



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

II. Medizinische Klinik und Poliklinik Klinikum rechts der Isar Gastroenterologisches Forschungslabor

Humane Immunantwort auf intakte Helicobacter pylori in vitro

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

Nadia Hafsi

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

II. Medizinische Klinik und Poliklinik Klinikum rechts der Isar Gastroenterologisches Forschungslabor

Humane Immunantwort auf intakte Helicobacter pylori in vitro

Nadia Hafsi

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät

Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

genehmigter Dissertation.

Vorsitzender der Dissertation:	Univ. Prof. Dr. J. Bauer
Prüfer der Dissertation:	1. Univ. Prof. Dr. M. Schemann
	2. apl. Prof. Dr. Chr. Prinz

Die Dissertation wurde am 17. Dezember 2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17. Februar 2005 angenommen. Diese Arbeit wurde von Juli 2002 bis Juli 2004 an der II. medizinischer Klinikum der Universität Klinik rechts der Isar der Technischen Universität München bei Prof. Dr. Christian Prinz (Leiter der Forschungslabor für Molekular Gastroenterologie) angefertigt.

Eingereicht am: 14 Dezember 2004

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Prinz danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung meiner Doktorarbeit, seine anregenden Gespräches und hilfreichen Diskussionen in immunologischen Fragen.

Für die praktische Betreuung danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Prinz.

Und ich danke herzlich meinem Vater und meiner Mutter und besonders meiner Schwester Linda, meiner Schwester Hounaida und meinem beste Freund Alain Fenninger für die Geduld und die seelische Unterstützung.

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für: Ernährung Landnutzung und Umwelt Der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel: **Humane Immunantwort auf intakte** *Helicobacter pylori* in *vitro*

in: II. Medizinischen Klinik und Poliklinik Klinikum rechts der Isar Gastroenterologisches Forschungslabor unter der Anleitung und Betreuung durch: Prof. Dr. med. C. Prinz ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Teile dieser Dissertation wurden in:

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

veröffentlicht.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den 14 Dezember 2004

Nadia Hafsi

Veröffentlichung

• Teile dieser Arbeit sind in folgender Originalarbeit veröffentlicht:

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

• Co-Autor bei weiteren Originalarbeiten:

Voland P, **Hafsi N**, Marco Zeitner, Prinz C Human immune response towards recombinant Helicobacter pylori urease and cellular fractions (submitted)

Voland P, **Hafsi N**, Zeitner M, Laforsch S, Wagner H, Prinz C. Antigenic properties of HpaA and Omp18, two outer membrane proteins of Helicobacter pylori. Infect Immun. 2003 Jul; 71(7):3837-43.

Prinz C, **Hafsi N**, Voland P. Helicobacter pylori virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. Trends Microbiol. 2003 Mar; 11 (3):134-8. Review.

• Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Teilen auf folgenden Kongressen in Form von Kurzvorträgen und Postern vorgestellt und als Abstract veröffentlicht worden:

Nadia Hafsi, Petra Voland, Christian Prinz: Helicobacter pylori induces MHC class II antigens expression and maturation of human plasmacytoid dendritic cells. Digestive Disease Week 2003, Orlando, Florida, USA.

N Hafsi, P. Voland, Christian Prinz: Helicobacter pylori activates human monozyte-derived dendritic cells, NK- and T-cells in vitro. European Helicobacter Study Group (EHSG) -XVIth International Workshop 2003, Stockholm, Sweden.

P.Voland, **N. Hafsi**, M. Zeitner, M. Gerhard, C. Prinz: Cellular immune responses towards recombinant H. pylori proteins and peptides in vitro. Helicobacter Study Group (EHSG) - XVIIth International Workshop 2004, Vienna, Austria.

C. Schmees, M. Sander, P. Voland, **N. Hafsi**, M. Mempel, C. Prinz, M. Gerhard: H. pylori activatetes T-Cells while inhibiting their proliferation, Helicobacter Study Group (EHSG) - XVIIth International Workshop 2004, Vienna, Austria.

P. Voland, **Nadia Hafsi**, Christian Prinz: Comparison of initial immune response towards recombinant urease A/B and the Helicobacter pylori outer membran proteins HpaA and Omp18 in vitro European Helicobacter. Study Group (EHSG) -XVIth International Workshop 2003, Stockholm, Sweden.

P. Voland, **N. Hafsi**, M. Zeitner, S. Laforsch, H. Wagner and C. Prinz: Human plasmacytoid dendritic cells (ppDC) recognize specific membrane associated proteins of Helicobacter pylori and induce proliferation of Th1-cells in vitro. The European Helicobacter pylori Study Group, Athens, Greece. GUT, Suppl. 2, Vol 51, A47 (4/02), 2002.

Nadia Hafsi, P. Voland, S. Schwendy, M Gerhard, C. Prinz: Helicobacter pylori activates Human dendritic cells, promoting NK-cell and Th1-effector responses in vitro. European Helicobacter Study Group (EHSG) -XVIIth International Workshop 2004, Vienna, Austria.

P. Voland, **N. Hafsi**, M. Zeitner, N. Neumayer, H. Wagner, C. Prinz: Antigenic potential of HpaA and Omp18, two ubiquitiously expressed membrane proteins of Helicobacter pylori. Keystone Symposia: Gene-based vaccines: mechanisms, delivery systems and efficacy (#115), Breckenridge, CO, USA, 2002.

P.Voland, **N. Hafsi**, M. Zeitner, M. Gerhard, C. Prinz: Antigenic Properties of Helicobacter pylori Outer Membrane Proteins (OMP). The Europien Society for H. pylori Research in Helsingoer 2002.

Preise

"**Bestes Poster**" auf dem XVII International Workshop der European Helicobacter Study Group. September 2004, Wien, Ostereich.

Inhaltverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Verlauf der Helicobacter pylori (H. pylori)-Infektion	1
1.2.	H. pylori	1
1.2.1.	Virulenzfaktoren von <i>H. pylori</i>	2
1.2.2.	Human Immunantwort auf <i>H. pylori</i> –Infektion	3
1.3.	Antigenerkennung bei der Immunabwehr	5
1.4.	Antigenaufnahme	6
1.5.	Dendritische Zellen	7
1.6.	Die dendritische Zellen als Mediatoren der Immunantwort	8
1.6.1.	DCs als Lymphozyten aktivierende Zellen	10
1.7.	T-Lymphozyten	11
1.7.1.	Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen	12
1.7.2.	T-Zell-Klassifikation	13
1.7.3.	Die Th ₁ -Differenzierung	14
1.7.4.	Transkriptionsfaktoren der Th ₁ - und Th ₂ -vermittelten Immunantwort	16
1.8.	Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	17
1.8.1.	Die Phänotypen der NK-Zellen	17
1.8.2.	Die NK-Zellen Rezeptoren (NKRs) und das CD16	17
1.8.3.	Zytokine- und Chemokine-Rezeptoren der NK-Zellen	19
1.9.	Ziel der vorliegenden Arbeit	20
	CD-Nomenklatur	21
2.	Material und Methoden	23
2.1.	Geräte	23
2.2.	Chemikalien	25
2.3.	Häufig verwendete Puffer und Medien	25

2.3.	Haung verwendete Puller und Medien	
2.3.1.	Häufig verwendete Puffer	25
2.3.2.	Kulturmedien für Bakterien	25
2.4.	Kultur von Bakterien	
2.4.1.	Verwendete Bakterienstämme	26

2.4.2.	H. pylori und E. coli Kultivierung	26
2.4.3.	Lichtmikroskopische Beurteilung der Morphologie von H. pylori	27
2.5.	Bakterienfraktionierung	27
2.5.1.	Isolierung von <i>H. pylori</i> DNA	27
2.5.2.	H. pylori-Membranfraktionierung	28
2.6.	Proteinbestimmungen (nach Bradford, 1976)	29
2.7.	Analyse von Bakterienfraktionen	29
2.7.1.	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).	29
2.7.2.	Eindimensionale Trizin-SDS PAGE (nach Schägger und Jagow 1988)	30
2.7.3.	Fixierung, Färbung und Entfärbung des Gels	31
2.7.4.	Coomassie-Blau Färbung	31
2.7.5.	Silberfärbung (nach Heukeshoven, 1985)	32
2.8.	Western-Blot-Analyse von Bakterienfraktionen (nach Towbin H 19	79 und
	Burnette WN 1981)	32
2.8.1.	Transfer von Proteinen auf Membranen in "Mini-Gel-Module"-Verfahre	n33
2.8.2.	Anfärbung von Proteinen auf Nitrozellulosefiltern	33
2.8.3.	Immunoblot	34
2.8.4.	Der serologische Test	35
2.9.	Zellbiologische Methoden	36
2.9.1.	Gewinnung von peripheren mononukleärer Zellen (mnZ)	durch
	Dichtegradientzentrifugation aus gesunden Spendern	36
2.9.2.	Immunfluoreszenz und Durchflußzytometrie	38
2.9.3.	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	40
2.9.4.	Aufreinigung von Zellen durch MACS (Magnetic Activated Cell Sort)	42
2.9.4.1.	Magnetische Sortierung von Monozyten	43
2.9.4.2.	Magnetische Sortierung von NK-Zellen	44
2.9.4.3.	Magnetische Sortierung von naiven T-Zellen	45
2.10.	Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten in vitro	46
2.11.	Reifung und Aktivierung von Mo-DCs	47
2.11.1.	Inkubation von de iMo-DCs mit <i>H. pylori</i>	47
2.11.2.	Untersuchung der <i>H. pylori</i> -Aufnahme durch iMo-DCs	48
2.11.3.	Inkubation von iMo-DCs mit H. pylori-Fraktionen	
	(DNA, Mem, iMem, aMem und Zyt)	48
2.11.4.	Kokultur von stimulierten Mo-DCs und autologenen NK-Zellen	49

2.11.5.	Kokultur von stimulierten Mo-DCs und autologenen naiven T-Zellen	49
2.12.	Molekularbiologische Methoden	50
2.12.1.	RNA-Isolierung aus T-Zellen	50
2.12.2.	Reverse Transkription	50
2.12.3.	Real-time quantitative PCR	51
2.13.	Statistische Auswertung	54

Ergebnisse55	5
Analyse von Bakterienfraktionen	55
Eindimensionale SDS-PAGE5	;5
Western-Blot-Analyse	;6
Der serologische Test5	\$8
Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen (mnZ) von H. pylori negativen	
Spendern durch Dichtegradienzentrifugation	59
Magnetische Sortierung	50
Sortierung von Monozyten	50
Sortierung von NK-Zellen	52
Sortierung von naiven T-Zellen	54
Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten in vitro	6
Reifung und Aktivierung von dendritischen Zellen6	58
Inkubation von <i>in vitro</i> generierten DCs mit <i>H. pylori</i> 6	<u>i</u> 9
Effekt der H. pylori Konzentration auf die Aktivierung von Mo-DCs7	3
Der Effekt der Inkubationszeit auf die Mo-DCs-Aktivierung	74
Untersuchung der Antigenaufnahme und Antigenprozessierung bei Mo-Dcs?	75
Effekt von <i>H. pylori</i> -Fraktionen auf die Aktivierung der iMo-DCs7	9
Kokultur von <i>H. pylori</i> infizierten Mo-DCs mit autologenen Zellen	30
Kultur von H. pylori infizierten Mo-DCs mit autologenen NK-Zellen	31
Kultur von H. pylori infizierten Mo-DCs mit autologenen naiven T-Zellen8	\$5
	Ergebnisse 55 Analyse von Bakterienfraktionen 5 Eindimensionale SDS-PAGE 5 Western-Blot-Analyse 5 Der serologische Test 5 Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen (mnZ) von <i>H. pylori</i> negativen Spendern durch Dichtegradienzentrifugation 5 Magnetische Sortierung 6 Sortierung von Monozyten 6 Sortierung von NK-Zellen 6 Sortierung von naiven T-Zellen aus Monozyten <i>in vitro</i> 6 Reifung und Aktivierung von dendritischen Zellen 6 Inkubation von <i>in vitro</i> generierten DCs mit <i>H. pylori</i> . 6 Effekt der Inkubationszeit auf die Mo-DCs-Aktivierung 7 Der Effekt der Inkubationszeit auf die Mo-DCs-Aktivierung bei Mo-Dcs. 7 Effekt von <i>H. pylori</i> infizierten Mo-DCs mit autologenen Zellen. 5 Kultur von <i>H. pylori</i> infizierten Mo-DCs mit autologenen naiven T-Zellen. 5

4.	Diskussion9		
4.1.	Generierung und Aktivierung von dendritichen Zellen in vitro	92	
4.2.	H. pylori-Infektion induziert eine Aktivierung der NK-Zellen	96	
4.3.	<i>H. pylori</i> -Infektion induziert eine Aktivierung der naiven T-Zellen	98	

5.	Zusammenfassung	
6.	Literaturverzeichnis103	

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
aq. bidest.	aqua destillata
BabA	Blut Group Antigen – Bindung Adhesin A
BFA	Brefeldin A
BHI	Brain Heart Infusion
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
B-Zellen	B-Lymphocyten
CagA	Cytotoxin associated Gene A
CD	Clusters of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CCA	Cytochalasin A
CCD	Cytochalasin D
DC	dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-diamin-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent assay
FACS	Fluorescent associated cell sorter (Durchflußzytometer)
FC	Flow Cytometry
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
h	Stunde(n)
H. pylori	Helicobacter pylori
HLA-DR	MHC II Isotyp: Human-Leucocyteassociated antigen
HLA-A, B, C	MHC I Isotyp: Human-Leucocyteassociated antigen
Hr	Human rekombinante
Ig	Immunoglobulin
iM	innere Membran

IL	Interleukin
IFN-γ	Gamma-Interferon
LB	Lauria-Bertami-Medium
L-Glu	L-Glutamin
LPS	Lipopolysaccharide
Lys	Lysat
mAb	Monoklonaler Antikörper
MACS	Magnetic Antigen Cell Sorting
MHC-II	Major histocompatibility complex class II
MHC-I	Major histocompatibility complex class I
MG132	Myo-Genics
	(carbogen-zooxy- _L -leucyl- _L -leucyl- _L -leucnal)
min	Minute(n)
μ	Mikro
Mo-DC	"monocyte-derived dendritic cell "
Mono	Monozyten
MOI	Multiplicity of infection
М	Membran (Zellmembran / Bakterienmembran)
mRNA	messenger RNA
mnZ	periphere mononukleäre Zellen
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
0.g	oben genante
aM	äußere Membran
OMP	outer membran protein
PerCP	peridininchlorophyllprotein
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
	(Polymerase-Ketten-Reaktion)
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
PSI	N-benzyloxycarbonyl-lle-Glu(O-tert-butyl)-Ala-Leucinal
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
R-PE	R-phycoerythrin
Strp	Streptomycin
SDS	Sodium dodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alpha
TGF-ß	Transforming-Growth-Factor-B
T-Zellen	T-Lymphocyten
VacA	Vacuolating cytotoxin
v/v	Volumen / Volumen
v/w	Volumen / Gewicht
Wt	Wildtyp
WC	Wilkins-Chalgern
x g	Erdbeschleunigung
Zyt	Zytosol

1. Einleitung

1.1. Verlauf der Helicobacter pylori (H. pylori)-Infektion

Die Infektion mit Helicobacter pylori (H. pylori) ist mit der Entstehung einer chronischen Gastritis, peptischen Ulcera, Magenlymphomen und Magenkarzinomen assoziiert (Blaser MJ 1997). Als Gründe für die Entstehung spezifischer Erkrankungen bei etwa 10-20% der Infizierten sind Wirtsfaktoren, Umweltfaktoren, aber auch bakterielle Virulenz- und Adhärenzfaktoren zu nennen (Blaser MJ 1995). Die chronische H.pylori Infektion führt in der Mehrzahl der Patienten zur multifokalen atrophischen Gastritis. Die atrophische Gastritis ist durch eine fokale Schleimhautdestruktion, mit Infiltration durch Monozyten, dendritischen Zellen (DCs), granulozytären und lymphozytären Zellen gekennzeichnet. Die Immunantwort des Menschen auf die H.pylori-Infektion besteht aus angeborenen, unspezifischen Mechanismen, aber auch aus adaptiven, spezifischen Prozessen (Prinz C 2003). Zur unspezifischen Immunabwehr zählen insbesondere Makrophagen und Phagozyten, die die Keime aufnehmen und durch Abtötung in Lysosomen zerstören können. H.pylori hat Mechanismen entwickelt, welche die Phagozytose beeinflussen können (Ramarao N 2000, Allen LA 2000). Offensichtlich ist der Keim in der Lage, in Phagozyten zu persistieren und die Verschmelzung der Phagosomen zu Lysosomen zu unterdrücken bzw. zu verzögern (Ramarao N 2001, Odenbreit S 2001, Allen LA 2000). Es sind auch spezifische T-Zellen in der Magenschleimhaut identifiziert worden, die auf bestimmte Bakterienantigene reagieren. Die funktionell wichtige Immunanwort, die zur Elimination führen sollte, scheint aber im Fall einer H. pylori Infektion unterdrückt zu sein; die in der Kindheit erworbene Infektion persistiert in der Regel lebenslang.

1.2. H. pylori

H. pylori ist ein gram-negatives, sinusförmiges oder leicht spiraliges Stäbchenbakterium. Die Länge beträgt 2,5-4,0 µm und die Dicke 0,5-1,0 µm (Goodwin CS, 1990; Kist M, 1991). *H. pylori* kann sich aufgrund seiner lophotrich angeordneten Flagellen auch in viskösen Flüssigkeiten gut fortbewegen (Suerbaum S 1993).

H. pylori vermehrt sich nicht unter normalen atmosphärischen Bedingungen (21 % Sauerstoff) sondern benötigt eine reduzierte Sauerstoffkonzentration von ca. 5% zum optimalen Wachstum und zählt damit zu den Microaerophilen. Mit einem ca. 1,7 Mega Basenpaare (bp) großen, AT-reichen Genom (Taylor DE 1992) erreicht H. pylori etwa ein Viertel der Größe des Genomes von E.coli. H. pylori weist eine außerordentlich hohe genetische Variabilität zwischen den verschieden Stämmen auf (Taylor DE 1992), welche durch seine natürliche Kompetenz zur genetischen Transformation erklärt werden kann (Nedenskov-Sorensen P 1990). Bei ungefähr 50 % aller H. pylori Stämme wurden Plasmide von unterschiedlicher Größe festgestellt (Penfold SS 1988). Ihre Funktion ist bislang noch unbekannt, da ihnen keine phänotypischen Eigenschaften zugeordnet werden konnten. H. pylori weist einige Besonderheiten in der Zusammensetzung seines zellulären Fettsäureprofils auf (Goodwin CS 1990), was eine Differenzierung gegenüber Campylobacter und anderen Mitgliedern der Helicobacter-Familie ermöglicht (Lamber MA 1987). Außerdem besitzt H. pylori eine Zelloberfläche, deren Hydrophobizität z. B. bei niedrigem pH in Anwesenheit von Harnstoff zunimmt (Pruul H 1989). Bakterien mit hydrophoben Oberflächeneigenschaften weisen eine erhöhte Affinität zu mukösen Membranen auf, was die Adhärenz von H. pylori an das Magenepithel begünstigen könnte (Goodwin CS 1990). Bezüglich seiner enzymatischen Eigenschaften erweist sich H. pylori als Oxidase-positiv und bildet große Mengen von Katalase und extrazellulärer Superoxid-dismutase. Diese Enzyme vermitteln Resistenz gegenüber den oxidativen Mechanismen der Makrophagen und polymorphkernigen neutrophilen Graunulozyten des Wirtes und bieten dem Keim somit einen Überlebensvorteil (Goodwin CS 1990).

1.2.1. Virulenzfaktoren von H. pylori

Von entscheidender Bedeutung für die Entstehung von Magengeschwüren bei etwa 60 % der *H. pylori* Infizierten sind die Virulenzfaktoren VacA, CagA und BabA (Censini S 1996, Censini S 2001, Atherton JC 1998, Atherton JC 1995, Atherton JC 1997, Boren T 1993, Boren T 1994, Falk P 1994). <u>Typ1</u> *H. pylori* Stämme besitzen sowohl VacA und CagA, <u>Typ 2</u> Stämmen fehlen diese Produkte (Xiang 1995). Das vacuolisierende Toxin A (VacA) induziert die Bildung von Vacuolen in epithelialen Zellen und gilt als der klassische Pathogenitätsfaktor von *H. pylori*. Das Zytotoxin assoziierte Antigen (CagA) ist ein Protein von 128 kDa, das eine ausgeprägte Antikörperproduktion beim Wirt hervorruft und mit der Entstehung einer Gastritis und dem Auftreten von Ulcera korreliert (Crabtree 1994).

Es wurde ein Adhärenzfaktor von *H. pylori*, das Blutgruppen Antigen bindendes Antigen (BabA), identifiziert und charakterisiert, der die Adhäsion des Keimes an Blutgruppen-Antigene vom Typ Lewis^b vermittelt (Boren T 1993, Boren T 1994, Ilver D 1998). Das für BabA kodierende Gen *babA2* ist nur in ca. 30 % der Stämme zu finden. Keime, die BabA exprimieren, sind besonders häufig mit der Ulcuskrankheit, Adeno-Carcinomen aber auch präkanzerösen Vorstufen im Magen assoziiert (Prinz C 2001).

1.2.2. Human Immunantwort auf die H. pylori-Infektion

H. pylori löst eine unspezifische (angeborene) und eine spezifische (erworbene) Immunantwort aus (Prinz C 2003). Es wird postuliert, dass die Entzündungsreaktion maßgeblich an der Entstehung der Pathologie im Magen verantwortlich ist (Ernst PB 2000). Die durch die *H. pylori* Infektion induzierte Infiltration der Mukosa mit Effektorzellen (aktivierte Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile) führt zu einer Schädigung der epithelialen Integrität durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen, NO, proteolytischen Enzymen und der Induktion von Apoptose (Ernst P 1999, Prinz C 2003). Die Schleimhautschädigung ist demnach nicht allein eine Folge direkter Einwirkung von *H. pylori* und dessen Produkten auf das Epithel sondern entsteht auch durch die Infiltration der Mukosa mit Entzündungszellen und konsekutiver entzündungsassoziierter Gewebedestruktion (Shimoyama T 1998).

Der primäre Abwehrmechanismus von Bakterien ist in der Regel eine granulozytäre und monozytäre Antwort. Bei der initialen Infektion mit *H. pylori* kommt es zu einer starken granulozytären Antwort (Shimoyama T 1998). Interessanterweise persistiert eine neutrophile Komponente auch während der chronischen *H. pylori* Infektion, was für eine besondere Bedeutung dieser Zellen bei der durch *H. pylori* ausgelösten Entzündungsreaktion spricht. Nach Kontakt des Keims mit Epithelzellen kommt es zur Induktion der IL-8 Sekretion aus diesen Zellen (Crabtree JE 1994, Bodger K 1998). IL-8 ist ein potentes Chemoattraktant für Granulozyten und stimuliert die Degranulierung dieser Zellen (Baggiolini M 1989). Dies trägt zur *H. pylori* induzierten Schleimhautschädigung bei (Ernst PB 2000, Bodger K 1998). Neben IL-8 spielen auch weitere Chemokine der C-X-C-Familie bei der Vermittlung der granulozytären Antwort eine Rolle, z.B. GRO-q. (Yamaoka Y 1996).

Darüber hinaus sind die CC-Chemokine MCP-1 und RANTES bei der Chemotaxis von Monozyten und Lymphozyten beteiligt. Der primäre Ursprung dieser CC-Chemokine sind jedoch Immunzellen und nicht Epithelzellen (Ya,aoka Y 1996). Noch unklar ist, welche Rolle Toll-like Rezeptoren bei der Vermittlung der angeborenen Immunität spielen.

Das Vorhandensein von T-Lymphozyten und Plasmazellen im Entzündungsinfiltrat sowie die Ausbildung von Lymphfollikeln lassen vermuten, dass antigen-spezifische zelluläre und humorale Immunmechanismen bei der *H. pylori* Infektion von Bedeutung sind. CD4⁺ Th-Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der antigen-spezifischen Immunität. Th-Zellen werden in zwei Haupttypen eingeteilt. Th₁ Lymphozyten bilden IFN- γ und sind Vermittler von zellulären Immunvorgängen. Im Gegensatz hierzu produzieren Th₂ Zellen IL-4, IL-5 und IL-10 und sind bei der Aktivierung von humoralen Immunmechanismen beteiligt, nämlich bei der B-Zell-Aktivierung und Antikörperproduktion (Szabo SJ 2003).

Die im Rahmen der H. pylori Infektion ausgelöste Th-Zell Antwort ist vom Th₁ Phänotyp (Mohammadi M 1996). In der H. pylori infizierten Mukosa sind die mRNA Spiegel von IFN- γ und IL-12 erhöht (Yamaoka 1996). T-Zellen von infizierten Mäusen (Smythies LE 1997), Rhesus Makaken (Mattapallil JJ 2000) und Menschen (Karttunen RA 1997, Bamford KB 1998) bilden hauptsächlich IFN- γ und nicht IL-4. Darüber hinaus zeigt die Mehrzahl der H. pvlori reaktiven T-Zell-Klonen, die aus Antrumbiopsien von infizierten Patienten generiert wurden, nach Stimulation mit H. pvlori Antigenen ein Th₁-Zytokin-Profil (D'Elios MM 1997). Das wichtigste Zytokin bei der Vermittlung der Th₁-Antwort ist IL-12, dass zum größten Teil aus antigenpräsentierenden Zellen stammt (Prinz C 2003). Ein hoch spezifischer Marker der Th-1 Antwort ist die IL-12 Rezeptor-\u00b32-Kette (IL-12R\u00b32). Der IL-12 Rezeptor, besteht aus zwei Untereinheiten, ist ein typischer Rezeptor, der auf Th-Zellen exprimiert wird (Presky DH 1996). Die IL-12RB2 Kette wird selektiv nur auf Th₁-Zellen exprimiert, wohingegen die β1 Kette auf Th₁ und Th₂ Zellen vorkommt (Rogge L 1997, Szabo SJ 1997). Die Expression der ß2-Kette wird im Rahmen von Erkrankungen hochreguliert, die durch einen Th₁-polarisierten Immunstatus gekennzeichnet sind (Zhang M 1999, Parrello T 2000). Ein weiteres Zytokin, das bei einer Th₁ vermittelte Immunantwort vermehrt exprimiert wird, ist TNF- α (Tumor necrosis factor- α) (Yamaoka Y 1997). Obwohl während der H. pylori Infektion eine Th₁-Antwort prädominiert, was zu einer zellvermittelten Immunität führt, wird auch eine humorale Immunität beobachtet. H. pylori spezifsiche IgA, IgG und IgM Antikörper können mittels ELISA in einem Drittel der infizierten Patienten im Magensaft nachgewiesen werden (Crabtree JE 1991).

Darüber hinaus kann in mehr als 90% der infizierten Patienten *H. pylori* spezifisches IgG im Serum nachgewiesen werden (Kosunen TU 1992).

