ebenso antiinflammatorische Zytokine, wie IL-10 bzw. TGF- $\beta$  mittels TaqMan RT-PCR quantifiziert. In chronisch infizierten Mäusen war die Foxp3 Expression ca. 100 mal höher als in nicht infizierten Mäusen. Ähnlich wie Foxp3 werden auch IL-10 und TGF- $\beta$  in chronisch infizierten Mäusen vermehrt exprimiert, was für ein Zusammenspiel verschiedener regulatorischer Effektorzellantworten spricht.





**Abbildung 7: Gastrale Zytokinsekretion während der chronischen *H. pylori*-Infektion der Maus**

*C57BL/6*-Mäuse wurden mit *H. pylori* SSI-Stamm infiziert und nach 180 Tagen euthanasiert. Nicht infizierte Kontrollmäuse erhielten keimfreie Ernährung. Die gastrale Zytokinexpression wurde mittels real-time RT-PCR analysiert und auf  $\beta$ -Actin-Kopienzahlen normalisiert. Die Daten repräsentieren zwei identische Versuche mit fünf Mäusen pro Gruppe und sind dargestellt als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  SEM. Die *p* Werte wurden mit dem Students-*t*-Test berechnet. [(\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ ;]

### **3.3. Leukozytäre Subpopulationen in der humanen *H. pylori* infizierten Magenschleimhaut**

Infolge der Infektion mit *H. pylori* kommt es zur Aktivierung des angeborenen und des erworbenen Immunsystems. Es folgt eine Entzündungsreaktion, die durch das Einwandern von Entzündungszellen des innate und adaptiven Immunsystems in die Magenschleimhaut charakterisiert ist. Um das leukozytäre Entzündungsinfiltrat dieser beiden Anteile genauer zu charakterisieren, wurden die in die humane Magenmukosa eingewanderten leukozytären Subpopulationen näher charakterisiert. Humane Leukozyten wurden anhand ihrer CD-Oberflächenmarker immunhistochemisch gefärbt, wobei CD4 als Marker der T-Helfer-Zellen, CD8 als Marker der zytotoxischen T-Zellen fungierte. Der Transkriptionsfaktor Foxp3 diente als Marker der regulatorischen T-Zellen. Mittels CD56 und CD68 wurden natürliche Killerzellen bzw. Makrophagen charakterisiert. B-Lymphozyten wurden anhand ihrer Oberflächenantigens CD20 immunhistochemisch dargestellt. Tabelle 17 fasst die etablierten Färbeprotokolle für die einzelnen Oberflächenantigene zusammen.

Nach Entparaffinierung der Schnitte und Austestung der optimalen Vorgehensweise zur Antigendemaskierung erfolgte die Blockade der endogenen Peroxidase- bzw. Biotinaktivität. Nach dem Primärantikörper erfolgte die Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers und des Peroxidase-markierten Streptavidin-Komplexes (AB-Komplex) für jeweils 30 Minuten. Die jeweiligen Antigene wurden mit Diaminobenzidin (DAB) gefärbt, die Gegenfärbung des Gewebes erfolgte durch Hämalun.

**Tabelle 17:** Etablierte Färbeprotokolle für die Oberflächenantigene CD4, CD8, CD20, CD56, CD68 und für den Transkriptionsfaktor Foxp3

Antigen	S	Ag-Demaskierung	Blockierung	1. Antikörper	2. Antikörper
<b>CD4</b> T-Helfer-Zellen	P	20 min Citrat-Puffer (ph 6), Mikrowelle	5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 15 min A-B-Block 10 min	IgG1 Maus-anti-human 1:200, 60 min	biotinylierter Ratten-anti-Maus-Ak
<b>CD8</b> zytotox. T-Zellen	P	7 min Citratpuffer (ph 6), Dampfkochtopf	5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 15 min A-B-Block 10 min	IgG1 Maus-anti-human 1:50, 60 min	biotinylierter Ratten-anti-Maus-Ak
<b>Foxp3</b> regulat. T-Zellen	P	20 min EDTA-Puffer (ph 8), Mikrowelle	5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 15 min A-B-Block 10 min	IgG1 Maus-anti-human 1:40, 60 min	biotinylierter Ratten-anti-Maus-Ak
<b>CD68</b> Makrophagen	P	7 min Citratpuffer (ph 6), Dampfkochtopf	5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 15 min A-B-Block 10 min	IgG1 Maus-anti-human 1:1000, 60 min	biotinylierter Ratten-anti-Maus-Ak
<b>CD56</b> NK-Zellen	P	7 min Citratpuffer (ph 6), Dampfkochtopf	5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 15 min A-B-Block 10 min	IgG1 Maus-anti-human 1:50, 60 min	biotinylierter Ratten-anti-Maus-Ak
<b>CD20</b> B-Lymphozyten	P	7 min Citratpuffer (ph 6), Dampfkochtopf	5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 15 min A-B-Block 10 min	IgG1 Maus-anti-human 1:500, 60 min	biotinylierter Ratten-anti-Maus-Ak

Abkürzungen: S: Schnitt, P: Paraffin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Wasserstoffperoxid; Blockade der endogenen Peroxidase, A-B-Block: Avidin-Biotin-Blockierlösung; Blockierung des endogenen Biotins;

Desweiteren wurden Zytokine mittels TaqMan RT-PCR in der infizierten Magenmukosa quantifiziert und deren Expression mit nicht infizierten Individuen verglichen.

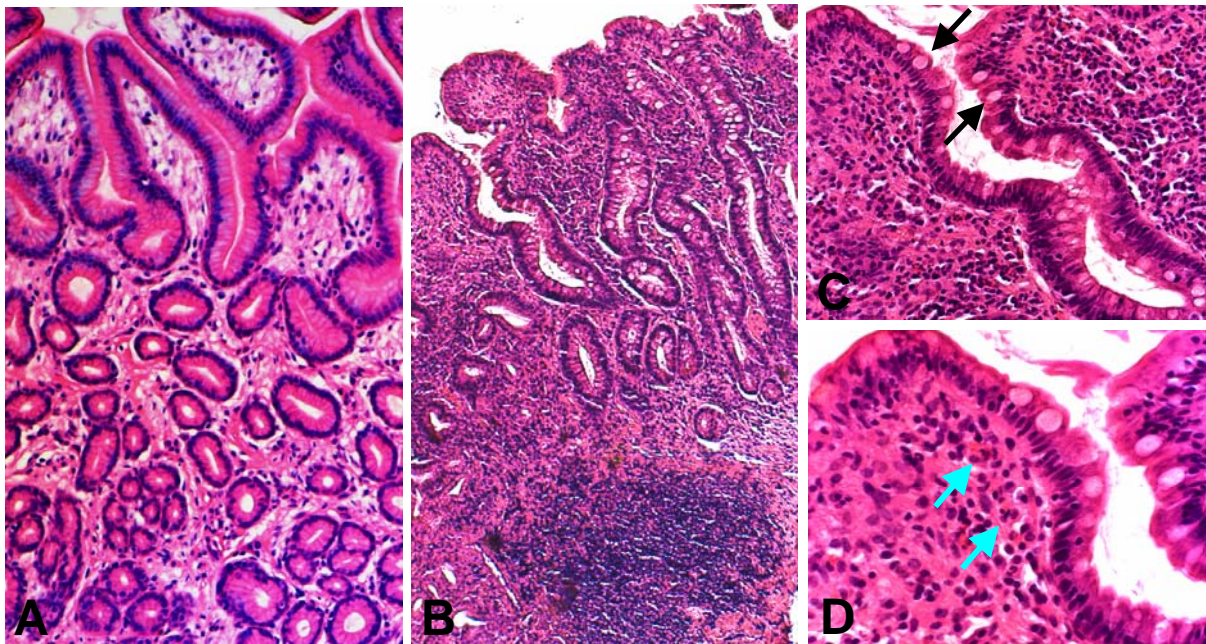
### 3.3.1 Die Zellen des innaten Immunsystems in der *H. pylori* infizierten Magenschleimhaut

Der erste Kontakt des Keimes mit Magenepithelzellen führt in erster Linie zur Induktion einer unspezifischen (innaten) Immunantwort. Die Adhäsion von *H. pylori* an die Epithelzelle induziert die Ausschüttung von chemoattraktiven Faktoren, wie beispielsweise Interleukin 8 (IL-8), die neutrophile Granulozyten an den Ort der Infektion rekrutieren. Desweiteren spielen

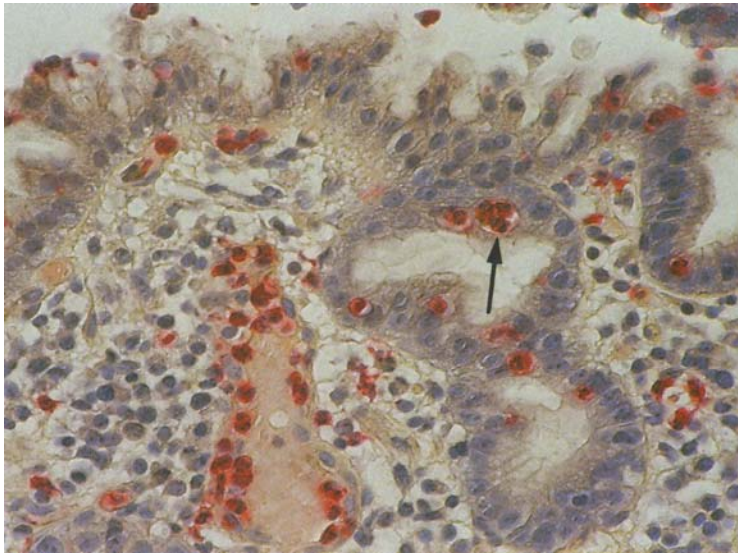
Makrophagen und natürliche Killerzellen bei der unspezifischen Immunantwort eine wichtige Rolle.

Abbildung 8 (A) zeigt anhand einer HE-Färbung die Schleimhaut eines nicht-infizierten im Vergleich zu einem chronisch infizierten Patienten (B). Während in der gesunden Mukosa nur vereinzelte Leukozyten zwischen den Drüsen vorhanden sind, findet sich in der Schleimhaut des infizierten Patienten ein ausgeprägtes leukozytäres Infiltrat. Ebenso lassen sich hier die Langzeitfolgen einer chronischen Infektion beobachten. In der Übersichtsabbildung 8 (B) lässt sich eine deutliche Atrophie mit Rarefizierung der Drüsen sowie intestinale Metaplasie beobachten. Bei weiterer Vergrößerung (C) sind die für intestinale Metaplasie charakteristischen Becherzellen (schwarze Pfeile) gut zu erkennen.

**Neutrophile Granulozyten** sind in der gesunden Magenmukosa nur vereinzelt vorhanden, dagegen finden sich diese Zellen in der infizierten Magenmukosa nahezu ubiquitär. Abbildung 8 (D) zeigt infiltrierende neutrophile Granulozyten (hellblaue Pfeile) in der infizierten Magenschleimhaut. Um das granulozytäre Infiltrat anschaulicher darzustellen, wurde die spezifische Esterase der neutrophilen Granulozyten in der chronisch infizierten Mukosa mittels einer Chloracetatesterase-Färbung dargestellt (Abbildung 9).

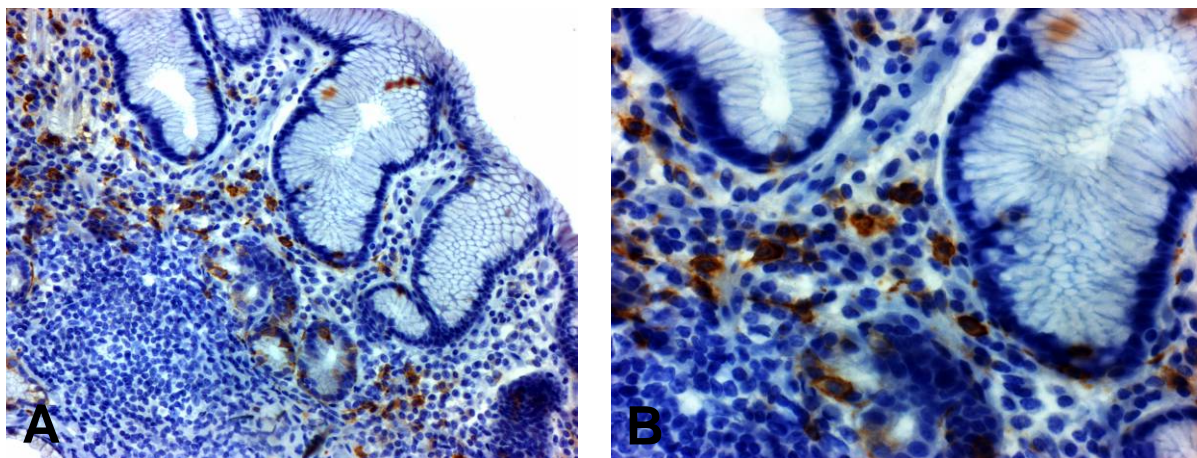


**Abbildung 8: Humane Magenschleimhaut eines nicht-infizierten und eines chronisch mit *H. pylori* infizierten Patienten, HE Färbung** (A) Nicht-infizierte Magenschleimhaut; Vergrößerung 100x, (B) chronisch mit *H. pylori* infizierte Magenschleimhaut; Vergrößerung 50x, (C) chronisch mit *H. pylori* infizierte Magenschleimhaut. Becherzellen sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet; Vergrößerung 200x, (D) chronisch mit *H. pylori* infizierte Magenschleimhaut. Neutrophile Granulozyten sind durch hellblaue Pfeile gekennzeichnet; Vergrößerung 400x



*Abbildung 9: Neutrophile Granulozyten in der humanen Magenschleimhaut eines chronisch mit *H. pylori* infizierten Patienten, Chloracetatesterase-Färbung; Die Neutrophilen sind durch das Reaktionsprodukt der Enzymhistochemie rot dargestellt, der Pfeil markiert mehrere einzelne, im Epithel gelegene neutrophile Granulozyten. Vergrößerung 400x.*

**Natürliche Killer-Zellen**, die auf eindringende Pathogene schnell reagieren können, sind ein wichtiger Teil der angeborenen (innaten) Immunantwort. Durch die Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  nehmen die NK-Zellen auch eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der adaptiven Immunantwort ein. NK-Zellen wurden mittels ihres CD-Oberflächenmarkers CD56 nach immunhistochemischer Methodik gefärbt. In Abbildung 10 sind die NK-Zellen dargestellt. Die Zellen infiltrieren alle Schichten der chronisch infizierten Magenmukosa.



*Abbildung 10: CD56<sup>+</sup> NK-Zellen in der *H. pylori* infizierten humanen Magenschleimhaut. (A) Vergrößerung 200x, (B) Vergrößerung 400x*

**Makrophagen** sind als phagozytierende Zellen ein ebenfalls wichtiger Bestandteil des innaten Immunsystems. Sie nehmen eine Schlüsselrolle als Effektorzellen des zellvermittelten Immunsystems ein, da sie durch Antikörper markierte Keime phagozytieren und eliminieren (Janeway, 2005). Die Makrophagen wurden anhand ihres Oberflächenmarkers CD68 immunhistochemisch gefärbt. Abbildung 11 zeigt CD68<sup>+</sup> Makrophagen, die infolge der chronischen *H. pylori*-Infektion in die Magenschleimhaut des Patienten eingewandert sind. Ähnlich zum Infiltrationsmuster in der murinen Mukosa, ist das Ausmaß der Schleimhautinfiltration mit Makrophagen nur schwach ausgeprägt.

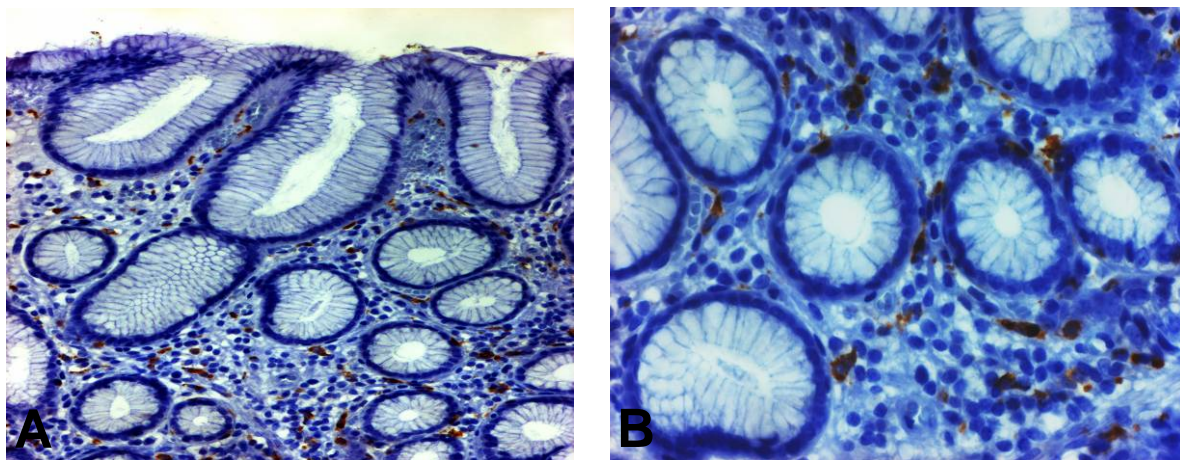


Abbildung 11: CD68<sup>+</sup> Makrophagen in der *H. pylori* infizierten humanen Magenschleimhaut. (A) Vergrößerung 200x, (B) Vergrößerung 400x

### 3.3.2 Die Zellen des adaptiven Immunsystems in der *H. pylori* infizierten Magenschleimhaut

Die adaptive Immunantwort auf die *H. pylori*-Infektion ist von einer zellvermittelten und einer humoralen Komponente geprägt.

T-Lymphozyten, die Effektorzellen der zellvermittelten, adaptiven Immunantwort, kann man anhand ihrer auf der Zelloberfläche exprimierten Korezeptoren in verschiedene Subpopulationen einteilen. Zellen, die den CD8-Korezeptor exprimieren (CD8<sup>+</sup> T-Zellen), erkennen Fremdpeptide, die über MHC-I-Moleküle präsentiert werden, und differenzieren zu zytotoxischen Effektorzellen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkennen Fremdpeptide, die mittels MHC-II-

Moleküle präsentiert werden. Sie werden als T-Helfer-Zellen bezeichnet. Die **T-Helfer Zellen** wurden anhand ihres Oberflächenantigens CD4 gefärbt. Abbildung 12 zeigt CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die infolge der chronischen *H. pylori*-Infektion in die Magenschleimhaut des Patienten eingewandert sind. Eine deutliche Infiltration der T-Helfer Zellen in die Mukosa lässt sich beobachten, sie sind in allen Schichten der Schleimhaut vorhanden (transmurale Infiltration).

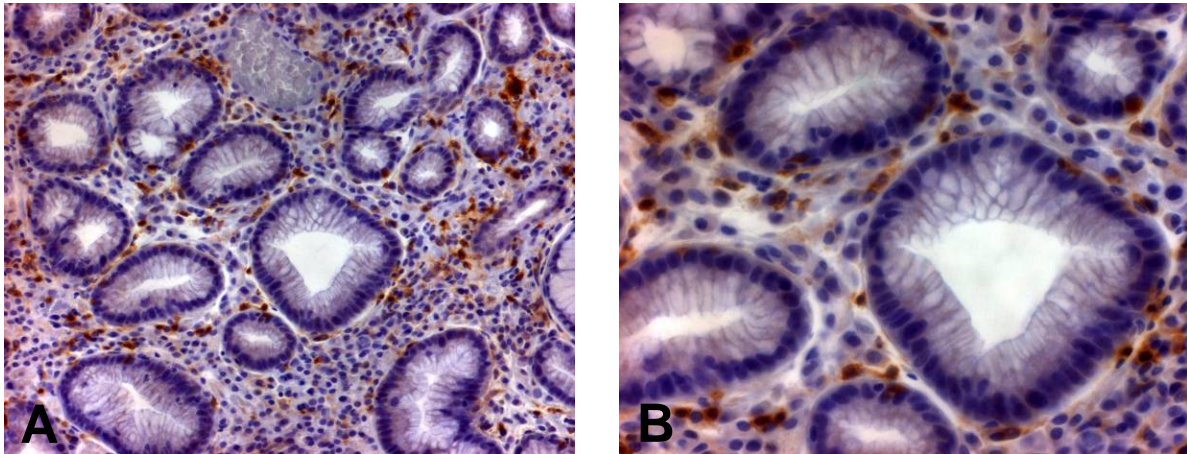
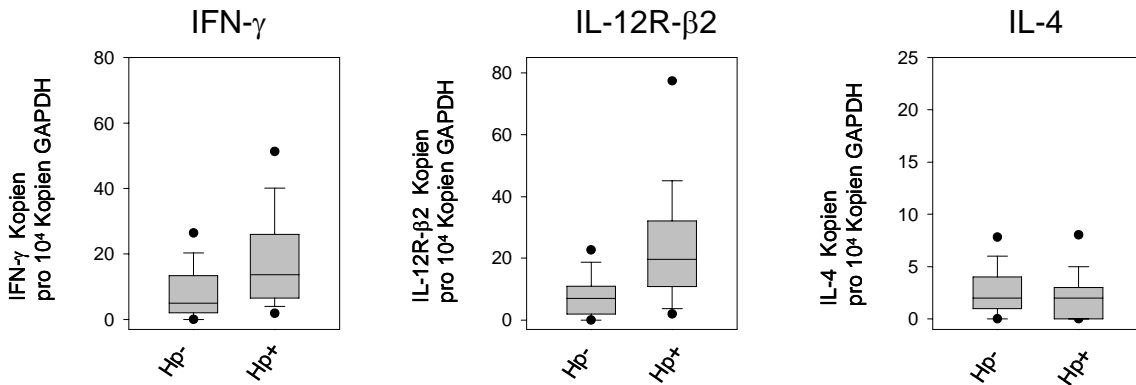


Abbildung 12: CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der *H. pylori* infizierten humanen Magenschleimhaut (A) Vergrößerung 200x, (B) Vergrößerung 400x

T-Helfer Zellen können sich in Th1-, Th2-Zellen oder regulatorische T-Zellen differenzieren (Constant und Bottomly, 1997; O'Garra, 1998; Lane, 2000; Liu et al., 2001; Salomon und Bluestone, 2001; Sperling und Bluestone, 2001).

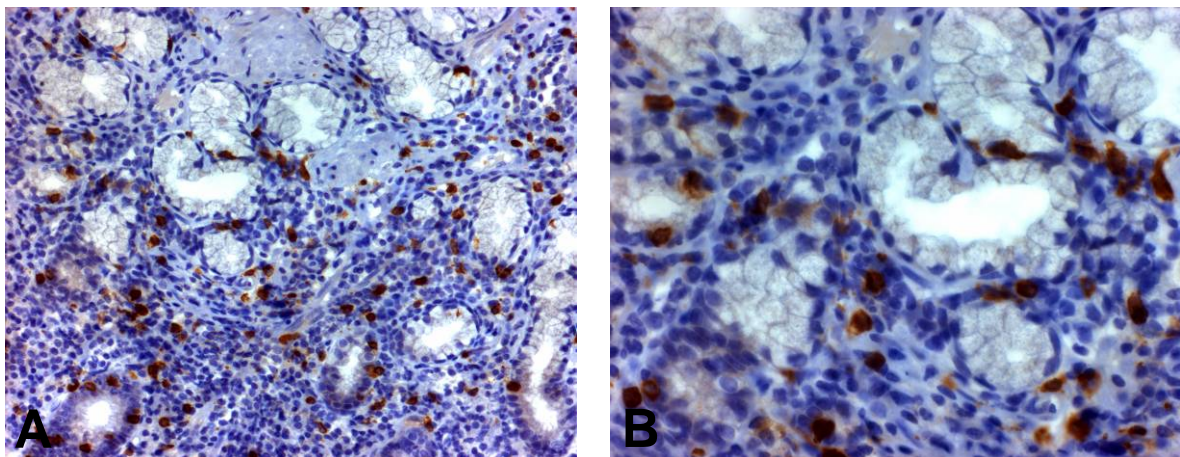
Um die Polarisierung der T-Helfer-Zellantwort genauer zu charakterisieren, wurden spezifische Marker mittels Genexpressionsanalyse in der mit *H. pylori* infizierten Magenmukosa von 65 Patienten quantifiziert und mit nicht infizierten Patienten (n=43) verglichen. Der spezifischste Marker von Th1-Zellen ist die IL-12 Rezeptor  $\beta$ 2-Kette (IL-12R $\beta$ 2). Ein weiterer Marker für die Th1-Antwort ist das von den Th1-Zellen gebildete IFN- $\gamma$ . Als Indikator für eine Th2-Polarisierung der Immunantwort wurde die IL-4 Genexpression in der Magenschleimhaut der infizierten Patienten gemessen. Abbildung 13 zeigt die Zytokinexpressionsprofile in der infizierten Magenschleimhaut im Vergleich zu nicht infizierten Patienten. Die Marker für eine Th1-Polarisierung der Immunantwort werden in der infizierten Schleimhaut vermehrt exprimiert. Beispielsweise wird im Gegensatz zur gesunden Magenschleimhaut im Mittel etwa doppelt so viel IFN- $\gamma$  und dreimal mehr IL-12-R $\beta$ 2 in der infizierten Schleimhaut exprimiert. Dagegen ist die Expression von IL-4 in nicht-infizierter bzw. in infizierter Schleimhaut nur in äußerst geringen Mengen oder überhaupt nicht

nachweisbar. Die lokale gastrale Helferzellantwort während der *H. pylori*-Infektion zeigt also eine Th1-Ausrichtung.



**Abbildung 13: Gastrale Zytokinsekretion in der *H. pylori* infizierten und nicht infizierten humanen Magenschleimhaut.** Die gastrale Zytokinexpression wurde mittels real-time RT-PCR analysiert und auf GAPDH-Kopienzahlen normalisiert. Hp- n=43, Hp+ n=65. Die Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen bei IFN- $\gamma$  und IL-12- $\beta$ 2 waren signifikant ( $p < 0,001$ ). Die p-Werte wurden mit dem Rank-Sum Test berechnet. Der Unterschied in der IL-4 Expression zwischen der Hp+ und Hp- Patientengruppe war nicht signifikant ( $p=0,28$ )

**Zytotoxische T-Zellen** erkennen körpereigene Zellen, die mit Viren oder intrazellulären Bakterien infiziert sind. Die immunhistochemische Färbung der zytotoxischen T-Zellen erfolgte mittels ihres CD8 Oberflächenantigens und ist in Abbildung 14 dargestellt. Man findet ebenfalls eine deutliche Infiltration der zytotoxischen T-Zellen in die humane Mukosa (transmurale Infiltration).



**Abbildung 14: CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der *H. pylori* infizierten humanen Magenschleimhaut (A) Vergrößerung 200x, (B) Vergrößerung 400x**



Die humorale Komponente der adaptiven Immunantwort auf die Infektion mit *H. pylori* wird durch **B-Lymphozyten** vermittelt (Kosunen et al., 1992). Die Ausbildung von kleineren Lymphfollikeln ist geradezu charakteristisch für eine *H. pylori*-Infektion (Ernst et al., 2001). Die immunhistochemische Färbung der B-Lymphozyten erfolgte anhand ihres CD20 Oberflächenmoleküls. Abbildung 15 zeigt CD20<sup>+</sup> B-Lymphozyten, die infolge der chronischen Infektion mit *H. pylori* in die humane Magenmukosa eingewandert sind. Die B-Lymphozyten infiltrieren die gesamte Schleimhaut. Die Ausbildung von B-Zell-Clustern kann ebenfalls beobachtet werden.

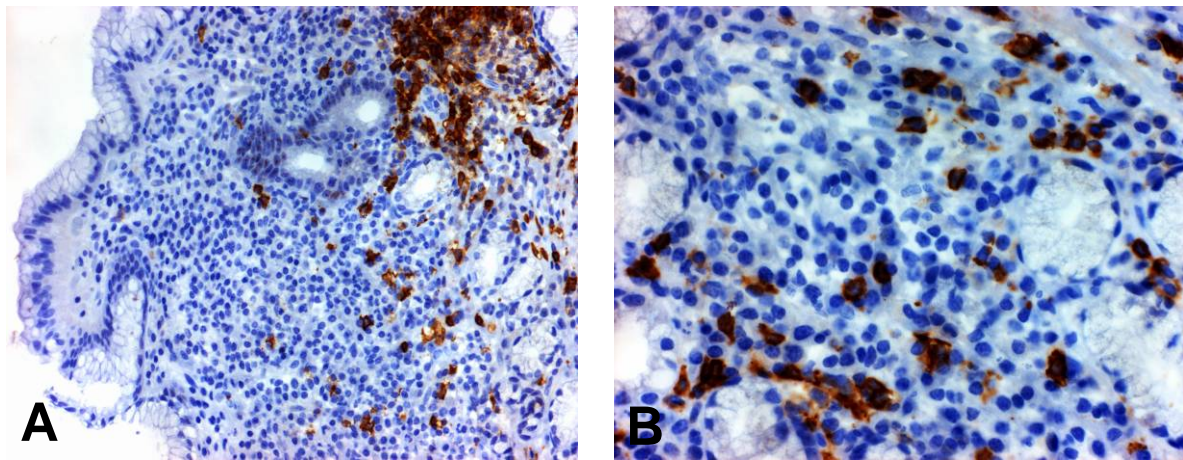
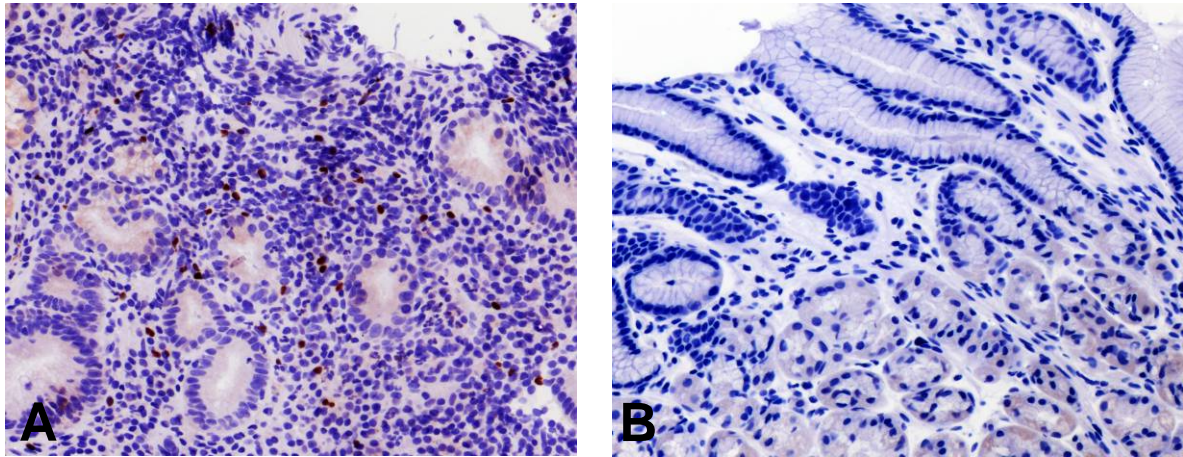


Abbildung 15: CD20<sup>+</sup> B-Lymphozyten in der *H. pylori* infizierten humanen Magenschleimhaut (A) Vergrößerung 200x, (B) Vergrößerung 400x

### 3.3.3 Die regulatorische T-Zell Antwort in der *H. pylori* infizierten Magenschleimhaut

Unter den CD4<sup>+</sup> T-Zellen existieren mehrere Untergruppen mit regulatorischen Eigenschaften, darunter die regulatorischen Tr1-Zellen, die Th3-Zellen und die CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Treg-Zellen (Thompson und Powrie, 2004). Diese Zellen sind in der Lage, die Immunantwort auf eindringende Pathogene zu supprimieren und damit zu modulieren. Die kürzliche Entdeckung des Transkriptionsfaktors Foxp3 als sehr spezifischen Marker von CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003) ermöglicht einen direkten Nachweis dieses Zelltyps in der Magenmukosa. Die CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen wurden anhand des Transkriptionsfaktors Foxp3 immunhistochemisch gefärbt. Foxp3 ist ein spezifischer Marker von CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Treg-Zellen, deren immunregulatorischer,

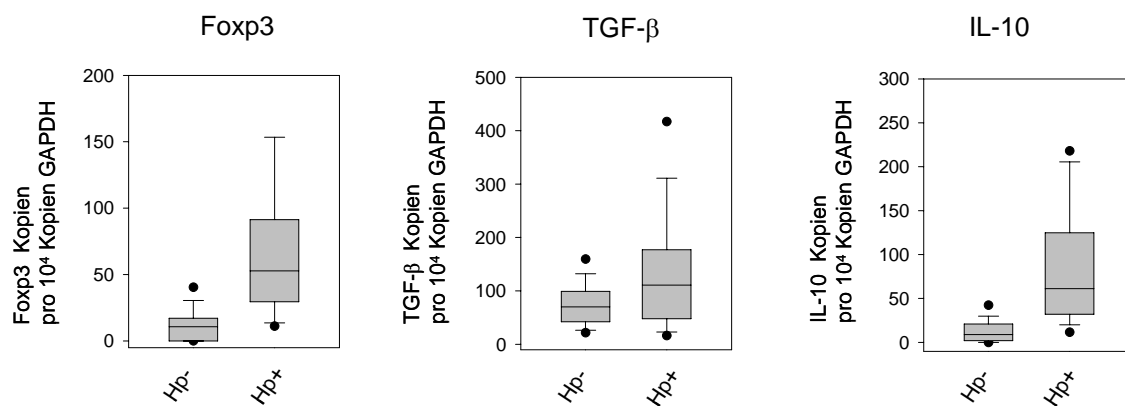
suppressierender Effekt zellkontaktabhängig vermittelt wird. Abbildung 16 (A) zeigt in die chronisch infizierte Magenmukosa eingewanderte regulatorische T-Zellen. Im Vergleich dazu können in der nicht mit *H. pylori* infizierten humanen Mukosa (B) keine regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden.



**Abbildung 16: Regulatorische T-Lymphozyten in der chronisch infizierten und nicht infizierten humanen Magenschleimhaut. (A) Foxp3 Färbung einer chronisch mit *H. pylori* infizierten Mukosa. Vergrößerung 200x. (B) Foxp3 Färbung einer nicht infizierten Mukosa. Vergrößerung 200x.**

Im Einklang hiermit ist in der chronisch infizierten Magenschleimhaut die Foxp3 Expression höher als in der nicht infizierten Mukosa. Abbildung 17 zeigt die mittels Taqman RT-PCR quantifizierte Foxp3 Expression in der Mukosa infizierter (n=65) und nicht-infizierter Patienten (n=43). Vergleicht man beide Patientengruppen, so wird Foxp3 bei infizierten Patienten etwa 50 mal stärker exprimiert als bei nicht infizierten Patienten.

Zur weiteren Charakterisierung von anti-inflammatorischen Prozessen in der *H. pylori* infizierten Magenschleimhaut wurde die Expression der Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  in gleicher Weise quantifiziert. Abbildung 17 zeigt, daß IL-10 und TGF- $\beta$  infolge der *H. pylori*-Infektion vermehrt exprimiert werden.



**Abbildung 17: Expression regulatorischer Marker in der *H. pylori* infizierten und nicht-infizierten humanen Magenschleimhaut.** Die Foxp3-, TGF-β- und IL-10-Expression wurde mittels real-time RT-PCR analysiert und auf 10<sup>5</sup> GAPDH-Kopienzahlen normalisiert. Hp- n=43, Hp+ n=65. Die p-Werte wurden mit dem Rank-Sum Test berechnet.  $p < 0,001$

Neben dem Vorhandensein von pro-inflammatorischen Anteilen in der Immunantwort lässt sich also auch eine anti-inflammatorische Komponente feststellen. Die vermehrte Infiltration mit Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen wie auch die Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen spricht für ein Zusammenspiel verschiedener regulatorischer Effektorzellantworten bei der regulatorischen Immunantwort auf *H. pylori*.