1.3. Antigenerkennung bei der Immunabwehr

Das Immunsystem des menschlichen Körpers setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, einem angeborenen unspezifischen und einem erworbenen, spezifischen Immunsystem. Beide Komponenten ergänzen sich und bilden einen gemeinsamen Abwehrmechanismus. Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist die initiale Erkennung von Krankheitserregern oder entarteten Zellen, deren Beseitigung, sowie die Einleitung der spezifischen Immunantwort durch T- und B-Zellen. Zellen des angeborenen Immunsystems (Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen (DC) und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)) werden durch verschiedene mikrobielle Strukturen (Zellwandbestandteile von Bakterien, CpG-DNA, doppelsträngige RNA, usw.) oder den Verlust von "major histocompatibility complex" (MHC) Klasse I-Molekülen auf Zelloberflächen aktiviert. Die frühe, unmittelbare Pathogenerkennung erfolgt durch keimbahnkodierte Rezeptoren. Einerseits kodiert nur eine Minderzahl der auf ca. 30000 geschätzten Gene des menschlichen Genoms Proteine des Immunsystems (Lander ES 2001; Venter JC 2001). Andererseits ist die Gruppe der mikrobiellen Pathogene sehr heterogen und weist eine hohe Mutationsrate auf. Ein wichtiger Mechanismus der angeborenen Immunität besteht daher darin, nicht jedes mögliche Antigen, sondern bestimmte, in der Evolution hoch konservierte Strukturen zu erkennen (Medzhitov R 2000). Beispiele dieser Strukturen, auch Pathogen-assoziierte molekulare Muster ("pathogen associated molecular patterns", PAMPs) genannt, sind Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane (PG), Lipoteichonsäuren (LTA), Mannane, Glykane, bakterielle DNA und doppelsträngige RNA (Aderem A 2000; Medzhitov R 2000). Diese chemisch sehr verschiedenen Strukturen haben mehrere Gemeinsamkeiten: sie werden von Mikroorganismen jedoch nicht vom Wirt selbst gebildet; sie sind essentiell für die Pathogenität oder das Überleben des Mikroorganismus und sie kommen in einer Vielzahl der Pathogene vor (Hoffmann J 1999; Medzhitov R 2000). Die Rezeptoren der angeborenen Immunität, so genannte Mustererkennende-Rezeptoren ("pattern-recognition receptors", PRRs), werden auf verschiedenen antigenpräsentierenden Zellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert (Janeway CA 1989; Medzhitov R 1997).

Diese Effektorzellen haben Rezeptoren mit einheitlicher Spezifität. Pathogene können also gleichzeitig von einer großen Anzahl dieser Zellen erkannt werden, und die von ihnen hervorgerufene Antwort erfolgt sofort ohne vorherige Vermehrung der Zellen (Medzhitov R 2000).

Diese Effektorzellen steuern auch durch die Sekretion von inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen, durch Antigenpräsentation MHC II-Molekülen und durch die Expression kostimulierender Moleküle die weitere angeborene und adaptive Immunantwort (Janeway CA Jr 1999).

1.4. Antigenaufnahme

Die wesentliche Eigenschaft von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) ist ihre Fähigkeit zur Phagozytose. Die Mechanismen der Phagozytose sind bisher nicht vollständig geklärtt. In der Regel wurden die Pathogenen von der Zellmembran umschlossen und als Phagosom internalisiert. Durch Verschmelzen mit dem Lysosom zu einem Phagolysosom werden die internalisierten Fremdkörper hydrolytischen Enzymen ausgesetzt und zu kleinen Peptidstücken verdaut (Aderem A 1999). Neben der Antigenerkennung beinhaltet die Abwehrreaktionen auch eine Sekretion antimikrobieller Enzyme und löslicher Mediatoren, wie Interleukine und Interferone. Zellen des mononukleären Phagozytensystems (Monozyten, Makrophagen, myeloide DC und deren Vorläufer) spielen eine besondere Rolle bei der Immunabwehr, da sie sowohl für die rasche angeborene Immunantwort, als auch für die Induktion einer spezifischen Antwort wichtig sind. Insbesondere sind DC in der Lage phagozytierte Antigene im Kontext mit MHC-Klasse II zu präsentieren. Die Antigen-Präsentation ist ein essentieller Schritt zur Aktivierung von naiven T-Zellen. Mononukleäre Phagozyten Zellen besitzen eine Reihe von Rezeptoren (PRR), die Antigene auf Fremdkörpern erkennen können. Die Erkennung der Fremdkörper erfolgt direkt oder durch ihre Maskierung mit sogenannten Opsoninen (IgG oder Komplementfaktor C3b). Opsonine werden von entsprechenden Rezeptoren auf mononukleären Phagozyten erkannt und gebunden (FcR- oder Komplement-vermittelte Phagozytose). Andere Rezeptoren (Mannose-Rezeptor, Scavenger-Rezeptor, Dectin-1) erkennen Antigene direkt und leiten die Phagozytose ein.

Diese Peptide binden im Zytosol an Transporterproteine (Transporters associated with Antigen Processing, TAP) und werden in das MHC-Klasse I-Kompartiment gebracht, wo sie in die Bindungsgrube der MHC -Moleküle binden, bevor an die Zelloberfläche gelangen. APCs sind befähigt auch extrazellulär vorliegende Peptide an MHC-Klasse-I-Moleküle zu binden. Für die Präsentation auf MHC-Klasse II-Molekülen hingegen müssen die Antigene aufgenommen werden, damit sie nach einer Prozessierung präsentiert werden können (Egner R 1993; Fanger NA 1996). Der turn-over der dendritischen MHC-Moleküle ist sehr langsam und die Expressionsdichte sehr hoch, so dass Peptide über einen langen Zeitraum präsentiert werden können (Steinman RM 1991).

1.5. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind hochspezialisierte antigenpräsentierende Zellen (APC). Als "Außenposten" des Immunsystems sind sie in den peripheren Organen (Geweben) stationiert. Sie sind in der Lage Pathogene zu erkennen, aufzunehmen, zu verarbeiten, in Lymphorgane zu wandern und während dessen zu reifen. Die dendritischen Zellen sind eine heterogene Zellpopulation, die aus dem Knochenmark abstammen. Liu et al. (Liu YJ 2001) haben zwei Linien von DCs beschrieben (Tab. 1.1).

<u>Prä-DC1</u> sind unreife myeloide Monozyten (pmM), die zu myeloiden DCs reifen und Interleukin 12 (IL-12) sezernieren; dadurch wird eine Th₁-Immunantwort induziert. <u>Prä-DC2</u> sind unreife plasmacytoide DCs (ppDC), die zu lymphoiden / plasmacytoiden DCs reifen und die Th₂-Immunantwort stimulieren. Myeloide und plasmacytoide DCs exprimieren toll-like Rezeptoren (TLR) und Lektin-Moleküle. Nur die plasmacytoiden DCs exprimieren TLR7 und TLR9; die myeloiden DCs dagegen exprimieren TLR2 sowie TLR4 und mehrere Mannose-Rezeptoren (Pulendran B 1997). Ausschließlich die myeloiden DCs exprimieren das CD83-Antigen auf ihrer Zelloberfläche welches damit einer der Hauptreifungsmarker der DC1 ist. Seine Funktion ist noch unbekannt (Tab. 1.1)

		DC1	DC2
Fu	Inktion	Immunogen	Tolerogen
Uı	reife DC	Prä-myeloid	Prä-plasmacytoid
0	Phänotyp	CD1a ⁺ (BDCA-1),	CD1a ⁻
		CD11c ⁺ , CD123 ⁻	CD11c ⁻ CD123 ⁺
		CD45RO ⁺ /RA ⁻	$CD45RO^+/RA^+$,
		BDCA-4 ⁺	BDCA-2 ⁺ , BDCA-3 ⁺
0	MHC-Klasse II	MHC-II ⁺	$MHC-II^+$
0	TLR	TLR-2, TLR-4	TLR-7, TLR-9
Re	eife DC	Myeloid_	Plasmacytoid
0	Phänotyp	CD83 ⁺⁺⁺ , B7 1/2 ⁺⁺⁺⁺	CD83 ⁻ , B7 1/2 ⁺⁺⁺⁺
0	MHC-Klasse II	MHC-II ⁺⁺⁺	MHC-II ⁺⁺⁺
0	Zytokinsekretion	IL-12	IL-10, IFN- α/β
0	Immunantwort	Th_1	Th_2

Tabelle 1.1: Die zwei dendritischen Zellpopulationen: Liu *et al* haben 2 Linien von DCs beschrieben, die DC1 und die DC2. Die Zellpopulationen unterscheiden sich sowohl auf der funktionellen als auch auf der phänotypischen Ebene. Der Phänotyp und die MHC-Klasse II-Expression der DCs sind vom Reifungszustand abhängig.

1.6. Die dendritische Zellen als Mediatoren der Immunantwort

Die Auslösung einer adaptiven Immunantwort beginnt dann, wenn in einem infizierten Gewebe ein Pathogen von einer unreifen DC erkannt, aufgenommen und präsentiert wird (Moser M 2000) (Abb. 1.1).

Diese spezialisierten phagozytischen Zellen, kommen in den meisten Geweben dauerhaft vor. Sie stammen von derselben Vorläuferzelle im Knochenmark ab wie die Makrophagen und wandern vom Knochenmark zu ihren peripheren Aufenthaltsorten, um dort die lokale Umgebung nach Krankheitserregern abzusuchen. Deswegen werden die dendritischen Zellen als die professionellen antigen-präsentierenden Zellen bezeichnet. Schließlich wandern alle infizierten geweberesidenten DCs über die Lymphflüssigkeit zu den regionalen Lymphknoten, wo sie, wenn sie aktiviert sind, mit den patrouillierenden naiven Lymphozyten in Wechselwirkung treten (Abb. 1.1). Wenn die DCs nicht aktiviert werden können, bewirken sie eine Toleranz des Körpers gegenüber den Antigenen, die sie tragen. Die unreifen DCs tragen an ihrer Oberfläche Rezeptoren, die allgemein vorkommende Merkmale von Pathogenen erkennen (TLR). Eine Bakterienbindung an diese Rezeptoren veranlassen die DCs dazu, das Pathogen aufzunehmen und intrazellulär abzubauen. Unreife DCs nehmen außerdem fortwährend mit Hilfe der Makropinocytose extrazelluläres Material

auf. Die Funktion der DCs besteht primär jedoch nicht darin, Krankheitserreger zu zerstören, sondern die Antigene von Pathogenen zu den peripheren lymphatischen Organen zu transportieren, dort den Lymphozyten zu präsentieren und damit zu aktivieren. Während des Reifungsprozesses wandern die DCs zu verschiedenen Orten wie Thymus oder Lymphknoten. Gleichzeitig produzieren die DCs Zytokine und Chemokine, welche die Makrophagen, NK-Zellen, Granulozyten, naiven T-Zellen und andere immature DCs aktivieren.



Abbildung 1.1: Dendritiche Zellen als Mediatoren der Immunantwort (*Martien L Kapsenberg. 2003. Nature Immunology. 3: 984-993*).

1.6.1. DCs als Lymphozyten aktivierende Zellen

Dendritische Zellen (DCs), Monozyten und B-Zellen erfüllen die Funktion von APCs. Diese Zellen sind besonders geeignet für die Präsentation von Antigenen via MHC-Klasse I und II Molekülen (Abb. 1.1). MHC-Klasse II-Moleküle sind Peptidkomplexe, die auf der Oberfläche von APC exprimiert werden und von CD4⁺ T-Zellen mittels des T-Zell-Rezeptors (TCR) erkannt werden können.

Die Erkennung von MHC-Klasse II benötigt die Beteiligung von kostimulatorischen Molekülen. Bei der Erkennung von MHC- Klasse I- oder II-Peptidkomplexe ist die Beteiligung von CD4- oder CD8-Molekülen wichtig. CD4 Moleküle helfen bei der Erkennung von MHC-Klasse II und CD8-Moleküle bei der Erkennung von MHC-Klasse I. (Norment AM 1988).

APCs exprimieren auch Adhäsionsmoleküle (z.B. CD11a), welche die Bindung zwischen APCs und T-Zellen verstärken können; dies führt zur Induktion von kostimulatorischen Signalen. DCs können neben MHC-Klasse II-, -Klasse I- und Adhäsionsmolekülen weiterhin auch co-stimulatorische Moleküle wie z. B. CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) exprimieren, welche bei der T-Zellantwort und bei der Antigen-Präsentation eine Rolle spielen (Abb. 1.1). Es handelt sich dabei um Membran-Gebundene-Glykoproteine.

Die Polarisation der T-Zellen läuft in vier Phasen. (Moser M 2000, Gajewski TF 1996):

Phase I: In der ersten Phase im Prozeß der Antigen-Erkennung ist die Interaktion zwischen dendritischen Zellen (APC) und Lymphozyten durch Adhäsionsmoleküle wichtig. In der zweiten Phase (Phase II) läuft die Erkennung der Antigene durch den T-Zell-Rezeptor (TCR). Danach wird die Expression von kostimulatorischen Molekülen (B7) hochreguliert welche die Zytokinsekretion und die Expression des entsprechenden Zytokinrezeptors auf der T-Zelle kontrollieren. Nach der Bindung an das B7-Molekül durch CD28 produzieren T-Zellen Interleukin-2 (IL-2) und regulieren den IL-2-Rezeptor (IL-2Rα/β/γ). Bei den APCs wird dieser Vorgang durch IFN-γ-Sekretion der T-Zellen ausgelöst, welches eine IL-12-Produktion durch die APCs induziert. Zytokine (IL-12 und IFN-γ) induzieren die Hochregulation von CD28 auf der T-Zellen und CD86 (B7/2) auf dendritischen Zellen. In Phase III binden CD28 auf der T-Zellen und CD86 auf der DCs. Dies induziert eine Präsentation von CD80 auf APCs und CTLA-4 auf T-Zellen. Der Prozeß wird durch die Proliferation der T-Zellen komplettiert (Phase IV).

1.7. T-Lymphozyten

Lymphozyten entstehen aus Stammzellen des Knochenmarks und differenzieren in den zentralen lymphatischen Organen aus; die B-Zellen im Knochenmark und die T-Zellen im Thymus. Von diesen Geweben wandern sie mit dem Blut in periphere oder sekundäre lymphatische Organe (Abb. 1.2). Die T-Lymphozyten sind kleine Zellen deren Kernchromatin größten Teils kondensiert und damit inaktiv (naiv) ist.

Lymphozyten besitzen tatsächlich keine funktionelle Aktivität, bevor sie auf ein Antigen treffen, das ihre Proliferation und die Ausdifferenzierung ihrer speziellen Funktionsmerkmale auslöst.



Abbildung 1.2: T-Zell-Entwicklung im Thymus und Aktivierung naiver Th-Zellen in den sekundären Lymphorganen. Aus dem Knochenmark eingewanderte Stammzellen entwickeln sich im Thymus zu reifen, naiven T-Zellen. Dargestellt sind die verschiedenen Entwicklungsstadien der Thymozyten anhand der charakteristischen Expression von Oberflächenmolekülen und die Expression der TCR-Gene. In der Peripherie sind zur Aktivierung der naiven Th-Zellen zwei durch APC-vermittelte Signale essentiell.

1.7.1. Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen

Die Besonderheit der Lymphozyten ist ihre Fähigkeit, eine spezifische Immunantwort gegen praktisch jedes fremde Antigen mittels eines jeweils spezifischen Antigenrezeptorprototyps zu entwickeln. Für eine Aktivierung und Expansion von naiven T-Zellen sind mehrere Signale, welche die T-Zelle durch die professionellen APCs erhalten muss, notwendig. Neben der Erkennung der antigenen Determinanten auf dem MHC-Molekül durch den TCR sind weitere kostimulatorische Signale erforderlich. Der TCR/MHC-Klasse-II-Kontakt und die stabilisierende Bindung zwischen dem CD4-Molekül und dem MHC-Klasse-II-Molekül führen zur verstärkten, vorübergehenden Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle auf der T-Zelle und der APC.

Das wichtigste kostimulatorische Signal wird durch die Bindung der APC-exprimierten CD80- (B7-1) oder CD86- (B7-2) Moleküle an das CD28-Molekül, das sich auf der Oberfläche der Th-Zellen befindet, vermittelt (Abb.1.2).

T-Zellen verwenden unterschiedliche, aber strukturell ähnliche Moleküle zur Erkennung von Antigenen. Die Antigenerkennungsmoleküle von T-Zellen existieren als Rezeptoren auf der Zelloberfläche. T-Zell-Rezeptoren sind hoch variable Moleküle; deren Vielfalt sich konzentriert in der variablen (V-) Region des Moleküls, die das Antigen bindet. Die Hauptformen des TCR erkennen nur Peptidfragmente fremder Proteine, wenn sie an MHC-Moleküle gebunden sind, die auf allen Zelloberflächen vorkommen. Der TCR erkennt einen zusammengesetzt Liganden, der aus dem fremden Peptid und einem körpereigenen MHC-Molekül ist. Das zwingt die T-Zellen, mit infizierten Körperzellen zu interagieren, damit sie aktiviert werden. Jeder T-Zell-Rezeptor ist spezifisch für eine ganz bestimmte Kombination aus einem körpereigenen Peptid und einem MHC-Molekül. MHC-Moleküle werden von einer Familie hochpolymorpher Gene codiert; jedes Individuum exprimiert zwar mehrere dieser Moleküle, jedoch nur eine kleine Auswahl aller möglichen Varianten. Während der T-Zell-Entwicklung unterliegt das TCR-Repertoire einer Selektion, so dass die T-Zellen jedes Individuums ein Antigen nur in Verbindung mit ihren eigenen MHC-Molekülen erkennen. Die Expression einer Vielzahl verschiedener MHC-Moleküle, von denen jedes ein anderes Spektrum von Peptiden bindet, trägt dazu bei, dass die T-Zellen eines Individuums zumindest einige Peptide von nahezu jedem Pathogen erkennen können.

1.7.2. T-Zell-Klassifikation

T-Zellen bilden zwei Klassen von denen eine bei Aktivierung zu Zytotoxischen T-Zellen wird, die das CD8-Molekül als charakteristisches Merkmal an der Zelloberfläche expimieren und virusinfizierte Zellen abtöten. Die zweite Klasse umfasst T-Zellen, welche die von ihnen erkannten Zellen aktivieren. Sie sind durch das an der Zelloberfläche exprimierte CD4-Molekül gekennzeichnet. Solche T-Zellen werden als T-Helferzellen (Th) bezeichnet und lassen sich in zwei Untergruppen einteilen: Th₁-Zellen und Th₂-Zellen. <u>Th₁-Zellen bekämpfen</u> Infektionen, aktivieren Makrophagen, stimulieren antibakterielle Mechanismen der Phagozyten und setzen auch Zytokine frei, die Makrophagen an den Inferktionsherd locken. <u>Th₂-Zellen zerstören intrazelluläre Krankheitserreger, indem sie infizierte Zellen töten und Makrophagen aktivieren.</u>

Th₂-Zellen aktivieren auch B-Zellen um den extrazellulären Erreger zu vernichten. Die Aktivierung naiver T-Zellen durch die Erkennung eines Peptid-MHC-Komplexes bei gleichzeitiger Kostimulation führt zur Expression und Sekretion von IL-2 sowie zur Expression hochaffiner IL-2-Rezeptoren. IL-2 bindet an diese Rezeptoren und fördert so auf autokrine Weise das T-Zell-Wachstum und die Aktivierung. Weiterhin existieren noch sogenannt Regulator-T-Zellen (auch als Th₃-Zellen bezeichnet), die durch Produktion des Zytokins TGF-ß und die Expression des Transkriptionsfaktors Fox-p3 gekennzeichnet sind. T-Helfer-Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten, tragen das Oberflächenmolekül CD45 in der Ausprägung CD45RA und werden als naive T-Zellen bezeichnet. Nach Antigenkontakt entwickeln sie die Ausprägung CD45RO und sind dann Effektor-T-Zellen, die sich teilweise zu Gedächtnis (Memory)-Zellen weiterentwickeln.

T-Helfer-Zellen werden anhand ihrer Oberflächenmoleküle, der von ihnen sezernierten Zytokine und ihrer Haupttranskriptionsfaktoren in weitere Untergruppen eingeteilt. Diese Einteilung ist in Tabelle 1.2 dargestellt.

1. Einleitung

- 14 -

Bezeichnung	Zytokin	Haupttranskriptions- Faktoren	Oberflächen- Moleküle
Th ₀ (naive)	Kein	Fox-p3, GATA-3 T-bet	CD45RA, CD4, CD3
Th ₁	IFN-γ, IL-2	T-bet	CD3, CD4 CD45RO
Th ₂	IL-4, IL-5, IL-13	GATA-3	CD3, CD4 CD45RO
Th ₃ (T-reg)	TGF-ß	Fox-p3	CD4, CD25

Tabelle 1.2: Übersicht und Charakterisierung der CD4-T-Zell-Subpopulationen

1.7.3. Die Th₁-Differenzierung

Die Aktivierung einer naiven T-Zelle durch Kontakt mit einem Antigen bildet zusammen mit ihrer anschließenden Proliferation und Differenzierung die primäre Immunreaktion. Dabei entstehen T-Effektorzellen sowie ein immunologisches Gedächtnis, das vor späteren Angriffen des gleichen Pathogens schützt. Naive CD4-T-Zellen reagieren zuerst auf ihre spezifischen Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexe, indem sie IL-2 synthetisieren und proliferieren. Diese Zellen entwickeln sich dann zu einem Zelltyp, den man als Th₀ bezeichnet und der einige Effektorfunktionen aufweist.

Die naiven T-Zellen (Th₀) lassen sie sich zu IL-4 (Th₂) oder IFN-γ (Th₁) produzierenden Zellen differenzieren [Chan S 1991, Ehlers S 19991, Hsieh CS 1993, Kamogawa Y 1993, Kopf M 1993, LeGros G 1990, Paul WE 1994, Rocken M 1992, Sad S 1995, Seder RA 1994, 1992, 1993]

Die Th₁-Zellen, die IFN- γ und TNF- α produzieren, unterstützen die zelluläre Immunantwort zur Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen. Th₂-Zellen, die IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 sezernieren, induzieren eine humorale Immunität zur Verteidigung gegen extrazelluläre Pathogene. Aus der Gruppe der Th₁-Zytokine spielt das IFN- γ eine zentrale und entscheidende Rolle. IFN- γ ist ein lösliches Protein, das neben aktivierten T-Zellen auch von aktivierten NK-Zellen produziert wird (Chan SH 1991). Während IL-12, das von Antigenpräsentierenden Zellen wie DCs als Antwort auf bestimmte Pathogene freigesetzt wird, die Th₁-Immunantwort fördert, induziert IFN- γ als Mitspieler die Differenzierung der T-Zellen in Richtung Th₁. Dabei bewirkt es die Suppression der humoralen Immunantwort und eine Inhibierung der Synthese und Effekte von IL-4. IFN- γ amplifiziert auch den Signalweg über IFN- γ -Rezeptoren (IFN- γ R1/R2) auf T-Zellen, so dass eine weitere Polarisierung der T-Zellen in Richtung einer Th₁-Immunantwort stattfindet. Nach Aktivierung der IFN- γ - und IL-12-Rezeptoren durch IFN- γ (sezerniert von T-Zellen) und IL-12 (APCs-Sekretion) werden die Proteine JAK aus der Familie der Januskinasen, die mit den Rezeptoren assoziiert sind, aktiviert. Anschließend werden unter anderem STAT-1 und STAT-4 durch Phosphorylierung aktiviert, die direkt über eine dafür spezifische DNA-Bindungstelle auf IFN- γ gesteuerte Gene wirken. Dabei freigesetztes IFN- γ hat einen direkten und einen indirekten Einfluss auf die Regulation der Th₁/Th₂-Balance (Abb. 1.3).



Abbildung 1.3: Schema zum Modell der Th₁/Th₂-Differenzierung durch Einfluss von Zytokinen (Jane L Gorgan and Richard M Locksley. 2002. Current Opinion in Immunology, 14: 366-372).

Naive T-Zellen besitzen auf ihren Oberflächen noch keine Rezeptoren für Zytokine. Im Laufe der Ausreifung und Differenzierung bilden sich Rezeptoren für diejenigen Zytokine aus, die Einfluss auf die weitere Entwicklung und Polarisierung der T-Zellen haben.

Da IL-12 ein wichtiges Zytokin zur Induzierung und Ausprägung von Th₁-Zellen ist, findet man auf diesen Zellen vermehrt den IL-12-Rezeptor. Die β 2-Untereinheit des heterodimeren IL-12-Rezeptors ist für die Regulation der Immunantwort durch IL-12 verantwortlich und befindet sich vorwiegend auf Th₁-Zellen, so dass von dendritischen oder anderen Zellen freigesetztes IL-12 dort wirkt.

1.7.4. Transkriptionsfaktoren der Th₁- und Th₂-vermittelten Immunantwort

Mehrere Familien von Transkriptionsfaktoren wurden identifiziert, die wichtige Regulatoren für die Ausdifferenzierung von Th₁- oder Th₂-Zellen sind. Dabei nehmen zwei Mitglieder der STAT-Proteine (*Signal transduces and activators of transcription*) entgegengesetzte Rollen bei der Immunantwort ein. STAT-6 wird für eine IL-4-vermittelte Th₂-Differenzierung benötigt, STAT-4 für eine IL-12- und STAT-1 für eine IFN-γ-vermittelte Th₁-Differenzierung von naiven T-Zellen. STAT-Proteine haben strukturelle Ähnlichkeiten in ihren SH2-SH3-Bindungsdomänen. Bevor die Signalkaskade über Zytokin-Rezeptor-Wechselwirkungen angeschaltet wird, liegen die STAT-Proteine im Zytoplasma in hypophosphorylierter inaktiver Form vor. Nach Aktivierung der Signalkaskade werden sie durch Janus-Kinasen (JAKs) phosphoryliert und dimerisieren über ihre SH2-Bindungsdomänen. Danach werden die jeweiligen Homodimere in den Zellkern transportiert, wo sie an Gene binden, die die GAS-Sequenz enthalten (*gamma-activated seuguence*) und diese somit aktivieren.

Die Phosphorylierung und die Aktivierung von STAT-4 erfolgt über IL-12, das von dendritischen Zellen oder Makrophagen sezerniert wurde, und die von STAT-1 über IFN- γ , das von den T-Zellen sezerniert wurde und damit die Th₁-Differenzierung fördert. STAT-4-defiziente Mäuse zeigen Defekte bei der IFN- γ -Produktion, T-Zellproliferation und NK-Zellfunktion (Kaplan MH 1996).

STAT-6 hingegen wird über die Bindung des IL-4-Rezeptors von JAK1 und JAK2 phosphoryliert und aktiviert IL-4-regulierte Gene wie IgE, IL-4-Rezeptor, Fc-Rezeptor und MHC-Klasse II, die alle GAS-Sequenzen enthalten (Patel BKR 1998). Naive, STAT-6 defiziente T-Zellen differenzieren nicht zu Th₂-Zellen aus, wenn sie *in vitro* mit IL-4 oder IL-13 stimuliert werden, was die Bedeutung von STAT-6 für die Th₂-Immunantwort demonstriert (Kaplan MH 1996).

T-bet ist ein Transkriptionsfaktor der T-box-Familie und spielt eine wichtige Rolle bei der Th₁-Entwicklung. Dieser Transkriptionsfaktor ist ein bedeutender Faktor der frühen T-Zell-Entwicklung.

Er reguliert zum einen die Expression von Th₁-Zytokinen (IFN- γ) und zum anderen die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th₁-Zellen (Szabo SJ 2000, Mullen AC 2001). Die Tbet-Transkription wird von STAT-1 verstärkt, das von IFN- γ -Rezeptoren amplifiziert und vom TCR aktiviert wird (Grogan JL 2002).

1.8. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) machen einen kleinen Anteil der peripheren lymphatischen Blutzellen (~ 15%) aus und besitzen, soweit man weiß, keine antigenspezifischen Rezeptoren. Sie können jedoch ein gewisses Spektrum von anormalen Zellen erkennen und töten. Entdeckt wurden sie erstmals aufgrund ihrer Fähigkeit, bestimmte Tumorzellen zu töten. Inzwischen weiß man allerdings, dass sie einen wichtigen Beitrag zur angeborenen Immunität leisten (Robertson MJ 1990).

1.8.1. Die Phänotypen der NK-Zellen

Die NK-Zellen exprimieren kein CD3-Antigen aber das CD56-Antigen (Robertson MJ 1990) und damit lassen sie sich in 2 Subpopulationen unterscheiden: 90 % der NK-Zellen sind CD56^{dim} und 10 % CD56^{bright} (Lanier LL 1986), d.h. sie exprimieren viel oder wenig CD56. Die genaue Funktion des CD56-Antigens ist immer noch unbekannt (Lanier LL 1989) jedoch, konnten Nitta T et al (1989) und Suzuki N et al (1991) ziegten, dass das DC56-Antigen eine Rolle beim Zell-Zell-Kontakt zwischen der NK-Zelle und der infizierten Zelle spielt.