### 3.4 Abhängigkeit der leukozytären Subpopulationen und der Zytokin-/Chemokin-Expression vom *H. pylori* Stammtyp

*H. pylori* Stämme, welche die sogenannte *cag*-Pathogenitätsinsel (*cagPAI*) besitzen, erzeugen zumeist eine stärkere Entzündungsreaktion als *cagPAI*-negative Stämme. Der Einfluss des *H. pylori*-Stammtypes auf die unterschiedlichen Bestandteile der innate und adaptiven Immunität konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden.

Um dies zu untersuchen, wurde bei 104 Patienten der bakterielle Stammtyp (in Bezug auf die *cagPAI*), sowie das Infiltrationsausmaß leukozytärer Subpopulationen in die Magenmukosa bestimmt. 104 Patienten (48 Männer und 56 Frauen) wurden in die Studie eingeschlossen.

Nach DNA-Isolierung aus Biopsiematerial wurde das Vorhandensein von *cagA*, eines Markergens der Pathogenitätsinsel, mittels PCR bestimmt. In dieser Population waren 62 Patienten (29 Männer und 33 Frauen) mit einem *cagA*-positiven *H. pylori*-Stamm infiziert,

was einen Anteil von 60 % ausmacht. Die restlichen 40 % der Population, 42 Patienten (19 Männer und 23 Frauen) waren mit einem *cagA*-negativen *H. pylori*-Stamm infiziert.

Die jeweiligen Effektorzellen der innaten, adaptiven und regulatorischen Immunantworten wurden durch immunhistochemische Färbungen charakterisiert. Diese Zellen wurden unter dem Mikroskop mit einer 1000-fachen Vergrößerung in sechs repräsentativen Gesichtsfeldern ausgezählt. Anschließend wurde die Korrelation der entsprechenden Leukozytenzahl mit dem infizierenden *H. pylori* Stamm untersucht. Desweiteren wurde der Einfluß des *H. pylori* Stammtypes auf Zytokin/Chemokin Antworten der einzelnen Anteile der Immunantwort quantifiziert.

### **3.4.1 Die innate Immunantwort in Abhängigkeit vom infizierenden *H. pylori* Stammtyp**

Um den Einfluß der *cagPAI* auf die Entstehung und das Ausmaß der unspezifischen Immunantwort zu untersuchen, wurde die Stärke der **granulozytären Infiltration** in Abhängigkeit vom infizierenden *H. pylori* Stammtyp evaluiert. Die granulozytäre Entzündungsreaktion wurde an Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitten beurteilt. Eine Gastritis-Klassifizierung erfolgte entsprechend der "updated" Sydney-Klassifikation (Dixon et al., 1996). Sie beinhaltet eine Kombination von topographischen, morphologischen und ätiologischen Informationen und klassifiziert diese Veränderungen anhand endoskopischer und histologischer Kriterien. Hierbei können einerseits die verschiedenen Grade der granulozytären und lymphozytären Infiltration erfasst werden. Das Ausmaß der granulozytären Infiltration (G0 keine, G1 milde, G2 mäßige, G3 ausgeprägte granulozytäre Infiltration) bestimmt die Aktivität der Gastritis.

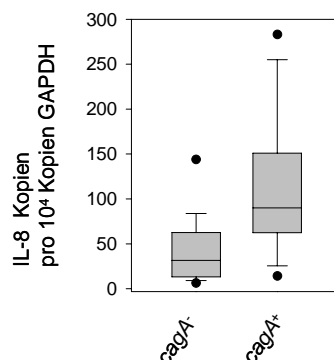
Um den Einfluss der *cagPAI* auf die Pathogenese der neutrophilen Gastritis zu bestimmen, wurde die Präsenz von verschiedenen Stammtypen mit dem Vorhandensein unterschiedlicher Grade der granulozytären Infiltration im Antrum korreliert. Tabelle 18 fasst die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammen.

	G0	G1	G2	G3	p Wert
	n	n	n	n	
<b><i>CagA</i>-</b>					
n=42	4	7	31	0	
<b><i>cagA</i><sup>+</sup></b>					0,017
n=62	2	7	40	13	

**Tabelle 18: Stärke der antralen granulozytären Infiltration bei Patienten mit unterschiedlichen *H. pylori* Stämmen (G0, fehlende; G1, milde; G2, mäßige; G3, starke granulozytäre Infiltration). Der Unterschied zwischen beiden Patientengruppen war signifikant,  $p = 0,017$ ;  $p$  Wert wurde mit Hilfe eines Mann-Whitney U Tests errechnet.**

Wie aus Tabelle 18 ersichtlich wird, hatten die 42 Patienten, die mit einem *cagA*-negativen *H. pylori*-Stamm infiziert waren, vor allem niedrige bis moderate Gastritisgrade. Die 62 Patienten, die mit einem *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori* -Stamm infiziert waren, hatten höhere Gastritisgrade. Der Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen war signifikant. Dies zeigt die bedeutende Rolle der *cagPAI* für die Entstehung der granulozytären Infiltration in der Magenschleimhaut.

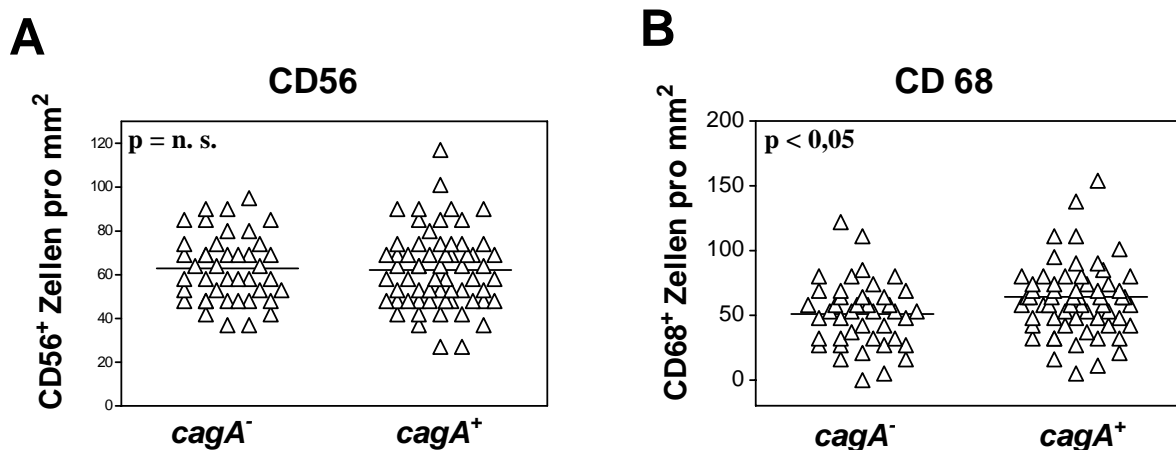
Da das Chemokin IL-8 eines der wichtigsten Vermittler der *H. pylori* induzierten granulozytären Infiltration ist (Baggiolini et al., 1989; Yamaoka et al., 1996), wurde die Expression mittels TaqMan RT-PCR in der Magenschleimhaut quantifiziert und mit den verschiedenen infizierenden Stammtypen korreliert. Abbildung 18 zeigt die IL-8 Expression in einer Untergruppe von Patienten (n=65) in Abhängigkeit vom infizierenden *H. pylori* Stammtyp.



**Abbildung 18: IL-8 Expression in der humanen Magenmukosa in Abhängigkeit vom infizierenden *H. pylori* Stammtyp. Die gastrale IL-8 Expression wurde mittels TaqMan RT-PCR analysiert und auf 10<sup>4</sup> GAPDH-Kopienzahlen normalisiert. *cagA*<sup>-</sup>: *cagA*-negative Patientengruppe n=32, *cagA*<sup>+</sup>: *cagA*-positive Patientengruppe n=33; Der Unterschied zwischen beiden Patientengruppen war signifikant,  $p < 0,001$ ; Der  $p$ -Wert wurde mittels eines Mann-Whitney U Tests errechnet.**

Wie aus der Abbildung 18 ersichtlich wird, ist die gastrale IL-8 Expression bei Patienten, die mit *cagA*<sup>-</sup> Stämmen infiziert sind, gering. Die Infektion mit *cagA*-positiven Stämmen ist mit deutlich erhöhter IL-8 Expression assoziiert. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind hochsignifikant ( $p < 0,001$ ; Mann-Whitney *U* Test).

Die Infiltrationsstärke der **natürlichen Killerzellen** und **Makrophagen**, weitere Bestandteile der innaten Immunantwort, wurde ebenfalls mit dem infizierenden Stammtyp korreliert. Nach immunhistochemischer Charakterisierung der CD56<sup>+</sup> natürlichen Killerzellen und der CD68<sup>+</sup> Makrophagen, wurde die Anzahl der jeweiligen in der Magenschleimhaut vorkommenden Zellen mit dem infizierenden Stammtyp korreliert. Abbildung 19 A zeigt die Anzahl der natürlichen Killerzellen, Abbildung 19 B die Anzahl der Makrophagen in Abhängigkeit vom infizierenden Stammtyp.



**Abbildung 19:** Anzahl der CD56<sup>+</sup> NK-Zellen und der CD68<sup>+</sup> Makrophagen pro mm<sup>2</sup> in der humanen Magenmukosa in Abhängigkeit vom infizierenden *H. pylori* Stammtyp. Die Zellen wurden immunhistochemisch charakterisiert und unter dem Mikroskop mit einer 1000-fachen Vergrößerung in sechs repräsentativen Gesichtsfeldern ausgezählt. Anschließend wurde die Anzahl pro mm<sup>2</sup> ausgerechnet. *cagA*<sup>-</sup>: *cagA*-negative Patientengruppe,  $n = 42$ ; *cagA*<sup>+</sup>: *cagA*-positive Patientengruppe,  $n = 62$ ;

Abbildung 19 (A) zeigt, daß die NK-Zell-Infiltrationsstärke nicht vom infizierenden *H. pylori* Stammtyp abhängt. Der Unterschied zwischen der *cagA*<sup>+</sup> und der *cagA*<sup>-</sup> Patientengruppen war nicht signifikant ( $p = 0,835$ ; Mann-Whitney *U* Test). Aus Abbildung 19 (B) wird ersichtlich, daß das Ausmaß der Makrophageninfiltration vom infizierenden *H. pylori* Stammtyp abhängt. Zwischen den beiden Patientengruppen besteht ein signifikanter Unterschied ( $p$ -Wert = 0,02; Mann-Whitney *U* Test). Eine Abhängigkeit der leukozytären Infiltrationsstärke vom

infizierenden Stammtyp ist also nur bei Makrophagen, nicht jedoch bei NK-Zellen zu beobachten.

### 3.4.2 Einfluss des *H. pylori*-Stammtyps auf die adaptive Immunantwort

Die gesunde Magenschleimhaut enthält nur sehr wenige mononukleäre Zellen (CD4/CD8 positive Lymphozyten, B-Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten, Mastzellen). Nach Infektion mit *H. pylori* kommt es neben einem granulozytären Infiltrat auch zur Infiltration mononukleärer Zellen. Die Sydney Klassifikation unterscheidet verschiedene Grade der lymphozytären Infiltration (L0 keine, L1 milde, L2 mäßige, L3 ausgeprägte lymphozytäre Infiltration). Das mononukleäre Infiltrat verschwindet nach Eradikation nur sehr langsam, wohingegen die Granulozyten bereits wenige Tage nach Beginn der Eradikation nicht mehr nachweisbar sind (Witteman et al., 1995). Um die Chronizität der Gastritis abzuschätzen, wurden die verschiedenen Grade der mononukleären Infiltration bei 104 mit *H. pylori* infizierten Patienten im Antrum erfasst. Anschließend wurde der Einfluss der *cagPAI* auf die Stärke der mononukleären Infiltration bestimmt, indem man die Präsenz von verschiedenen Stammtypen mit dem Vorhandensein unterschiedlicher Grade der mononukleären Infiltration korrelierte. Tabelle 19 fasst die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammen.

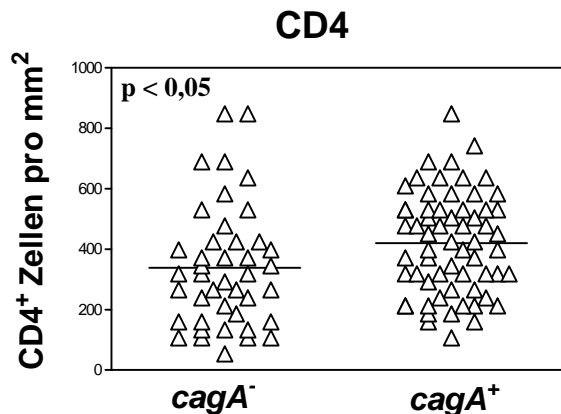
	L0	L1	L2	L3	p Wert
	n	n	n	n	
<b>CagA-</b>					
n=42	1	15	25	1	
<b>cagA+</b>					0,001
n=62	0	8	38	16	

**Tabelle 19:** Stärke der antralen mononukleären Infiltration bei Patienten mit unterschiedlichen *H. pylori* Stämmen (L0, fehlende; L1, milde; L2, mäßige; L3, ausgeprägte mononukleäre Infiltration).  $p < 0,001$ ; *p*-Wert wurden mit Hilfe eines Mann-Whitney U Tests errechnet.

Aus Tabelle 19 wird ersichtlich, daß die Patienten, die mit einem *cagA*-negativen *H. pylori*-Stamm infiziert waren, vor allem milde bis mäßiggradige mononukleäre Infiltration der Magenschleimhaut aufwiesen. Patienten, die mit einem *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori* Stamm infiziert waren hatten zumeist eine stärkere mononukleäre Infiltration. Der Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen war signifikant ( $p < 0,001$ ; Mann-Whitney Rank Sum Test).

### 3.4.2.1 Einfluss des *H. pylori* Stammtyps auf die T-Helfer Zell Antwort

Um den Einfluss der *cagPAI* auf die Infiltration der Magenschleimhaut mit **T-Helfer Zellen** zu untersuchen, wurden die Anzahl der CD4<sup>+</sup> Zellen pro mm<sup>2</sup> bestimmt und mit dem *cagA*-Status korreliert.



**Abbildung 20:** Anzahl der CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten pro mm<sup>2</sup> in der humanen Magenmukosa in Abhängigkeit vom infizierenden *H. pylori* Stammtyp. Die Zellen wurden immunhistochemisch charakterisiert und unter dem Mikroskop mit einer 1000-fachen Vergrößerung in sechs repräsentativen Gesichtsfeldern ausgezählt. Anschließend wurde die Zellanzahl pro mm<sup>2</sup> ausgerechnet. *cagA*<sup>-</sup>: *cagA*-negative Patientengruppe, n = 42; *cagA*<sup>+</sup>: *cagA*-positive Patientengruppe, n = 62;

Abbildung 20 zeigt die durchschnittliche Anzahl von CD4<sup>+</sup> Zellen pro mm<sup>2</sup> bei der *cagA*-positiven und *cagA*-negativen Patientengruppe. Wie aus Abbildung 20 ersichtlich wird, befinden sich bei der Patientengruppe, die mit einem *cagA*-positiven *H. pylori* Stamm infiziert sind, deutlich mehr T-Helfer-Zellen in der Magenschleimhaut als bei denen, die mit einem *cagA*-negativen Stamm infiziert sind. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war signifikant (p-Wert = 0,027). Der p-Wert wurde mit einem Mann-Whitney Rank Sum Test ausgerechnet.

### 3.4.2.2 Einfluss des *H. pylori* Stammtyps auf die zytotoxischen T-Zellen

Als weiterer Bestandteil der adaptiven Immunantwort wurde die Anzahl der in der Magenschleimhaut vorkommenden CD8<sup>+</sup> **zytotoxischen T-Zellen** mit dem infizierenden Stammtyp korreliert. Wie aus Abbildung 22 ersichtlich wird, besteht zwischen den beiden Patientengruppen, die mit verschiedenen *H. pylori*-Stämmen infiziert sind, kein signifikanter Unterschied (p-Wert = 0,567; Mann-Whitney U Test).



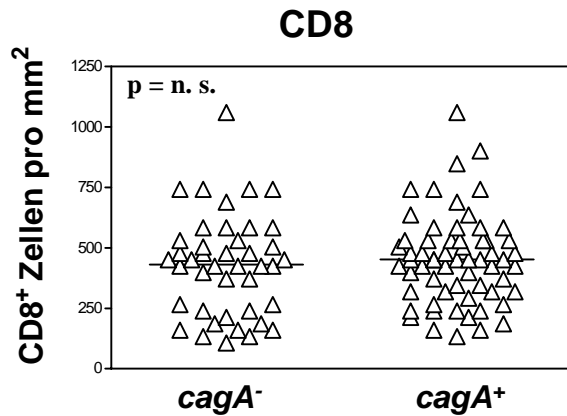


Abbildung 22: Anzahl der  $CD8^+$ T-Lymphozyten pro  $mm^2$  in der humanen Magenmukosa in Abhängigkeit vom infizierenden *H. pylori* Stammtyp.  $p = 0,567$ ,  $p$ -Wert wurde mittels eines Mann-Whitney U Tests errechnet.  $cagA^-$ :  $cagA$ -negative Patientengruppe,  $n = 42$ ;  $cagA^+$ :  $cagA$ -positive Patientengruppe,  $n = 62$ ;

### 3.4.2.3 Einfluss des *H. pylori* Stammtyps auf die B-Zell-Antwort

Die in der infizierten Magenschleimhaut vorhandenen **B-Lymphozyten** wurden ausgezählt und mit dem infizierenden *H. pylori* Stamm korreliert. Das nestartige Vorkommen der B-Zellen in solchen Lymphfollikeln machte eine genaue Auszählung der einzelnen B-Lymphozyten unmöglich. Aus diesem Grund wurden nur klar abgrenzbare  $CD20^+$  Zellen (außerhalb von Lymphfollikeln) ausgezählt und als Maß für die Stärke der B-Zell-Infiltration gewertet. Es muss also berücksichtigt werden, daß die absolute Anzahl der in den Magenbiopsien vorkommenden B-Lymphozyten um ein Vielfaches höher ist. In Abbildung 23 ist die Anzahl der B-Lymphozyten pro  $mm^2$  mit dem *H. pylori* Stammtyp korreliert.

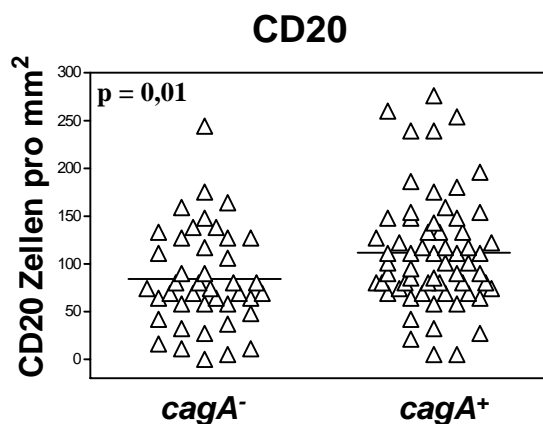
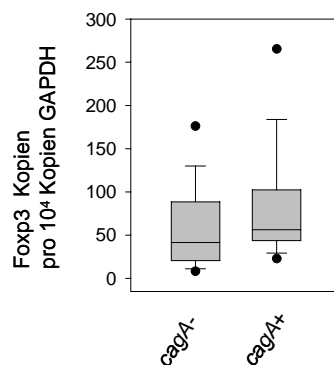


Abbildung 23: Anzahl der  $CD20^+$ B-Lymphozyten pro  $mm^2$  in der humanen Magenmukosa in Abhängigkeit vom infizierenden *H. pylori* Stammtyp.  $cagA^-$ :  $cagA$ -negative Patientengruppe,  $n = 42$ ;  $cagA^+$ :  $cagA$ -positive Patientengruppe,  $n = 62$ ; Der Unterschied zwischen beiden Patientengruppen war signifikant,  $p = 0,012$ ;  $p$ -Wert wurde mittels eines Mann-Whitney U Tests errechnet.

Wie Abbildung 23 zeigt, sind in der Magenschleimhaut von Patienten, die mit einem *cagA*<sup>+</sup> Stamm infiziert sind, deutlich mehr B-Lymphozyten vorhanden als in der Mukosa von Patienten, die mit einem *cagA*<sup>-</sup> Stamm infiziert sind. Der Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen war signifikant (p-Wert = 0,012; Mann-Whitney Rank Sum Test). Die Korrelation der Anzahl vorhandener B-Zell-Follikel mit den verschiedenen *H. pylori*-Stammtypen, ergab ein ähnliches Bild. Es waren mehr B-Zell-Follikel in den mit einem *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori* Stamm infizierten Magenbiopsien vorhanden, als in den mit *cagA*<sup>-</sup> Stämmen infizierten Magenbiopsien.

#### 3.4.2.4 Die regulatorische T-Zell Antwort in Abhängigkeit vom *H. pylori* Stammtyp

Um zu prüfen, ob die regulatorische T-Zell-Antwort abhängig vom infizierenden *H. pylori* Stamm ist, wurde die gastrale Foxp3 Expression bei Patienten, die mit unterschiedlichen *H. pylori* Stammtypen infiziert waren, bestimmt. Abbildung 24 zeigt die Foxp3 Expression in Abhängigkeit vom *H. pylori* Stammtyp.



**Abbildung 24:** Gastrale Expression des regulatorischen Markergens Foxp3 in der humanen Magenmukosa in Abhängigkeit vom infizierenden *H. pylori* Stammtyp: Foxp mRNA Kopienzahlen wurden auf 10<sup>4</sup> GAPDH Kopienzahlen normalisiert. *cagA*<sup>-</sup>: *cagA*-negative Patientengruppe n=32, *cagA*<sup>+</sup>: *cagA*-positive Patientengruppe n=33; Der Unterschied zwischen beiden Patientengruppen war signifikant, p < 0,028; Der p-Wert wurde mittels eines Mann-Whitney U Tests errechnet.

Aus Abbildung 24 wird ersichtlich, daß Foxp3 in der Patientengruppe, die mit *cagA*<sup>+</sup> Stämmen infiziert ist, deutlich stärker exprimiert wird, als in der mit *cagA*<sup>-</sup> Stämmen infizierten Patientengruppe. Der Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen war signifikant (p = 0,028; Mann-Whitney U Test). Die Infektion mit einem *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori* Stamm ruft also eine stärkere regulatorische T-Zell Antwort hervor als ein *cagA*-negativer Keim.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden die humane und murine Immunantwort auf die Infektion mit *H. pylori* charakterisiert und miteinander verglichen. Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluss der Virulenzfaktor *cagA* auf die einzelnen Anteile der Immunantwort besitzt.

### 4.1 Die unspezifische Immunantwort auf *H. pylori*

Die Adhäsion des Keimes an die Magenepithelzellen führt zunächst zur Induktion einer unspezifischen Immunantwort (Ernst et al., 2001). Die Effektorzellen der unspezifischen Immunantwort neutrophile Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen infiltrieren die Mukosa und nehmen als phagozytierende und zytotoxische Zellen eine bedeutende Rolle ein. Bei *H. pylori* handelt es sich um einen primär extrazellulären Keim (Israel und Peek, 2001), obwohl Studien ergeben haben, daß der Keim auch intrazellulär überlebt (Kwok et al., 2002; Semino-Mora et al., 2003). Um den Keim wirksam bekämpfen zu können, sind also phagozytierende Zellen von großer Bedeutung. Histologische Untersuchungen der infizierten Magenmukosa bestätigte eine deutliche Infiltration der Magenschleimhaut mit **neutrophilen Granulozyten** infolge der *H. pylori*-Infektion. Ebenso konnte gezeigt werden, daß **Makrophagen** in die infizierte Schleimhaut einwandern. Frühere Studien zeigten, daß *H. pylori* über Phagozytose eliminiert werden kann (Israel und Peek, 2001). Makrophagen sind wichtige Effektorzellen des innatens wie auch spezifischen Immunsystems. Sie eliminieren zum einen eindringende Pathogene. Zum anderen fördern sie die Entstehung der adaptiven Immunantwort durch Antigenpräsentation (Janeway, 2005). Angesichts dieser Schlüsselposition war die geringe Anzahl der in der infizierten Mukosa vorhandenen Makrophagen überraschend. *H. pylori* scheint mit der Funktion von Makrophagen zu interferieren und so seiner Eliminierung zu entgehen. Allen et al. zeigten in einer Studie, daß *H. pylori* seine eigene Aufnahme in Makrophagen verzögert und der intrazellulären Eliminierung durch Bildung von Megasomen entgehen kann (Allen, 2000; Allen, 2001). Diese Effekte werden durch das vacuolisierende Zytotoxin (VacA) vermittelt (Allen, 2000; Allen, 2001). Darüberhinaus kann *H. pylori* in Makrophagen die Produktion von reaktiven Stickstoff-Molekülen, eine effektive Waffe gegen mikrobielle Pathogene, durch kompetitive

Hemmung verhindern (Nathan und Shiloh, 2000; Gobert et al., 2001). Die Rolle der Makrophagen bleibt in der Bekämpfung von *H. pylori* unklar. Die geringe Anzahl der in die Magenschleimhaut eingewanderten Makrophagen und die Tatsache, daß  $VacA^+$  Keime ihre eigene Phagozytose durch Makrophagen hemmen können (Ramarao et al., 2000; Ramarao et al., 2001), deutet auf eine eher untergeordnete Rolle hin. In der vorliegenden Studie konnten ebenfalls **natürliche Killerzellen** in der Magenschleimhaut immunhistochemisch nachgewiesen werden. NK-Zellen nehmen im innate Immunsystem eine wichtige Schlüsselposition ein, da sie in der frühen Phase einer Infektion Pathogen-befallene Zellen effektiv zerstören können. Sie vermitteln zelluläre Zytotoxizität und produzieren Chemokine und inflammatorische Zytokine, wie  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha$  (Trinchieri, 1989). Neben der wichtigen Rolle in der unspezifischen Immunantwort haben NK-Zellen auch immunmodulatorische Eigenschaften, die eine nachfolgende adaptive Immunantwort beeinflussen. Zwischen NK-Zellen und dendritischen Zellen finden wechselseitige Interaktionen statt, die die adaptive Immunantwort in verschiedener Weise beeinflussen können (Fernandez et al., 1999; Ferlazzo et al., 2002; Gerosa et al., 2002; Piccioli et al., 2002). Eine Studie aus der eigenen Arbeitsgruppe legt den Schluss nahe, daß die NK-Zellen möglicherweise eine „Helferfunktion“ bei der Polarisierung der T-Zell Antwort einnehmen. Die Studie konnte zeigen, daß durch *H. pylori*-stimulierte DCs in hohem Maße IL-12 bilden und hierdurch die  $IFN-\gamma$  Sekretion aus NK-Zellen induzieren. Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen blieb aber unbeeinflusst (Hafsi et al., 2004).  $IFN-\gamma$  ist ein entscheidender Faktor, der die Funktion von Makrophagen (Phagozytose, Antigenprozessierung und Antigenpräsentation) maßgeblich fördert und zudem die Differenzierung der ThP-Zellen zu Th1-Zellen vermittelt.

## **4.2 Die spezifische Immunantwort auf *H. pylori***

Zahlreiche Studien, in denen Lymphozyten aus der Magenschleimhaut von infizierten Individuen untersucht wurden, dokumentieren eine starke, hauptsächlich von  $IFN-\gamma$ -produzierenden T-Zellen geprägte T-Zell-Antwort (Bamford et al., 1998; Lindholm et al., 1998; Blanchard et al., 2004), was eine Polarisierung der adaptiven Immunantwort in Richtung Th1-Antwort nahelegt.

Die Untersuchung der Zytokin-Expressionprofile in der Magenschleimhaut im Rahmen der vorliegenden Studie bestätigt die Infiltration von hauptsächlich Th1-Zellen in die Magenschleimhaut. Die Gene für IL-12R $\beta$  und IFN $\gamma$  sind in der infizierten Magenschleimhaut vermehrt exprimiert, wohingegen die IL-4 Expression nur sehr gering ist. Im Allgemeinen wird eine Th1 polarisierte Immunantwort eingeleitet, wenn der Körper mit intrazellulären Pathogenen konfrontiert ist (Janeway, 2005). Als Effektorzellen der Th1 Antwort fungieren beispielsweise Makrophagen und zytotoxische T-Zellen, die auf die Phagozytose bzw. Zerstörung der infizierten Körperzellen spezialisiert sind. B-Lymphozyten werden als Effektorzellen einer Th2 polarisierten Immunantwort angesehen (Janeway, 2005).

Makrophagen haben neben ihrer wichtigen Rolle bei der innatens Immunität auch eine Schlüsselposition als Effektorzellen der spezifischen Immunität inne. Wie bereits oben beschrieben, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß Makrophagen in die *H. pylori* infizierte Magenmukosa einwandern. Die verhältnismäßig geringe Anzahl der Makrophagen in der infizierten Schleimhaut war jedoch unerwartet.

### **Zytotoxische T-Zellen**

Durch immunhistochemische Färbung konnten in der vorliegenden Arbeit zytotoxische T-Zellen in der infizierten Schleimhaut dargestellt werden. Ebenso konnte gezeigt werden, daß diese Zellpopulation zahlenmäßig stark vertreten ist. Frühere Studien bestätigen eine Infiltration CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen in die *H. pylori* infizierte Magenschleimhaut (Fan et al., 1994; Hatz et al., 1996). Ob zytotoxische T-Zellen bei der Eliminierung des Keimes eine bedeutende Rolle spielen, ist jedoch fraglich. Immunisierungs-Experimente in Mäusen haben ergeben, daß eine schützende Immunisierung gegen *H. pylori* im wesentlichen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen abhängt, aber unabhängig von CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist (Ermak et al., 1998; Pappo et al., 1999).

Desweiteren übernehmen zytotoxische T-Zellen im Immunsystem die Eliminierung von intrazellulären Pathogenen wie Viren (Janeway, 2005). Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei *H. pylori* aber primär um einen extrazellulären Keim. Dennoch konnten erst kürzlich erschienene Studien die Existenz intrazellulärer Bakterien und auch deren aktive Invasion in kultivierte Magenepithelzellen dokumentieren (Amieva et al., 2002). Die Wahrnehmung dieser Nische könnte die Ineffektivität nicht zellgängiger Antibiotika, und damit das häufige Versagen der Eradikationstherapie mit diesen Substanzen erklären (Engstrand et al., 1997). Die intrazelluläre Lokalisation des Keimes könnte eine Erklärung für die starke zytotoxische T-Zell Antwort und für die Th1 Polarisierung der T-Helfer Zell-Antwort sein.

Wahrscheinlich haben zytotoxische T-Zellen, ähnlich wie die NK-Zellen, eine „Helferfunktion“ bei der Polarisierung der T-Zell Antwort inne. Bramford et al. konnten zeigen, daß zytotoxische T-Zellen einen großen Anteil an der IFN- $\gamma$  Produktion in der *H. pylori*-infizierten Magenschleimhaut übernehmen (Bamford et al., 1998). Durch diese Zytokinproduktion könnten die zytotoxischen T-Zellen zu der Polarisierung der T-Zell Antwort in Richtung Th1-Phänotyp beitragen.

### **B-Zellen**

Bei der Infektion mit *H. pylori* wandern B-Lymphozyten in die Mukosa ein, aggregieren und bilden kleinere Lymphfollikel mit Keimzentren. Sie sind für die humorale Komponente der Immunantwort zuständig. Eine starke humorale Immunantwort gegen *H. pylori* kann im Serum von infizierten Patienten nachgewiesen werden (Blanchard et al., 1999). Die Immunglobulin-Subklassen IgG2a (charakteristisch für eine Th1-Antwort) und IgG1 (charakteristisch für eine Th2-Antwort) (Toellner et al., 1998) können beide im Serum nachgewiesen werden, wobei IgG2a jedoch überwiegt (Bontkes et al., 1992; Mitchell et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, daß die Infektion mit *H. pylori* eine starke Infiltration von B-Lymphozyten und gleichzeitige Ausbildung von Lymphfollikeln in der Magenschleimhaut verursacht. Für die Th2-Polarisierung charakteristische Zytokine konnten jedoch in der Magenschleimhaut nicht nachgewiesen werden. Es stellt sich die Frage, warum B-Zellen in der Magenmukosa so zahlreich vorhanden sind und ebenfalls funktionelle Antikörper gegen *H. pylori* produzieren (Ferrero et al., 1997), obwohl das für ihre Aktivierung notwendige Zytokin IL-4 fehlt.

Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ist, daß die Aktivierung der B-Lymphozyten nur in geringem Maße am Infektionsort selbst erfolgt. Es muß davon ausgegangen werden, daß die B-Zell-Aktivierung hauptsächlich in den umliegenden Lymphknoten stattfindet (Friedl und Brocker, 2002).

Ein anderer Erklärungsansatz für das zahlreiche Vorkommen der B-Zellen in der Magenschleimhaut ist, daß hier die B-Zellen-Aktivierung unabhängig von T-Helfer-Zellen stattfindet. Dies würde auch erklären, warum in der Magenschleimhaut kein IL-4 gefunden wurde. In den meisten Fällen ist für die Aktivierung von B-Zellen eine Interaktion dieser Zellen mit T-Helfer Zellen notwendig. Einige Studien konnten jedoch zeigen, daß Menschen mit Wiskott-Aldrich-Syndrom (Erkrankung des Immunsystems mit defekter humoralen Immunität) und T-Zell-defiziente Mäuse mehrere Antikörperklassen gegen verschiedenen Antigene bilden können (Liu et al., 1991; Bachmann und Zinkernagel, 1997). Diese Antigene werden auch als Thymus-independent (TI)-Antigene bezeichnet (Janeway, 2005). TI-

Antigene sind in Lage, B-Zellen ohne Hilfe von T-Zellen zu aktivieren, so daß diese proliferieren und Antikörper bilden. Ein Beispiel für ein TI-Antigen ist bakterielles LPS. LPS bindet an das LPS-bindende Protein und bildet mit CD14 einen Komplex, welchen an TLR 4 auf der Oberfläche der B-Zellen bindet und diese dadurch aktiviert (Janeway, 2005). Bekanntlich besitzt *H. pylori* als gram-negativer Keim LPS, eine Aktivierung der B-Zellen ohne die Hilfe von T-Zellen wäre also durchaus denkbar.

### **4.3 Regulatorische T-Zellen spielen eine Schlüsselrolle bei der chronischen Persistenz von *H. pylori***

Im Gegensatz zu anderen gastrointestinalen Pathogenen heilt eine Infektion mit *H. pylori* nicht spontan aus, sondern persistiert als chronische Gastritis ohne adäquate Therapie ein Leben lang. Die Immunantwort des Menschen ist nicht in der Lage, den Keim zu eliminieren, so daß eine chronische Infektion bestehen bleibt. Es stellt sich die Frage, warum das Immunsystem diesen Keim nicht eliminieren kann, werden doch die meisten anderen pathogenen Bakterien sehr wirksam bekämpft. Immunisierungsexperimente in Tiermodellen konnten zeigen, daß *H. pylori* eliminiert werden kann, wenn die von ihm eingeleitete Th1 Antwort genügend verstärkt wird (Ermak et al., 1998; Akhiani et al., 2002). Da aber die eingeleitete Immunantwort auf den Keim nicht die genügende Stärke erreicht, muss in Betracht gezogen werden, daß *H. pylori* wahrscheinlich die Immunantwort herunterreguliert und dadurch seiner Eliminierung entgeht.