1.8.2. Die NK-Zellen Rezeptoren (NKRs) und das CD16

Die Zerstörung von mit Antikörper bedeckten Zielzellen durch natürliche Killerzellen bezeichnet man als antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC). Ausgelöst wird sie, wenn an die Oberfläche einer Zelle gebundene Antikörper mit Fc-Rezeptoren einer NK-Zelle in Kontakt treten. NK-Zellen exprimieren den Rezeptor FcγRIII (CD16), der die IgG1- und IgG3-Subklassen erkennt und einen zytotoxischen Angriff der NK-Zellen auf die mit Antikörpern überzogenen Zielzellen auslöst. Die immunregulatorische Funktion der NK-Zellen ist von der Expression der zwei Antigene CD56 und CD16 abhängig.

CD56^{dim}/CD16^{bright}- NK-Zellen sind zytotoxischer als die CD56^{bright} / CD16^{dim}-NK-Zellen sind (Lanier LL 1986), die mehr Zytokine sezernieren.

Der Angriff der NK-Zellen verläuft genau wie bei den zytotoxischen T-Zellen, einschließlich der Freisetzung von Oberflächenrezeptor-granula, die Perforin und Granzyme enthalten. Welche Bedeutung die ADCC für die Abwehr von Infektionen mit Bakterien oder Viren hat, ist noch nicht vollständig geklärt. Die ADCC stellt jedoch eine weitere Möglichkeit dar, wie Antikörper durch Bindung an einen Fc-Rezeptor einen antigenspezifischen Angriff einer Effektorzelle steuern können, die selbst keine Antigenspezifität besitzt. Wenn NK-Zellen die Immunreaktionen gegen eine von Vieren oder anderen Pathogenen ausgelöste Infektion vermitteln sollen, müssen sie über Mechanismen verfügen, die es ihnen ermöglichen, zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen zu unterscheiden. Wie ihnen dies gelingt, weiß man noch nicht genau. Wahrscheinlich handelt es sich um die Erkennung von "veränderten körpereigenen" Strukturen. NK-Zellen besitzen zwei Typen von Oberflächenrezeptoren (NKRs), welche die zytotoxische Aktivität steuern und die MHC-Klasse-I-Moleküle erkennen (Lanier LL 2000, Moretta A 2001). Bei dem einen Typ handelt es sich um "aktivierende Rezeptoren". Diese lösen den Tötungsmechanismus der NK-Zellen aus. Es gibt mehrere Typen von Rezeptoren, die ein solches Signal geben, z.B. calciumbindende C-Typ-Lektine (CD94; NKG2), die ein breites Spektrum von Kohlenhydratliganden erkennen, wie sie oftmals auf Zelloberflächen vorkommen.

Darüber hinaus exprimieren menschliche NK-Zellen ein Heterodimer aus beiden C-Typ-Lektinen CD94 und NKG2. Der CD94:NKG2-Rezeptor tritt mit nichtpolymorphen MHCähnlichen (HLA-E) Molekülen in Wechselwirkung, welche die Leitpeptide anderer MHC-Klasse-I-Moleküle binden.

Die zweite Subpopulation von NK-Rezeptoren hemmt die Aktivierung und verhindert, dass NK-Zellen normale und genetisch identische Zellen abtöten (Voss SD 1998, Colonna M 1997). Diese "inhibitorischen Rezeptoren" sind spezifisch für MHC-Klasse-I-Allele (HLA-A, HLA-B- und HLA-C-Allele). Beim Menschen gehören sie zur Immunglobulin-Superfamilie, man bezeichnet sie als p58 und p70 oder killerhemmende Rezeptoren (*killer inhibitory receptors*, KIRs) (Andre P 2000)

Weitere Oberflächenrezeptortypen, deren Liganden immer noch unbekannt sind, sind der " natural cytoxicity Receptor" NCR (Morreta A 2001, Lanier A 1998) und der "Ig-like transcripts" ILT Rezeptor, der ein inhibitorischer Rezeptor ist. (Colonna M 1997).

Mit der CD56-Antigenexpression und mit den NKRs lassen sich die NK-Zellen zu zwei Gruppen klassifizieren (Andre P 2000, Voss SD 1998, Colonna M 1997) (Tab. 1.3).

- Gruppe 1: CD56^{bright}/CD16^{dim} NK-Zellen exprimieren fast keine KIRs und ILT, allerdings sehr viele CD94-NKG2-Heterodimere auf ihren Zelloberflächen und sind damit fast nicht zytotoxisch. Diese Zellen sezernieren aber viele immunregulatorische Zytokine (IFN-γ) (Megan A. Cooper 2001).
- Gruppe 2: CD56^{dim}/CD16^{bright} NK-Zellen exprimieren sehr stark die KIRs und ILT2-Rezeptoren, allerdings fast keine CD94-NKG2-Heterodimere auf ihren Zelloberflächen und sind damit stark zytotoxisch (Megan A. Cooper 2001).

Der Unterschied bei der CD16-Expression hat einen funktionalen Effekt auf die ADCC bei den NK-Zellen

1.8.3. Zytokine- und Chemokine-Rezeptoren der NK-Zellen

Alle NK-Zellen exprimieren den funktionalen heterodimeren IL- 2 Rezeptor (IL- $2R\beta\gamma$) und verfügen damit über eine höhere Affinität zu IL-2.

Die CD56^{bright} -NK-Zellen exprimieren den c-kit-Rezeptor, der die IL-2 Aktion auf die NK-Zellen vermittelt (Matos ME 1993, Carson WE 1994) und die INF-γ-Sekretion stimuliert.

Die CD56^{dim}-NK-Zellen exprimieren im Gegensatz zu den CD56^{bright} keinen c-kit-Rzeptor und damit sezernieren die NK-Zellen kein IFN-γ.

Die NK-Zellen exprimieren Rezeptoren für Monokine (*monocyte dirived Zytokin*) IL-1, IL-10, IL-12, IL-15 und IL-18, die die NK-Zell-Aktivierung bzw. die IFN-γ-Sekretion steuern (Tab. 1.3)

Subpopulation	CD56 ^{bright}	CD56 ^{dim}
Phänotyp	CD16 ^{low}	CD16 ^{high}
NK-Rezeptoren	KIR ^{low} , CD94 ^{high}	KIR ^{high} , CD94 ^{low}
Zytokine-Rezeptoren	$IL-2R^+$, c-kit ⁺	IL-2R ⁺ , c-kit ⁻

Tabelle 1.3: Klassifizierung der NK-Zell-Subpopulationen

1.9. Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, welchen Einfluss intakte *H. pylori* und bestimmte Bestandteile der Bakterien auf menschliche Immunzellen haben. Daraus ergab sich die Frage, ob dendritische Zellen mit *H. pylori* infizierbar sind und wie sich die Infektion auf die Ausreifung und Biologie dieser Zellen auswirkt. Die Anzucht von dendritischen Zellen aus Monozyten wurde bereits in unserem Labor etabliert, so dass zunächst eine Charakterisierung der Zellen über die Expression spezifischer Oberflächenmarker und die Produktion von Zytokine mit und ohne *H. pylori* Infektion im Vordergrund stand.

Weiter ergab sich die Fragestellung, ob und auf welcher Ebene sich die Ausbildung einer Th₁-Immunantwort und die Aktivierung von NK-Zellen in Kokulturen von *H. pylori*-infizierten dendritischen Zellen mit naiven T-Zellen bzw. NK-Zellen auswirkt. Hierzu sollten neben Zytokinmessungen in Kulturüberständen auch die relevanten Transkriptionsfaktoren von Th₁ und Th₂ vermittelter Immunantwort mittels quantitativer (TaqMan) PCR untersucht werden.

CD-Nomenklatur

CD	Zelltyp	Funktion
CD1	Thymozyten, dendritische Zellen	Präsentation von nicht-Peptid-Antigenen
CD3	T-Zellen	Signaltransduktion
CD4	T-Zellen	Adhäsionsmolekül (Ligand: MHC Klasse II-Moleküle), Signaltransduktion
CD8	T-Zellen	Adhäsionsmolekül (Ligand: MHC Klasse I-Moleküle), Signaltransduktion
CD11c	Monozyten, Granulozyten, NK-Zellen	Adhäsion, Phagozytose von iC3b-beladenen Partikeln
CD14	Monozyten	LPS-Rezeptor
CD16	NK-Zellen, Granulozyten, Makrophagen	Fcg-Rezeptor: ADCC, Aktivierung von NK-Zellen
CD19	Die meisten B-Zellen	Aktivierung
CD25	Aktivierte T-Zellen, B-Zellen und aktivierte Makrophagen	α-Kette des IL-2 Rezeptors, Komplexiert mit β-und γ-Kette zu hochaffinem Rezeptor
CD28	T-Zellen (CD4 > CD8)	Kostimulation von T-Zellen (Ligand: B7.1 und B7.2)
CD45	Leukozyten	Tyrosinphosphatase zur Regulation der Signaltransduktion über den Antigenrezeptor
CD45RO	Gedächtnis-T-Zellen	
CD45RA	Naive T-Zellen	
CD45RB	B-Zellen, Subpopulation von T-Zellen	
CD56	NK-Zellen	Homotypische Adhäsion
CD69	Aktivierte T- und B-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen	Marker für T-Zell-Aktivierung, Funktion unbekannt

CD80	Dendritische Zellen, aktivierte B-Zellen, Makrophagen	Kostimulatorisches Molekül für T-Zell-Aktivierung (Liganden CD28 und CTLA-4; Synonym: B7.1)
CD83	Aktivierte T- und B-Zellen	Funktion unbekannt
CD86	Aktivierte dendritische Zellen, B-Zellen, Monozyten	Kostimulatorisches Molekül für T-Zell-Aktivierung (Liganden CD28 und CTLA-4; Synonym: B7.2)
CD94	NK-Zellen	Inhibitorischer Rezeptor (Ligand: HLA-Klasse I-Moleküle)
2. Material und Methoden

2.1. Geräte

Autoklav	Modell KSG 25-2-5 (Fa. KSG, Olching)
ELISA-Reader	Multiscan RC Thermolabsystem Software: Ascent Version 2.6 (Fa. Thermo Life Sciences, Egelsbach)
FACS- Gerät	FACSCalibur, Software: CellQuest 3.3 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)
Film	CL-XPosure TM Film (Fa. Pierce, Bonn)
Fluoreszensmikroskop	Axiovert 135 TV (Fa. Zeiss)
Gel Dokumentationssystem	(Fa. MWG-Biotech, Ebersberg)
Inkubatoren	Brutschrank, nicht begasbar Brutschrank, begasbar, Modell BB 6060 (Fa. Heraeus, Hanau)
Kassette (für Filmentwicklung)	Hypercassette (Fa. Amersham Biosciences, Freiburg)
Mini-Gel Blot Module	XCell II TM Mini-Cell & Xcell II TM Blot Module (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
Neubauer-Zählkammer	Tiefe: 0,1mm / 0,0025 mm ² (Fa. Neubauer, Marienfeld)
Pasteur-Pipetten	(Fa. Poulten & Graf GmbH, Wertheim)
pH-Meter	(Fa. Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz)

Photometer	Biophotometer (Fa. Eppendorf, Hamburg)
Pipetten	(Fa. Abimed, Düsseldorf) (Fa. Eppendorf, Hamburg)
Power supplies	Power Pac 3000 power supply (Fa. Biorad, München)
Sicherheitsarbeitsbank	Clean Air mit S2-Zertifikat
Taq Man PCR - Reader	ABI Prism 7700 Sequence Detector (Fa. Perkin Elmer, Weiterstadt)
Thermo cycler	Primus 96Plus (Fa. MWG-Biotech, Ebersberg)
Ultraschallgerät mit Ultrastab	Branson SONIC Power Company (Fa. Danbury, USA)
Vortex	Vibrofix VF1 Electronic (Fa. Janke & Kunkel GmbH, Staufen)
Waage	Fa. Sartorius AG Göttingen
Wasserbad	Schüttelwasserbad GFL 1083 (Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel)
Zentrifugen	Kühlzentrifuge: Rotina 46R Tischzentrifuge: Universal 30 RF (Fa. Hettich)
Ultrazentrifuge	Optima TM XL Serie (Fa. Beckman, Kalifornien USA)

2.2. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Serva (Heidelberg) bezogen.

2.3. Häufig verwendete Puffer und Medien

2.3.1. Häufig verwendete Puffer

 PBS (phosphate buffered saline)

 140 mM NaCl

 1,5 mM KH2PO4

 6,5 mM Na2HPO4

 2,5 mM KCL

 (pH 7,25)

1xTBS 20 mM Tris/HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl

Alle Lösungen wurden in aq. bidest. angesetzt und bei Bedarf autoklaviert

2.3.2. Kulturmedien für Bakterien

BHI (Brain heart infusion)
36 g Brain heart infusion (Fa. Sigma)
0,25 % (w/v) Hefeextrakt
5 % (v/v) FCS*
ad 1L *aqua bidest*(*)Zugabe nach dem Autoklavieren
bei maximal 56°C

LB-Agarplatten LB-Medium + 15 g Agar-Agar pro Liter WC-dent Agarplatten 43 g WC-Anaerobier Agar 0,4 g Kaliumnitrat 45-50 ml (9-10 %) Pferdeblut Dent (*Helicobacter-pylori*-Supplemet) (Fa. OXOID, Hampshire England) Ad 1 L *aq.bidest*

LB (Luria-Bertani) Medium 1% (w/v) Caseinhydreolysat 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl pH 7,6 (eingestellt mit 1N NaOH)

2.4. Kultur von Bakterien

2.4.1. Verwendete Bakterienstämme

Für alle Stimulationen wurden der *H. pylori* Stamm-G27 Wildtyp und als positive Kontrolle *E.coli* verwendet.

Bakterien	Stamm	Genotyp	Referenz
H.pylori	G27 Wt	$VacA^{+}, CagA^{*}$	Covacci et al (1997)
E.coli	XL-1blue	SupE44 hsdR17 recA1 endA1	Bullock et al (1987)
		gyrA46 this rel A1 lac-	
		F'(pro AB+ lac1q lac ZDM15	
		Tn 10(tetr))	

Tabelle 2.1.: Verwendete H. pylori und E coli Stämme

2.4.2. H. pylori und E. coli Kultivierung

Zur Anzucht auf WC-dent Agarplatten wurde der *H. pylori* Stamm- G27 Wt als Zellsuspension (Bakterienpellet wurde in BHI Medium resuspendiert) ausplattiert oder mit der Impföse von einer anderen Platte übertragen. Anschließend wurden die Platten in einem begasbaren unter mokroaeroben Bedingungen Brutschrank (10% CO₂, 5% O₂, 85 %N₂, 37°C) für 3 bis 4 Tage inkubiert. Die Kultivierung von *H. pylori* in Flüssigkultur erfolgte in BHI Medium 10% (v/v) FCS, Dent. Nach der Beimpfung der benötigten Mengen des BHI Mediums in Zellkulturflaschen wurden die *H. pylori* unter mikroaeroben Bedingungen bei 37 °C und 120 rpm auf einem Inkubationsschüttler für 3 bis 4 Tage inkubiert.

Zur Anzucht auf LB-Agarplatten wurden die *E. coli* Bakterien entweder als Zellsuspensionen (Bakterienpellet wurde in 1xPBS suspendiert) ausplattiert oder mit der Impföse von einer anderen Platte übertragen. Anschließend wurden die Platten in einem nicht begasbaren Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Die Kultivierung von *E. coli* in Flüssigkultur erfolgte in LB-Medium. Nach der Beimpfung der benötigten Mengen des LB Mediums in Zellkulturflaschen über Nacht wurden *E. coli* bei 37 °C und 120 rpm auf einem Inkubationsschüttler für einen Tag inkubiert.

H. pylori wurde in BHI Medium mit 20 % FCS (v/v) und 20 % Glyzerin (w/v), und *E. coli* in LB Medium mit 40 % Glyzerin (w/v) bei -80 °C gelagert.

2.4.3. Lichtmikroskopische Beurteilung der Morphologie von H. pylori

Die Morphologie von *H. pylori* Zellen wurde regelmäßig sowohl während der Kultur als auch im Versuchablauf mikroskopisch kontrolliert, da die Morphologie der Bakterien eine schnelle Beurteilung des Wachstums einer Kultur oder des Zustandes der Zellen während eines Versuchs erlaubt. Damit konnte bei mikroskopischer Beobachtung der Zellen eine Kontamination mit Fremdbakterien oder Kokkenbildung sofort detektiert werden.

2.5. Bakterienfraktionierungen

Unter dem Begriff Bakterienfraktionen werden die Bestandteile DNA (chromosomal und Plasmid), Zytosol, innere Membran und äußere Membran von *H. pylori* verstanden. Diese werden isoliert und einzeln untersucht, um festzustellen welcher Bakterienbestandteil die Aktivierung von dendritischen Zellen stimuliert bzw. NK-Zellen und naive CD4⁺ T-Lymphozyten aktiviert.

2.5.1. Isolierung von H. pylori DNA

Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem Boehringer Kit. Die DNA wird dabei an eine Silikon-Gelmembran in den verwendeten Säulen gebunden und nach Waschschritten mit Elutionspuffer eluiert.

Nach 3 bis 4 Tagen bzw. 24 h Inkubation wurden die Bakterien bei 5000 rpm geerntet, dann in 200 µl PBS resuspendiert und in 15 µl Lyse Puffer bei 37 °C inkubiert.

Nach 15 min wurden 200 μ l Bindungspuffer und 40 μ l Proteinase K zugegeben, sofort gemischt und 10 min bei 72 °C (Thermoblock) inkubiert. Danach wurden 100 μ l Isopropanol zugegeben und gut gemischt. Das erhaltene Lysat wurde auf eine Säule pipettiert und ca. 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert.

Die Säule wurde in ein neues Auffanggefäß eingesetzt und mit 500 µl Waschpuffer 1 min, bei 8000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß eingesetzt und mit 500µl Waschpuffer 10 sek. bei max. Geschwindigkeit gewaschen. Anschließend wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eingesetzt und 2 mal 1 min bei 8000 rpm mit 200 µl vorgewärmten (70°C) Elutionspuffer zentrifugiert. Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde mit dem Photometer bei 260 nm bestimmt, dann bei -20 °C gelagert und nach Bedarf aufgetaut und verwendet.

2.5.2. H. pylori-Membranfraktionierung

Puffer A	Puffer B	Puffer C
25 mM Tris / HCl pH 7,5	1 mM Tris	2 mM MgCl ₂
1 mM DTT	5 mM EDTA (pH 8,0)	1 % TX-114
10 mM MgCl ₂	1 mM PMSF	
1 mM PMSF		
(PMSF wird immer frisch dazu		
gegeben)		

Die *H. pylori* wurden von 500 ml Bakterienkultur ($OD_{600} \sim 1,5$) bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min geerntet. Das Pellet wurde zuerst in 1/10 (v/v) Volumen PBS resuspendiert und bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert, dann in 1/500 (v/v) Volumen Puffer A (~ 1ml) resuspendiert, mehrere Male in Stickstoff eingefroren und bei 37 °C (Wasserbad) aufgetaut, bis die Bakterienwände komplett zerstört waren. Ein Teil von der erhaltenen Suspension wurde als Lysat (Lys) bei -20°C gelagert. Bei der folgenden Zentrifugation (10.000xg und 4°C, 20 min) wurden Zellschrott und nicht lysierte Bakterien pelletiert. Der Überstand wurde in 5 x Volumen (~ 5ml) Puffer A verdünnt und weiter bei 100.000 g und 4 °C für 1 h zentrifugiert. Der Überstand enthält die Zytosol-Fraktion und das Pellet die gesamt Membran (innere und äußere Membran).

Die Gesamtmembran wurde in ca. 6 ml Puffer B gelöst und bei 4 °C für 10 min inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Ansatz bei 100.000 g und 4°C für 1 h zentrifugiert.

Das erhaltene Membranpellet wurde 2 x in PBS gewaschen (100.000 g und 4 °C für 1 h), in 500 μ l PBS gelöst, aliquotiert, bei -20 °C gelagert und nach Bedarf aufgetaut und als Gesamtmembran verwendet.

Als nächstes sollte die innere Membran (iMem) von der äußeren Membran (aMem) getrennt werden. Dafür wurde die gesamt Membran (Mem) in 1ml Puffer C gelöst und bei 100.000 g und 4° C für 1 h zentrifugiert.

Der Überstand enthält nur die innere Membran und das Pellet die äußere Membran, die in 500 μ l PBS gelöst wurde und bei -20°C gelagert. Die Konzentrationen der erhaltenen Fraktionen (Lys, Zyt, Mem, iMem und aMem) wurden mit dem Bradford-Protein-Bestimmungsassay bestimmt und mit SDS-PAGE bzw. Immunoblot weiter analysiert.

2.6. Proteinbestimmungen (nach Bradford, 1976)

<u>Prinzip</u>

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford handelt es sich um eine Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Lösung aus Coomassie-Brilliant-Blau G-250 von 465nm zu 595 nm bei Bindung von Protein. Die Extintionszunahme ist zur Proteinkonzentration proportional.

100 μ l Probe wurde mit 1ml Farbstoff-Reagenz (Nr. 500-0006, BioradRad; 1:5 mit H₂O versetzt) 15 min bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm gegen einen Leerwert, bei dessen Ansatz anstelle der Probe 100 μ l 1xPBS verwendet worden waren, gemessen. Für die Eichkurve, die sich über einen Bereich von 6,25-100 μ g Protein erstreckt, wurde BSA (1 mg / ml in 1xPBS) verwendet. Entsprechende Mengen dieser Stammlösung wurden mit 1 x PBS auf 100 μ l aufgefüllt und mit 1 ml Farbreagenz gemischt.

2.7. Analyse von Bakterienfraktionen

2.7.1. Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Prinzip

Bei Gelelektrophoresen handelt es sich um trägergebundene Systeme. Die Matrix besteht bei Polyacrylamidgelen aus Acrylamidnetzwerken, deren Durchlässigkeit von der Polyacrylamid-Monomerkonzentration und dem Quervernetzungsgrad abhängig ist. Bei SDS-PAGE sorgt eine Vorbehandlung des Proteingemischs dafür, dass für die Wanderung nur die jeweilige Masse der Proteine ausschlaggebend ist. Dies erreicht man durch Zusatz von Natrium-Laurylsulfat, dem Schwefelsäureester des Laurylalkohols (Sodium dodecyl Sulfat:SDS). SDS ist ein Detergenz mit stark amphipathischen Eigenschaften. Es zerlegt oligomere Proteine in die Untereinheiten und denaturiert diese. An die entfaltenen Peptidketten binden SDS Moleküle und verleihen ihnen eine stark negative Ladung.

Zur vollständigen Denaturierung gibt man außerdem β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) zu, um Disulfid-Brücken im Protein zu spalten.

Bei der Elektrophorese wandern Moleküle in einem elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von drei Faktoren ab: ihrer Größe, ihrer Form und ihrer elektrischen Ladung.

2.7.2. Eindimensionale Trizin-SDS PAGE (nach Schägger und Jagow 1988)

Probenpuffer (2 x)	(4 %) Sammelgel
8 % (w/v) SDS	2,08 ml H ₂ O
24 % (w/v) Glyzerin	0,78 ml Puffer (3 M Tris/HCl (pH 8,45)/ 0,3
100 mM Tris/HCl, pH 6,5	% SDS)
0,02 % (w/v) Sera Blau G	0,25 ml Acrylamidlösung (48 % (w/v) AA,
(4 % β- Mercaptoethanol)	1,5 % (w/v) Bis)
	2,5 µl Temed
Laufpuffer	37,5 µl APS (10 % (w/v))
100mM Tris	
100mM Trizin	(10 %) Trenngel
рН 8,25	5,19 ml H ₂ O
	3,75 ml Puffer (3M Tris / SDS)
Marker	2,27 ml Acylamidlösung (46,5 % (w/v) AA,
See-Blue TM Plus2, Pre-Stained Standards	3 % (w/v) Bis)
(Invitrogen, Life technologies, Karlsruhe)	3,75 µl Temed
	56 μl APS, (10% (w/v))

Die eindimensionale Trizin-SDS-PAGE Methode erlaubt eine lineare Auftrennung von Proteinen im Bereich von 100 - 1 kDa. Bei diesem Gel- und Puffersystem ist die Molarität des Puffers hoch und Trizin dient als das terminierende Ion. In die Gel Kasette wurde das Trenngel eingebracht und nach Polymerisation mit Sammelgel überschichtet, in das ein Probentaschenkamm eingesetzt wurde. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde die Kassette in die Elektrophorese-Kammer eingespannt und die Kammer mit Laufpuffer gefüllt.

Die Proben, Lysat (Lys), Membran (Mem), innere Membran (iMem), äußere Membran (aMem) und Zytosol (Zyt), wurden folgendermaßen vorbereitet. 5 µg Protein wurden 1:2 mit 2x Probenpuffer gemischt, für 10 min bei 100 °C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen.

Als Molekulargewichtsstandard wurde der vorgefärbte Marker (See-BlueTM) mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei RT zunächst mit 50 V bis zum vollständigen Eintritt der Proteine ins Sammelgel und wurde anschließend mit 140 V zu Ende geführt.

2.7.3. Fixierung, Färbung und Entfärbung des Gels

Nach der Elektrophorese mussten die Proteine im Gel lokalisiert werden. Sofern keine Western-Blot-Analyse durchgeführt werden sollte, wurde das Gel, abhängig von der auftragenen Proteinmenge, einer Coomassie-Blau-bzw. Silberfärbung unterzogen.

2.7.4. Coomassie-Blau Färbung

Fixierer	Coomassie Färblösung
50 % Methanol	0,1 % (w/v) Coomassie Brillant Blau R250
10 % (v/v) Essigsäure	45 % (v/v) Methanol
	10 % (v/v) Essigsäure

Coomassie Entfärber Lösung 10 % (v/v) Essigsäure 45 % (v/v) Methanol

Coomassie Brillant Blau gehört zu den am häufigsten verwendeten Protein-Farbstoffen. Die Nachweisgrenze liegt im Bereich von 0,1 bis 2 μ g pro Proteinbande. Das Proteingel wurde zunächst für 30 min in Fixierer und ausschließend, nach kurzem Waschen in H₂O, für 1,5 h in Coomassie Färblösung inkubiert. Das Entfärben erfolgt in Entfärberlösung. Das Gel wurde eingescannt zur Dokumentation.

- 32 -

2.7.5. Silberfärbung (nach Heukeshoven, 1985)

Fixierer 1	Entwickler
30 % (v/v) Ethanol	2,5 % Na ₂ CO ₃
10 % (v/v) Essigsäure	0,01 % (v/v) Formaldehyd
Fixierer 2	Stopplösung
30 % (v/v) Ethanol	1 % (v/v) Essigsäure
500 mM Natriumacetat	
0,5 % (v/v) Glutaraldehyd	Silberlösung
0,2 % (w/v) Natriumthiosulfat	0,1 % (w/v) Silbernitrat
(immer frisch angesetzt)	0,02 % (v/v) Formaldehyd

Die Silberfärbung ist eine empfindlichere Methode zur Sichtbarmachung von Proteinen als die Coomassie-Blau-Färbung. Durch sie lassen sich Proteinmengen bis 5 ng pro Bande nachweisen.

Zur Silberfärbung wurde das Polyacrylamidgel auf einem Horizontalschüttler unter leichtem Schütteln 30 min in Fixierer 1 und anschließend 30 min in Fixierer 2 inkubiert. Es folgte ein Waschschritt mit *aq. dest.* für 1 h unter häufigem Wechsel der Lösung und eine 30 minütige Inkubation in der Silberlösung. Zum Sichtbarmachen der Proteine wurde das Gel in die Entwicklerlösung überführt, die bei ausreichender Entwicklung der Proteinbanden sofort gegen Stopplösung ausgetauscht wurde. Danach wurde das Gel zur Dokumentation eingescannt.

2.8. Western-Blot- Analyse von Bakterienfraktionen (nach Towbin H 1979 und Burnette WN 1981)

Prinzip

Beim Western-Blot werden Proteine, die durch Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, durch ein transversal zur Geloberfläche angelegtes elektrisches Feld an der Anode auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Auf dieser Membran sind die Proteine Reaktionen zugänglich, welche die Gelmatrix verhindert.

2.8.1. Transfer von Proteinen auf Membranen in "Min-Gel Blot-Module"-Verfahren

Nitrozellulosemembran:	Cellulosenitrat, BA 85, 0,45µm Porendurchmesser (Fa. Schleicher& Schuell, Dassel)
Filterpapier	Wattman Papier GB003 (Fa. Schleicher&Schnell)
Schwamm "Blotting Pad"	(Fa. Invitrogen)
Transferpuffer	190 mM Glycin
(Lagerung bei 4°C)	20 % (v/v) Methanol
	0,1 % (w/v) SDS

Als erstes wurden 5 Schwämme, zwei Filterpapiere, eine Nitrozellulosemembran und das Gel kurz in Transferpuffer eingelegt.

Die Schichtung im Mini-Gel Blot-Module erfolgt auf der Kathodenseite der Apparatur in folgender Reihenfolge: auf die zwei Schwämme folgt ein Filterpapier und das Gel. Das Gel wurde zuerst mit der Nitrozellulosemembran, dann mit dem zweiten Filterpapier und anschließend mit den restlichen drei Schwämmen abgedeckt. Alle Lagen sollten luftblasenfrei aufeinander gelegt werden. Nach Aufsetzen der Anode erfolgt der Transfer in Transferpuffer mit 23 V, 230 mA für 90 min.

2.8.2. Anfärben von Proteinen auf Nitrozellulosefiltern

Ponceau Färbelösung	0,2 % (w/v) Ponceau S
	3 % (v/v) Trichloressigsäure
	in H ₂ O

Proteine, die auf eine Nitrozellulosemembran transferiert wurden, können reversibel mit einem Farbreagenz sichtbar gemacht werden. Die Membran wurde hierzu für 5min in Ponceau Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Entfärben bis zum gewünschten Färbegrad erfolgte mit H₂O. Die vollständige Entfärbung der Membran wurde durch weiteres Waschen in H₂O erreicht.

Bezeichnung	Тур	Titer	Spezies	Herkunft
Anti-UreA	Polyklonal	1:20000	Kaninchen	Wurde von Dr. Harry
				Mobley, Baltimore, zur
				Verfügung gestellt
Anti-HpaA	Monoklonal	1:1000	Maus	Universität Göteborg,
				Schweden
Blutplasma		1:1000	Human	Blutspender
Anti-Human-POX	Polyklonal	1:10000	Goat	Fa. Dianova (Hamburg)
Anti-Mause-POX	Monoklonal	1:10000	Esel	Fa. Dianova (Hamburg)
Anti-Rabbit- POX	Polyklonal	1:10000	Esel	Fa. Dianova (Hamburg)

2.8.3. Immunoblot

Tabelle 2.2.: Liste der verwendeten Antikörpern (POX: Peroxidase)

Prinzip

Im "Immuno-blot" werden selektiv einzelne Proteine (Antigene) eines Proteingemisches gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Bei der Chemilumineszenz handelt es sich um eine nicht radioaktive Methode zur direkten Detektion immobilisierter spezifischer Antigene oder zur indirekten mit Horseradish-Peroxidase (HRP).

Zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrozellulosemembran in TBST-Blotto für 1h bei RT abgesättigt. Der erste Antikörper (Anti-UreA, Anti-HpaA, Blutplasma) wurde je nach Titer in TBST-Blotto verdünnt und die Membran darin über Nacht im Kühlraum unter leichtem Schütteln inkubiert.

Anschließend wurde die Membran 3 bis 4 mal 15 min in TBST unter kräftigem Schütteln gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Anti-Human-POX, Anti-Mause-POX, Anti-Rabit-POX) wurde nach Titer in TBST-Blotto verdünnt und die Membran darin 1-2 h bei RT inkubiert Nach dieser Inkubation wurde die Membran 4 x 15 min in TBST gewaschen.

Zur Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes mit SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate-System wurden Reagenz 1 und Reagenz 2, welche das Substrat Luminol/Enhancer und Peroxide enthalten, zu gleichen Teil gemischt und die Membran 5 min darin inkubiert. Die Membran wurde anschließend in eine Filmkassette eingelegt und bei RT unterschiedlich lange Zeit gegen einen CL-XPosureTM-Film exponiert. Der Film wurde danach entwickelt (Röntabteilung des Klinikums rechts der Isar) eingescannt und dokumentiert.

SuperSignal[®]West Pico Chemiluminescent Substrate (Fa. Pierce Rockford, Bonn)

- 1. SuperSignal ® west Pico Luminol Enhancer solution
- 2. SuperSignal ® west Pico stable Peroxide solution

TBS / Tween-Waschlösung (TBST)	0,05 % (v / v) Tween-20 in TBS, pH7,5
Magermilchpulverlösung (TBS-Blotto)	5 % (w / v) Sprühmagermilchpulver in TBS

2.8.4. Der serologische Test

Der Serologische Test wurde durchgeführt um zu prüfen, ob die Blutspender serologisch *H. pylori* positiv sind oder nicht. Dafür wurden 5 µg *H. pylori*-Lysat in einem 10 % Trizin-SDS-Minigel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.7.2.), auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (s. 2.8.1.) und mit dem Blutplasma des Spenders als ersten Antikörper und mit einen Anti-Human-POX als zweiten Antikörper (s. Tab. 2.2) inkubiert (s. 2.8.3.). Der Nachweis wurde mittels Chemilumineszens (CL-System) wie unter 2.8.3. beschrieben durchgeführt

2.9. Zellbiologische Methoden

2.9.1. Gewinnung von peripheren mononukleärer Zellen (mnZ) durch Dichtegradientzentrifugation aus gesunden Spendern

Prinzip der Zentrifugation im Dichtegradienten-Medium

Grundlage jeder Trennung von Partikeln verschiedener Größe oder Dichte durch Zentrifugation oder Sedimentation ist das Stokesche Gesetz:

$$V = \frac{d_p^2 (\rho_p - \rho_M)}{18\eta} g$$

V: Sedimentationsgeschwindigkeit des Partikels (m / s)
d: Partikeldurchmesser (kugelförmige Partikel m)
ρ_p: Dichte des Partikels (Kg / m³)
ρ_M: Dichte des Zentrifugationsmediums (Kg / m³)
η: Dynamische Viskosität des Zentrifugationsmediums (Ns / m³)
g: Erdbeschleunigung (9,81 m / s²) (m / s²)

Aus dieser Formel lässt sich ableiten, dass die Sedimentationsgeschwindigkeit gegen Null geht, wenn die Partikeldichte gleich der Dichte des Zentrifugationsmediums wird. Zusätzlich erkennt man den Einfluss der Partikelgröße, wobei die Formel nur für kugelförmige Partikel gilt.

Zur genauen Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit von Zellen wird sie nur selten benutzt, da zusätzlich bestimmte Eigenschaften der Zellen berücksichtigt werden müssen. So sind Zellen selten exakt kugelförmig und Wechselwirkungen zwischen Zelloberflächen und Zentrifugationsmedien können die Sedimentationsgeschwindigkeiten beeinflussen.

Durch Zentrifugation werden Zellen mit unterschiedlicher Dichte und/oder Größe voneinander getrennt, wobei sich grundsätzlich drei Verfahren unterscheiden lassen: Zentrifugation in homogenen Zentrifugationsmedium, Dichtegradienten mit einem stufenweisen Anstieg der Dichte und Zentrifugation im Dichtegradienten-Medium.

Bei Zentrifugation im Dichtegradienten-Medium ist die Mediendichte einzelner Schichten größer als die Dichte bestimmter Zellen und sie sind sehr einfach und bequem in der Handhabung.

Ein Beispiel ist der Ficoll paque-Gradient : Die Zellsuspension wird über das Ficoll-Medium (Dichte zwischen 1,07 und 1,12) geschichtet, und der Gradient wird ca. 30 - 40 min lang bei 400 g zentrifugiert.

Zellen, deren Dichte kleiner ist als die Dichte des Ficolls, bleiben über dem Ficoll liegen; Zellen und Partikel, deren Dichte größer ist als die des Ficolls, werden durch das Ficoll hindurch zentrifugiert. So lassen sich Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen als dichte Zellen aus der Zellsuspension (Blut) einfach und schnell entfernen.

mnZs- Aufreinigung

nersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)
9 g NH ₄ Cl g KHCO ₃ mM EDTA

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes können aufgrund ihrer Dichte von den anderen Bestandteilen des Blutes getrennt werden.

Sie wurden unter anderem zur Generierung von dendritischen Zellen und Isolierung von NK-Zellen und naiven T-Zellen eingesetzt. Heparinisiertes Blut wurde 1:1 mit PBS verdünnt und davon jeweils 35 ml vorsichtig über 15 ml Ficoll-Hypaque in 50 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet. Nach Zentrifugation (bei 400 g für 25 min ohne Bremse) wurden die mononukleären Zellen aus der Interphase zwischen dem Ficoll und dem Plasma mit einer Pipette abgezogen und für 10 min bei 300 g zentrifugiert. Um alle Erythrocyten zu eliminieren, wurde das Pellet für 5 min mit 5 ml Erythrozyten-Lyse Puffer bei RT inkubiert und dann mit 45 ml PBS aufgefüllt und gewaschen.

Nach zweimaligem Waschen mit PBS, bei 300 g für jeweils 10 min, wurden die Zellen anschließend in RPMI-Medium aufgenommen und ausgezählt.

Zellzahlbestimmung

Zur Ermittlung der Zellzahl und Überprüfung der Vitalität der Zellen wurden diese mit dem Farbstoff Trypanblau verdünnt, den nur tote Zellen aufnehmen.

10 μ l der Zellsuspension wurden mit 90 μ l Trypanblau (1:10) in einem Eppendorfgefäß vermischt und davon 10 μ l in einer Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Mikroskopisch wurden die Zellen in den vier Feldern der Kammer gezählt und der Durchschnittswert ermittelt.

Dieser, multipliziert mit dem Kammer- und Verdünnungsfaktor, ergab wiederum die Zellkonzentration pro ml.

Die erhaltenen mnZ wurden für die magnetische Zellsortierung weiterverwendet.

2.9.2. Immunfluoreszenz und Durchflußzytometrie

Prinzip

Bei der Immunofluoreszenz werden Antigene auf der Oberfläche von Zellen mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern nachgewiesen. Die Zellen liegen in einer Zellsuspension vor und werden objektiv durch Photomultiplyer und nicht durch das menschliche Auge beurteilt. Das Prinzip ist schematisch in Abbildung 2.1. dargestellt.



Abbildung 2.1: **Prinzip der Fluoreszenz-aktivierten** (FACSortTM) Zellsortierung (Nach Mta serie: 8 (1993) 5 Seite 530)

Der erste Schritt im Prozeß der Durchflusszytometrie ist es, Zellen spezifisch mit fluoreszierenden Farbstoffen zu markieren. Wenn die Zellen markiert sind und sich in einer Trägerflüssigkeit befinden, werden sie in das Rohr des Durchflusszytometers injiziert.

Durch die hohe Strömungsgeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit werden die Zellen vereinzelt und in einer fixen Position am Laserlicht vorbei geführt. Das Argon-Laserlicht führt zu einer Exitation der Fluoreszenzfarbstoffe, die wiederum Fluorezsenzlicht emittieren.

Die emittierten Fluoreszenzen können durch verschiedene Photozellen detektiert werden.

Pro Zelle können 4 verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe [FL1: FITC, FL2: PE, FL3: PerCP, FL4: APC (allophycocyanin)] (Abb.2.2) und 2 weiteren Parametern [SSC und FSC] gleichzeitig gemessen werden (s. Abb. 2.3).

In Abbildung 2.2 ist die Verteilung der Zellen aufgrund ihrer Markierung mit 2 verschiedenen Antikörpern dargestellt. Jede Achse repräsentiert dabei beide Fluoreszenzen. Je stärker die Zellen FITC (grün) markiert sind, umso weiter werden sie nach oben abgelenkt und je stärker die Zellen PE (rot) markiert sind, umso mehr werden sie nach rechts abgelenkt.

Zwei zusätzliche Parameter, FCS (Vorwärtsabweichung) und SSC (Seitenabweichung), erlauben eine Unterscheidung der Zellen aufgrund von morphologischen Parametern wie Zellgröße und Oberflächenbeschaffenheit (Abb. 2.3).



Abbildung 2.2: Verteilung der Zellen aufgrund von zwei verschiedenen Fluoreszenz Parametern, FL1 und FL2 (FL1: CD4-FITC, FL2: CD45-PE)



Abbildung 2.3:. Verteilung der Zellen anhand von morphologischen Parametern (FSC, SSC).

Mit Hilfe des FACS-Gerätes können in ca. 1 Sekunde 50.000 Zellen untersucht werden. Auf der X-Achse werden die Zellen nach Ihrer Größe verteilt, d.h. je größer die Zellen sind, umso weiter nach rechts auf der X-Achse werden sie abgelenkt. Auf der Y-Achse werden die Zellen nach Ihrer Komplexität verteilt, d.h. je mehr Bestandteile die Zellen enthalten, umso weiter werden sie nach oben abgelenkt.

Durchführung

FACS-Puffer 1 x PBS 1 % (w/v) BSA

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden jeweils zwei Antikörper eingesetzt, die gegen unterschiedliche Antigene gerichtet und mit verschiedenen Farbstoffen wie Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) konjugiert waren.

Zu Beginn wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und in FACS-Puffer suspendiert. Zu 100 μ l Zellsuspension wurden 10 μ l jedes Antikörpers zugegeben. Für eine verlässliche Messung ist eine mindest Zellzahl von 1 x 10⁴ notwending.

Nach kurzer Durchmischung erfolgte die Inkubation der Ansätze für 30min bei 4°C im Dunkeln. Danach wurden die Zellen mit 880 μ l FACS-Puffer aufgefüllt und einmal gewaschen (10 min, 300 g), um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Die FACS-Analyse wurde nach der Suspendierung der Zellen in 500 μ l FACS-Puffer mit dem FACSCaliburTM durchgeführt und die Ergebnissauswertung erfolgte mit der Software CellQuest 3.3

2.9.3. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein Testverfahren, das Antigene oder Antikörper mittels eines Enzym-markierten Antikörpers (Konjugat) und einer dadurch katalysierten Farbreaktion quantitativ nachweist.

Da bestimmte Kunststoffe (NUNC Maxisorp Mikrotiterplatten) Proteine gut anlagern, können sie mit Antigenen (Ag) oder Antikörpern (Ak) (1) beschichtet werden. Beim Auswaschen der Kunststoffvertiefungen der ELISA-Platte werden sie nicht abgelöst. Nach Absätigung unspezifischer Bindungsstellen und Waschen wurde die zu untersuchenden Proben und der Zytokinstandard auf die Platte gebracht (2). Anschließend erfolgt die Zugabe eines Biotinmarkierten Zweitantikörpers, der gegen das entsprechende Zytokin (Detektor) gerichtet war (3).

2.4)

Die Menge des gebundenen Zytokins wurde durch Zugabe eines markierten Enzyms (4) (Streptavidin-HRP Komplex) mit Hilfe einer Substratlösung (Tetramethyl Benzidin: TMB) ermittelt (5). Das Substrat wurde durch das Enzym in Abwesenheit von H_2O_2 zu einem Farbstoff reduziert, der bei 450 nm photometrisch gemessen wird. Die Farbereaktion wurde abgestoppt und anhand des mitgeführten Standards konnte dann, nach Erstellung einer Eichkurve, die Farbereaktion direkt mit der Antikörperkonzentration korreliert werden (Abb.



Abbildung 2.4: Sandwich-ELISA-Prinzip

Durchführung:

In dieser Arbeit wurde IL2, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ und TNF- α in den Zellkulturüberständen der dendritischen Zellen bzw. Kulturen mit NK-Zellen und T-Lymphozyten bestimmt. Dafür wurden human CytoSetsTM von der Firma Biosource Europe S.A. (Nivelles, Belgium) für IL-8, IL-12 (p40), IFN- γ und TNF- α und Sets von der Firma Biocarta (Hamburg) für IL-2 und IL-10 verwendet und nach den Hersteller-Anleitungen durchgeführt und ausgewertet.

2.9.4. Aufreinigung von Zellen durch MACS (Magnetic Activated Cell Sort)

Prinzip von MACS

Mit dem MACS-Verfahren lassen sich Zellen nach einer Vielzahl von <u>physikalischen</u> [Zellgröße und Zellvolumen, Zelldichte, Lichtstreuung, Lichtabsorption], <u>biochemischen</u> [Anheftung an Oberflächen, Empfindlichkeit für Zellgifte, DNA-Menge, Ionenkonzentrationen, Enzyme] und <u>immunphänotypischen</u> [Expression von z. B. aktivierungs- und differenzierungsspezifische Proteine der Zelloberfläche] Eigenschaften sortieren, so dass eine reine Zellpopulation für weitergehende Versuche zur Verfügung steht.

Die immunologisch-genetischen Parameter werden deshalb so bezeichnet, weil diese Oberflächenproteine von (monoklonalen) Antikörpern spezifisch erkannt werden und daher Antikörper zur Trennung von Zellen eingesetzt werden können.

Beim MACS-Verfahren werden sehr kleine, superparamagnetische Partikel mit < 50 nm Durchmesser eingesetzt, die damit nicht viel größer als Antikörper sind und für die Trennung direkt oder indirekt an Antikörper gekoppelt sind.

Mit diesen Partikeln lassen sich sehr spezifische und quantitative Markierungen von Zellen durchführen. Zur Trennung sind allerdings sehr starke Magnetfelder nötig, denn die kleinen Partikel sind nur schwach magnetisch, damit sie nicht aggregieren.

Die starken Magnetfelder werden in speziellen Säulen aus Stahlwolle zwischen den Magnetpolen eines Hochleistungspermanentmagneten erzeugt. Die Magnetpartikel können auf verschiedene Weise spezifisch über monoklonale Antikörper an bestimmte Zellen gebunden werden: direkt als Antikörper-Magnetpartikel-Konjugat oder als Streptavidin-Magnetpartikel-Konjugat, wenn der spezifische erste Antikörper biotinyliert verfügbar ist.

Bei der magnetischen Markierung ist es wichtig, die Reagenzien auszutitrieren, damit die Markierung so stark und spezifisch wie möglich ist. Unspezifische Markierung führt zwangsläufig zu schlechter Reinheit der isolierten Zellen.

Die magnetisch markierte Zellsuspension kann jetzt im Magnetfeld über die mit der Stahlwollmatrix gefüllte Säule gegeben werden. Zwischen den Fäden der Stahlwolle, die außerhalb des Magneten unmagnetisch ist, entsteht im Magnetfeld ein sog. "Hochgradientenfeld", in dem auf dien Magnetpartikel äußerst hohe Kräfte ausgeübt werden.

Die magnetisch markierten Zellen bleiben in der Matrix hängen, die nicht markierten Zellen laufen durch und werden als negative Fraktion aufgefangen.

Die markierten Zellen lassen sich durch Spülen der Säule außerhalb des Magnetfelds gewinnen.

MACS-Puffer		
1xPBS	MACS Separationssäulen	FACS-Puffer
0,5 % (w/v) BSA	LD- Separationssäule	1xPBS
2 mM EDTA	MS-Separationssäule	1% (w/v) BSA
(steril filtriert und mit		
Ultraschall entgast)	MACS Magnet	
	Midi MACS Magnet	

- Alle MACS-Produkte wurden von der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) erworben.
- Bei allen Zellisolierungen wurden die LD- und die MS-Säulen mit MACS-Puffer voräquilibriert.
- Die Reinheitsbestimmung und die Identifizierung der isolierten Zellen wurden mit entsprechenden Antikörpern durchflußzytometrisch durchgeführt (s. 2.9.2.).
- Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde regelmäßig sowohl nach der Isolierung, als auch im Versuchablauf mikroskopisch nach der Färbung mit Trypanblau kontrolliert (s. 2.9.2.).

2.9.4.1. Magnetische Sortierung von Monozyten

• Monocytes Isolation Kit II

FcR Blocking	human Ig	
Monocyte Biotin-Antibody Cocktail	Cocktail aus humanen monoklonalen Biotin-	
	konjugierten CD3-, CD7-, CD16-, CD19-, CD56-,	
	CD123- und Glykophorin-Antikörpern.	
Anti-Biotin MicroBeads	Mikro-Beats, an monoklonale anti-Biotin	
	Antikörper gekoppelt.	

 Antikörper: Folgende Antikörper kamen für die Analyse von Monozyten in der Durchflußzytometrie zur Verwendung: Anti-CD14, Anti-CD45, Anti-CD3 und Anti-CD19. Alle Antikörper sind monoklonal und FITC oder PE-konjugiert und wurden bei der Firma Becton Dickinson (San Jose CA, USA) erworben. Bei der Isolierung von Monozyten mit dem "Monocyte Isolation Kit II" handelt es sich um eine negative Selektion, bei der 10^7 Zellen (mnZ) in 60 µl MACS-Puffer, 20 µl FcR Blocking Reagenz und 20 µl Hapten-Antibody Cocktail gemischt werden. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 6-12°C wurden die Zellen zweimal mit MACS-Puffer gewaschen (300 g für 10 min).

Das Pellet wurde anschließend in 60 μ l/10⁷ Zellen MACS-Puffer und 20 μ l/10⁷ Zellen Anti-Hapten MicroBeads resuspendiert und gut gemischt. Nach 15 min Inkubation bei 4-8 °C wurden die Zellen gewaschen und in 500 μ l/10⁸ Zellen in MACS-Puffer suspendiert. Für die Isolierung von Monozyten wurde die LD Säule als Depletionssäule verwendet, da sie eine hohe Kapazität für markierte Zellen hat (bis zu 10⁸ Zellen). Nach der Äquilibrierung der LD-Säule wurden 10⁸ Zellen/LD-Säule aufgetragen. Durch zweimaliges Waschen wurden alle unmarkierten Zellen von der Säule eluiert, welche die Monozyten-angereichte Fraktion darstellt.

Die Reinheitsbestimmung und die Identifizierung der gewonnenen Zellen (Monozyten) wurden mittels FACS-Analyse wie unter 2.9.2. beschrieben durchgeführt.

Die CD14⁺/CD45⁺ Zellen wurden als Monozyten charakterisiert und für die Generierung dendritischer Zellen weiter verwendet.

2.9.4.2. Magnetische Sortierung von NK-Zellen

• NK Cell Isolation Kit II

NK Cell Biotin-Antibody Cocktail	Cocktail aus humanen monoklonalen Biotin-
	konjugierten CD3-, CD4-, CD14-, CD15-, CD19-
	CD36-, CD123- und Glykophorin-Antikörpern.
Anti-Biotin MicroBeads	Mikro-Beads, an humanen monoklonale anti-Biotir
	Antikörper gekoppelt

 Antikörper: Folgende Antikörper kamen für die Analyse von NK-Zellen in der Durchflußzytometrie (s. 2.9.2.) zur Verwendung: Anti-CD56, Anti-CD4 und Anti-CD 16. Alle Antikörper sind monoklonal und FITC oder PE konjugiert (Fa. Becton Dickinson, San Jose CA, USA). 10⁷ isolierte mnZ wurden in 40 μl MACS-Puffer, 10 μl Biotin konjugiertem Antibody Cocktail bei 4 - 8 °C für 10 min inkubiert, danach wurden 30 μl MACS-Puffer und 20 μl Anti-Biotin konjugierte Mikro-Beads dazu gegeben, gut gemischt und bei 4 -8 °C für 15 min inkubiert.

Nach einem Waschschritt mit MACS-Puffer wurden 10^8 Zellen in 500 µl MACS-Puffer suspendiert und auf eine LD-Säule aufgetragen. Durch zweimaliges Waschen der Säule wurden alle unmarkierten NK-Zellen von der Säule eluiert.

Die Reinheit die Identifizierung der gewonnenen NK-Zellen wurden durch FACS-Analyse (s. 2.9.2.) bestimmt. CD16⁺ / CD56⁺ Zellen wurden als NK-Zellen charakterisiert und für die Ko-Kultur mit den dendritischen Zellen weiter verwendet.

2.9.4.3. Magnetische Sortierung von naiven T-Zellen

• Pan T Cell Isolation Kit II

Pan T Cell Biotin-Antibody Cocktail:	Cocktail aus humanen monoklonalen	
	Biotin-konjugierten CD14-, CD16-, CD19-,	
	CD36-, CD56-, CD123- und Glykophorin-	
	Antikörpern.	
Anti-Biotin MicroBeads:	Mikro-Beads, an monoklonale anti-Biotin	
	Antikörper gekoppelt	

• CD45RA Micro-Beads

Mikro-Beads konjugiert mit monoklonalen humanen CD45RA Antikörpern.

 Antikörper: Folgende Antikörper kamen für die Identifizierung von naiven T-Zellen in der FACS-Analyse (s. 2.9.2.) zum Einsatz: Anti-CD45RA und Anti-CD4. Alle Antikörper sind monoklonal und FITC- oder PE- konjugiert (Fa. Becton Dickinson, San Jose CA, USA).

Die Isolierung von naiven T-Zellen aus den mnZ wurde in zwei Schritten durchgeführt: Zuerst wurden die CD3⁺ T-Lymphocyten mit der "Pan T Cell Isolation Kit II" isoliert.

Dabei wurden je 10^7 Zellen (mnZ) in 40 µl MACS-Pufer suspendiert und in 10 µl Biotin-Antibody Cocktail bei 4 – 8 °C für 10 min inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden je 10^7 Zellen (mnZ) in 30 µl MACS-Puffer gewaschen (300 g, 10 min).

Das Pellet wurde mit 20 μ l/10⁷ Zellen Anti-Biotin MicroBeads gut gemischt und bei 4 – 8 °C für 15 min inkubiert, danach mit MACS-Puffer gewaschen und suspendiert (500 μ l/10⁸Zellen).

Die Depletion und Elutions wurden wie bei der Monozyten-Isolierung (s. 2.9.4.1.) durchgeführt. Beim zweiten Schritt handelt es sich um eine positive Selektion von den naiven T-Zellen, bei der 10⁷ Zellen aus Schritt 1 in 80 µl MACS-Puffer und 20 µl MACS CD45RA MicroBeads gut gemischt, bei 4 °C für 15 min inkubiert und dann gewaschen (300 g, 10 min) wurden. Für die positive Selektion wurden je 10⁸ Zellen in 500 µl MACS-Puffer suspendiert und auf eine MS-Säule aufgetragen, da die MS Säule eine kleinere Kapazität als die LD-Säule für markierte Zellen hat (bis zu 10⁷ Zellen). Durch Waschen der MS Säule mit MACS-Puffer werden die unmarkierten Zellen gewonnen, wohingegen die magnetisch markierten CD45RA⁺ Zellen in der MS-Säule vom Magnetfeld entfernt und die Zellen mit 500 µl MACS-Puffer eluiert. Die Identifizierung und die Reinheit der erhaltenen naiven T-Zellen wurden mittels FACS (s. 2.9.2.) durchgeführt. CD4⁺/CD45RA⁺ Zellen wurden als naive T-Zellen charakterisiert und für die Ko-Kultur mit den dendritischen Zellen weiter verwendet.