Frühere Studien zeigen, daß regulatorische T-Zellen bei verschiedenen mikrobiellen Infektionen für die Suppression der Immunantwort von großer Bedeutung sind (Belkaid und Rouse, 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß *H. pylori* eine starke regulatorische T-Zell Antwort verursacht. Es ist erstmals gelungen regulatorischen T-Zellen anhand ihres spezifischen Markers Foxp3 mittels Immunhistochemie in der *H. pylori* infizierten humanen Magenschleimhaut direkt nachzuweisen. Durch Genexpressionsanalysen konnte eine starke Induktion einer regulatorischen T-Zell Antwort bestätigt werden. Ebenso konnte die Stärke der regulatorischen T-Zell Antwort mit dem Vorhandensein der *cagPAI* assoziiert werden.

Foxp3<sup>+</sup> Treg Zellen infiltrieren die infizierte Magenmukosa. In der uninfizierten Schleimhaut konnten keine Foxp3<sup>+</sup> Treg Zellen nachgewiesen werden, was darauf hinweist, daß *H. pylori* das Einwandern der natürlichen Treg Zellen in die gastrale Schleimhaut induziert. Die

physiologische Relevanz dieser Ergebnisse wird deutlich, wenn man bedenkt, daß bereits wenige Tregs die Proliferation und Zytokinproduktion einer großen Anzahl von T-Effektorzellen *in vitro* hemmen können (bei einem Verhältnis Treg/Teffector von 1:10, Hemmung der Proliferation und Zytokinsekretion aus Effektorzellen um 60%) (Thornton und Shevach, 1998).

Ebenso bestätigen Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe die Vermutung, daß regulatorische T-Zellen in der Immunantwort auf *H. pylori* eine bedeutende Rolle einnehmen. Mäuse, bei denen die regulatorischen T-Zellen mittels eines anti-CD25 Antikörpers *in vivo* depletiert wurden, wiesen schon nach vier Wochen Infektion mit *H. pylori* eine wesentlich stärkere Entzündung der Magenschleimhaut und eine deutlich verringerte bakterielle Kolonisationsdichte auf, verglichen mit nicht-depletierten Tieren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Studienergebnissen der Arbeitsgruppe Raghavan et al, die den Effekt der *H. pylori*-Infektion in T-Zell-defizienten *nu/nu* Mäusen untersuchte. In dieser Studie wurden Lymphozyten aus Lymphknoten von Mäusen isoliert und in T-Zell-defiziente *nu/nu* Mäuse transferiert. Anschließend wurden die T-Zell-defizienten Mäuse mit *H. pylori* infiziert. Aus gesunden Mäusen wurden anschließend CD25-depletierte und nicht-depletierte T-Zellen in Nacktmäuse transferiert. Tiere, die CD25-depletierte Zellen erhalten haben, entwickelten eine deutlich stärkere Entzündung der Magenschleimhaut als Mäuse, die nicht-depletierte T-Zell Populationen erhalten haben. Als Folge der verstärkten Inflammation in Tieren mit CD25-depletierten T-Zellen war die bakterielle Kolonisationsdichte im Magen deutlich erniedrigt (Raghavan et al., 2003).

Die durch *H. pylori* induzierte regulatorische T-Zell Antwort scheint die Magenschleimhaut vor einer zu starken Immunantwort und dadurch verursachten Immunpathologien zu schützen. Gleichzeitig begünstigt dies jedoch die chronische Persistenz des Keims, da die durch regulatorische T-Zellen gehemmte Immunantwort nicht ausreicht, den Keim zu eliminieren. Von einem evolutionären Standpunkt aus gesehen, stellt die Pathogenpersistenz wahrscheinlich einen von Bakterium und Wirt eingegangenen Kompromiss dar.



#### **4.4 Vergleich der humanen und murinen *H. pylori* induzierten Immunantwort**

Um Unterschiede zwischen der humanen und murinen Immunantwort zu untersuchen, fand das Infektionsmodell, in dem C57BL/6-Mäuse mit dem *H. pylori* Stamm SS1 infiziert wurden, in unserer Studie Anwendung.

In dieser Arbeit konnte durch immunhistochemische Untersuchungen und Genexpressionsanalysen festgestellt werden, daß die murine Immunantwort auf die Infektion mit *H. pylori* der humanen Immunantwort sehr ähnlich ist. Mittels der Untersuchung von Zytokinexpressionsprofilen in der murinen Magenmukosa konnte gezeigt werden, daß es in der Maus, genauso wie beim Mensch, überwiegend zu einer Infiltration mit Th1-Zellen in die Magenmukosa kommt. Ebenso konnte durch immunhistochemische Untersuchungen gezeigt werden, daß trotz fehlender IL-4 Expression eine starke lokal-gastrale B-Zell Antwort beim Menschen vorhanden ist.

Des weiteren können in der Maus ebenso *H. pylori* spezifische Antikörper IgG1 und IgG2a (bzw. IgG2c in der Maus, die dem humanen Subtyp IgG2a entsprechen) (Martin et al., 1998) im Serum detektiert werden, was Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe bestätigen. Obwohl in der Schleimhaut das Th2 spezifische Zytokin IL-4 nicht detektiert werden konnte, zeigen die vorhandenen Antikörper, daß eine Th2 Immunantwort in der Maus genauso wie beim Menschen vorhanden ist. Die Aktivierung der B-Zellen und somit die keimspezifische Antikörperproduktion findet nicht am Infektionsort selbst statt, sondern in den sekundär lymphatischen Organen. Eine Studie an Mäusen konnte zeigen, daß bei Tieren, die an Autoimmungastritis erkrankt waren, IL-4 exprimierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen und somit die autoreaktiven Antikörper bildenden Zellen, in Milz und gastralen Lymphknoten vorhanden waren, jedoch nicht im Magen selbst (Katakai et al., 1998).

Beim Vergleich der beiden Immunantworten fällt dennoch ein wesentlicher Unterschied auf. Im Gegensatz zum Menschen kommt es in der Maus infolge der Infektion nur zu einer schwachen Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Magenschleimhaut. Ein granulozytäres Infiltrat, das in irgendeiner Weise mit der granulozytären Entzündungsreaktion des Menschen vergleichbar wäre, ist praktisch nicht vorhanden. Der wichtigste Vermittler der granulozytären Infiltration in die humane Magenschleimhaut ist das Chemokin IL-8 (Baggiolini et al., 1989), welches nach der Infektion mit *H. pylori* in großen Mengen ausgeschüttet wird (Yamaoka et al., 1996). Im Genom der Maus ist das *IL-8* Gen, im Gegensatz zum *IL-8*-Rezeptor-kodierendem Gen, nicht vorhanden. Wahrscheinlich ist das *IL-*

8 Gen im Laufe der phylogenetischen Entwicklung der Mausspezies verloren gegangen (Modi und Yoshimura, 1999). Eine kürzlich erschienene Studie konnte in einem intestinalen Infektionsmodell zeigen, daß IL-8 eine entscheidende Rolle bei der Granulozyteninfiltration des Darmes spielt. Die intestinale Entzündungsreaktion auf die Infektion mit dem invasiven Keim *Shigella* war bei Mäusen, denen rekombinantes humanes IL-8 verabreicht wurde, von einer starken granulozytären Infiltration geprägt. Mäuse, denen kein rekombinantes IL-8 verabreicht wurde, konnten kein granulozytäres Infiltrat entwickeln (Singer und Sansonetti, 2004). Die fehlende Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten infolge einer *H. pylori*-Infektion in die Magenschleimhaut ist damit aller Wahrscheinlichkeit nach in dem Fehlen des für IL-8 kodierenden Gens begründet.

#### 4.5 Abhängigkeit der Immunantwort vom *H. pylori* Stammtyp

Zahlreiche Studien konnten zeigen, daß *cagA*<sup>+</sup>-Stämme mit einem signifikant höheren Risiko für schwere Gastritis, Atrophie, gastroduodenale Ulkuserkrankungen und distalem Magenkarzinom assoziiert waren als *cagA*<sup>-</sup>-Stämme (Kuipers et al., 1995; Peek, Jr. et al., 1995; Parsonnet et al., 1997; van Der Hulst et al., 1997). Ähnlicherweise führen im Mausmodell Infektionen mit *cagA*<sup>-</sup> *H. pylori* Stämmen nicht zur Entwicklung von starken Entzündungsreaktionen, wohingegen *cagA*<sup>+</sup> Stämme eine stärkere Inflammation sowie mukosale Schäden hervorrufen (Marchetti et al., 1995). Mehrere Gene der *cagPAI* kodieren für ein Typ-IV Sekretionssystem, welches bakterielle Makromoleküle, darunter auch das CagA-Protein in die Wirtszelle transloziert (Odenbreit et al., 2000). CagA interagiert mit mehreren intrazellulären Wirtsproteinen und hat multiple Effekte auf Signaltransduktionswege der Epithelzelle (Backert und Selbach, 2005). In die Zellen transloziertes CagA stört die normale Funktion von "Tight Junctions", so daß die Epithelbarriere permeabilisiert wird.

Über den Einfluss des *H. pylori*-Stammtypes auf die einzelnen Effektorarme der innate und adaptiven Immunantwort konnte bisher noch keine genaue Aussage getroffen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, welche Teile der innate und adaptiven Immunantwort auf *H. pylori* von CagA abhängen.

Die histopathologische Evaluierung von Magenbiopsien mit verschiedenen Stammtypen infizierter Patienten ergab einen eindeutigen Einfluss von CagA auf die Entstehung der **granulozytären Infiltration** in der Magenschleimhaut. Patienten, die mit einem *cagA*-

negativen *H. pylori*-Stamm infiziert waren, wiesen vor allem niedriggradige bis moderate Grade der granulozytären Infiltration auf. Im Einklang mit früheren Studien konnte in der vorliegenden Arbeit bei Patienten, die mit einem *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori*-Stamm infiziert waren, eine stärkere granulozytäre Infiltration beobachtet werden (Peek, Jr. et al., 1995; Yamaoka et al., 1996). Die Ursache dieser stammabhängigen granulozytären Infiltration ist die ebenfalls *cagA*-abhängige Expression des wichtigsten Chemokins für Neutrophile IL-8 in Magenepithelzellen (Peek, Jr. et al., 1995; Yamaoka et al., 1996). Microarray-Analysen aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, daß Magenepithelzellen eine Reihe von Chemokingenen, darunter das Gen für IL-8, *cagPAI*-abhängig hochregulieren. Stimuliert man die Epithelzellen mit einem *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori*-Stamm, exprimieren diese wesentlich mehr IL-8 als Epithelzellen, die mit einem *cagPAI*-negativen *H. pylori*-Stamm (CagE-k.o.-Stamm) stimuliert wurden. Passend hierzu zeigte die Untersuchung der IL-8 Expression in unserer Biopsiebank, daß *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori* Stämme eine höhere IL-8 Expression in der Magenschleimhaut induzierten als *cagA*<sup>-</sup> Stämme. Da IL-8 das wichtigste Chemokin für Granulozyten ist, erklärt dies die starke Abhängigkeit der granulozytären Infiltration von CagA.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich bei der Patientengruppe, die mit einem *cagA*-positiven *H. pylori* Stamm infiziert sind, deutlich mehr CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen in der Magenschleimhaut befinden als bei Patienten, die mit einem *cagA*-negativen Stamm infiziert sind. CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden von APC, v.a. von dendritischen Zellen, aktiviert. Analysen aus der eigenen Arbeitsgruppe konnten jedoch zeigen, daß die Funktion von dendritischen Zellen *cagA*-unabhängig ist. DCs werden von *H. pylori* unabhängig vom Vorhandensein der *cagPAI* aktiviert. So ist das Transkriptom der dendritischen Zelle bei Stimulation mit einem *cagPAI*-positiven *H. pylori* Stamm praktisch identisch mit dem Transkriptom bei Stimulation mit einem isogenen *cagPAI*-Knockout Stamm (nicht publizierte Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe). Obwohl das Transkriptionsprofil der Epithelzelle also in hohem Maße *cagPAI*-abhängig ist, sind die durch *H. pylori* ausgelösten transkriptionellen Veränderungen der DC unabhängig von der *cagPAI*.

Möglicherweise kann die verstärkte CD4<sup>+</sup> T-Zell Antwort bei Infektion mit einem CagA-positiven *H. pylori* Stamm dadurch erklärt werden, daß CagA ein immundominantes Antigen ist, welches von APC erkannt und präsentiert wird. Mehrere Studien konnten CagA-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zell Klone aus dem Magen isolieren, deren Proliferation CagA-abhängig ist (D'Elis et al., 1997a; D'Elis et al., 1997b; D'Elis et al., 1999). Die verstärkte CD4 T-Zell-Antwort war von einer verstärkten mukosalen Infiltration mit Makrophagen und B-Lymphozyten, den Effektorzellen von Th1/Th2 Antworten, begleitet. Die Infektion mit einem

CagA-positiven *H. pylori* Stamm ist stets von einer starken CagA-spezifischen humoralen Immunantwort begleitet. Anti-CagA-spezifische Antikörper sind im Serum von Patienten, die mit einem *cagA*<sup>+</sup> Keim infiziert sind, immer nachweisbar (D'Elia et al., 1997b). Es kommt also offensichtlich zu einer klonalen B-Zell Expansion mit der Produktion von anti-CagA Antikörpern. Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe konnten desweiteren zeigen, daß bestimmte Chemokine, wie zum Beispiel CCL-20 (MIP-3 $\alpha$ ) in der infizierten Magenschleimhaut *cagA*-abhängig vermehrt aus Epithelzellen ausgeschüttet werden. Da CCL-20 ein potentes Chemoattraktant für B-Lymphozyten ist (Cook et al., 2000; Varona et al., 2001), wäre dies eine weitere mögliche Erklärung für die stärkere mukosale B-Zell-Antwort bei Infektion mit einem *cagA*<sup>+</sup> Stamm. Die starke B-Zell-Antwort trägt möglicherweise zur antikörper-abhängigen Aktivierung von Makrophagen bei (Ravetch und Bolland, 2001).

Als weitere *cagA*-abhängige Komponente der durch *H. pylori* induzierten Immunantwort konnte in der vorliegenden Arbeit die **regulatorische T-Zell Antwort** identifiziert werden. Durch Genexpressionsanalysen konnte eine starke Induktion einer regulatorischen T-Zell Antwort bestätigt werden. Mittels quantitativer RT-PCR konnte gezeigt werden, daß bei Patienten, die mit einem *cagA*-positiven Stamm infiziert sind, eine deutlich höhere Foxp3 Expression vorliegt als Patienten die mit einem *cagA*-negativen Stamm infiziert sind. Im Mausmodell existiert *in vivo* eine natürliche Selektion gegen *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori*-Stämme, die eine starke Entzündungsreaktion verursachen (Philpott et al., 2002). Aus diesem Grund ist es überraschend, daß je nach Land 60–95 % der weltweit infizierten Individuen mit einem *cagA*<sup>+</sup>-Stamm infiziert sind (Blaser und Atherton, 2004). Die starke regulatorische T-Zell Antwort supprimiert die protektive anti-mikrobielle Th1-Antwort und könnte auf diese Weise zu dem evolutionärem Erfolg von *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori* Stämmen beitragen.

#### 4.6 Modell der *H. pylori* induzierten Immunantwort

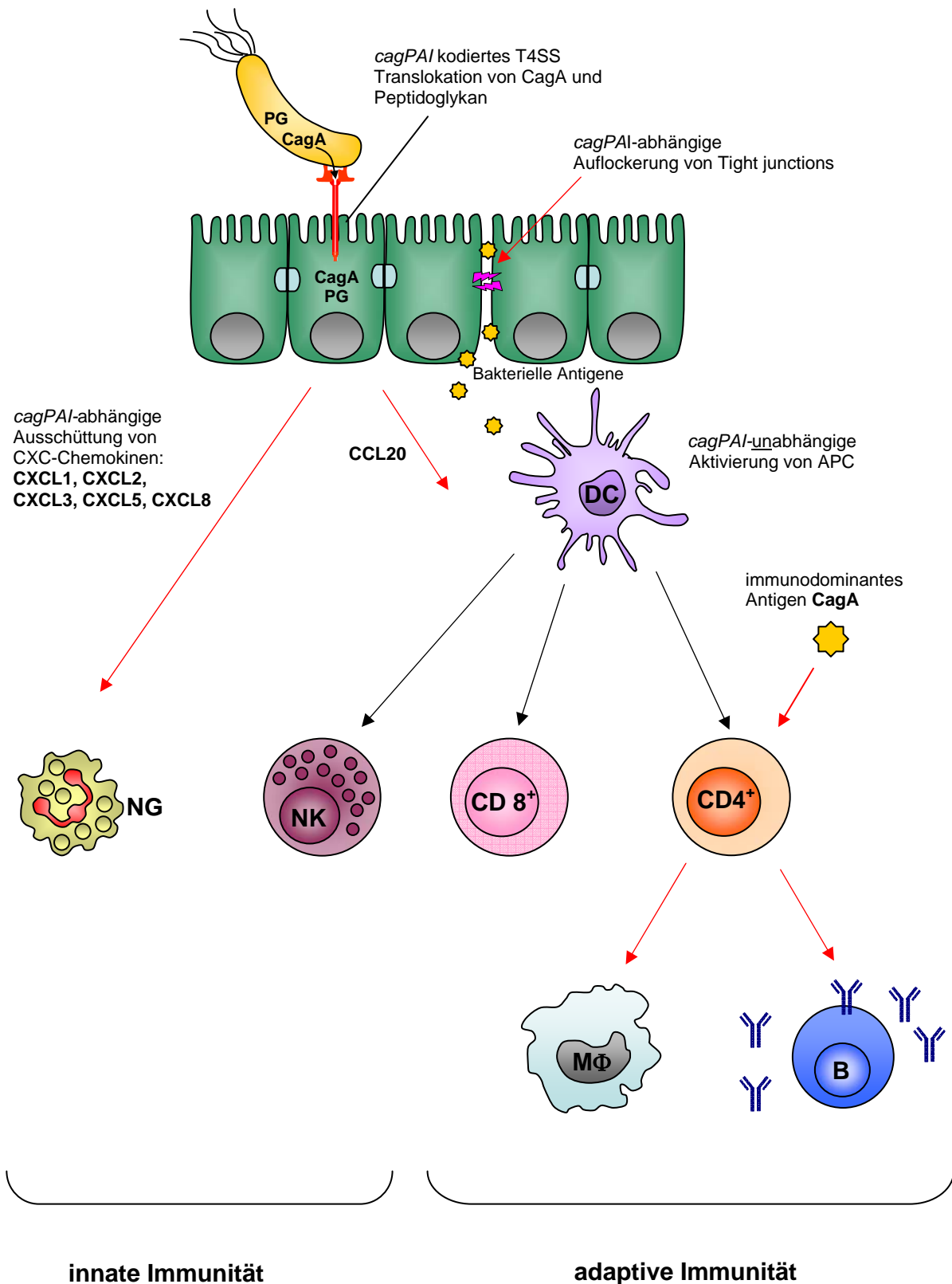
Eine zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit und weiterer Ergebnisse der Arbeitsgruppe ermöglicht ein besseres Verständnis der durch *H. pylori* ausgelösten Immunität. Abbildung 25, zeigt in welcher Weise die innate und adaptive Immunität von *H. pylori* beeinflusst wird, und welche Rolle das bakterielle T4SS hierbei spielt.