2.10. Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten in vitro

Konditionsmedium:	RPMI, 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Pen-Step, 1 % (v/v) L- Glutamin, 20 ng/ml hr IL-4,20 ng/ml hr GM-CSF
RPMI 1640	Life Technologies, Paisley, Scotland
Penicillin/Streptomycin	Fa. Cambrex, Verviers, Belgium
FCS	Fa. ICN Biomedicals, Inc, Aurova, Ohio
L-Glutamin	Boehringer, Ingelheim
Inhibitoren	Cytochalasin A (CC A) (Fa. Sigma, Steinheim) Cytochalasin D (CCD) (Fa. Sigma, Steinheim) PSI: (Fa. Calbiochem Biochemicals) MG132: (Fa. Sigma, Steinheim) Brefeldin A (BFA) (Fa. Sigma, Steinheim)
Antikörper:	Anti-HLA-DR, Anti-CD1a, Anti-CD86, Anti-CD83, Anti- CD80. Alle Antikörper sind monoklonal und FITC oder PE-konjugiert (Fa. Becton Dickinson, San Jose CA, USA)

Bei der Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten *in vitro* ("Mo-DC") handelt es sich um ein Verfahren, bei dem sich Monozyten in einem GM-CSF und IL-4-haltigen Medium zu dendritischen Zellen differenzieren lassen (Jeannin P 2000, Corinti S 2001, Landmann A 2001, Peretti J 2001, Akira K 2001, Rerscigno M 2001, Liu YJ 2001). In 6 Well-Platten wurden 10^7 Zellen/Well in 5 ml Konditionsmedium über Nacht im Brutschrank (100 % Feuchtigkeit, 37 °C, 5 % CO₂) inkubiert.

Am nächsten Tag (T2) und an T4 und T6 wurden die Zellen mit 1ml Konditionsmedium pro 10^7 Zellen gefüttert und weiter inkubiert. An T7 sollten die Monozyten zu unreifen Monocytederived dendritischen Zellen (iMo-DC) differenziert sein.

Hier zu wurden die generierten Mo-DCs mit Hilfe eines Lichtmikroskops in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (s. 2.9.1). Zellen mit typischer DC-Morphologie (große Zellen mit höherer intrazellulärer Granularität und feinen zytoplasmatischen Ausläufern) wurden als unreife dendritischenZellen (iMo-DC) betrachtet.

Die Zellanreicherung von iMo-DC wurde mit einem Durchflußzytometer wie unter 2.9.2. ermittelt. CD1a⁺/HLA-DR⁺/CD14⁻/CD80⁻/CD83⁻/CD86⁻-Zellen wurden als iMo-DC definiert und für nachfolgende Versuche eingesetzt.

2.11. Reifung und Aktivierung von Mo-DC

Alle Stimulationsansätze wurden in 48 Well-Platten mit $1,5 - 2x10^5$ Mo-DC/Well und 880 ml/Well Konditionsmedium durchgeführt.

2.11.1. Inkubation von den iMo-DC mit *H.pylori*

Der erste Ziel der Arbeit war es, der Effekt von intakten *H. pylori* auf die dendritischen Zellen zu beobachten. Die *H. pylori* wurden nach einer Inkubationszeit von 3 - 4 Tagen auf WC-dent Agarplatten in einem begasbaren Brutschrank geerntet (s. 2.4.2.) und in 1xPBS suspendiert. Mit dem Spektralphotometer wurde die Bakteriensuspension auf eine OD₆₀₀ von 1 (entspricht $2x10^8$ *H.pylori/ml*) (Hafsi N 2004) eingestellt, zu den iMo-DCs im Verhältnis [Mo-DC/*H. pylori*] von 1:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:6, 1:8 und 1:10 hinzugegeben und für 48 h im Brutschrank inkubiert.

Die DCs wurden nach 48h Inkubation mit jeweils 2 Antikörpern markiert und wie unter 2.9.2. beschrieben weiter behandelt und durch FACS-Analyse untersucht.

Folgende Fluoreszenz-markierte Antikörper wurden zur phänotypischen Analyse der Zellen verwendet: Anti-HLA-DR-FITC, Anti-CD1a-PE, Anti-CD86-PE, Anti-CD83-FITC, Anti-CD80–FITC.

Nach der FACS-Analyse (s. 2.9.2.) der Reifung der dendritischen Zellen wurde ein Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (s. 2.9.3.) für die Zellüberstandanalyse durchgeführt. Mit dem ELISA (s. 2.9.3.) wurde die Konzentration IL-12 und IL-10 gemessen.

Nach der Bestimmung der *H. pylori* Konzentration, die den signifikanten Effekt auf die iMo-DC verursacht, wurde die Inkubationszeit bei konstant dieser Konzentration variiert (24 h, 48 h, 72 h und 96 h).

Um die Spezifität des stimulierenden Effekts von *H. pylori* auf die iMo-DCs zu zeigen, wurde *E.coli* als Positivkontrolle verwendet.

Dazu wurden nach einer Inkubationszeit von 12 bis 18 h auf LB-Agarplatten bei 37 °C wurden *E.coli* in 1xPBS resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde mit dem Spektralphotometer bei 600 nm gemessen und eine OD₆₀₀ von 0,2 (entspricht $10^8 E.coli/ml$) (Wilson 1996) eingestellt und den iMo-DCs zugegeben.

2.11.2. Untersuchung der *H. pylori*-Aufnahme durch iMo-DCs

Zur Untersuchung, ob *H. pylori* oder Bestandteil durch iMo-DCs internalisiert werden, wurde mehrere Inhibitoren, die unterschiedliche Effekte auf die Zellbiologie des DCs haben, eingesetzt.

Dafür wurden die iMo-DCs mit 3 μ M MG132, 1 μ g/ml CCA, 1 μ g/ml CCD, 4 ng/ml PSI, 1ng/ml BFA oder ohne als Negativkontrolle im Brutschrank vorinkubiert. Nach 1,5 h wurden die Zellen gewaschen und mit *H. pylori* (MOI 5) in 1 ml Konditionsmedium für 48 h weiter inkubiert.

Als Indikator für die Effekte der Inhibitoren auf die dendritischen Zellen wurde die IL-12- und die IL-8-Sekretion in die Zellüberstände mittels ELISA (2.9.3.) bestimmt.

2.11.3. Inkubation von iMo-DCs mit *H. pylori*-Fraktionen (DNA, Mem, iMem, aMem und Zyt)

Zuletzt wurde der Effekt von einzelnen *H. pylori*-Bestandteilen auf iMo-DCs untersucht. Dafür wurden die iMo-DCs mit jeweils 1 µg/ml DNA, Mem, aMem, iMem und Zyt inkubiert. Nach 48 h wurden die IL12-Konrentationen mittels ELISA (s. 2.9.3.) gemessen.

Anti-CD96-PE: Monoklonal, PE-konjugiert (Fa. Becton Dickinson, San Jose CA, USA).

Das zweite Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die immunstimulatorische Kapazität der *in vitro* generierten Mo-DC zu testen. Dafür wurden autologene NK-Zellen als Responderzellen isoliert (s. 2.9.4.2.) und mit *H. pylori*-Infizierten reifen Mo-DCs stimulierende Zellen in kokultur gebracht.

In einem Ansatz wurden 5 NK-Zellen pro mMo-DCs eingesetzt. Als Kontrolle wurden die NK-Zellen mit nicht infizierten Mo-DCs kokultiviert.

Nach 24 h Inkubation wurden die NK-Zellen phänotypisch mittels Druchflußzytometer auf CD69-Expression analysiert und die Sekretion von IFN- γ , TNF- α und IL-2 mit ELISA (s. 2.9.3) bestimmt.

2.11.5. Kokultur von stimulierten Mo-DCs und autologenen naiven T-Zellen

Die zweite autologene Lymphozytenreaktion wurde mit autologenen naiven CD4⁺ T-Zellen durchgeführt. Dabei wurden die naiven T-Zellen nach der magnetische Isolierung im Verhältnis von 1:10 (10 naiven T-Zellen pro DC) zu den *H. pylori*-, bzw. *H. pylori*- Fraktionen infizierten Mo-DCs oder nicht infizierten Mo-DCs (Kontrolle) gegeben und für 24h, 48h, 72h und 96h im Brutschrank kokultiviert.

Die aktivierten bzw. differenzierten T-Lymphozyten wurden phänotypisch durch die CD69-Expression im Druchflußzytometer analysiert (s. 2.9.2) und die genotypische Untersuchung wurde über die Messung von IFN- γ und TNF- α und dem Lymphokin IL-2 mit ELISA bestimmt (s. 2.9.3.) wurde eine quantitativen Messung von den Transkriptionsfaktoren t-bet (Th1) und GATA-3 (Th2) wie unter 2.12. beschrieben durchgeführt.

2.12. Molekularbiologische Methoden

2.12.1. RNA-Isolierung aus DCs und T-Zellen

Zur RNA-Isolierung wurde das Rneasy Mini-Kit von der Firma Qiagen (Düsseldorf) eingesetzt. Dafür wurden die Zellen einzeln oder als KoKultur aus den Mikrotitterplatten geerntet und bei 300 g zentrifugiert. Die Überstände wurden direkt für ELISA Messungen weiterverwendet oder bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden mit Lyse-Puffer aus dem Kit lysiert. Desweiteren wurde unter Anwendung der Methode für Zellen in Suspension nach den Anweisungen des Herstellers verfahren,. Die erhaltene RNA Konzentration wurde photometrisch bei OD₂₆₀ bestimmt.

RNA Bestimmung

Die Konzentration von isolierter RNA kann photometisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen werden. Eine OD_{260} von 1 entspricht bei einer Schichtdichte der Küvette von 1cm 40 μ g/ml RNA.

Die Reinheit der RNA wird anhand der Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Nukleinsäuren werden als rein bezeichnet, wenn der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} zwischen 1,8 und 2,0 liegt.

2.12.2. Reverse Transkription

Die Reverse Transkription dient dem Umschreiben von RNA in eine einzelsträngige DNA-Sequenz. Sie wird nach ihrem Produkt, der cDNA ("complementar" DNA) auch als cDNA-Synthese bezeichnet. Als Templates kamen aus Zellen isolierte RNAs zum Einsatz. Die reverse Transkription wurde mit dem TaqMan Reverse Transcription Reagents von der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) durchgeführt.

Für einen Standardansatz von 50µl wurden 5µl RNA auf ein Volumen von 20 µl mit *aqua*. *bidest* aufgefüllt. Anschließend wurden 11 µl MgCl₂ (5 mM), 10 µl dNTP-Mix [jeweils 2,5 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)], 5 µl 10x RT-Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3), 2,5 µl Random Primer (Hexamer) (50 µM [d(N)6]), 1 µl RNAse Inhibitor (20 U/µl) und 0,5 µl Reverse Transkriptase (50 U/µl MultiScribe, Applied Biosystem) zugesetzt.

Die cDNA- Synthese wurde bei 25°C für 10 min (Primer-Annealing), dann bei 48°C für 30 min (Gegenstrang-Synthese) und schließlich bei 95°C für 5 min (Denaturierung) durchgeführt.

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

2.12.3. Real-time quantitative PCR

Prinzip

Real-time PCR ist eine hochsensitive Methode zur quantitativen DNA- und cDNA-Analyse, die sich die $5' \rightarrow 3'$ Exonukleaseaktivität der AmpliTaq-DNA Polymerase zu Nutze macht. Zur Quantifizierung wird eine Nukleotidsequenz (Sonde) spezifisch für die zu amplifizierende DNA-Matritze gewählt. Bei der Sonde sitzen Reporter (Floureszeinderivat: 5'-FAM) und Quencher (Rhodaminderivat: 3'-TAMRA) auf demselben Oligonukleotid, vorzugweise am 5'und 3'-Ende. Die Sonden wurden so gewählt, dass sie spezifisch an einen DNA-Strang, der Ziel-DNA binden. Solange die Sonde intakt ist, ist die Floureszenz des Reporters gering.

Aufgrund der räumlichen Nähe der zwei Farbstoffe unterdrückt nämlich der Quencher die Reporterfloureszenz. Dieser Vorgang wird als Floureszenz-Energie-Transfer (FET) bezeichnet. In der Extensionsphase trifft die Taq-Polymerase nun auf die Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die $5' \rightarrow 3'$ Exonukleaseaktivität der AmpliTaq-DNA Polymerase aktiviert und die Sonde gespalten 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 werden, ist die Zunahme der Reporterfloureszenz zu jedem

Die Veränderung der Floureszenzen der verschiedenen Farbstoffe kann mit Hilfe des 7700 ABI PRISM Sequence Detectors (Applied Biosystems) Zyklus für Zyklus erfaßt werden. Hierbei ermittelt das Gerät für jede Probe den sogenannten Ct-Wert. Der Ct-Wert bezeichnet jene Zykluszahl, bei der zum ersten Mal die Reporterfloureszenz das Baseline-signal meßbar überschreitet, das heißt, wenn zum ersten Mal die durch die PCR-Amplifikation entstandene Floureszenz detektierbar wird. Der Ct-Wert wird zum Vergleich verschiedener Proben herangezogen und ist somit der wichtigste Parameter bei der quantitativen PCR. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde der so genannte Amperase-Verdau durchgeführt.

Zeitpunkt der PCR direkt proportional zur Konzentration der amplifizierten Zielsequenz.

Hierbei werden am Anfang eines jeden Laufes mittels des Enzyms Amperase alle UTP enthaltenden PCR Nukleotide verdaut. Da bei der PCR statt TTP immer UTP verwendet wird, erfolgt immer am Anfang der PCR der Verdau von eventuellen Kontaminationen mit alten PCR-Produkten, wohingegen die cDNA nicht verdaut wird.

Primer und Probes für die TaqMan-PCR

Bei der Auswahl der Primer wurden folgende Punkte beachtet:

- o Die Länge der Primer sollte 20-30 Basen betragen.
- Der GC-Gehalt darf nicht höher als 60% liegen und sollte für beide Primer möglichst gleich sein.
- AT- und GC- reiche Regionen (Haarnadelstrukturen) sowie Bereiche mit Polypurinen und Polypyrimidinen sollten vermieden werden.
- o Die beiden Primer dürfen keine komplementären Sequenzen besitzen.

Primer- und Probesequenzen wurden mittels der Primerdesign Software Primer-Express erstellt. Um die Amplifikation von genomischer DNA zu verhindern wurden die Primer über Exongrenzen gelegt. Die Primer und die fluorogenen Oligonukleotidsonden (Probes) wurden von der Firma Applied Biosystems (Cheshire UK) in lyophilisierter Form geliefert und in sterilem Wasser aufgenommen bzw. verdünnt (25 pM für die Primer und 10 pM für die Probe).

GAPDH

Sense Primer:	5'- ACG GAT TTG GTC GTA TTG GGC -3'
Antisense Primer:	5'- TTG ACG GTG CCA TTG AAT TTG -3'
Oligo:	5'- CCT GGT CAC CAG GGC TGC TTT TAA-3'

T-bet

Sense Primer:	5'-TCA GCA CCA GAC AGA GAT GAT CA-3'
Antisense Primer:	5'-GCC ACA GTA AAT GAC AGG AAT GG-3'
Oligo:	5'-CCA AGC AGG GAC GGC GGA TGT-3'

GATA-3:

Sense Primer:	5'-TCT ATC ACA AAA TGA ACG GAC AGA A-3
Antisense Primer:	5'-GCT CTC CTG GCT GCA GAC A-3'
Oligo:	5'-CGG CCC CTC ATT AAG CCC AAG C-3'

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

Universal MM:	15 µl
H ₂ 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

Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde die Standard-Verdünnungs-Methode angewandt. Hierbei wurden Plasmide verwendet, welche die zu untersuchende Zielsequenz enthielten. Zunächst wurde das PCR-Produkt kloniert. Nach Plasmidisolation wurde die DNA-Menge photometrisch bestimmt. Bei Kenntnis der Plasmidgröße konnten dann Plasmidkopienzahlen errechnet werden und Plasmidverdünnungsreihen mit bekannten Plasmidkopienzahlen hergestellt werden.

Bei jeder PCR von unbekannten Proben wurden die Plasmidverdünnungsreihen mituntersucht. Das Gerät ermittelt die Ct-Werte der Plasmidverdünnungen und konstruiert eine Standardkurve, indem es jeder Plasmidverdünnung mit ihrer Ausgangskopienzahl den entsprechenden Ct-Wert zuordnet. Aus der Kurve entsteht eine Gerad, wenn man die Kopienzahl in logarythmischem Maßstab darstellt. Durch Projektion der Ct-Werte von unbekannten Proben auf die Standardkurve wurde anschließend deren Kopienzahl ermittelt. Da die zu untersuchenden Proben unterschiedlich viel cDNA enthielten (z.B. durch unterschiedliche Biospiegröße), war eine Normalisierung für die quantitative Auswertung unerlässlich. Hierzu mussten die ermittelten Kopienzahlen auf ein Housekeeping-Gen bezogen werden, dessen Expression konstant ist, und folglich ein Maß für die Gesamt-cDNA-Menge in allen Proben ist. Hierfür wurde GAPDH (Gycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) gewählt. Die cDNA Kopien für die einzelnen Zytokine wurden dann pro 10000 Kopien GAPDH angegeben.

2.13. Statistische Auswertung

Bei den Balkendiagrammen wurden jeweils die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen ermittelt. Die vertikalen Balken bei den phänotypischen DC-Untersuchungen stellen ebenfalls den Mittelwert dar. Die Daten wurden zuvor auf Normalverteilung getestet (One Way ANOVA-Test).

Unterschiede zwischen zwei zu vergleichenden Gruppen wurden bei einem p< 0,05 als signifikant bezeichnet, ein p< 0,001 weist auf einen hoch signifikanten Unterschied hin. Bei einem p>0,05 sind die Unterschiede nicht signifikant.

3. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die humane Immunantwort auf *Helicobacter pylori in vitro* zu untersuchen. In erster Linie sollte der Effekt von intakten *H. pylori* und die verschiedenen Bestandteilen des Keims auf die Immunzellen untersucht werden. Außerdem sollten die Effekte von mit *H. pylori* infizierten dendritischen Zellen auf autologene NK-Zellen und naive CD4⁺ T-Zellen in KoKulturen Systemen untersucht werden.

3.1. Analyse von Bakterienfraktionen

3.1.1. Eindimensionale SDS-PAGE

Eine eindimensionale SDS-PAGE-Analyse wurde eingesetzt, um die *H. pylori* Fraktionen zu identifizieren und zu analysieren.

Eine Flüssigkultur des H. pylori-Stamms G27 Wt (s. Tab. 1.1.) wurde in BHI-Dent unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert (s. 2.4.2.). Nach 3-4 Tagen zeigte die lichtmikroskopische Kontrolle (s. 2.4.3.) Vitalität und Mobilität des Keims und keine Kokkenbildung oder Kontamination der Kultur. Nach der photometrischen OD Bestimmung $(OD_{600} \sim 1,5)$ wurde die Bakterienfraktionierung durchgeführt (s.2.5.2.). Der Proteingehalt der erhaltenen Membran- (Mem), Zytosol- (Zyt), innere Membran- (iMem) und äußere Membran-(aMem) Fraktionen wurden mittels Bradford-Assay (s. 2.6.) bestimmt. Die Fraktionen wurden dann in einem 10 %. Trizin-Gel unter reduzierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.7.2.). Die Coomassie-Blau Färbung (s. 2.7.4.) konnte keine signifikanten Unterschiede im Proteinmuster zwischen dem Lys, Zyt und der Mem zeigen (Abb.3.1 a). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Silberfärbung (s. 2.7.5.) durchgeführt. Nach der Silberfärbung ließ sich in der Auftrennung das Zellysat, das Zytosol und die Membran als distinkte Banden unterscheiden (Abb. 3.1.b) Spur 1-3. Signifikante Unterschiede im Proteinbandenmuster lassen sich feststellen. Lediglich bei der Auftrennung der Membranproteine konnte die Abnahme von mehreren Proteinbanden sichtbar gemacht werden.



Abbildung 3.1: Eindimensionale SDS-PAGE von *H. pylori*-Fraktionen. Es wurde jeweils 5µg jeder Fraktion in einem 10 % SDS-Gel (reduziert) aufgetrennt. Anschließend wurde eine Coomassie-Blau Färbung (a) und eine Silberfärbung (b) durchgeführt. (a) Die Coomassie-Blau Färbung zeigt keinen signifikanten Unterschied im Proteinmuster zwischen dem Lsy, dem Zyt und der Mem. Die Silberfärbung (b) zeigt einen signifikanten Unterschied im Proteinmuster. Abnahme von mehreren Proteinbanden bei dem Membranpräparat. M= Molekulargewichtsstandard in kDa.

3.1.2. Western-Blot-Analyse

Für die folgenden Versuche war es von Bedeutung, die Membranisolierung und die Trennung der inneren von der äußeren Membran zu zeigen. Ergänzend dazu konnte die Expression des Proteins UreA bzw. die Expression des "Outer" Membranproteins (OMP) HpaA im verwendeten *H. pylori*-Stamm G27 Wt durch immunologischen Nachweis gezeigt werden (O'Toole PW1995, Jones AC 1997, Lundstrom AM 2001).

- Urease ist ein zytosolisches multimeres Enzym von 550 kDa Größe und besteht aus zwei strukturellen Untereinheiten, UreA (26,5 kDa) und UreB (60,3 kDa). Außerdem löst Urease eine starke Immunantwort mit hohen Serumspiegeln von IgG und IgA aus und zählt damit zu den effektivsten Immunogenen von *H. pylori* (Newell K 1989; Perez-Perez GI 1989).
- HpaA ist ein Protein der äußeren Membran (OMP) (32 kDa) und zeigt eine spezifische Reaktion mit menschlichen Antikörpern (Voland P 2002).

- 56 -

Der immunologische Nachweis der Membranisolierung und der Trennung der inneren von der äußeren Membran mit spezifischen Antikörpern gegen das Enzym UreA und das OMP HpaA Protein (s. Tab.2.2) wurde durch Western-Blot-Analyse untersucht und (s. 2.8.) ist in Abbildung 3. 2 gezeigt.

Es wurden jeweils 5µg Lys, Zyt, Mem, innere Membran (iMem) und äußere Membran (aMem) in einem 10 % Trizin-SDS-Minigel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.7.2.), auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (s. 2.8.2.) und mit dem polyklonalen Antikörper gegen UreA (a) und mit dem monoklonalen Antikörper gegen HpaA (b) inkubiert. Der Nachweis wurde mittels Chemilumineszens (CL-System) durchgeführt (s. 2.8.3).

Das Zytosol zeigt einen hohen Gehalt an UreA, ebenso das Lysat, im Gegensatz zur Membran, die einen geringen UreA-Anteil zeigt (Abb. 3.2.a). Der Nachweis des zytosolischen Enzyms Urease in der Membranfraktion könnte durch eine leichte Kontamination während der Membranisolierung verursacht worden. Es ist aber aus der Literatur bekannt, dass durch Lyse von Bakterien freigesetzte Urease unspezifisch an der Oberfläche von *H. pylori* haftet und so zusammen mit der Membran isoliert wird (Suhas HP 1996, Dunn BE 1997, Dunn BE 1998, Bode G 1993, Hawtin PR 1990).

Im Gegensatz ist im Zytosol kein HpaA nachzuweisen und das Lysat nur einen geringen im Vergleich zur Membran. Die aMem zeigt einen großen Anteil von HpaA im Vergleich zur Mem, der iMem sowie dem Zytosol kein HpaA enthalten (Abb. 3.2.b.).

Das "Outer" Membran Protein HpaA findet sich nach der Fraktionierung wie erwartet im Lysat, der Membran und der äußere Membran und nicht in im Zytosol oder der inneren Membran (Abb.3.2.b).

Der ziemlich schwache HpaA-Gehalt in der Gesamtmembran, wie in dem Lysat, erklärt sich mit dem Prozentualgehalt des Proteins in jeder Fraktion, da die HpaA Konzentration am stärksten in der äußeren Membran (aMem) ist und im der Membran (Mem) und im Lysat abnimmt.



Abbildung 3.2: Western-Blot-Analyse von *H. pylori*-Fraktionen: 5µg der verschiedenen-Fraktionen (Lys, Zyt, Mem, iMem und aMem) wurden in einem 10 % Trizin-SDS-Minigel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit einem polyklonalen Antikörper gegen UreA (a) und mit einem monoklonalen Antikörper gegen HpaA (b) inkubiert. Der Nachweis wurde mittels Chemilumineszens (CL-System) durchgeführt. M = Molekulargewischtsstandard in kDa.

3.2. Der serologische Test

Der serologische Test wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Blutspender für die Isolierung der Immunzellen serologisch *H. pylori* negativ sind oder nicht. Dafür wurden 5µg *H. pylori*-Lysat in einem 10 % Trizin –SDS-Gel elektrophoretisch getrennt (s. 2.7.2.), auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (s. 2.8.2.), mit dem Blutplasma des Spenders als erstem Antikörper und mit einem Anti-Human Antikörper als zweitem Antikörper inkubiert und mittels Chemilumineszens (CL-System) nachgewiesen (s. 2.8.3.).

Bei *H. pylori* positiven Spendern (Abb. 3.3) enthält das Blutpalsma Antikörper gegen verschiedene *H. pylori* Proteine. Das zeigt, dass die *H. pylori* Infektion eine starke humorale Immunantwort mit hohen Antikörper-Titer im Blut auslöst. Dagegen zeigen die *H. pylori* negative Spender keine Reaktion mit den Proteinen des Bakterienlysats.


Abbildung 3.3: Serologische Test für die Blutspender: 5µg *H. pylori*-Lys wurden in einem 10 % Trizin-SDS-Minigel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit dem Blutspenderplasma inkubiert. Der Nachweis wurde mittels Chemilumineszens (CL-System) durchgeführt. Das Blutpalsma von *H. pylori* positiven Spendern zeigt einen hohen *H. pylori*-Antikörpergehalt (Spender Nr. 1, 2, 5, 6 und 7). Bei den *H. pylori* negativen Spendern (Nr 3 und 4) konnte keine Immunreaktion detektiert werden.

3.3. Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen (mnZ) vom *H. pylori* negativen Spendern durch Dichtegradientzentrifugation

Im Blut befinden sich unterschiedliche Zelltypen wie Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten, sowie Erythrozyten und Thrombozyten. Diese lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte voneinander trennen. Zur Isolierung der mnZ wurde das mit PBS verdünnte, heparinisierte Blut über Ficoll-Hypaque geschichtet und anschließend zentrifugiert (s. 2.9.1).

Granulozyten und Erythrozyten sedimentieren dabei durch die Ficollschicht, während sich die mnZ an der Interphase zwischen Plasma und Ficoll ansammeln und abgenommen werden können. Die gewonnenen mnZ wurden gewaschen, ausgezählt und für die magnetische Sortierung der Immunzellen weiter verwendet.

3.4. Magnetische Sortierung

3.4.1. Sortierung von Monozyten

Bei der Isolierung von Monozyten aus den mnZ mit dem "Monocyte Isolation Kit II" handelt es sich um eine negative Selektion, da die Nicht-Monozyten eliminiert wurden (s. 2.9.4.1.). Die Reinheitsbestimmung und die Identifizierung der erhaltenen Zellen wurden mittels FACS-Analyse (s. 2.9.2.) durchgeführt. Die gewonnenen Zellen wurden gewaschen und mit den Fluoreszenz-markierten Antikörpern Anti-CD45-FITC, Anti-CD14-PE, Anti-CD3-FITC und Anti-CD19-PE gefärbt (s. 2.9.2.).

- Das CD3-Molekül ist assoziiert mit dem Antigenrezeptor der T-Zellen (TCR) und notwendig für die Zelloberflächenexpression und Signalübertragung über den TCR. Das Molekül ist ein Hauptmarker der T-Lymphozyten.(Ledbetter JA, 1981; Clevers H, 1988).
- Das CD19-Molekül ist der Hauptmarker für den B-Lymphozyten bei Menschen und Mäusen.
- Das CD45-Molekül ist ein transmembranäres Glykoprotein, das in verschiedenen Isoformen vorliegt. Dem Antigen kommt eine entscheidende Bedeutung für die Aktivierung von T-Zellen zu. Das CD45-Antigen findet sich üblicherweise auf T-Lymphozyten (CD45RA oder CD45RO) und auf Monozyten.
- Das CD14-Molekül ist ein Phospholipid-verankertes Protein, Rezeptor für den Komplex aus Lipopolysaccharid und lipopolysaccharidbindendem Protein und ist vorwiegend auf Monozyten und Polymorphkernigen zu finden (Simmons DL 1989).