Zwei verschiedene Zelltypen, die Magenepithelzelle und APC, spielen bei der Induktion der Immunantwort auf die Infektion mit *H. pylori* eine entscheidende Rolle. Primären Kontakt hat *H. pylori* mit der Magenepithelzelle. Die Epithelzelle reagiert auf diesen ersten Kontakt vor

allem durch die Ausschüttung von Chemokinen. Hauptsächlich werden Chemokine der „CXC“-Klasse ausgeschüttet, welche für die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten verantwortlich sind. Die bedeutendste Rolle spielt in diesem Zusammenhang das Chemokin CXCL-8 (IL-8), dessen Ausschüttung aus den Epithelzellen in starkem Maße von der *cagPAI* abhängig ist. Genchip-Analysen aus der eigenen Arbeitsgruppe konnten zeigen, daß als einziges nicht-CXC-Chemokin ein Chemokin der „CC“-Klasse, nämlich CCL-20, *H. pylori*-abhängig ausgeschüttet wird. Hierbei zeigte sich, daß die CCL-20 Expression sehr stark durch die *cagPAI* induziert wird. CCL-20 vermittelt die Infiltration von T und B-Zellen in die Magenmukosa. Auf diese Weise werden also ebenfalls Teile des adaptiven Immunsystems *cagA*-abhängig beeinflusst. In Übereinstimmung hiermit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß bei Patienten, die mit einem *cagA*-positiven Stamm infiziert waren, die T- und B-Zell Infiltration in der Schleimhaut verstärkt war, verglichen mit Patienten, die mit einem *cagA*-negativen Stamm infiziert waren.

Der Kontakt mit APCs, und hier vor allem mit dendritischen Zellen, ist für die Vermittlung der adaptiven Immunität von großer Bedeutung. Dendritische Zellen präsentieren CD4<sup>+</sup> T-Helfer Zellen bakterielle Antigene. Th-Zellen aktivieren wiederum B-Zellen und Makrophagen. Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, daß die Aktivierung der DC *cagPAI*-unabhängig geschieht. Nichts desto trotz konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Infektion mit einem *cagA*-positiven *H. pylori* Stamm im Gegensatz zu einem *cagA*-negativen Stamm zu einer verstärkten Infiltration mit Zellen des adaptiven Immunsystems führt. Mögliche Ursachen hierfür sind einerseits, daß *cagA* die adaptive Immunität auf der Ebene der T-Helfer Zellen beeinflusst. CagA ist ein immundominantes Antigen. Die Infektion mit einem *cagA*-positiven *H. pylori* Stamm hat eine klonale Expansion von *cagA*-spezifischen Th-Zellen zur Folge, was möglicherweise zu einer verstärkten adaptiven Immunität führt (D'Elis et al., 1997a; D'Elis et al., 1997b; D'Elis et al., 1999). Desweiteren beeinflusst CagA die Barrierefunktion von Epithelzellen, was auch zur verstärkten adaptiven Immunantwort durch *cagA*-positive Stammtypen beitragen könnte. In die Zellen transloziertes CagA stört die normale Funktion von "Tight Junctions", infolgedessen die Integrität der Epithelbarriere beeinträchtigt wird (Amieva et al., 2003). Durch diese aufgelockerte Epithelbarriere gelangen möglicherweise bakterielle Antigene leichter in das subepitheliale Kompartiment. Dort werden die Antigene von APC aufgenommen und präsentiert, wodurch die adaptive Immunantwort möglicherweise verstärkt initiiert wird. Eine weitere Möglichkeit der *cagPAI*-abhängigen Einflussnahme auf die

adaptive Immunität könnte durch die verstärkte Anlockung von Granulozyten erklärt werden. Zellkontakt-vermittelt oder durch sezernierte Botenstoffe können Neutrophile die Funktion von Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen und auch B-Zellen potenzieren (Nathan, 2006).



**Abbildung 25: Modell der *H. pylori* induzierten Immunantwort.** Die *cagPAI*-abhängigen Anteile sind durch rote Pfeile gekennzeichnet: Die Epithelzelle reagiert nach stattgehabtem Kontakt mit *H. pylori* durch die Ausschüttung von hauptsächlich „CXC“ Chemokinen, welche für die Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten verantwortlich sind. Die Ausschüttung dieser CXC-Chemokine erfolgt *cagPAI* abhängig. Einige Gene in der *cagPAI* kodieren für ein Typ 4 Sekretionssystem (T4SS), welches bakterielle Makromoleküle in die Wirtszelle transloziert. Eines dieser translozierten

Proteine, CagA, interagiert mit zahlreichen intrazellulären Wirtspoteinen und hat multiple Effekte auf die Signaltransduktionsprozesse in der Wirtszelle (Backert und Selbach, 2005). Als weiteres wichtiges Molekül wird Peptidoglykan (PG) in die Wirtszelle injiziert. PG wird durch NOD-1 erkannt, wodurch anschließend NFκB aktiviert und die Sekretion von IL-8 induziert wird (Keates et al., 1997). Als einziges nicht-CXC-Chemokin wird durch *H. pylori* die Expression von CCL-20 induziert. CCL20, ein Chemokin der „CC“-Klasse, wird ebenfalls *cagPAI*-abhängig exprimiert. CCL-20 vermittelt die Infiltration von T und B-Zellen in die Magenmukosa. Bakterielle Antigene werden von APCs, vor allem von DCs aufgenommen und an CD4<sup>+</sup> T-Helfer Zellen präsentiert. Die Aktivierung der DCs geschieht *cagPAI*-unabhängig. Th-Zellen aktivieren B-Zellen und Makrophagen. CagA als immundominantes beeinflusst Antigen die adaptive Immunität auf der Ebene der T-Helfer Zellen. Die Infektion mit einem *cagA*-positiven *H. pylori* Stamm hat eine klonale Expansion von *cagA*-spezifischen Th-Zellen zur Folge. CagA beeinflusst die Barrierefunktion von Epithelzellen. In die Zellen transloziertes CagA stört die normale Funktion von "Tight Junctions", infolgedessen die Integrität der Epithelbarriere beeinträchtigt wird. Durch diese aufgelockerte Epithelbarriere gelangen bakterielle Antigene auf leichtere Weise in das subepitheliale Kompartiment. Die *cagPAI* spielt bei der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und NK-Zellen keine Rolle. DC: dendritische Zelle, NG: neutrophiler Granulozyt, NK: natürliche Killerzelle, CD8<sup>+</sup>: zytotoxische T-Zelle, CD4<sup>+</sup>: T-Helfer Zelle, B: B-Lymphozyt, MΦ: Makrophage, T4SS: Typ 4 Sekretionssystem, PG: Peptidoglykan.



## 5. Zusammenfassung

Die Entdeckung von *Helicobacter pylori* vor über 20 Jahren durch Warren und Marshall hat nicht nur das Verständnis der gastralen Physiologie, sondern auch die klinische Gastroenterologie, nachhaltig verändert (Warren JR und Marshall BJ, 1983; Marshall und Warren, 1984). Obwohl nur 10-20 % der infizierten Personen klinisch fassbare Folgeleiden entwickeln, ist eine Infektion mit *H. pylori* für den beträchtlichen Anteil der weltweiten Morbidität und Mortalität im Bereich der Gastroenterologie verantwortlich. Die Infektion ist die Hauptursache für die Entstehung von peptischen Ulzera sowie des Magenkarzinoms und des MALT-Lymphoms (Parsonnet et al., 1991; Uemura et al., 2001; Suerbaum und Michetti, 2002). Die durch *H. pylori* induzierte Entzündung und die daraufhin eingeleitete Immunantwort spielt für die Entstehung gastraler Pathologie und wahrscheinlich für die Karzinogenese eine entscheidende Rolle (Fox et al., 2000). Frühere Studien konnten zeigen, daß im murinen Modell die T-Zell-vermittelte Immunantwort der essentielle Mediator der *H. pylori*-assoziierten Karzinogenese ist (Eaton et al., 1999; Roth et al., 1999; Fox et al., 2000).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Anteile der durch *H. pylori* induzierten Immunantwort systematisch charakterisiert. An einer vorhandenen Magenbiopsiebank wurden histologische und molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt. Bei über 100 Patienten wurden mittels immunhistochemischer Färbungen leukozytäre Subpopulationen (T-Helfer-Zellen, zytotoxische T-Zellen, B-Lymphozyten, NK-Zellen, Makrophagen und regulatorische T Zellen) in der *H. pylori*-infizierten Magenmukosa nachgewiesen und quantitativ charakterisiert. Ebenso wurden die für die einzelnen Effektorzellantworten charakteristischen Zytokinprofile durch TaqMan RT-PCR quantifiziert. B-Lymphozyten, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen repräsentieren den größten Teil des entzündlichen Infiltrats, wohingegen nur eine geringe Infiltration von Makrophagen und NK-Zellen beobachtet werden kann. Die quantitative Untersuchung der Zytokin-Expressionsprofile in der Magenschleimhaut im Rahmen der vorliegenden Studie zeigte, daß es zu einer überwiegenden Infiltration von Th1-Zellen in die *H. pylori*-infizierte Magenschleimhaut kommt. TaqMan RT-PCR Analyse zeigte, daß die Gene für IL-12R $\beta$  und IFN $\gamma$  in der infizierten Magenschleimhaut stark exprimiert waren, wohingegen die IL-4 Expression nur sehr gering war.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des bakteriellen Typ-IV Sekretionssystem (T4SS) auf die Immunantwort evaluiert. Das T4SS wird von den Genen auf

der *cag* Pathogenitätsinsel kodiert. Ein Markergen der *cag*PAI ist das *cagA* Gen. Zahlreiche Studien konnten zeigen, daß *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori* Stämme mit einer stärkeren Entzündungsreaktion assoziiert waren als *cagA*<sup>-</sup> Stämme (Cover et al., 1990; Crabtree et al., 1991; Blaser et al., 1995; Kuipers et al., 1995; Parsonnet et al., 1997; van Der Hulst et al., 1997). Es ist bisher jedoch nicht klar, welche zellulären Anteile der innaten und adaptiven Immunantwort davon betroffen sind. Zu diesem Zweck wurde bei allen in diese Studie eingeschlossenen Patienten der bakterielle Stammtyp mittels PCR aus Magengewebe bestimmt. In anschließenden Assoziationsstudien wurde der Einfluß von *cagA* auf die einzelnen Anteile der spezifischen und unspezifischen Immunantwort untersucht. Es zeigte sich ein deutlicher Einfluss von CagA auf die Entstehung der granulozytären Infiltration in der Magenschleimhaut. Patienten, die mit einem *cagA*-negativen *H. pylori*-Stamm infiziert waren, wiesen vor allem niedriggradige bis moderate Grade der granulozytären Infiltration auf, während bei Patienten, die mit einem *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori*-Stamm infiziert waren, eine stärkere granulozytäre Infiltration beobachtet werden konnte (Peek, Jr. et al., 1995; Yamaoka et al., 1996). Eine mögliche Ursache hierfür ist, daß es in der Magenepithelzelle zur Ausschüttung von CXC-Chemokinen in *cagA*-abhängiger Weise kommt.

Desweiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß bei Patienten, die mit einem *cagA*-positiven *H. pylori* Stamm infiziert sind, deutlich mehr CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten die Magenschleimhaut infiltrieren als bei Patienten, die mit einem *cagA*-negativen Stamm infiziert sind. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß CagA als ein stark immundominantes Antigen fungiert. Frühere Studien zeigten bereits, daß es im Rahmen der Infektion zur klonalen Expansion von CagA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (D'Elis et al., 1997a; D'Elis et al., 1997b; D'Elis et al., 1999) und B-Zellen kommt, was die Produktion von anti-CagA Antikörpern zur Folge hat.

In dritten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß *H. pylori* neben der proinflammatorischen Antwort auch die Infiltration der Magenschleimhaut mit regulatorischen T-Zellen auslöst. Unter den CD4<sup>+</sup> T-Zellen existieren mehrere Untergruppen mit regulatorischen Eigenschaften, darunter die regulatorischen Tr1-Zellen, die Th3-Zellen und die CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Treg-Zellen (Thompson und Powrie, 2004). Die kürzliche Entdeckung des Transkriptionsfaktors Foxp3 als sehr spezifischen Marker von CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003) ermöglicht einen direkten und spezifischen Nachweis dieses Zelltyps in der Magenmukosa. Mittels Immunhistochemie konnte erstmals eine Infiltration regulatorischer T- (Treg-) Zellen infolge der *H. pylori*

Infektion dargestellt werden. Desweiteren wurde mittels RT-PCR-Analyse die gastrale Foxp3 Expression bei infizierten (n= 65) und nicht-infizierten Patienten (n= 43) quantifiziert. Es zeigte sich, daß es im Verlauf der *H. pylori*-Infektion zu einer stark erhöhten Foxp3 Expression kommt. In parallelen Versuchen der Arbeitsgruppe konnte in einem murinen Treg-Depletionsmodell gezeigt werden, daß diese durch *H. pylori* induzierte Treg Antwort die gastrale Inflammation supprimiert und dadurch vor der Entstehung ausgeprägter Immunpathologie schützt. Gleichzeitig begünstigt jedoch die Hemmung der Immunantwort die bakterielle Kolonisation und Persistenz. Interessanterweise zeigte sich, daß bei Patienten, die mit einem *cagA*-positiven Stamm infiziert waren, eine deutlich höhere Foxp3 Expression vorliegt, als Patienten, die mit einem *cagA*-negativen Stamm infiziert waren, was zum evolutionären Erfolg von *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori* Stämmen beitragen könnte.

Abschließend wurde im vierten Teil der Arbeit die murine mit der humanen Immunantwort auf die Infektion mit *H. pylori* verglichen. Die Maus stellt einen wichtigen Modellorganismus für die Untersuchung der anti-mikrobiellen Immunantwort dar. C57BL/6 Mäuse wurden mit *H. pylori* infiziert und über einen Zeitraum von sechs Monaten beobachtet. Die zeitliche Dynamik der Inflammation wurde auf zellulärer Ebene und auf Zytokinebene im Mausmodell analysiert. Die zellulären Bestandteile der Immunantwort, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen wurden mittels immunhistochemischer Färbungen dargestellt. Die Zytokinantwort wurde mehrere Monate nach der Infektion mittels quantitativer TaqMan RT-PCR analysiert. Der systematische Vergleich der humanen mit der murinen Immunantwort im Magen ergab große Ähnlichkeiten der beiden Immunantworten. Bei C57Bl/6 Mäusen kommt es, ebenso wie beim Menschen, zu einer Th1 Polarisierung der Immunantwort. Im Unterschied zum Menschen konnte jedoch bei der Maus keine granulozytäre Infiltration in die Magenmukosa beobachtet werden. Dies ist höchstwahrscheinlich Folge einer Deletion des *IL-8* Gens im Genom der Maus.

**Literaturverzeichnis**

Achtman, M., Azuma, T., Berg, D.E., Ito, Y., Morelli, G., Pan, Z.J., Suerbaum, S., Thompson, S.A., van Der, E.A., van Doorn, L.J. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol. Microbiol.* 32 (1999) 459-470

Aihara, M., Tsuchimoto, D., Takizawa, H., Azuma, A., Wakebe, H., Ohmoto, Y., Imagawa, K., Kikuchi, M., Mukaida, N., Matsushima, K. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect. Immun.* 65 (1997) 3218-3224

Akhiani, A.A., Pappo, J., Kabok, Z., Schon, K., Gao, W., Franzen, L.E., Lycke, N. Protection against *Helicobacter pylori* infection following immunization is IL-12-dependent and mediated by Th1 cells. *J. Immunol.* 169 (2002) 6977-6984

Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., Berg, D.E. PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 6221-6225

Allen, L.A. Modulating phagocyte activation: the pros and cons of *Helicobacter pylori* virulence factors. *J. Exp. Med.* 191 (2000) 1451-1454

Allen, L.A. The role of the neutrophil and phagocytosis in infection caused by *Helicobacter pylori*. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 14 (2001) 273-277

Amieva, M.R., Salama, N.R., Tompkins, L.S., Falkow, S. *Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. *Cell Microbiol.* 4 (2002) 677-690

Amieva, M.R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L.S., Nelson, W.J., Falkow, S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* 300 (2003) 1430-1434

Anderson, K.V. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 12 (2000) 13-19

Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M., Jr., Tummuru, M.K., Blaser, M.J., Cover, T.L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 17771-17777

Atherton, J.C., Peek, R.M., Jr., 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

Bachmann, M.F., Zinkernagel, R.M. Neutralizing antiviral B cell responses. *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997) 235-270

Backert, S., Selbach, M. Tyrosine-phosphorylated bacterial effector proteins: the enemies within. *Trends Microbiol.* 13 (2005) 476-484

Baggiolini, M., Walz, A., Kunkel, S.L. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest* 84 (1989) 1045-1049

- Bamford, K.B., Fan, X., Crowe, S.E., Leary, J.F., Gourley, W.K., Luthra, G.K., Brooks, E.G., Graham, D.Y., Reyes, V.E., Ernst, P.B. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* 114 (1998) 482-492
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Palucka, K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18 (2000) 767-811
- Basset, C., Holton, J., O'Mahony, R., Roitt, I. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine* 21 Suppl 2 (2003) S12-S23
- Bauer, M., Redecke, V., Ellwart, J.W., Scherer, B., Kremer, J.P., Wagner, H., Lipford, G.B. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J. Immunol.* 166 (2001) 5000-5007
- Bayerdorffer, E., Neubauer, A., Rudolph, B., Thiede, C., Lehn, N., Eidt, S., Stolte, M. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. *Lancet* 345 (1995) 1591-1594
- Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M., Sacks, D.L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420 (2002) 502-507
- Belkaid, Y., Rouse, B.T. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat. Immunol.* 6 (2005) 353-360
- Belvin, M.P., Anderson, K.V. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12 (1996) 393-416
- Blanchard, T.G., Eisenberg, J.C., Matsumoto, Y. Clearance of *Helicobacter pylori* infection through immunization: the site of T cell activation contributes to vaccine efficacy. *Vaccine* 22 (2004) 888-897
- Blanchard, T.G., Nedrud, J.G., Reardon, E.S., Czinn, S.J. Qualitative and quantitative analysis of the local and systemic antibody response in mice and humans with *Helicobacter* immunity and infection. *J. Infect. Dis.* 179 (1999) 725-728
- Blaser, M.J., Atherton, J.C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J. Clin. Invest* 113 (2004) 321-333
- Blaser, M.J., Perez-Perez, G.I., Kleanthous, H., Cover, T.L., Peek, R.M., Chyou, P.H., Stemmermann, G.N., Nomura, A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 55 (1995) 2111-2115
- Bodger, K., Crabtree, J.E. *Helicobacter pylori* and gastric inflammation. *Br. Med. Bull.* 54 (1998) 139-150
- Bontkes, H.J., Veenendaal, R.A., Pena, A.S., Goedhard, J.G., van, D.W., Kuiper, J., Meijer, J.L., Lamers, C.B. IgG subclass response to *Helicobacter pylori* in patients with chronic active gastritis and duodenal ulcer. *Scand. J. Gastroenterol.* 27 (1992) 129-133
- 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* 262 (1993) 1892-1895

- Brenner, H., Arndt, V., Stegmaier, C., Ziegler, H., Rothenbacher, D. Is *Helicobacter pylori* infection a necessary condition for noncardia gastric cancer? *Am. J. Epidemiol.* 159 (2004) 252-258
- Burg, N.D., Pillinger, M.H. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin. Immunol.* 99 (2001) 7-17
- Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A., Colonna, M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat. Immunol.* 1 (2000) 305-310
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., Colonna, M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* 5 (1999) 919-923
- Censini, S., Stein, M., Covacci, A. Cellular responses induced after contact with *Helicobacter pylori*. *Curr. Opin. Microbiol.* 4 (2001) 41-46
- Chomczynski, P., Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156-159
- Colonna, M., Krug, A., Cella, M. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* 14 (2002) 373-379
- Constant, S.L., Bottomly, K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997) 297-322
- Cook, D.N., Prosser, D.M., Forster, R., Zhang, J., Kuklin, N.A., Abbondanzo, S.J., Niu, X.D., Chen, S.C., Manfra, D.J., Wiekowski, M.T., Sullivan, L.M., Smith, S.R., Greenberg, H.B., Narula, S.K., Lipp, M., Lira, S.A. CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity.* 12 (2000) 495-503
- Correa, P., Chen, V.W. Gastric cancer. *Cancer Surv.* 19-20 (1994) 55-76
- Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N., . Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90 (1993) 5791-5795
- Cover, T.L., Dooley, C.P., Blaser, M.J. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect. Immun.* 58 (1990) 603-610
- Cover, T.L., Tummuru, M.K., Cao, P., Thompson, S.A., Blaser, M.J. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 10566-10573
- Crabtree, J.E., Farmery, S.M., Lindley, I.J., 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) 945-950

- Crabtree, J.E., Taylor, J.D., Wyatt, J.I., Heatley, R.V., Shallcross, T.M., Tompkins, D.S., Rathbone, B.J. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet* 338 (1991) 332-335
- D'Elios, M.M., Amedei, A., Manghetti, M., Costa, F., Baldari, C.T., Quazi, A.S., Telford, J.L., Romagnani, S., Del, P.G. Impaired T-cell regulation of B-cell growth in *Helicobacter pylori*--related gastric low-grade MALT lymphoma. *Gastroenterology* 117 (1999) 1105-1112
- D'Elios, M.M., Manghetti, M., Almerigogna, F., Amedei, A., Costa, F., Burroni, D., Baldari, C.T., Romagnani, S., Telford, J.L., Del, P.G. Different cytokine profile and antigen-specificity repertoire in *Helicobacter pylori*-specific T cell clones from the antrum of chronic gastritis patients with or without peptic ulcer. *Eur. J. Immunol.* 27 (1997a) 1751-1755
- D'Elios, M.M., Manghetti, M., De, C.M., Costa, F., Baldari, C.T., Burroni, D., Telford, J.L., Romagnani, S., Del, P.G. T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J. Immunol.* 158 (1997b) 962-967
- Del, G.G., Michetti, P. Inflammation, immunity and vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 9 Suppl 1 (2004) 23-28
- Dixon, M. F. pathology of gastritis and peptic ulceration. 459-469. 2001. in: Mobley HLT, Mendz GL, Hazel SL eds. *Helicobacter pylori: physiology and genetics*. Washington, D.C.: ASM Press, 2001.
- Dixon, M.F., Genta, R.M., Yardley, J.H., Correa, P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am. J. Surg. Pathol.* 20 (1996) 1161-1181
- Dooley, C.P., Cohen, H., Fitzgibbons, P.L., Bauer, M., Appleman, M.D., Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N. Engl. J. Med.* 321 (1989) 1562-1566
- Dubois, A., Fiala, N., Heman-Ackah, L.M., Drazek, E.S., Tarnawski, A., Fishbein, W.N., Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J. Natural gastric infection with *Helicobacter pylori* in monkeys: a model for spiral bacteria infection in humans. *Gastroenterology* 106 (1994) 1405-1417
- Eaton, K.A., Ringler, S.R., Danon, S.J. Murine splenocytes induce severe gastritis and delayed-type hypersensitivity and suppress bacterial colonization in *Helicobacter pylori*-infected SCID mice. *Infect. Immun.* 67 (1999) 4594-4602
- Eaton, K.A., Suerbaum, S., Josenhans, C., Krakowka, S. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect. Immun.* 64 (1996) 2445-2448
- El-Omar, E.M. The importance of interleukin 1beta in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut* 48 (2001) 743-747
- El-Omar, E.M., Penman, I.D., 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
- Engstrand, L., Graham, D., Scheynius, A., Genta, R.M., El-Zaatari, F. Is the sanctuary where *Helicobacter pylori* avoids antibacterial treatment intracellular? *Am. J. Clin. Pathol.* 108 (1997) 504-509

- Ermak, T.H., Giannasca, P.J., Nichols, R., Myers, G.A., Nedrud, J., Weltzin, R., Lee, C.K., Kleanthous, H., Monath, T.P. Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J. Exp. Med.* 188 (1998) 2277-2288
- Ernst, P.B., Gold, B.D. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu. Rev. Microbiol.* 54 (2000) 615-640
- Ernst, P.B., Takaishi, H., Crowe, S.E. *Helicobacter pylori* infection as a model for gastrointestinal immunity and chronic inflammatory diseases. *Dig. Dis.* 19 (2001) 104-111
- Falk, P.G., Bry, L., Holgersson, J., Gordon, J.I. Expression of a human alpha-1,3/4-fucosyltransferase in the pit cell lineage of FVB/N mouse stomach results in production of Leb-containing glycoconjugates: a potential transgenic mouse model for studying *Helicobacter pylori* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92 (1995) 1515-1519
- Fan, X.J., Chua, A., Shahi, C.N., McDevitt, J., Keeling, P.W., Kelleher, D. Gastric T lymphocyte responses to *Helicobacter pylori* in patients with H pylori colonisation. *Gut* 35 (1994) 1379-1384
- Feldman, R. A. Epidemiologic observations and open questions about disease and infection caused by *H.pylori*. 29-51. 2001. in Achtman M, Suerbaum S, eds. *Helicobacter pylori: molecular and cellular biology*. Wymondham, United Kingdom: Horizon Scientific Press, 2001.
- Feldman, R.A., Eccersley, A.J., Hardie, J.M. Epidemiology of *Helicobacter pylori*: acquisition, transmission, population prevalence and disease-to-infection ratio. *Br. Med. Bull.* 54 (1998) 39-53
- Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M., Munz, C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J. Exp. Med.* 195 (2002) 343-351
- Fernandez, N.C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E., Zitvogel, L. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* 5 (1999) 405-411
- Ferrero, R.L., Thiberge, J.M., Labigne, A. Local immunoglobulin G antibodies in the stomach may contribute to immunity against *Helicobacter* infection in mice. *Gastroenterology* 113 (1997) 185-194
- Fitzgerald-Bocarsly, P. Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacol. Ther.* 60 (1993) 39-62
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4 (2003) 330-336
- Forman, D., Newell, D.G., Fullerton, F., Yarnell, J.W., Stacey, A.R., Wald, N., Sitas, F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ* 302 (1991) 1302-1305



- Fox, J. G. Rodent models for Helicobacter-induced gastric cancer. Hunt, R. H. and Tytgat, G. N. in Helicobacter pylori, Basic Mechanisms to Clinical Cure 2000. 489-505. 2000. Kluwer Academic Publishers.
- Fox, J.G., Beck, P., Dangler, C.A., Whary, M.T., Wang, T.C., Shi, H.N., Nagler-Anderson, C. Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy. *Nat. Med.* 6 (2000) 536-542
- Fox, J.G., Sheppard, B.J., Dangler, C.A., Whary, M.T., Ihrig, M., Wang, T.C. Germ-line p53-targeted disruption inhibits helicobacter-induced premalignant lesions and invasive gastric carcinoma through down-regulation of Th1 proinflammatory responses. *Cancer Res.* 62 (2002) 696-702
- Friedl, P., Brocker, E.B. TCR triggering on the move: diversity of T-cell interactions with antigen-presenting cells. *Immunol. Rev.* 186 (2002) 83-89
- Gallo, R.L., Murakami, M., Ohtake, T., Zaiou, M. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110 (2002) 823-831
- Galmiche, A., Rassow, J., Doye, A., Cagnol, S., Chambard, J.C., Contamin, S., de, T., V, Just, I., Ricci, V., Solcia, E., Van, O.E., Boquet, P. The N-terminal 34 kDa fragment of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J.* 19 (2000) 6361-6370
- Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Boren, T., Rad, R., Schepp, W., Miehke, S., Classen, M., Prinz, C. Clinical relevance of the Helicobacter pylori gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96 (1999) 12778-12783
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., Trinchieri, G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195 (2002) 327-333
- Gessner, A., Rollinghoff, M. Biologic functions and signaling of the interleukin-4 receptor complexes. *Immunobiology* 201 (2000) 285-307
- Go, M.F., Kapur, V., Graham, D.Y., Musser, J.M. Population genetic analysis of Helicobacter pylori by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J. Bacteriol.* 178 (1996) 3934-3938
- Gobert, A.P., McGee, D.J., Akhtar, M., Mendz, G.L., Newton, J.C., Cheng, Y., Mobley, H.L., Wilson, K.T. Helicobacter pylori arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98 (2001) 13844-13849
- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A. Microbiological aspects of Helicobacter pylori (Campylobacter pylori). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9 (1990) 1-13
- Gordon, D. CagA protein from Helicobacter pylori is a Trojan Horse to epithelial cells. *Gastroenterology* 118 (2000) 817
- Gordon, S., Taylor, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 953-964

- Graham, D.Y. *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: a model. *Gastroenterology* 113 (1997) 1983-1991
- Grouard, G., Rissoan, M.C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., Liu, Y.J. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* 185 (1997) 1101-1111
- 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. U. S. A* 99 (2002) 15136-15141
- Gunn, M.C., Stephens, J.C., Stewart, J.A., Rathbone, B.J., West, K.P. The significance of cagA and vacA subtypes of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of inflammation and peptic ulceration. *J. Clin. Pathol.* 51 (1998) 761-764
- 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. U. S. A* 95 (1998) 3925-3930
- Hafsi, N., Voland, P., Schwendy, S., Rad, R., Reindl, W., Gerhard, M., Prinz, C. Human dendritic cells respond to *Helicobacter pylori*, promoting NK cell and Th1-effector responses in vitro. *J. Immunol.* 173 (2004) 1249-1257
- Hartmann, G., Weiner, G.J., Krieg, A.M. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96 (1999) 9305-9310
- Hashimoto, C., Hudson, K.L., Anderson, K.V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52 (1988) 269-279
- Hatz, R.A., Meimarakis, G., Bayerdorffer, E., Stolte, M., Kirchner, T., Enders, G. Characterization of lymphocytic infiltrates in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Scand. J. Gastroenterol.* 31 (1996) 222-228
- Hawtin, P.R., Stacey, A.R., Newell, D.G. Investigation of the structure and localization of the urease of *Helicobacter pylori* using monoclonal antibodies. *J. Gen. Microbiol.* 136 (1990) 1995-2000
- 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., Mark, M.R., Buchan, A.M., Finlay, B.B. Characteristics of *Helicobacter pylori* attachment to human primary antral epithelial cells. *Microbes. Infect.* 2 (2000) 1669-1676
- Hedges, S.R., Agace, W.W., Svanborg, C. Epithelial cytokine responses and mucosal cytokine networks. *Trends Microbiol.* 3 (1995) 266-270
- 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

- Ho, I.C., Glimcher, L.H. Transcription: tantalizing times for T cells. *Cell* 109 Suppl (2002) S109-S120
- Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299 (2003) 1057-1061
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I.M., Kersulyte, D., Incecik, E.T., Berg, D.E., Covacci, A., Engstrand, L., Boren, T. Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 279 (1998) 373-377
- Israel, D.A., Peek, R.M. pathogenesis of Helicobacter pylori-induced gastric inflammation. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15 (2001) 1271-1290
- Israel, D.A., Salama, N., Arnold, C.N., Moss, S.F., Ando, T., Wirth, H.P., Tham, K.T., Camorlinga, M., Blaser, M.J., Falkow, S., Peek, R.M., Jr. Helicobacter pylori strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *J. Clin. Invest* 107 (2001) 611-620
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik M.J. Immunobiology: the immune system in health and disease. 6th edition. 2005 Garland Science Publishing.
- Kapsenberg, M.L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 984-993
- Karttunen, R.A., Karttunen, T.J., Yousfi, M.M., el-Zimaity, H.M., Graham, D.Y., el-Zaatari, F.A. Expression of mRNA for interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-12 (p40) in normal gastric mucosa and in mucosa infected with Helicobacter pylori. *Scand. J. Gastroenterol.* 32 (1997) 22-27
- Katakai, T., Mori, K.J., Masuda, T., Shimizu, A. Differential localization of Th1 and Th2 cells in autoimmune gastritis. *Int. Immunol.* 10 (1998) 1325-1334
- 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
- Khattari, R., Cox, T., Yasayko, S.A., Ramsdell, F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* 4 (2003) 337-342
- Kirschner, D.E., Blaser, M.J. The dynamics of Helicobacter pylori infection of the human stomach. *J. Theor. Biol.* 176 (1995) 281-290
- Koop, I. Gastroenterologie compact. 2002. Georg Thieme Verlag.
- Kosunen, T.U., Seppala, K., Sarna, S., Sipponen, P. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of Helicobacter pylori. *Lancet* 339 (1992) 893-895
- Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z.K., Endres, S., Krieg, A.M., Hartmann, G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 31 (2001) 2154-2163
- Kuipers, E.J., Israel, D.A., Kusters, J.G., Gerrits, M.M., Weel, J., van Der, E.A., van Der Hulst, R.W., Wirth, H.P., Hook-Nikanne, J., Thompson, S.A., Blaser, M.J. Quasispecies

development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J. Infect. Dis.* 181 (2000) 273-282

Kuipers, E.J., Perez-Perez, G.I., Meuwissen, S.G., Blaser, M.J. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J. Natl. Cancer Inst.* 87 (1995) 1777-1780

Kwok, T., Backert, S., Schwarz, H., Berger, J., Meyer, T.F. Specific entry of *Helicobacter pylori* into cultured gastric epithelial cells via a zipper-like mechanism. *Infect. Immun.* 70 (2002) 2108-2120

Labigne, A., de, R.H. Determinants of *Helicobacter pylori* pathogenicity. *Infect. Agents Dis.* 5 (1996) 191-202

Lane, P. Role of OX40 signals in coordinating CD4 T cell selection, migration, and cytokine differentiation in T helper (Th)1 and Th2 cells. *J. Exp. Med.* 191 (2000) 201-206

Le, Y., Murphy, P.M., Wang, J.M. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol.* 23 (2002) 541-548

Lee, A., O'Rourke, J., De Ungria, M.C., Robertson, B., Daskalopoulos, G., Dixon, M.F. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 112 (1997) 1386-1397

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86 (1996) 973-983

Leunk, R.D., Johnson, P.T., David, B.C., Kraft, W.G., Morgan, D.R. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 26 (1988) 93-99

Leying, H., Suerbaum, S., Geis, G., Haas, R. Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol. Microbiol.* 6 (1992) 2863-2874

Li, C.Y. Diagnosis of mastocytosis: value of cytochemistry and immunohistochemistry. *Leuk. Res.* 25 (2001) 537-541