Die Abbildung 3.4 zeigt die Durchflußzytometrie der isolierten Monozyten, nach Markierung mit anti-CD45-FITC und anti-CD14-PE. Die morphologischen Parameter SSC und FSC (a) zeigten, dass es sich um zwei Zellpopulationen handelt. Die Dot-Plot Darstellung (b) zeigte, dass sich im LR-Feld (unterer rechter Quadrant) 3,31 %, im (oberen linken Quadrant) UL-Feld 0,39 %, im LL-Feld (unterer linker Quadrant) 1,26 % und im UR-Feld (oberer rechter Quadrant) 95,04 % der gesamten Zellen befinden. Folglich waren insgesamt 95,04 % der Zellen CD14⁺/CD45⁺ und wurden als Monozyten definiert.

Zellen, ermittelt über die zuvor eingesetzten Marker.

Die Dot-Plot Darstellung (b) zeigt ebenfalls, dass die isolierten Monozyten aus zwei Subpopulationen bestehen. Eine Subpopulation mit starker CD14 Expression (CD14^{high}) und eine mit geringer CD14 Expression (CD14^{low}).

Die FACS-Analyse mit Anti-CD3 und Anti-CD19 zeigte, dass die isolierten Zellen noch 0,66 % CD3⁺- und 0,46 % CD19⁺-Zellen enthalten (Daten nicht gezeigt), d.h. es ist ein vernachlässigbar geringer Anteil von T-Zellen und B-Zellen vorhanden.

Beide Zellpopulationen wurden für die Generierung der dendritischen Zellen eingesetzt, da bis jetzt keine Funktionsunterschiede zwischen den Zellpopulationen beschrieben wurden, die die Zelldifferenzierung bzw. die DC-Generierung beeinflussen könnten.



Abbildung 3.4: Durchflußzytometrische Messung der magnetisch sortierten Monozyten. (a) Mit den morphologischen Parametern SSC und FSC wurde die Vitalität und Reinheit der Zell- Population gezeigt. (b) Die Dot-Plot Darstellung zeigte, dass 95,04 % der isolierten Zellen Monozyten ($CD14^+/CD45^+$) sind. Die Positionierung des Quadranten beim Dot-Plot erfolgt anhand der Isotypkontrolle der jeweiligen Antikörper IgG und IgG_{2a}.

3.4.2. Sortierung von NK-Zellen

Die NK-Zellen wurden aus den mnZ magnetisch durch eine negative Selektion (Depletion) mittels MACS und "NK-cell-Isolation Kit II" sortiert (s. 2.9.4.2.). Für die Reinheitsbestimmung und die Identifizierung der erhaltenen Zellen wurde die Expression von CD56-Antigen und CD16-Antigen auf den Zelloberflächen durch FACS-Analyse (s. 2.9.2.) untersucht. Dafür wurden die isolierten Zellen mit den Fluoreszenz-markierten Antikörpern Anti-CD56-FITC, Anti-CD4-PE und Anti-CD16-PE gefärbt.

- Das CD56-Molekül ist ein Hauptmarker der NK-Zellen (Van CampB, 1990) und damit lassen sich die NK-Zellen in zwei Subpopulationen teilen (CD56^{dim} und CD56^{bright}). Ca. 90 % der humanen NK-Zellen exprimieren wenig CD56-Antigen und werden als CD56^{dim} bezeichnet, die restlichen 10 % sind CD56^{bright}, d.h. die Expression von CD56 ist sehr hoch (Lanier LL 1986, Lanier LL 1989, Megan A Cooper 2001).
- Das CD16-Antigen (Leu-11) ist der IgG Fc Rezeptor III und wird auf der CD56^{dim} NK-Zellsubpopulation exprimiert, d.h. die CD56^{bright} NK-Zellen sind CD16^{dim} bzw. CD16⁻ (Lanier LL 1985, Lanier LL 1986). Die CD16-Dichte spielt eine Rolle bei der Aktivität der NK-Zellen (Megan A. Cooper 2001, 2004).

Die Abbildung 3.5 zeigt eine durchflußzytometrische Analyse der erhaltenen NK-Zellen. Die Dot-Plot Darstellung (a) zeigte, dass sich im LR-Feld 87,9 % (CD56⁺), im UL-Feld 1,4 % (CD4⁺), im LL-Feld 7,6 % (CD4⁻/CD56⁻) und im UR-Feld 3,1 % (DC4⁺/DC56⁺) der gesamten Zellen befinden.

Die Positionierung des Quadranten beim Dot-Plot erfolgt anhand der Isotypkontrolle der jeweiligen Antikörper und die Prozentzahl bezieht sich auf die Anzahl an positiven Zellen, ermittelt über die zuvor eingesetzten Marker.

Das Histogramm (b) zeigt einen Overlay von CD56 markierten Zellen und Isotypkontrolle. Das helle Histogramm in der Darstellung zeigt die Zellen nach Färbung mit den Antikörpern der Isotypkontrolle, wohingegen die dunklen Histogramme die Fluoreszenz der CD56-FITC markierten Zellen darstellen. Die CD56-Färbung zeigt, dass es zwei CD56 positiven Populationen innerhalb der isolierten Zellen gibt. Um diese näher zu untersuchen, wurden die NK-Zellen mit anti-CD56-FITC und anti-CD16-PE gefärbt uns nochmals analysiert. Die Dot-Plot-Darstellung in der Abbildung 3.6 zeigt, dass die erhaltenen CD56⁺ NK-Zellen aus zwei Zellpopulationen besteht: ca. 88 % CD56^{dim} CD16^{high/low} und 11 % CD56^{bright} CD16^{low}.

Beide Subpopulationen der NK-Zellen wurden für die autologenische Kokultur mit den *H. pylori*-infizierten dendritischen Zellen eingesetzt.



Abbildung 3.5: Durchflußzytometerie der magnetisch sortierten NK-Zellen. (a) Die Dot-Plot Darstellung zeigte, dass die isolierten Zellen aus ca. 88 % $CD56^+$ Zellen bestehen. (b) Overlay-Histogramm der CD56-positiven Zellen. Die Positionierung des Quadranten bei dem Dot-Plot erfolgt anhand der Isotypkontrolle der jeweiligen Antikörper (Dot-Plot: *Hafsi N* et. al: Journal of Immunology 7/2004).



Abbildung 3.6: FACS-Analyse der magnetisch sortierten NK-Zellen. Die Dot-Plot Darstellung zeigte, dass die isolierten Zellen aus 88 % CD56^{dim}/CD16^{high/low} und aus 11 % CD56^{bright}/CD16^{low} NK-Zellen bestehen. Die Positionierung des Quadranten bei dem Dot-Plot erfolgt anhand der Isotypkontrolle der jeweiligen Antikörper.

3.4.3. Sortierung von naiven T-Zellen

Die naiven T-Zellen wurden aus den mnZ wurden durch die Kombination des "Pan T Cell Isolation Kit II" und der "CD45RA Micro-Beads" in zwei Schritten gewonnen.

Mit den "Pan T Cell Isolation Kit II" wurden die gesamten CD3⁺ T-Lymphocyten durch Depletion isoliert (s. 2.9.4.3.), gewaschen, mit Anti-CD3 und Anti-CD19 gefärbt und mit FACS-Analyse untersucht.

Die FACS-Messungen ergaben eine Zellpopulation, die nur aus CD3 positiven Zellen besteht (Daten nicht gezeigt).

Durch die "CD45RA Micro-Beads" wurden die CD45RA⁺ Zellen aus den CD3⁺ positiven aus sortiert (s. 2.9.4.3). Mit extrazellulärer Immunfluorreszenz wurden die an der Zelloberfläche gelegenen Antigene CD45RA und CD4 über eine Antigen-Antikörper-Bindung spezifisch markiert und mittels der Durchflusszytometrie sichtbar gemacht (s. 2.9.2.) (Abb. 3.7).

- Das CD4-Molekül ist wichtig für die Erkennung von Antigenpeptiden, die an MHC-Klasse II-Moleküle gebunden sind, durch den T-Zell-Rezeptor. CD4 wirkt als Corezeptor, indem es an die seitliche Oberfläche von MHC-Klasse II-Molekülen bindet. Das CD4 ist vor allem auf Subpopulationen der T-Helferzellen (Th₀, Th₁, Th₂ und Treg) exprimiert (Ledbetter JA, 1981).
- Das CD45RA-Molekül ist eine Isoform von CD45 mit A-Exon. Es wird auf naiven T-Zellen exprimiert und wird bei den aktivierten T-Zellen (Th₁, Th₂ und Treg) herunterreguliert (Morimoto C 1985).

Die Abbildung 3.7 zeigt eine FACS-Analyse von isolierten naiven T-Zellen. Die Dot-Plot Darstellung zeigte, dass sich im LR-Feld 0,9 % (CD45RA⁺), im UL-Feld 8,69 % (CD4⁺), im LL-Feld 7,27 % (CD4⁻/CD45RA⁻) und im UR-Feld 86,52 % (DC45RA⁺/DC4⁺) der gesamten Zellen befinden. Folglich waren insgesamt ca. 87 % der Zellen CD4⁺/CD45RA⁺, die als naiven T-Zellen definiert und für die autologenische Kokultur mit dendritischen Zellen weiter verwendet wurden.



Abbildung 3.7: Durchflußzytometerie von magnetisch sortierten naiven T-Zellen. (a) Die Dot-Plot Darstellung zeigte die zwei naive T-Zellpopulationen ($CD4^{low} / CD4^{high}$). (b) Overlay-Histogramm der CD45RA-positiven Zellen. Die Positionierung des Quadranten bei dem Dot-Plot erfolgt anhand der Isotypkontrolle der jeweiligen Antikörper (*Hafsi N* et. al: Journal of Immunology 7/2004).

In einer Ein-Parameter-Darstellung als Histogramm (b) sind nochmals die CD45RA-positiven Zellen in einem Overlay mit der der Isotypkontrolle dargestellt. Die hellen Histogramme in der Darstellung zeigen die Zellen nach Färbung mit den Antikörpern der Isotypkontrolle, wohingegen die dunklen Histogramme zeigen die Fluoreszenz der CD45RA-FITC markierten Zellen.

In den Dot-Plot- (a) und die Histogramm- (b) Darstellungen wird deutliche unterschiedlichen, dass die naiven T-Zellen aus zwei Subpopulation bestehen, die anhand der CD4 Expression auf der Zelloberfläche zwei Zelltypen, CD45RA⁺/CD4^{high} und CD45RA⁺/CD4^{low}, unterschieden werden können.

3.5. Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten *in vitro*

Da die Anzahl der zirkulierenden DCs viel zu gering für den Einsatz in den *in-vitro*-Experimenten ist (< 0,01 % der mononukleären Zellen, Steinman 1991), liegen mittlerweile eine Reihe von Protokollen vor, nach denen DCs gewonnen werden können. Als Ausgangmaterial wurden dabei Monozyten eingesetzt.

Zur Differenzierung von dendritischen Zellen *in vitro* wurden frisch isolierte Monozyten (s. 2.9.31.) aus gesunden Spendern verwendet, da Monozyten sich nach 6 Tagen in einem GM-CSF und IL-4-haltigen Medium zu unreifen dendritischen Zellen differenzieren lassen (iMo-DCs) (s. 2.10) (Corinti S 2001; Landmann A 2001; Peretti J 2001, Liu YJ 2001; Peters JH 1993; Sallusto F 1994; Pickl WF 1996; Pietschmann P 2000).

- IL-4 wird auch als BCGF-1 oder BSF-1 bezeichnet (129 AA, Monomer). CD124 und CD132 sind die zwei Rezeptoren f
 ür IL-4. IL-4 wird von T-Lymphozyten (Th2) und Mastzellen sezerniert und bewirkt eine B-Zell-Aktivierung. Gleichzeitig verringert es die IgE-Synthese und hemmt somit die Th₁-Differenzierung. Es hemmt außerdem die Entwicklung der Monozyten zu Makrophagen (Jansen JH 1989).
- GM-CSF: "Der Granulozyte macrophage colony stimulating factor" GM-CSF ist ein 127 AA Monomer, wird von Makrophagen und T-Zellen produziert und stimuliert das Wachstum und die Differenzierung der myelomonozytischen Linie (Reid CD 1992).

Die *in vitro* generierten dendritischen Zellen konnten durch die Expression der Oberflächenmarker CD1a, MHC-Klasse II, CD80, CD83 und CD86 charakterisiert werden (Abb. 3.5).

 CD1a ist eine Isoform aus der multigenen Familie der CD1-Gene mit insgesamt fünf Isoformen beim Menschen. Es hat strukturelle Ähnlichkeiten mit dem MHC Klasse I-Molekül und spielt eine Rolle bei der Antigenpräsentation (Melian A 1996, Blumberg RS 1995). CD1a wird während des Reifungsprozesses der DCs herunterreguliert.

- Das CD83-Molekül ist ein 45 kDa Transmembranprotein der Ig Superfamilie und besteht aus einer intrazellulären Domäne und einer zytoplasmatischt mit C-Terminahlen Ende. Es ist der Hauptmarker der myeloiden dendritischen Zellen, die sich in Lymphknoten befinden. Die Aufgabe des Moleküls ist immer noch unbekannt, doch es wird vermutet, dass es eine Rolle bei der Zell-Zell Interaktion während der Antigenpräsentation spielt (Zhou, LJ, 1995, Hart DNJ 1997; Jeannin P, 2000).
- Das MHC-Klasse II-Molekül ist ein hochpolymorphes Glycoprotein, das von MHC-Klasse I und MHC-Klasse II-Genen codiert wird und bei der Präsentation von Antigenpeptiden für die T-Zellen von Bedeutung ist, MHC-Klasse II ist auf der Zelloberfläche der reifen dendritischen Zellen stark expremiert (O'Doherty U, 1994; Thomas R 1994; Grouard G, 1996). Das Anti-MLA-DR interagiert mit dem humanen Klasse II Antigen MHC.
- Die B7-Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) sind die wichtigsten kostimulatorischen Moleküle zur Aktivierung der T-Zellen. Sie binden beide an das CD28-Molekül auf T-Zellen und sind auf reifen dendritischen Zellen hoch exprimiert (Schweitzer AN 1997, Schweitzer AN 1998).

Am siebten Tag wurden die differenzierten Zellen geerntet und mit den Fluoreszenzantikörper Anti-CD1a-PE, Anti-HLA-DR-FITC, Anti-CD14-PE, Anti-CD80-FITC, Anti-CD86-PE, Anti-CD4-FITC, Anti-CD4-PE und Anti-CD83-FITC markiert und mittels Durchflußzytometer analysiert (s. 2.9.2.). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.8 dargestellt.

Die Untersuchung der Zellen im Durchflußzytometer bestätigte die lichtmikroskopische (Bilder nicht gezeigt) Beobachtung, dass die Zellen sich zu unreifen DCs differenziert hatten, wobei die Hochregulation von CD1a und die Herrunterregulation von CD14 sich deutlich in den Dot-Plot Darstellungen zeigen lässt (Abb. 3.8 a und b).

Die Vitalität und die Morphologie der differenzierten DCs konnten mit der Kombination aus IL4 und GM-CSF auch über einen Zeitraum von 6 Tagen hinaus aufrechterhalten werden, wenn die Zellen regelmäßig alle zwei Tage frisches Medium mit IL-4 und GM-CSF erhielten. Die FACS-Analyse zeigte, dass die generierten Zellen unreife dendritische Zellen sind und als Monozyten-abgeleitete dendritischen Zellen (Mo-DC) bezeichnet und für die gesamten folgenden Versuche weiter verwendet werden konnten.



Abbildung 3.8: Immunphänotyp von frisch geernteten unreifen Mo-DCs (iMo-DCs). Der Effekt der IL-4 und GM-CSF Kombination auf den Phänotyp der sich differenzierenden DCs, wurde nach 6 Tagen durch FACS-Analysen bestimmt. Die Dot-Plot Darstellungen zeigten, dass die *in vitro* differenzierten DCs CD1a⁺/HLA-DR⁺ (a), CD14⁻/CD80⁻ (b), CD86⁻/CD4⁻ (c) und CD4⁻ / CD83⁻ (d) waren. Die Positionierung des Quadranten beim Dot-Plot erfolgte anhand der Isotypkontrolle (*Hafsi N* et. al: Journal of Immunology 7/2004).

3.6. Reifung und Aktivierung von dendritischen Zellen

DCs gelangen über das Blut in das Gewebe, wo sie als unreife Zellen vorkommen, die sehr gut Antigene aufnehmen und prozessieren können. Der Übergang von der Antigenaufnahme zur Antigenpräsentation wird als Reifungsprozess bezeichnet (Banchereau J 1998, Lanzavecchia A 2000, Matzinger, 1994). Während des Reifungsprozesses sezernieren die DCs mehrere Zytokine (z.B. IL-10 und IL-12) und etablieren die immunologische Synapse, die aus antigenpräsentierenden Molekülen (MHC-Klasse II und I) und kostimulatorischen Molekülen (CD83, CD80 und CD86) besteht (Corinti S 2001, De Smedt TM 1997, Dixon G 2001).

Zur Klärung der Fragstellung, ob *H. pylori* einen Reifungsprozess in den iMo-DC auslöst, wurden *in vitro* generierte Mo-DCs mit *H. pylori* (MOI 5) oder mit *E.coli* (MOI 5) als Positivkontrolle bzw. ohne Bakterien (Basal) als Negativkontrolle, für 48h inkubiert (s. 2.11.1.).

Die Zellen wurden anschließend mit den Fluoreszenzantikörpern Anti-CD1a, Anti-HLA-DR, Anti-CD80, Anti-CD86 und Anti-CD83 markiert und mittels Durchflußzytometer analysiert (s. 2.9.2.). Abbildung 3.9 zeigt die Ergebnisse einer FACS Analyse von mit *H. pylori* Stamm-G27 Wt inkubierten iMo-DC im Vergleich mit Kontrollzellen (Basal).

Die hellgrauen Balken zeigen die Basal-Werte der unstimulierten iMo-DCs, die die morphologischen und phänotypischen Merkmale der iMo-DCs behalten haben (s. 3.5.).

Die schwarzen Balken zeigen die phänotypischen Veränderungen der dendritischen Zellen nach 48 h Inkubation mitintakt *H. pylori*, bei denen eine starke Abnahme der Expression des CD1a-Antigens und eine Hochregulation des MHC-Klasse II sowie des CD83 kostimulatorischen Moleküls und des B7-Komplexes (CD80 und CD86) zu beobachten waren.

Die Ausreifungsmarker für dendritische Zellen wie CD83, CD80 und CD86 (B7-Komplex) und das HLA-DR-Molekül (MHC-Klasse II) werden bei der Inkubation von unreifen DCs durch *H.pylori* (MOI5) erhöht exprimiert, wobei der Grad an HLA-DR-Expression schon in Kultur ohne *H.pylori* (Basal) ziemlich hoch war.

Das CD1a-Molekül war hauptsächlich auf den unreifen DCs hoch exprimiert und wurde durch *H.pylori* herunterreguliert.



Abbildung 3.9: FACS Analyse der mit *H. pylori* Stamm-G27 Wt inkubierten dendritischen Zellen (Mo-DCs). Die hellgrauen Balken zeigen die Basal-Werte der unstimulierten DCs, die die Morphologie und den Phänotyp von unreifen DCs zeigen. Die schwarzen Balken zeigen die mit *H. pylori* (MOI5) stimulierten DCs nach 48h Inkubation, mit einer starken Herunterregulation des CD1a-Antigens und einer Hochregulation des MHC Klasse II sowie des CD83 kostimulatorischen Moleküls und des B7-Komplexes (CD80 und CD86). (*Hafsi N* et. al: Journal of Immunology 7/2004).

Neben den durch die FACS Messungen nachgewiesenen morphologischen und phänotypischen Ergebnissen wurde der Zytokinspiegel in den Kulturüberständen mittels ELISA (s. 2.9.3.) untersucht und in der Abbildung 3.10 dargestellt.

- Human Interleukin 10 (IL-10) ist ein 18 kDa monomeres Molekül. Monozyten (CD14⁺/CD16⁻), aktivierte CD4⁺ T-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen und aktivierte dendritische Zellen produzieren IL-10 (Iwasaki A 1999). Es ist ein Produkt der Th2-Zellen und unterbindet die Entwicklung von Th1-Zellen.
- Interleukin 12 (IL-12) ist ein 70 kDa heterodimeres Glykoprotein und besteht aus einer 40 kDa (p40) und einer 35 kDa (p35) Untereinheit. Aktivierte dendritische Zellen sind Hauptproduzenten von IL-12, das eine Th1-Antwort begünstigt (Dixon G 2001).

Die Abbildung 3.10 zeigt, dass *H. pylori* eine sehr starke IL-12-Sekretion induziert, wohingegen die im Vergleich IL-10-Sekretion sehr gering war. Das Ergebnis zeigt, dass *H. pylori* eine Reifung und Aktivierung der iMo-DC induziert.

Die induzierte IL-10-Sekretion durch *H. pylori* wurde bei 102 pg/ml gemessen und im Vergleich zu den Basalwerten (11,8 pg/ml) als signifikant betrachtet.

Die erhaltenen *H. pylori* stimulierten dendritischen Zellen wurden auf Grund der hohen IL-12-Sekretion als reife und aktive myeloide dendritische Zellen (DC1) ["mature monocyt derived dendritc cells (mMo-DC)"] definiert (Pulendran B 1997, Liu YJ 2001). Dieser Vorgang ist in der Abbildung 3.11 zusammengefasst.



Abbildung 3.10: Zytokinsekretionsprofil des Kulturüberstandes von *H. pylori* infizierten Mo-DCs. *In vitro* generierten Mo-DCs wurden mit *H. pylori* (MOI5) bzw. mit *E.coli* (MOI5) und ohne Bakterien als Negativkontrolle (Basal) für 48h inkubiert. Das Zytokinsekretionsprofil wurde mittels ELISA in den Kulturüberständen bestimmt. Die hellgrauen Balken zeigen die IL-10 Sekretion und die schwarzen Balken die IL-12 Sekretion. *E.coli* als Positivkontrolle wurde mit getestet. (*Hafsi N* et. al: Journal of Immunology 7/2004).



Abbildung 3.11: Schematische Darstellung der Generierung und Reifung von Mo-DCs. Monozyten wurden durch MACS isoliert und Zugabe von IL-4 und GM-CSF nach einer Inkubation von sechs Tagen zu unreifen dendritischen Zellen (Prä-DC1 myeloide Monozyten: iMo-DC) differenziert. Nach 48h Inkubation mit *H. pylori* (MOI5) wurden die Zellen zu reifen, aktivierten Mo-DCs (myeloide DC1: mMo-DC), die Zytokine sezerniert.

3.6.2. Effekt der H. pylori Konzentration auf die Aktivierung von Mo-DCs

Im anschließenden Experiment wurde eine Titrationsreihe mit *H. pylori* durchgeführt, um mögliche Effekte der *H. pylori* Zellzahl auf den Aktivierungs- bzw. Reifungsprozess der dendritischen Zellen festzustellen.

Hierzu wurde mit dem Spektralphotometer eine Bakteriensuspension von *H. pylori* auf eine OD_{600} von 1,0 (entspricht $2x10^8$ *H.pylori* pro ml) (Hafsi N 2004) eingestellt, den iMo-DC im Verhältnis von 1:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:6, 1:8 und 1:10 zugegeben und für 48 h im Brutschrank inkubiert (s. 2.11.1.). Mittels ELISA (s. 2.9.3.) wurden die IL-12 Konzentrationen in den Kulturüberständen gemessen.

Die Abbildung 3.12 zeigt den Effekt der Bakterienkonzentration auf die IL-12 Sekretion bei dendritischen Zellen nach einer Inkubationszeit von 48h. Die Diagrammbalken zeigen Konzentrationsabhängige Zunahme der IL-12-Produktion der Bakterienzahl.

Bei einer Konzentration von sechs *H. pylori* pro DC bzw. acht *H. pylori* pro DC erreicht die IL-12 Konzentration das Maximum (ca. 4700 pg/ml). Bei zehn *H. pylori* pro DC sinkt die IL-12-Konzentration wieder auf 2800 pg/ml ab.



Abbildung 3.12: Effekt der Bakterienkonzentration auf die IL-12 Sekretion bei dendritischen Zellen. Die Diagrammbalken zeigen eine Zunahme des IL-12 bei Zunahme der Bakterienkonzentration. Bei einer Konzentration von sechs *H. pylor* /DC (6) bzw. acht *H. pylori*/DC (8) erreicht die IL-12 Konzentration das Maximum und nimmt bei zehn *H. pylori*/DC (10) wieder ab.

Die lichtmikroskopische Beobachtung (Daten nicht gezeigt) konnte die Abnahme der IL-12-Sekretion bei 10 *H. pylori* pro DC damit erklären, dass bei dieser Zellkultur zahlreiche apoptotische DCs festgestellt wurden. Im Gegensatz dazu wiesen bei den anderen Konzentrationen die Zellkulturen morphologisch vitale große Zellen mit globulären Kernen und feinen zytoplamatischen Ausläufern auf.

Um möglichst physiologische Bedingungen zu erhalten, wurde bei den nächsten Versuchen eine Konzentration von fünf Bakterien pro DC gewählt.

3.6.3. Der Effekt der Inkubationszeit auf die Mo-DC-Aktivierung

Um die zellphysiologischen Vorgänge während der Kultivierung von DC mit *H. pylori* zu untersuchen, wurde die Inkubationszeit der DCs mit *H. pylori* variiert. Dazu wurden die DCs mit *H. pylori* (MOI5) oder ohne, als negative Kontrolle, für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h inkubiert (s. 2.11.1.). Zur Kontrolle, ob sich die Mo-DCs nach verschiedenen Inkubationszeiten physiologisch verhalten, wurde die IL-12-Sekretion in den Kulturübertanden mittels ELISA (s. 2.9.3.) durchgeführt und in der Abbildung 3.13 präsentiert.



Abbildung 3.13. Einfluss der Inkubationszeit mit *H. pylori* auf die IL-12 Sekretion in Mo-DCs. Die Negativkontrollen (Basal) (hellgrauen Balken) zeigen die nicht infizierten Mo-DC und die schwarzen Balken die mit *H. pylori* (MOI5) infizierten Zellen. Die maximale IL-12-Konzentration wurde nach einer Inkubationszeit von 48h gemessen. (*Hafsi N et al: Journal of Immunology 7/2004*).

Abbildung 3.13 demonstriert den Einfluss der Inkubationszeit mit *H. pylori* auf die IL-12 Sekretion der Mo-DCs. Die hellgrauen Balken zeigen die Messung der Negativkontrolle (Basalwerte), diese DCs wurden ohne Zugabe von *H. pylori* für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h inkubiert. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede detektiert. Die schwarzen Balken präsentieren die Messwerte der Kulturüberstände von Mo-DCs mit *H. pylori* (MOI5) inkubiert wurden. Die maximale IL-12-Sekretion wurde nach einer Inkubation von 48h erreicht wurde und nahm nach 72 h und 96 h wieder ab.

Die IL-12 Konzentration betrug nach 48 h Inkubation mit *H. pylori* ca. 3300 pg/ml und damit im Vergleich zu 600 pg/ml als Basalwert als hoch signifikant ermittelt.

3.7. Untersuchung der Antigenaufnahme und Antigenprozessierung bei Mo-DCs

Unreife Mo-DCs sind sehr effiziente Antigenfänger. Dafür stehen ihnen die folgenden Mechanismen zu Verfügung:

- Mannoserezeptoren vermitteln die Endozytose (Engering AJ, 1997, Jiang W 1995, Sallusto F, 1994).
- CD36 und Integrin-Komplexe vermitteln die Phagozytose (Albert ML 1998, Rubartelli A, 1997).
- Aquaporine (Wasserkanäle) vermitteln die Makropinozytose;

DCs nehmen nicht nur Antigene auf, sondern sie besitzen auch Rezeptoren (Toll-like Rezeptoren), mit deren Hilfe sie charakteristische Merkmale von Mikrooganismengruppen erkennen können. Durch diese Erkennungsmechanismen von fremden Antigenen findet die Initiation einer Immunantwort statt (David M, 2003, 2002; Akira S 2003).

Die Antigenpräsentation durch DCs hat drei Aspekte: (i) Hochregulation von MHC- Klasse II, (ii) Hochregulation des CD86 kostimulatorischen Moleküls bzw. Etablierung der Immunsynapse und (iii) die Sekretion des immunstimulatorischen Zytokins IL-12 (Yoshimura S 2001).

Um zu untersuchen, wie die iMo-DC mit intakten *H. pylori* interagieren, *d.h.* ob sie das Bakterium bzw. einen Teil davon aufnehmen oder nicht, wurden die frisch generierten iMo-DCs mit unterschiedlichen Inhibitoren für 1,5h vorinkubiert, dann gewaschen und mit *H. pylori* (MOI 5) für weitere 48 h inkubiert.

Folgende Inhibitoren wurden mit der passenden Konzentration getestet:

- Cytochalasin A (CCA) ist ein Proteintransport-Inhibitor (Kumiko M 2004) und interagiert genau wie das CCD mit der Polymerisation von Actinfilamenten (Colino J 2003).
- Cytochalasin D (CCD), ein Gift aus Schimmelpilzen, blockiert cytostatisch die Polymerisation der Actinfilamente durch Bindung an das (+)-Ende des F-Actin und hemmt dadurch die Bakterienaufnahme bei den DCs (Ulf Yrlid, 2002; Yan, 2004) und bei Makrophagen (Kuhn M 1998) und auch die Antigenpräsentation (Stober D 2002, Corinti S 1999, Colino J 2003).
- Brefeldin A (BFA) hemmt den Proteintransport zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi Apparat (Kumiko M 2004) und hemmt dadurch die Antigenpräsentation über das MHC-Klasse I-Molekül (Malide D 2001).
- Proteasome Inhibitor I (PSI) [N-benzyloxycarbonyl-lle-Glu(O-tert-butyl)-Ala-Leucinal]: ist ein unspezifischer NFκB-Proteasomen-Inhibitor mit dem demonstriert wurde, dass die Antigenpräsentation bei DCs NFκB abhängig ist (Yoshimura S 2001).
- MG132 (carboben-zooxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leuchal) zerstört bzw. hemmt die Proteasomen-Aktivität (Ubiquitin-proteasome pathway) und damit die Antigenprozessierung und die Antigenpräsentation über MHC-Klasse I (Yang BB 1996, Qureshi N 2003, Lee DH 1998).

Nach zwei Tagen wurde die Konzentration von IL-12 Reifungsmarker der Mo-DCs und IL-8 inflamatorischer Marker in der Kulturüberständen mittels ELISA (s. 2.9.3.)gemessen. Die Abbildung 3.14 zeigt die IL-12 Sekretion. Alle Inhibitoren führten zu einer vollständigen Blockade der IL-12-Sekretion. Die hellgrauen Balken zeigen den Effekt der Inhibitoren auf die Inkubation von iMo-DCs ohne Zugabe von *H. pylori* und die schwarzen Balken zeigen Messungen nach Vorinkubation der Mo-DCs mit den Inhibitoren, und nachfolgender *H. pylori*.

Bei den Ansätzen mit CCD und CCA zeigte die blockierte IL 12-Sekretion, dass die Antigenaufnahme bei den Mo-DCs vollständig blockiert war.

Die Vorinkubation von Mo-DCs mit BFA zeigt offensichtlich, dass der Proteintransport zwischen dem ER und Golgi-Apparat gehemmt wurde und damit der Reifungsprozess der Zellen nicht abgeschlossen werden konnte, die daraufhin kein IL-12 mehr produzierten.

Die Hemmung der IL-12-Sekretion durch PSI zeigte eine deutliche Abhängigkeit der Antigenpräsentation vom Transkriptionsfaktor NF κ B, der die IL-12 Transkription und damit die Sekretion kontrolliert.

Die Beteiligung von intrazellulären Proteasomen wurde durch die IL-12-Produktionshemmung mit dem proteasomen Inhibitor MG132 gezeigt. Dadurch ist folglich auch die Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I unterbunden.

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass *H.pylori* von den iMo-DCs aufgenommen bzw. in den intrazellulären Kompartimenten prozessiert wurde und damit die Reifung und die Aktivierung von den DCs induziert hat [schwarze Balken mit *H. pylori* und ohne Inhibitoren (Basal)].

Die Vitalität und die Morphologie der Mo-DCs wurden im Versuchsverlauf permanent mit dem Lichtmikroskop beurteilt und die Zellen waren während der Inkubationszeit mit den Inhibitoren (vor Zugabe von *H. pylori*) vital und zeigten die entsprechende Morphologie von unreifen bzw. inaktivierten DCs.

Um zu zeigen, dass die Inhibitoren keine Nebenwirkung auf die Vitalität der Zellen hatten und nur die Antigenaufnahme bzw. intrazelluläre Antigenprozessierung hemmten, wurde in denselben Ansätzen die IL-8-Sekretion mittels ELISA (s. 2.9.3.) (Abbildung 3.15).

Die Abbildung 3.15 demonstriert deutlich, dass die Inhibitoren kein Effekt auf die IL-8-Sekretion der Mo-DCs haben und beweist, dass die allgemeinen physiologischen und biologischen Fähigkeiten der Zellen nicht gestört sind.



Abbildung 3.14: Hemmung der IL-12 Sekretion durch Mo-DCs durch Inhibitoren. Die hellgrauen Balken zeigen die Inkubation von iMo-DCs ohne Zugabe von *H. pylori* und die schwarzen Balken zeigen Messungen von zuerst mit Inhibitoren, dann mit *H. pylori* inkubierten iMo-DCs-Kulturen. Teilweise publiziert (*Hafsi N et al: Journal of Immunology 7/2004*)



Abbildung 3.15: Effekt von Inhibitoren auf die IL-8-Sekretion. Die hellgrauen Balken zeigen die Inkubation von iMo-DCs ohne Zugabe von *H. pylori* und die schwarzen Balken zeigen Messungen von mit Proteasomeninhibitoren vorinkubierten Zellen die anschließend mit *H. pylori* inkubiert wurden. Teilweise publiziert. (*Hafsi N et al: Journal of Immunology 7/2004*).

Nach dem Nachweis, dass *H. pylori* von iMo-DCs aufgenommen (s. 3.7) wurde und damit die Reifung bzw. Aktivierung der Mo-DCs induziert hatte, wurde als nächstes untersucht, welche *H. pylori*-Bestandteile den stimulierenden Effekt auf den Reifungsprozess der iMo-DCs hatte. Die verschiedenen *H. pylori* Fraktionen wurden wie unter 2.11.3. beschrieben erhalten und umfassten äußere Membran (aMem), Membran (Mem), innere Membran (iMem), DNA, und Zytosol (Zyt). Dazu wurden die *in vitro* generierten iMo-DCs mit jeweils 1μ g/ml der verschiedenen *H. pylori*-Fraktionen für 48 h inkubiert. Nach 48 h wurde die IL-12-Konzentration in den Kulturüberständen gemessen (s. 2.9.3.).

Die Abbildung 3.16 zeigt die IL-12-Konzentrationen in den Kulturüberständen. Bei den Kulturen die mit Zytosol (Zyt), DNA oder innerer Membran (iMem) stimuliert wurden, wurde eine IL-12-Konzentration von ca. 600 pg/ml, die damit nicht signifikant über den Basalwerten (400 pg/ml) lag, gemessen. Die lichtmikroskopische Beurteilung (Daten nicht gezeigt) der Zellen zeigte, dass die Zellen vital waren und ihr Morphologie war mit unter basalen Bedingungen vergleichbar.

Im Gegensatz dazu wurde bei Stimulation der Zellen mit Membran (Mem) und äußere (aMem) Membran eine erhöhte IL-12-Sekretion gemessen. Der Effekt der äußeren Membran (2319 pg/ml) ist im Vergleich zu Basal (400 pg/ml) hoch signifikant und noch stärker als der Effekt der kompletten Membran (1100 pg/ml).

Der Unterschied zwischen dem Effekte der äußeren Membran und der kompletten Membran bei der IL-12-Induktion und die lichtmikroskopische Beobachtung bestätigten, dass der Stimulus bzw. der Antigenfaktor von *H. pylori* in der äußeren Membran lokalisiert sein, da die Zellen eine Morphologie von reifen dendritischen Zellen zeigten.

Dass bei der Kultur der iMo-DCs mit *H. pylori*-DNA kein stimulierender Effekt gefunden wurde, ist durch die Tatsache zu erklären, dass die iMo-DC kein TLR-9 exprimieren (Pulendran B 1997), der CpG-DNA erkennen können.



Abbildung 3.16.: Zytokinsekretionsprofil der Mo-DCs nach Stimulation mit verschiedenen *H. pylori* Fraktionen. Die *in vitro* geernteten generierten Mo-DCs wurden mit jeweils 1 µg/ml äußere Membran (aMem), Membran (Mem), innere Membran (iMem), DANN, und Zytosol (Zyt) oder ohne als Negativkontrolle (Basal) für 48h inkubiert. Die IL-12-Sekretion wurde mittels ELISA in den Kulturüberständen bestimmt.

3.9. Kokultur von *H. pylori* infizierten Mo-DC mit autologenen Zellen

Eine charakteristische Eigenschaft von DCs ist die Fähigkeit, sowohl endogene als auch exogene Antigene über MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Moleküle für NK-Zellen und T-Lymphozyten zu präsentieren.

Humane infizierte dendritische Zellen, als stimulierende Zellen, aktivieren NK- und T-Zellen (Responderzellen) durch Zell-Zell-Kontakt (Ferlazzo G 2002, Ferlazzo G 2003, Biron CA 1997) und induzieren eine Th₁/Th₂-Immunantwort (Moser M 2000, Lanzavecchia A 2001).

Für die Untersuchungen äußerer Einflüsse, wie die *H. pylori*-Infektion, auf das Immunsystem eines *H. pylori* negativen Spenders wurde in Vorversuchen ein humanes *In-vitro*-System etabliert. Dabei standen die *H. pylori*-infizierten DC (mMo-DC) als professionelle antigenpräsentierende Zellen, die für die Aktivierung und Proliferation von ungeprägten NK-Zellen (s. 2.9.4.2.) und naiven T-Zellen (s. 2.9.4.3.) zuständig sind, im Vordergrund. Es wurde getestet, ob die aus Blut gewonnen Zellen naive T-Zellen und NK-Zellen zur Aktivierung stimulieren können.

3.9.1. Kultur von H. pylori infizierten Mo-DC mit autologenen NK-Zellen

Die immunstimulatorische Kapazität von *in vitro* generierten Mo-DCs (s. 2.10.) wurde vor und nach Infektion mit *H. pylori* (s. 2.11.1.) in autologenen Ansätzen untersucht. Als Responderzellen wurden durch negative Selektion isolierte NK-Zellen (s. 2.9.4.2.) von HLA-A und HLA-B identischen Spendern eingesetzt. Die Reinheit der isolierten NK-Zellen wurde mit FACS nachgewiesen und lag bei ca. 89 % (s. 3.4.3.).

Die Aktivierung der Responder-NK-Zellen wurde nach 24 h Kokultur anhand der TNF- α -, IFN- γ - und IL-2-Konzentrationen in den Kulturüberständen mittels ELISA (s. 2.9.3.) und durch durchflußzytometrische (s. 2.9.2.) Messung der CD69-Antigen-Expression auf den NK-Zelloberflächen überprüft.

- TNF- α als Entzündungsmediator wird von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen und aktivierten NK- und T-Zellen sezerniert.
- IFN-γ ist ein lösliches Protein, gehört zum Interferon Typ II (Typ I: IFN-α und IFN-β) und spielt eine wichtige Rolle im Immunsystem (Bei der T-Zelldifferenzierung). Es wird nur von aktivierten T-Lymphozyten (Th1) und NK-Zellen sezerniert.
- IL-2 ist ein immunmodulatorisches Zytokin, denn es spielt eine Hauptrolle bei der Entwicklung der T- und B-Lymphozyten-Antwort. Es wirkt autokrin, das heißt es wird von Lymphozyten sezerniert die dann über Bindung an den IL-2-Rezeptor stimuliert werden. IL-2 wird nur von aktivierten Lymphozyten (T- und B-Zellen) sezerniert und ist damit ein Lymphokin.
- Das CD69-Molekül ist ein Marker aktivierter NK- und T-Zellen (Moretta A 1991, Borrego F 1999).

Unreife iMo-DCs und *H. pylori*- infizierte Mo-DCs (mMo-DCs) wurden mit frische isolierten autologenen NK-Zellen in Verhältnis von 5 NK-Zellen pro Mo-DC (5:1) kokultiviert (s.2.11.6.).

Die Abbildung 3.19 (a-c) zeigt die Mittelwerte von Versuchen mit Zellen von verschiedenen Spendern. Bei den Stimulationsansätzen von *H. pylori*-infizierten dendritischen Zellen in Kokultur mit NK-Zellen sind die Konzentrationen von (a) IL-2, (b) TNF- α und (c) INF- γ gegenüber den Kontrollansätzen (DCs + NK-Zellen) signifikant erhöht.

Die dunkelgrauen Balken in Abb. 3.17 a, b und c zeigen, dass die Zytokin-Sekretion in Kokulturen von nicht infizierten Mo-DC und NK-Zellen Kulturen im Vergleich zu den Basal-Werten (DCs) nicht erhöht ist und die hellgrauen Balken (DC + H. pylori) zeigen im Vergleich zu den Basal-Werten keine signifikante Zytokinsekretionserhöhung.

Die gefundene erhöhte Zytokinsekretion ausschließlich in Kokulturen von *H. pylori* infizierten DCs mit NK-Zellen zeigte, dass die Zytokine von den aktivierten NK-Zellen sezerniert wurden.



Abbildung 3.17: Zytokinsekretionsprofil von Mo-DCs/NK-Zellen-Kokulturen. Bei den Stimulationsansätzen mit *H. pylori*-infizierten Mo-DC und NK-Zellen sind die Zytokinkonzentrationen (a) IL-2, (b) TNF- α und (c) INF- γ im Gegensatz zu den Kontrollansätzen signifikant erhöht. Damit wurde die Aktivierung der NK-Zellen durch die *H. pylori*-Infektion gezeigt. (**: p<0,001) (*Hafsi N et al: Journal of Immunology 7/2004*).

Die phänotypische Analyse der Responderzellen (NK-Zellen) mittels FACS nach 24 h Kokultur mit *H. pylori*-infizierten dendritischen Zellen zeigte eine hohe Expression von CD69-Antigen auf den NK-Zelloberflächen (Abb. 3.18.), was ein weiterer Beweis für die Aktivierung der NK-Zellen war.

Die Abbildung 3.18 präsentiert das Histogramm der FACS-Analyse von CD69-FITC markierten NK-Zellen nach Inkubation mit *H. pylori*-infizierten Mo-DCs. Im Histogramm markiert M1 den Bereich den CD69 negativen NK-Zellen und M2 positiven Ereignisse (CD69⁺ NK-Zellen).

Um die statistischen Prozentwerte der CD69-FITC gefärbten Populationen zu bestimmen, wurden die gesamten Ereignisse gezählt und mit den Ereignissen des Gates ($CD69^+$ -Zellen) verglichen. Dieser Wert steht in der Histogramm-Statistik in der Spalte % Gated, Zeile M2 = 79%.



Abbildung 3.18: Durchflußzytometrische Analyse von CD69⁻-Zellen (M1) und CD69⁺-Zellen (M2) NK-Zellen. Das Histogramm zeigt die Oberflächenexpression von CD69 auf stimulierten (M2) und nicht stimulierten (M1) NK-Zellen mit *H. pylori*-infizierten Mo-DCs

3.9.2. Kultur von *H. pylori*-infizierten DC (mMo-DC) mit autologenen naiven T-Zellen

Dendritische Zellen dirigieren und beeinflussen durch Zytokin-Produktion die Immunantwort, weil sie damit die T-Zellen-Aktivierung, -Differenzierung und -Proliferation (Moser M 2000, Pulendran B 2001).

Um zu testen, ob die aus den gesunden Spendern *in vitro* generierten Mo-DCs *H. pylori* Antigene auf ihrer Zelloberfläche präsentieren können, wurde untersucht, ob sie in der Lage sind, autologe, naive T-Lymphozyten zu aktivieren. Dafür wurden naive CD4⁺/CD45RA⁺ T-Zellen von HLA-DR identischen Spendern durch magnetische Sortierung isoliert (s. 2.9.4.3.) und als Responderzellen eingesetzt.

H. pylori-infizierte bzw. nicht infizierte dendritische Zellen wurden mit autologenen naiven T-Zellen [10 naiven T-Zellen pro DCs] kokultiviert. Nach 72 h wurde die extrazelluläre Produktion der beiden Leitzytokine für eine Th₁- (IFN- γ) bzw. Th₂-Immunantwort (IL-4) mittels ELISA (s. 2.9.3.) gemessen.

Die Abbildung 3.19 stellt die Sekretion der beiden Leitzytokine für die Th₁-Th₂-Immunantwort in Mo-DCs/T-Zellen-Kokulturen dar. Die schwarzen Balken zeigen die IFN- γ -Sekretion und die hellgrauen Balken die IL-4-Sekretion. Im Vergleich zur IFN- γ -Sekretion wurde die IL-4-Sekretion in allen Kulturansätzen als nicht signifikant betrachtet, da jeweils nur ca. 5 pg/ml gemessen wurden. Die IFN- γ - Sekretion erreichte ihr Maximum (ca. 240 pg/ml) im Kulturansatz der *H. pylori*-infizierten DCs mit T-Zellen, dagegen wurden beim Ansatz der nicht infizierten Mo-DCs mit T-Zellen nur 125 pg/ml gemessen und damit wurde der Unterschied als signifikant (*: p< 0,05) betrachtet. Dieser Unterschied in der IFN- γ -Sekretion zwischen den Kulturen von infizierten und nicht-infizierten DCs mit autologenen naiven T-Zellen zeigte, dass die *H. pylori* Infektion die IFN- γ -Sekretion bei den T-Zellen stimuliert hatte.



Abbildung 3.19: Die Sekretion der Leitzytokin für Th₁-Th₂-Immunantwort. Die schwarzen Balken zeigen die IFN- γ -Sekretion (Th₁) und die hell grauen Balken die IL-4-Sekretion (Th₂). Im Vergleich zur IFN- γ -Sekretion wurde die IL-4-Sekretion als nicht signifikant betrachtet. Die *H. pylori*-infizierten DC induzierten eine signifikant erhöhte IFN- γ -Sekretion bei den T-Zellen. Teilweise publiziert (*Hafsi N et al: Journal of Immunology 7/2004*).

Um zu ermitteln, ob die Sekretion der Leitzytokine für die Th₁-Immunantwort von der Inkubationszeit abhängig ist, wurden die IFN- γ -, TNF- α - und IL-2-Konzentrationen nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h Kokultur mittels ELISA bestimmt (s. Abb. 3.20).

In Abbildung 3.20 ist die Sekretion der Leitzytokine für die Th₁-Immunantwort dargestellt. Die schwarzen Balken repräsentieren die IFN- γ - (A), TNF- α - (B) und IL-2-Konzentration (C) nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h Kokultur der *H. pylori*-infizierten Mo-DCs mit autologenen naiven T-Zellen und die hellgrauen Balken die Konzentrationen von nicht-infizierten Mo-DCs mit autologenen naiven T-Zellen.

Während die Zytokin-Produktion im Laufe der Kokultur zunimmt und nach 72 h für alle drei Zytokine ihr Maximum erreicht, bleibt die IL-2-Sekretion im Vergleich zu der TNF- α - und IFN- γ -Sekretion trotz eines Anstiegs recht niedrig.

Nach 96 h Kokultur sinkt die Sekretion der Leitzytokine für eine Th₁-Immunantwort, was die lichtmikroskopischen Beobachtungen bestätigte, welche einen großen Anteil von apoptotischen Zellen zeigten.



Abbildung 3.20: Kinetik der Zytokinsekretion in Mo-DCs/T-Zellen-Kokulturen. IFN- γ - (A), TNF- α - (B), und IL-2- Sekretion (C) in Kokulturen von *H. pylori*-infizierten und nicht-infizierten Mo-DCs mit naiven T-Zellen. Die schwarzen Balken zeigen die Kokultur *H. pylori*-infizierten Mo-DCs mit naiven T-Zellen. Weiße Balken die nicht infizierten Mo-DCs mit naiven T-Zellen. (*Hafsi N et al: Journal of Immunology 7/2004*).

Nach der Untersuchung des Effekts von intakten *H. pylori* auf die Mo-DCs und die naiven T-Zellen und der Feststellung, dass die Bakterien die Aktivierung der Mo-DCs und folglich eine Th₁-Immunantwort in der Co-Kultur mit naiven T-Zellen induziert, wurde weiterhin der Effekt der *H. pylori*-Zellmembran auf die naiven T-Zellen untersucht, da bei dieser als einziger Bakterienfraktion ein Reifungseffekt auf die dendritischen Zellen nachgewiesen werden konnte (s. 3.7.3.).

Dafür wurden die frischen *in vitro* generierten Mo-DCs (s. 2.10.) mit 1 μ g/ml *H. pylori*-Zellmembran (Mem) inkubiert, nach 48 h die magnetisch isolierten naiven T-Zellen (s. 2.9.4.3.) zu den infizierten DCs gegeben und für weitere 72 h inkubiert (s. .2.11.5.).

Nach der Inkubationszeit wurden die T-Zellen auf mRNA- Ebene mittels RT-PCR analysiert Auf RNA-Ebene wurde die Expression von den Th_1 - bzw. Th_2 -spezifischen Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA-3, die in den differenzierten T-Zellen exprimiert werden, mittels quantitativer Real-time (RT)-PCR (s. 2.12.3.) analysiert.

- T-bet ist der Transkriptionsfaktor der Th₁-Effektor Zellen (Afkarian M 2002, Lighvani AA 2001, Szabo SJ 2000)
- GATA-3 (GATA-binding Protein 3) ist der wichtigste Regulationsfaktor bzw.
 Transkriptionsfaktor bei der Th₂-Polarisierung. (Lee HJ 2000, Grogan JL 2002).

Die über 72 h mit *H. pylori-*, *H. pylori-*Membran-infizierten oder nicht-infizierten Mo-DCs Negativkontrolle kokultultivierten T-Zellen wurden geerntet und die Gesamt-RNA isoliert (s. 2.12.1.). Nach der Umschreibung der RNA in cDNA (s. 2.12.2.), wurde diese mit T-bet- bzw. GATA-3-Primern hybridisiert und mittels RT-PCR analysiert (s. 2.12.3.) (Abb. 3.21.).Als Standard wurde GAPDH verwendet.

Die Abbildung 3.21 zeigt die mRNA-Expression von GATA-3 und T-bet in den Kokulturen der T-Zellen mit nicht-infizierten (Kontrolle) und *H. pylori*- und *H. pylori*-Membran stimulierten Mo-DCs. In Mo-DCs/T-Zellen-Kokulturen ist GATA-3 in Vergleich zu T-bet hohe exprimiert (weißen Balken). GATA-3 wurde in T-Zellen, die mit *H.pylori*-(schwarzer Balken), als mit *H. pylori*-Membran (Mem)-infizierten Mo-DCs kokultiviert (dunkelgrauer Balken), herunterreguliert. Die Herunterregulation des Transkriptionsfaktors GATA-3 bei der Infektion mit *H. pylori* wurde als signifikant (*: p<0,05) und bei der *H. pylori*-Membran-Infektion als hoch signifikant(**: p<0,001) betrachtet.

Die T-bet-Expression wurde bei den beiden Kokulturen, von naiven T-Zellen mit *H. pylori*bzw. *H. pylori*-Membran-infizierten Mo-DCs signifikant hochreguliert (**: p<0,001). *H. pylori* stimuliert *in vitro* die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet bei T-Zellen und damit eine Th₁-Immunantwort.



Abbildung 3.21: Quantitative RT-PCR der mRNA-Expression von GATA-3 und T-bet in Kokulturen der T-Zellen mit *H. pylori-*, *H. pylori-* Membran- und nicht-infizierten Mo-DCs. Bei einer Infektion mit *H.pylori* (schwarzer Balken) und mit der Bakterienmembran (dunkelgrauer Balken) zeigen die T-Zellen eine Hochregulation des T-bet- und eine Herunterregulation des GATA-3- Transkriptionsfaktors (*: p<0,05, **: p<0,001) (*Hafsi, N et al: Journal of Immunology 7/2004*)

Um Aufschluss über dien Aktivierungszustand der CD4⁺ naiven T-Zellen in Kokulturen mit *H. pylori*-infizierten Mo-DCs zu erhalten, wurde eine durchflußzytometrische Analyse der Expression des CD69-Antigens auf den T-Zelloberflächen durchgeführt (s. 2.9.2.). Nach 72 h Kokultur der T-Zellen mit den *H. pylori*-infizierten und nicht infizierten Mo-DCs wurden die Zellen geerntet, mit CD69-FITC markiert und mittels FACS analysiert.

Der Oberflächenmarker CD69 wird von T-Zellen nicht konstitutiv exprimiert, kann aber im Rahmen der frühen T-Zellaktivierung nachgewiesen werden.

Abbildung 3.22 präsentiert eine Histogrammdarstellung von CD69-positiven Zellen (M2) und CD69-negativen Zellen (M1). Im ersten, hellen Histogramm markiert M1 den Bereich der negativen CD69 positiven T-Zellen, die mit nicht infizierten Mo-DCs kokultiviert wurden.

Um die statistischen Prozentwerte der CD69-PE gefärbten Populationen zu bestimmen, wurden die gezählten Ereignisse innerhalb des Gates (T-Zellen) mit den Ereignissen außerhalb verglichen. Dieser Wert steht in der Histogramm-Statistik in der Spalte % Gated, Zeile M2 = 93 %.



Abbildung 3.22 : FACS-Analyse der CD69-Expression auf T-Zellen. Histogramm Overlay von naiven T-Zellen in Kokultur mit nicht infizierten dendritischen Zellen (M1) und mit *H. pylori*-infizierten Mo-DCs (M2) mit den Histogramm-Statistikmarkern M1 und M2. M2-Markierung zeigt die Responderzellen (T-Zellen) nach der Aktivierung durch die *H. pylori*- infizierten dendritischen Zellen (*Hafsi, N et al: Journal of Immunology* 7/2004).

4. Diskussion

Die Entdeckung des humanpathogenen Keims *Helicobacter pylori* vor mehr als 20 Jahren (Warren und Marshall, 1983) eröffnete ein neues Forschungsgebiet in der Gastroenterologie. Die Tatsache, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen gastroduodenalen Erkrankungen des Menschen und einer Infektion mit *H. pylori* besteht, veränderte entscheidend die Therapieverfahren dieser Krankheitsbilder (Suerbaum S und Michetti P 2002, Bayerdörffer E 1992). Seither ist es eine der wichtigsten Intentionen der experimentellen Untersuchungen an *H. pylori* zu verstehen, wie das humane Immunsystem mit dieser Infektion umgeht und warum der Keim trotz einer nachgewiesenen Immunreaktion, sowohl auf humoraler als auch zellulärer Ebene, perisitieren kann (Bamford KB 1998, Sommer F 1998).