Liew, F.Y. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 55-60

Lindholm, C., Quiding-Jarbrink, M., Lonroth, H., Hamlet, A., Svennerholm, A.M. Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect. Immun.* 66 (1998) 5964-5971

Liu, Y.J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106 (2001) 259-262

Liu, Y.J., Kanzler, H., Soumelis, V., Gilliet, M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat. Immunol.* 2 (2001) 585-589

Liu, Y.J., Zhang, J., Lane, P.J., Chan, E.Y., MacLennan, I.C. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur. J. Immunol.* 21 (1991) 2951-2962

- Lundgren, A., Stromberg, E., Sjoling, A., Lindholm, C., Enarsson, K., Edebo, A., Johnsson, E., Suri-Payer, E., Larsson, P., Rudin, A., Svennerholm, A.M., Lundin, B.S. Mucosal FOXP3-expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Infect. Immun.* 73 (2005) 523-531
- Lundgren, A., Suri-Payer, E., Enarsson, K., Svennerholm, A.M., Lundin, B.S. *Helicobacter pylori*-specific CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> regulatory T cells suppress memory T-cell responses to *H. pylori* in infected individuals. *Infect. Immun.* 71 (2003) 1755-1762
- Magram, J., Connaughton, S.E., Warriar, R.R., Carvajal, D.M., Wu, C.Y., Ferrante, J., Stewart, C., Sarmiento, U., Faherty, D.A., Gately, M.K. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity.* 4 (1996) 471-481
- Malaty, H.M., Graham, D.Y. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 35 (1994) 742-745
- Malaty, H.M., Nyren, O. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 8 Suppl 1 (2003) 8-12
- Marchetti, M., Arico, B., Burroni, D., Figura, N., Rappuoli, R., Ghiara, P. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 267 (1995) 1655-1658
- Marone, G., Florio, G., Petraroli, A., Triggiani, M., de, P.A. Human mast cells and basophils in HIV-1 infection. *Trends Immunol.* 22 (2001) 229-232
- Marone, G., Triggiani, M., de, P.A. Mast cells and basophils: friends as well as foes in bronchial asthma? *Trends Immunol.* 26 (2005) 25-31
- Marshall, B.J., Goodwin, C.S., Warren, J.R., Murray, R., Blincow, E.D., Blackburn, S.J., Phillips, M., Waters, T.E., Sanderson, C.R. Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet* 2 (1988) 1437-1442
- Marshall, B.J., Warren, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1 (1984) 1311-1315
- Martin, R.M., Brady, J.L., Lew, A.M. The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice. *J. Immunol. Methods* 212 (1998) 187-192
- Mattapallil, J.J., Dandekar, S., Canfield, D.R., Solnick, J.V. A predominant Th1 type of immune response is induced early during acute *Helicobacter pylori* infection in rhesus macaques. *Gastroenterology* 118 (2000) 307-315
- McGuirk, P., McCann, C., Mills, K.H. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J. Exp. Med.* 195 (2002) 221-231
- Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1 (2001) 135-145
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388 (1997) 394-397

- Megraud, F. Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9 Suppl 2 (1995) 85-91
- Metcalf, D.D., Baram, D., Mekori, Y.A. Mast cells. *Physiol Rev.* 77 (1997) 1033-1079
- Middleton, D., Curran, M., Maxwell, L. Natural killer cells and their receptors. *Transpl. Immunol.* 10 (2002) 147-164
- Miehlke, S., Kirsch, C., gha-Amiri, K., Gunther, T., Lehn, N., Malfertheiner, P., Stolte, M., Ehninger, G., Bayerdorffer, E. The *Helicobacter pylori* vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int. J. Cancer* 87 (2000) 322-327
- Mitchell, H.M., Mascord, K., Hazell, S.L., Daskalopoulos, G. Association between the IgG subclass response, inflammation and disease status in *Helicobacter pylori* infection. *Scand. J. Gastroenterol.* 36 (2001) 149-155
- Mittrucker, H.W., Kaufmann, S.H. Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited. *Eur. J. Immunol.* 34 (2004) 306-312
- Modi, W.S., Yoshimura, T. Isolation of novel GRO genes and a phylogenetic analysis of the CXC chemokine subfamily in mammals. *Mol. Biol. Evol.* 16 (1999) 180-193
- Mohammadi, M., Czinn, S., Redline, R., Nedrud, J. *Helicobacter*-specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. *J. Immunol.* 156 (1996) 4729-4738
- Montecucco, C., de, B.M. Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes. Infect.* 5 (2003) 715-721
- Moretta, A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 957-964
- Moser, M., Murphy, K.M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat. Immunol.* 1 (2000) 199-205
- Mosmann, T.R., Coffman, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7 (1989) 145-173
- Murphy, K.M., Reiner, S.L. The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 933-944
- Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006) 173-182
- Nathan, C., Shiloh, M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97 (2000) 8841-8848
- Negrini, R., Savio, A., Appelmelk, B.J. Autoantibodies to gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2 Suppl 1 (1997) S13-S16

- O'Garra, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*. 8 (1998) 275-283
- O'Garra, A., Vieira, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat. Med.* 10 (2004) 801-805
- Odenbreit, S., Puls, 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
- 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) 1601-1610
- Owen, R.J. *Helicobacter*--species classification and identification. *Br. Med. Bull.* 54 (1998) 17-30
- Pagliaccia, C., de, B.M., Lupetti, P., Ji, X., Burrioni, D., Cover, T.L., Papini, E., Rappuoli, R., Telford, J.L., Reyrat, J.M. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95 (1998) 10212-10217
- Pappo, J., Torrey, D., Castriotta, L., Savinainen, A., Kabok, Z., Ibraghimov, A. *Helicobacter pylori* infection in immunized mice lacking major histocompatibility complex class I and class II functions. *Infect. Immun.* 67 (1999) 337-341
- Parsonnet, J., Friedman, G.D., Orentreich, N., Vogelman, H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 40 (1997) 297-301
- Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vandersteen, D.P., Chang, Y., Vogelman, J.H., Orentreich, N., Sibley, R.K. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 325 (1991) 1127-1131
- Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A.B., Warnke, R.A., Jellum, E., Orentreich, N., Vogelman, J.H., Friedman, G.D. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 330 (1994) 1267-1271
- Paul, W.E., Seder, R.A. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76 (1994) 241-251
- Peek, R.M., Jr., Blaser, M.J. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 28-37
- Peek, R.M., Jr., 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 the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res.* 59 (1999) 6124-6131
- Peek, R.M., Jr., 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* 73 (1995) 760-770
- Peiser, L., Mukhopadhyay, S., Gordon, S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 14 (2002) 123-128

- Perez-Perez, G.I., Dworkin, B.M., Chodos, J.E., Blaser, M.J. *Campylobacter pylori* antibodies in humans. *Ann. Intern. Med.* 109 (1988) 11-17
- Philpott, D.J., Belaid, D., Troubadour, P., Thiberge, J.M., Tankovic, J., Labigne, A., Ferrero, R.L. Reduced activation of inflammatory responses in host cells by mouse-adapted *Helicobacter pylori* isolates. *Cell Microbiol.* 4 (2002) 285-296
- Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., Valiante, N.M. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J. Exp. Med.* 195 (2002) 335-341
- Piccotti, J.R., Li, K., Chan, S.Y., Ferrante, J., Magram, J., Eichwald, E.J., Bishop, D.K. Alloantigen-reactive Th1 development in IL-12-deficient mice. *J. Immunol.* 160 (1998) 1132-1138
- Pitman, R.S., Blumberg, R.S. First line of defense: the role of the intestinal epithelium as an active component of the mucosal immune system. *J. Gastroenterol.* 35 (2000) 805-814
- Prinz, C., Hafsi, N., Volland, P. *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. *Trends Microbiol.* 11 (2003) 134-138
- Raghavan, S., Fredriksson, M., Svennerholm, A.M., Holmgren, J., Suri-Payer, E. Absence of CD4+CD25+ regulatory T cells is associated with a loss of regulation leading to increased pathology in *Helicobacter pylori*-infected mice. *Clin. Exp. Immunol.* 132 (2003) 393-400
- Raghavan, S., Suri-Payer, E., Holmgren, J. Antigen-specific in vitro suppression of murine *Helicobacter pylori*-reactive immunopathological T cells by CD4CD25 regulatory T cells. *Scand. J. Immunol.* 60 (2004) 82-88
- Ramarao, N., Gray-Owen, S.D., Meyer, T.F. *Helicobacter pylori* induces but survives the extracellular release of oxygen radicals from professional phagocytes using its catalase activity. *Mol. Microbiol.* 38 (2000) 103-113
- Ramarao, N., Meyer, T.F., Ramarao, N., Gray-Owen, S.D., Meyer, T.F. *Helicobacter pylori* resists phagocytosis by macrophages: quantitative assessment by confocal microscopy and fluorescence-activated cell sorting  
*Helicobacter pylori* induces but survives the extracellular release of oxygen radicals from professional phagocytes using its catalase activity. *Infect. Immun.* 69 (2001) 2604-2611
- Raulet, D.H. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat. Immunol.* 5 (2004) 996-1002
- Ravetch, J.V., Bolland, S. IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 275-290
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., Ricciardi-Castagnoli, P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2 (2001) 361-367
- Reyrat, J.M., Pelicic, V., Papini, E., Montecucco, C., Rappuoli, R., Telford, J.L. Towards deciphering the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Mol. Microbiol.* 34 (1999) 197-204
- Rogers, A.B., Fox, J.G. Inflammation and Cancer. I. Rodent models of infectious gastrointestinal and liver cancer. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 286 (2004) G361-G366



- Roth, K.A., Kapadia, S.B., Martin, S.M., Lorenz, R.G. Cellular immune responses are essential for the development of *Helicobacter felis*-associated gastric pathology. *J. Immunol.* 163 (1999) 1490-1497
- Rouse, B.T., Suvas, S. Regulatory cells and infectious agents: detentes cordiale and contraire. *J. Immunol.* 173 (2004) 2211-2215
- Rovai, L.E., Herschman, H.R., Smith, J.B. The murine neutrophil-chemoattractant chemokines LIX, KC, and MIP-2 have distinct induction kinetics, tissue distributions, and tissue-specific sensitivities to glucocorticoid regulation in endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.* 64 (1998) 494-502
- Rudi, J., Kuck, D., Strand, S., von, H.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
- Sachs, G., Shin, J.M., Munson, K., Vagin, O., Lambrecht, N., Scott, D.R., Weeks, D.L., Melchers, K. Review article: the control of gastric acid and *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14 (2000) 1383-1401
- Sachs, G., Weeks, D.L., Melchers, K., Scott, D.R. The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu. Rev. Physiol* 65 (2003) 349-369
- Sakaguchi, S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 22 (2004) 531-562
- Salomon, B., Bluestone, J.A. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 225-252
- Sawai, N., Kita, M., Kodama, T., Tanahashi, T., Yamaoka, Y., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Imanishi, J. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Infect. Immun.* 67 (1999) 279-285
- Schlemper, R.J., van der Werf, S.D., Biemond, I., Lamers, C.B. Seroepidemiology of gastritis in Japanese and Dutch male employees with and without ulcer disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 8 (1996) 33-39
- Segal, E.D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., Tompkins, L.S. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96 (1999b) 14559-14564
- Segal, E.D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., Tompkins, L.S. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96 (1999a) 14559-14564
- 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
- Semino-Mora, C., Doi, S.Q., Marty, A., Simko, V., Carlstedt, I., Dubois, A. Intracellular and interstitial expression of *Helicobacter pylori* virulence genes in gastric precancerous intestinal metaplasia and adenocarcinoma. *J. Infect. Dis.* 187 (2003) 1165-1177

- Sharma, S.A., Tummuru, M.K., Miller, G.G., Blaser, M.J. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. *Infect. Immun.* 63 (1995a) 1681-1687
- Sharma, S.A., Tummuru, M.K., Miller, G.G., Blaser, M.J. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. *Infect. Immun.* 63 (1995b) 1681-1687
- Shimoyama, T., Crabtree, J.E. Bacterial factors and immune pathogenesis in *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 43 Suppl 1 (1998) S2-S5
- Shortman, K., Liu, Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 151-161
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., Liu, Y.J. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284 (1999) 1835-1837
- Singer, M., Sansonetti, P.J. IL-8 is a key chemokine regulating neutrophil recruitment in a new mouse model of *Shigella*-induced colitis. *J. Immunol.* 173 (2004) 4197-4206
- 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 exacerbated in IL-4, but not IFN- $\gamma$ , gene-deficient mice. *J. Immunol.* 165 (2000) 1022-1029
- Sperling, A.I., Bluestone, J.A. ICOS costimulation: It's not just for TH2 cells anymore. *Nat. Immunol.* 2 (2001) 573-574
- Steinman, R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 271-296
- Steinman, R.M., Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137 (1973) 1142-1162
- Stephens, J.C., Stewart, J.A., Folwell, A.M., Rathbone, B.J. *Helicobacter pylori* cagA status, vacA genotypes and ulcer disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 10 (1998) 381-384
- Suerbaum, S., Achtman, M. *Helicobacter pylori*: recombination, population structure and human migrations. *Int. J. Med. Microbiol.* 294 (2004) 133-139
- Suerbaum, S., Michetti, P. *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J. Med.* 347 (2002) 1175-1186
- Takeda, K., Akira, S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells* 6 (2001) 733-742
- Thompson, C., Powrie, F. Regulatory T cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4 (2004) 408-414
- Thornton, A.M., Shevach, E.M. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 188 (1998) 287-296

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

Trinchieri, G. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 47 (1989) 187-376

Uemura, N., Okamoto, S. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on subsequent development of cancer after endoscopic resection of early gastric cancer in Japan. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 29 (2000) 819-827

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. *N. Engl. J. Med.* 345 (2001) 784-789

van Der Hulst, R.W., Rauws, E.A., Koycu, B., Keller, J.J., Bruno, M.J., Tijssen, J.G., Tytgat, G.N. Prevention of ulcer recurrence after eradication of *Helicobacter pylori*: a prospective long-term follow-up study. *Gastroenterology* 113 (1997) 1082-1086

van Doorn, L.J., Figueiredo, C., Sanna, R., Pena, S., Midolo, P., Ng, E.K., Atherton, J.C., Blaser, M.J., Quint, W.G. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J. Clin. Microbiol.* 36 (1998a) 2597-2603

van Doorn, L.J., Figueiredo, C., Sanna, R., Plaisier, A., Schneeberger, P., de B.W., Quint, W. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 115 (1998b) 58-66

Varona, R., Villares, R., Carramolino, L., Goya, I., Zaballos, A., Gutierrez, J., Torres, M., Martinez, A., Marquez, G. CCR6-deficient mice have impaired leukocyte homeostasis and altered contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity responses. *J. Clin. Invest* 107 (2001) R37-R45

Warren JR, Marshall BJ Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1 (1983) 1273-1275

Watanabe, K., Iida, M., Takaishi, K., Suzuki, T., Hamada, Y., Iizuka, Y., Tsurufuji, S. Chemoattractants for neutrophils in lipopolysaccharide-induced inflammatory exudate from rats are not interleukin-8 counterparts but gro-gene-product/melanoma-growth-stimulating-activity-related factors. *Eur. J. Biochem.* 214 (1993) 267-270

Watanabe, T., Tada, M., Nagai, H., Sasaki, S., Nakao, M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology* 115 (1998) 642-648

Wedemeyer, J., Tsai, M., Galli, S.J. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12 (2000) 624-631

Weeks, D.L., Eskandari, S., Scott, D.R., Sachs, G. A H<sup>+</sup>-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* 287 (2000) 482-485

Wittman, E.M., Mravunac, M., Bex, M.J., Hopman, W.P., Verschoor, J.S., Tytgat, G.N., de Koning, R.W. Improvement of gastric inflammation and resolution of epithelial damage one year after eradication of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Pathol.* 48 (1995) 250-256

Wotherspoon, A.C. Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. *Br. Med. Bull.* 54 (1998) 79-85

Wotherspoon, A.C., Ortiz-Hidalgo, C., Falzon, M.R., Isaacson, P.G. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 338 (1991) 1175-1176

Wurster, A.L., Tanaka, T., Grusby, M.J. The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* 19 (2000) 2577-2584

Yamaoka, Y., Kita, M., Kodama, T., Sawai, N., Imanishi, J. Helicobacter pylori cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. *Gastroenterology* 110 (1996) 1744-1752

Zhang, P., Summer, W.R., Bagby, G.J., Nelson, S. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol. Rev.* 173 (2000) 39-51

Zhang, Y., Apilado, R., Coleman, J., Ben-Sasson, S., Tsang, S., Hu-Li, J., Paul, W.E., Huang, H. Interferon gamma stabilizes the T helper cell type 1 phenotype. *J. Exp. Med.* 194 (2001) 165-172

Zucca, E., Bertoni, F., Roggero, E., Bosshard, G., Cazzaniga, G., Pedrinis, E., Biondi, A., Cavalli, F. Molecular analysis of the progression from Helicobacter pylori-associated chronic gastritis to mucosa-associated lymphoid-tissue lymphoma of the stomach. *N. Engl. J. Med.* 338 (1998) 804-810

Zucca, E., Bertoni, F., Roggero, E., Cavalli, F. The gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type. *Blood* 96 (2000) 410-419

## **Danksagung**

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christian Prinz, der meine Arbeit stets mit fachlicher Kompetenz, zahlreichen konstruktiven Anregungen und viel Geduld betreut und unterstützt hat.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Roland Rad für die hervorragende Betreuung und exzellente fachliche Kompetenz und Unterstützung. Ohne Dr. Rad wäre diese Arbeit nicht realisierbar gewesen. Insbesondere möchte ich mich ebenfalls bei Carmen Hartmann und Dr. Jörg Nährig für die kompetente „immunhistochemische“ Mitbetreuung und vor allem für die entstandene Freundschaft bedanken.

Außerdem möchte ich mich bedanken bei Frau Dr. Petra Voland (ohne Petra kein Labor), meinen Eltern (die ewigen Sponsoren) und bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Prinz.