Der Magen ist dabei der Ort, an dem die Zellen des Immunsystems primären Kontakt zum Pathogen haben damit der Ort der primären Immunantwort. Es wurde gezeigt, dass dort nach Aufnahme der Bakterien durch Phagozytose-Zellen der Magenschleimhaut Chemokine und Zytokine sezerniert werden, welche eine starke Infiltration durch Immunzellen bzw. Lymphozyten induzieren (Mattsson A 1998, Fan XJ 1994).

Das Zusammenspiel von Phagozyten und eingewanderten Granulozyten, Monozyten, dendritischen Zellen, T-Lymphozyten und möglicherweise natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) induziert eine starke Sekretion von TNF- α , IL-12 und IFN- γ . Es erfolgt keine IL-4-Sekretion (Karttunen R 1995, Sommer F 1998), bis Antigen-spezifische T-Lymphozyten (Th₁) an den Ort der Infektion rekrutiert werden (Bamford KB 1998, Sommer F 1998).

Dieses Zytokinmuster entspricht einer primär innaten Immunatwort vom Th₁-Typ. Gefolgt von einer spezifischen Immunantwort die eine Erkennung und Präsentation des Pathogens oder seiner Bestandteile voraus setzt. Hierzu sind antigenpräsentierende Zellen befähigt, die nach Aufnahme und Prozessierung von Antigenen des Keims, Immunzellen des innaten und adaptiven Immunsystems aktivieren können. Professionelle Vertreter dieses Zelltyps sind dendritische Zellen, die T-Zellen und NK-Zellen aktivieren und somit die Immunreaktion polarisieren und modulieren.

Ziel dieser Arbeit war es ein *in vitro*-Modell der humanen Immunantwort auf intakte *H. pylori* Bakterien zu entwickeln, um den komplexen Prozess der Immunantwort, wie er im Magen abläuft, in Einzelschritten untersuchen zu können. Der wichtigste Schritt war dabei die Generierung humaner dendritischer Zellen in ausreichender Menge und Reinheit. Die dendritischen Zellen für diese Arbeiten wurden *in vitro* aus Monozyten generiert und charakterisiert. Die so erhaltenen Mo-DC wurden auf ihre Fähigkeit untersucht als Antwort auf die Infektion mit *H. pylori* zu reifen und Zytokine zu sezernieren. Dazu wurden Oberflächenreifungsmarker mittels Duchflusszytometrie bestimmt und die Zytokine im Zellkulturüberstand durch ELISA quantifiziert.

Die Fähigkeit reifer bzw. aktivierter dendritischer Zellen NK-Zellen und naive T-Zellen zu aktivieren und zur Zytokinproduktion anregen zu können, machte sie zum Kernstück des Modells. Im zweiten Schritt wurden daher humane NK-Zellen und naive T-Zellen aus dem Blut eines identischen Spenders isoliert und mit den *H. pylori* infizierten Mo-DCs in ein Kokultur-System gebracht.

Durch die Modellstruktur dieses Systems konnten die induzierten Zytokine, die exprimierten Oberflächenreifungsmarker der NK- und T-Zellen und die Expression von T-Zellspezifischen Transkriptionsfaktoren durch quantitiative RT-PCR gezielt untersucht werden.

Weiterhin konnte der Einfluss von einzelnen *H. pylori*-Bestandteilen, wie DNA, Membran (Mem), innere Membran (iMem), äußere Membran (aMem) und Zytosol (Zyt) auf die primäre Immunantwort untersucht werden.

4.1. Generierung und Aktivierung von dendritischen Zellen *in vitro*.

Dendritische Zellen sind im peripheren Blut in sehr geringer Quantität (< 0,1 %) vorhanden und daher sehr schwer für wiederholte Versuchsreihen zu isolieren. Zur Etablierung des Modells wurden daher dendritische Zellen durch Kultur über 6 Tage unter Zugabe von Zytokinen (GM-CSF und IL-4) aus CD14⁺ Monozyten generiert (s. 3.5.). Es handelt sich dabei um ein in der Literatur etabliertes Verfahren (Pickl WF 1996, Pietschmann P 2000), das für unser System angepasst und standartisiert wurde. Die generierten Zellen zeigten den charakteristischen Phänotyp dendritischer Zellen mit typischer Zellmorphologie. Die Untersuchung der Oberflächenmarker der Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen (Mo-DCs) mittels FACS-Analyse ergab den Verlust von Monozytenmarkern (CD14) und die Expression des Hauptmarkers CD1a für unreife myeloide Mo-DCs (s. 3.5, Abb. 3.8).

Diese phänotypischen Merkmale sind spezifisch für unreife Mo-DC und ein hinreichender Kontrollparameter.

Die DCs sind der Hauptvermittler zwischen der angeborenen und erworbenen Immunität. Sie spielen eine essenzielle Rolle bei der Antigenaufnahme, -Prozessierung und -Präsentation (Banchereau J 2000, Banchereau J 1998).

Der Differenzierungsprozess von unreifen zu reifen APCs wurde von Bakterienmembran oder -Bestandteilen induziert. Dieser Prozess ist begleitet von einer Hochregulation von MHC-Klasse I und II, kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD83 und CD86) und Adhäsionsmolekülen wie CD54 (Banchereau J 1998, Guermonprez P 2002) sowie einer Zytokinproduktion (Dixon G 2001, Verhasselt V 1997).

Dendritische Zellen sind in fast allen Geweben des menschlichen Körpers lokalisiert. In der Magenschleimhaut sind die dendritischen Zellen fähig, die "Tight-Junctions" zu öffnen und direkt mit den Bakterium im Kontakt zu kommen (Rescigno M 2001, Scheinecker C et al. 2002).

Amieva et al. (2003) haben vor kurzem gezeigt, das *H. pylori* eine potente Rolle bei der Destruktion des Apikal-Junktional Komplexes spielen wodurch DCs in die Magenschleimhaut eindringen können um direkt in Kontakt mit den Bakterien zu treten (Amieva MR 2003).

Es wurde weiterhin gezeigt, dass in der Magenschleimhaut ein direkter Kontakt zwischen DCs und *H. pylori* sehr wahrscheinlich ist, wodurch ein Aktivierungs- und Reifungsprozess der dendritichen Zellen ausgelöst wird (Amieva MR 2003).

Molinari et al. und Ramarao et al. haben beschrieben, dass die Antigenpräsentation durch bestimmte *H. pylori*-Virulenzfaktoren (VacA) und die Antigenaufnahme durch cag-PAI (*H. pylori* Pathogenität Insel) bei APCs gehemmt wurde (Molinari M 1998, Ramarao N 2000). Trotz vieler Studien, die sich mit der Interaktion zwischen *H. pylori* und angeborener Immunität beschäftigt haben (de Jonge R 2001, Innocenti M 2001, Kalinski P 1999, Knipp U 1994, Meyer F 2000, Stassi G 2002), ist immer noch wenig bekannt über dem Einfluss von *H. pylori* auf humane dendritische Zellen (Guiney DG 2003, Voland P 2003).

Im diesem etablierten Modell zeigt sich nach Infektion mit *H. pylori* bei den Monozytenabgeleiteten dendritischen Zellen (Mo-DCs) eine Reifung und Aktivierung. Die *H. pylori*gepulsten Mo-DCs zeigen durch ihre Kapazität zu höher IL-12-Sekretion, sowie nach morphologischen und phänotypischem Kriterien das Bild von reifen und aktivierten dendritischen Zellen (s. 3.6.1, Abb. 3.9, Abb. 3.10).

Diese Kriterien betreffen die Oberflächenexpression von kostimulatorischen-Molekülen CD80, CD83 und CD86, von Antigen-präsentierenden-Molekülen der MHC-Klasse II, und das Fehlen des Markers für unreife dendritichen Zellen, CD1a (s. Abb. 3.9).

Der Zell-Zellkontakt zwischen DCs und T-Zellen verlangt die Etablierung einer der Immunologischen Synapse zwischen den beiden Zelltypen. (Valitutti S 1995, Lezzi G 1998 und Grakoui A 1999).

4. Diskussion

Al-Alwan et al. (2001) haben gezeigt, wie wichtig ist die Rolle der DCs bei der Etablierung der Immunologischen Synapse und dadurch der T-Zelldifferenzierung ist. Unsere Untersuchungen zeigen ein ähnliches Resultat, da *H. pylori*-Infizierte dendritische Zellen eine erhöhte Expression der für die Etablierung der Immunologischen-Synapse zwischen dendtische Zellen und T-Zellen wichtigen kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 (B7-Komplex), HLA-DR (MHC Klasse II) und CD83 zeigten, was auf eine Ausreifung der dendritischen Zellen durch *H. pylori*-Einfluss hinweist. Die Funktion der CD83 Oberflächenmolekül ist immer noch unbekannt. Diese phänotypischen Merkmale sind spezifisch für reife und aktivierte dendritische Zellen und hinreichender Nachweis.

Bei der Arbeit von Kranzer et al. wurde eine Steigerung der IL-12, IL-10- and IL-6-Sekretion ab einer Infektion mit 10 *H. pylori* Bakterien pro DCs beschrieben. Diese Arbeitsgruppe hat durch FACS-Analyse gezeigt, dass in Mo-DCs bei einer Infektion mit 10 *H. pylori* pro DC auch Apoptose abläuft (Kranzer K 2004).

Betrachtet man die Induktion der Zytokinproduktion in Mo-DCs in Abhängigkeit von der Bakterienzahl, zeigt sich in unserem Modell ein Maximum mit 6-8 Bakterien pro DC und ein Absinken ab 10 Bakterien pro DC. Die mikroskopische Beobachtung zahlreicher toter DCs bei einer Infektion mit 10 Bakterien pro DC weist daraufhin, dass diese Konzentration unphysiologisch ist. (s. Abb. 3.12). Bei der Berücksichtigung des zeitlichen Verlaufs der Zytokininduktion in Mo-DCs durch *H. pylori*-Infektion, zeigt sich eine maximale IL-12-Sekretion nach 48 h. Obwohl auch die IL-10-Sekretion nach 48 h *H. pylori*-Infektion deutlich höher als bei den nicht infizierten DCs (basal) ist, wurde sie im Vergleich zur IL-12-Sekretion nach 48 h of signifikant betrachtet (s 3.6.1. Abb. 3.10). Die IL-12- Sekretion Abnahme nach 72 h und 96 h entspricht den lichtmikroskopischen Beobachtungen, die eine große Zahl toter DCs in der Zellkultur gezeigten haben (Daten nicht gezeigt).

Durch welchen Mechanismen wird *H. pylori* von den Magenschleimhautzellen erkennt, ist es immer noch unbekannt. Smith et al. haben die Interaktion zwischen *H. pylori* und TLRs, die ein intrazellulär Signalübertragung in den Magenepithelzellen vermitteln, untersucht und gezeigt, dass TLR-2 durch *H. pylori*-LPS und TLR-5 durch *H. pylori*-Flagelline FLaA und FLaB eine Aktivierung von NF_{κ}B bei den Magenschleimhautzellen induzieren (Smith MF 2003, Lee SK 2003).

Die Aktivierung von NF_{κ}B in den Magenepithelzellen induziert die Sekretion vom Chemokin IL-8 (Aihara M 1997).
Die meisten *H. pylori*-LPS Studien wurden mit TLR-2, -4 und -5 assoziiert (Ozinsky 2000, Takeuchi O 2001, 2002, Shimazu 1999) und zeigen, dass das *H. pylori*-LPS die IL-12-Sekretion bzw. Aktivierung bei den myeloiden dendritischen Zellen durch TLR-2 oder 4 induziert. In anderen Studien wurde gezeigt, dass das *H. pylori*-LPS eine geringere biologische Aktivität bzw. Effekt als *E. coli*-LPS auf die dendritischen Zellen hat (Kranzer K 2004, Muotiala A 1992, Nielson H 1994).

LPS ist ein Komponente der äußeren Membran von gram-negativ Bakterien und ein potentiale Aktivator des immunologischen und inflamatorische Systems. Eine weitere Arbeit hat beschrieben, dass *H. pylori* -LPS mit DC-SIGN-Rezeptoren interagiert und dadurch die Th₁-Immunantwort beeinflusst (Mathijis PB 2004).

Es wurde auch demonstriert, dass das *H. pylori*-LPS bei den Monozyten und den Magenepithelzellen eine Aktivierung und eine pro-inflamatorische Zytokinensekretion induziert (Kirkland T 1977, Bliss CM 1998, Innocenti M 2001).

Nach den oben genannten Studien ist in unserem etablierten System die IL-12-Sekretion bzw. Aktivierung bei den Mo-DCs durch *H. pylori* offensichtlich nicht nur von LPS induziert. Es wurde auch in unsere Arbeitsgruppe der LPS-Effekt von *H. pylori* auf den dendritischen Zellen durch Zugabe von Polymexin B getestet und es wurde gezeigt, dass durch die Polymixin B Zugabe die dendritischen Zellaktivierung nicht gehemmt wurde (Daten nicht gezeigt.).

Dendritische Zellen sind in der Lage, Antigene durch Endo-, Pino- und Phagozytose aufzunehmen (Engering AJ 1997, Jiang W 1995, Sallusto F 1994).

Diese Fähigkeit ist stark abhängig von dem Differenzierungszustand der Zellen, da die DCs die Antigenaufnahmefähigkeit mit zunehmendem Reifungsgrad verlieren.

Al-Alwan et al. (2001) haben gezeigt, dass Cytochalasin D (CCD) einen Effekt auf das Zytoskelett der DCs hat. CCD wie der Cytochalasin A (CCA) blokieren zytostatisch die Polymerisation der F-Aktinfilamente der DCs und dadurch wird Antigenaufnahme sowie die Etablierung der immunologische Synapse gehemmt werden (Cooper JA 1978).

In unserem *in vitro* etabliertem Modell wurde die IL-12-Sekretion als Messparameter der Antigenaufnahme-Fähigkeit der dendritischen Zellen betrachtet.

Die Vor-Inkubation der dendritischen Zellen mit CCA oder CCD für 1,5 h hat eine vollständige Hemmung der IL-12-Sekretion nach anschließender *H*. pylori-Infektion für 48 h gezeigt (s. 3.7., Abb. 3.14), was durch die gehemmte Aufnahmefähigkeit der dendritischen Zellen erklärt werden kann.

Trotz der vollständigen Hemmung der IL-12-Sekretion durch CCA und CCD, wurde die IL-8-Sekretion nicht gehemmt und war somit nicht abhängig von der Antigenaufnahme (s. 3.7, Abb. 3.15). Aihara et al. haben gezeigt, dass die IL-8-Sekretion von extrazellulären Signalen (TLRs) abhängig ist (Aihara M 1997).

Die komplette Hemmung der IL-12-Sekretion bei den *H. pylori*-infizierten dendritischen Zellen in den mit den Inhibitoren BFA, PSI und MG132 durchgeführten Versuchen zeigt, dass eine intrazelluläre Blockade der Antigenprozessierung und Präsentation stattgefunden hat (s. 3.7., Abb. 3.14).

Die Vitalität der mit den verschiedenen Inhibitoren vorinkubierten dendritischen Zellen wurde nicht nur mit dem Lichtmikroskop kontrolliert, sondern auch durch die Messung der IL-8-Sekretion bei diesen Zellen. Die IL-8-Messungen zeigten die Vitalität der dendritischen Zellen und wiesen damit nach, dass die Hemmung der IL-12-Sekretion nicht durch der Tot der Zellen verursacht wurde, sondern durch Blockade der Intrazellulärprozessierung des Antigens induziert wurde (s. 3.7., Abb. 3.15).

Nach dem Nachweis, dass die intakten *H. pylori* einen Reifungs- und Aktivierungs-Effekt auf die von Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen hatten und, dass dieser nicht ein LPS-Effekt ist, kam die Frage auf, welcher Bestandteil des Bakteriums die DCs aktiviert.

Voland et al. (2003) haben gezeigt, dass HpaA und Omp18, zwei Proteine der äußeren Membran von *H. pylori*, spezifischesantigenpotential beim Menschen haben. In dieser Abeit wurde auch beschrieben, dass HpaA und Omp18 eine Reifung und Aktivierung bei den dendritischen Zellen induzieren (Voland P 2003). Wir konnten einen ähnlichen Effekt für die äußere Membranfraktion von *H. pylori* beobachten (s. 3.8., Abb. 3.16).

4.2. H. pylori-Infektion induziert eine Aktivierung der NK-Zellen

Es ist bekannt, dass NK-Zellen an der Elimination von Tumorzellen und Vieren beteiligt sind. Über ihre Bedeutung für die frühe Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien ist hingegen wenig bekannt. Die Besonderheit von NK-Zellen ist die Fähigkeit rasch und ohne Aktivierung atypische Zellen zu lysieren und IFN- γ zu sezernieren. Zusätzlich sezernieren NK-Zellen den Entzündungsfaktor TNF- α und exprimieren das CD69-Oberflächenmolekül.

Schließlich exprimieren NK-Zellen Granulysin, ein antibakterielles Effektormolekül, welches in den zytoplasmatischen Granula gespeichert wird. Damit sind NK-Zellen mit einer Vielzaht von Effektormechanismen gegen eine *H. pyori*-Infektion ausgestattet und ihre Mitwirkung an der frühen Immunantwort gegen diese Erreger wahrscheinlich.

In unserem *in vitro*-System stellten die Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen die Zellen dar, die als professionell antigenpräsentierende Zellen die Aktivierung der NK-Zellen bewirkten. Dabei zeigte sich, dass die *H. pylori*-gepulsten-dendritischen Zellen die Aktivierung von den NK-Zellen induziert (s. 3.9.1., Abb. 3.17).

Wie in der Literatur gezeigt wurden konnte, müssen die NK-Zellen (CD56^{dim}) unter bakterieller oder viraler Infektion eine gewisse Zytotoxizität gewährleisten. Ist das nicht der Fall, führt unterdrückte Zytotoxizität zu IFN-γ-Sekretion bzw. zu Aktivierung von CD56^{bright} NK-Zellen (Megan A Cooper 2001).

Zu Beginn der Kokultivierung wurden die zwei Haupt-Subpopulationen der NK-Zellen eingesetzt, die den Marker $CD56^{dim} / CD16^{high/low}$ und $CD56^{bright} / CD16^{low}$ trugen (s. 3.4.2.). Nur solche Zellen, die mit den *H. pylori*-gepulsten dendritischen Zellen oder nicht gepulsten dendritischen Zellen in Kontakt kamen und diese über ihren unspezifischen Antigenrezeptoren im autologenen System als fremd erkannten, konnten aktiviert werden.

Es wurden keine toten Zellen auf Grund der *H. pylori*-Infektion durch die lichtmikroskopischen Beobachtungen festgestellt, sondern alle Zellen haben eine Vitalität gezeigt und mittels ELISA wurde eine starke IFN- γ - und TNF- α -Sekretion nachgewiesen.

Eine Hochregulation oder Herunterregulation der MHC-Klasse I-Expression bei *H. pylori*infizierten dendritischen Zellen ist bisher nicht beschrieben worden. Eine mögliche Erklärung für die hohe Expression von den MHC-Klasse I-Molekülen auf der Zelloberflächen der *H.pylori*-infizierten dendritischen Zellen ist ein Immunausweichmechanismus gegenüber den CD56^{dim} NK-Zellen, da bei der Kokultur kein lysierten (toten) Zellen festgestellt wurden.

Die starke IFN-γ-Sekretion könnte nur von den CD56^{bright} NK-Zellen induziert worden sein.

Es wurde schon in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen, dass die NK-Zellen bei einer *H. pylori*-Infektion im klassischen cytotox-Assay keine Zytotoxizität zeigen (Hafsi N 2004).

Die Daten haben eine sehr niedrige IL-2-Sekretion gezeigt (Abb. 3.17), was die Reinheit der DCs/NK-Zellen Kokultur bestätigt, da nur T-Zellen und im geringen Masse B-Zellen das Lymphokin IL-2 sezernieren.

Die Aktivierung der NK-Zellen mit *H. pylori*-gepulsten dendritischen Zellen führt zu funktionellen und morphologischen Veränderungen dieser Zellen. Einerseits kommt es zu IFN-γ-Sekretion und keiner Zytotoxizität, anderseits zur Induktion der Expression des Aktivierungsmarkers CD69 (s. 3.18). CD69 wurde auch als "activation inducer mlecule (AIM)", "early activation antigen (EA-1)", MLR-3 oder LEU-23 bezeichnet (Testi R 1989, Laner 1988)

Es ist konstitutiv auf unreifen Thymozyten, Thrombozyten und Monozyten exprimiert (Testi R 1988, Testi R 1990) und auf NK-Zellen und B-Lymphozyten induzierbar (Risso A 1991, Lanier 1988). Kreuzvernetzung von CD69 induziert die Zytokingenexpression und Proliferation von T-Lymphozyten (Testi R 1998).

Die Expression von CD69 auf der NK-Zelloberfläche wurde mittels FACS-Analyse bestimmt und zeigt eine Aktivierung der CD56^{bright} NK-Zellgruppen (s. Abb. 3.18).

Zu Beginn der Kokultur waren nur 11 % der eingesetzten NK-Zellen CD56^{bright} /CD16^{low}. Nach 24 h Kokultur zeigten die statistischen Prozentwerte, dass der Anteil der CD69⁺ Population bei 72% lag, was durch eine höhere Proliferationsrate der CD56^{bright} NK-Zellgruppen erklärt werden kann.

4.3. *H. pylori*-Infektion induziert eine Aktivierung der naiven T-Zellen

In dem humanen Immunsystem stellen die dendritischen Zellen die Zellen dar, die als professionell antigenpräsentierende Zellen die Aktivierung der naiven T-Zellen bewirken (Hida N 1999).

Für die Aktivierung und Expansion der naiven CD4⁺ T-Zellen sind mehrere Signale, welche die T-Zelle durch die *H. pylori*-gepulsten Mo-DCs erhalten müssen, notwendig. Neben der Erkennung der Antigendeterminanten auf dem MHC-Klasse II-Molekül durch die TCRs sind weitere kostimulatorische Signale erforderlich. Bei der T-Zellpolarisierung von naiven Zellen spielt von allem das sezerniertes IL-12-Zytokin eine zentrale Rolle. IL-12, das von dendritischen Zellen unter bestimmten Stimuli gebildet wird, ist ein Hauptinduktor für die Th₁-Zellpolarizierung und IFN-γ-Synthese (Sinigaglia, 1999).

Tatsächlich wurden in den Kulturüberständen von *H. pylori* (MOI 5) infizierten dendritischen Zellen große Mengen an IL-12 gemessen und in der Kokultur mit autologenen naiven CD4⁺ T-Zellen eine höhere IFN- γ -Sekretion festgestellt (s. 3.9.2., Abb. 3.19).

Der TCR/MHC-Klasse II-Kontakt und die stabilisierende Bindung zwischen dem CD4-Molekül und dem MHC-Klasse II-Molekül führen zur verstärkten, vorübergehenden Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle auf der T-Zelle und den DCs. Das wichtigste kostimulatorische Signal wird durch die Bindung der DC-exprimierten membrangebundenen Glykoproteine CD80 (B7-1) und / oder CD86 (B7-2) mit dem CD28-Molekül, das sich auf der Oberfläche der T-Zellen befindet, vermittelt. (Lanzavecchia A 2001, Luther SA 2001, Coyle 2001). Nach Aktivierung differenzieren naive CD4⁺ T-Zellen zu T-Effektorzellen. Aufgrund der von ihnen sezernierten IFN- γ -Zytokine lassen sich T-Zellen in Th₁-Subpopulationen einteilen. Das schon vorherrschende Th₁-Zytokinmuster in unserem System wurde durch die Infektion der dendritischen Zellen mit *H. pylori* signifikant verstärkt, d.h. es wurden prozentual mehr T-Zellen detektiert , die IFN- γ produzierten, wohingegen die IL-4-Produktion von einem kaum messbaren Niveau auf Null absank (s. Abb. 3.19).

Zu Beginn der Kokultur wurden CD4⁺ T-Zellen eingesetzt, die den Marker für naive T-Zellen (CD45RA) trugen (s. 3.4.3.). Nur solche Zellen, die mit den infizierten dendritischen Zellen in Kontakt kamen und diese über ihren T-Zellrezeptor als fremd erkannten (alutogenes System) konnten expandieren (s. 3.9.2).

Durch die *H. pylori*-Infektion wurde das Aktivierungsverhalten der T-Zellen deutlich verändert, was anhand der IFN- γ -, IL-2- und TNF- α -Sekretion gezeigt wurde. Die Zytokin-Sekretionen erreicht ihr Maximum nach 72 h (s. Abb. 3.20).

Während bei den infizierten Kulturen die Aktivierung bis zu 72 h lang anstieg, blieb sie bei den nicht *H. pylori*-infizierten Kulturen auf einem fast gleich bleibenden Niveau (s. Abb. 20.). Trotz des Anstiegs der IFN- γ -Sekretion bleibt diese im Vergleich zur TNF- α -Sekretion immer niedrig, was durch die naiven T-Zellen erklärt werden kann. Vermutlich ist die Zellzahl der spezifischen Vorläuferellen (naive T-Zellen) zu gering, die den exprimieren passenden TCR um die MHC-II-Peptid-Komplexe auf den dendritischen Zellen erkennen können.

Die IL-2-Sekretion (Proliferationsindikator) war in den infizierten Kokulturen bis zu 72 h deutlich niedriger als die IFN- γ - und TNF- α -Sekretion, was durch die Differenzierung der naiven T-Zellen sowohl zu Th₁-Zellen als auch zu Regulator-T-Zellen (Th₃) bedingt sein kann, da die starke lymphozytäre Infiltration in der Magenschleimhaut bei *H. pylori*infizierten Patienten von TGF- β -produzierenden Zellen (Th₃) begleitet ist (Lindholm C 1997). Die Th₃-Zellen sind T-regulatorische Zellen, deren Hauptfunktion die Hemmung der Proliferation von Th₁ und Th₂ ist (Lundgren A 2003), was in unserem System durch die IL-2-Messungen gezeigt wurde. Untersuchungen der Kulturen auf Transkriptionsfaktorsebene ergaben Hinweise auf mögliche Regulationsmechanismen.

An dieser Stelle wurde nun deutlich, dass *H. pylori*-Infektion erst auf Ebene der Signaltransduktion den IL-4-Weg (Th₂) hemmt und den IFN- γ -Weg (Th₁) fördert. Zu dieser Schlussfolgerung führen die Ergebnisse, dass schon zu einem frühen Zeitpunkt der Kokultur (Basal-Wert: DCs+T-Zellen) untersuchte T-Zellen GATA-3 im Zellkern aufwiesen, was bei der Th₂-Zelldifferenzierung eine Rolle spielt.

GATA-3 sollte durch IL-4-STAT6 Signalwege induziert werden, was durch die *H.pylori*-Infektion verhindert wurde stattdessen wurde der Transkriptionsfaktor T-bet durch IFN-γ-STAT1- und TCR-induzierte Signalwege exprimiert (Gragan JL 2002) (s. 1.7.8.). Dies wurde anhand von TaqMan PCRs mit spezifischen Oligonukleotidsequenzen nachgewiesen.

T-bet, ein Transkriptionsfaktor, dessen Bedeutung erst im vergangenen Jahr klar wurde, wird einerseits in Th₁-Zellen exprimiert, andererseits kann er die Expression von Th₁-Zytokinen in sich entwickelnden Th₁-Zellen induzieren (Lee, 2000).

Die Expression von CD69 auf der aktivierten T-Zelloberfläche wurde mittels FACS-Analyse bestimmt und in den Kokulturen mit *H. pylori* gepulsten dendritischen Zellen gezeigt (Abb. 3.22).

Als letztes wurde der Effekt der H.pylori-Membran auf die T-Zellpolarisierung gemessen.

H. pylori-Membran-gepulste dendritische Zellen induzieren eine stärkere T-bet Expression in den Zellkernen der T-Zellen als die mit intakten Bakterien infizierten dendritischen Zellen. (s. 3.9.2., Abb. 3.21).

Die Steigerung der T-bet-Expression bei den T-Zellen zeigt, dass die *H.pylori*-Membran der für die Immunantwort verantwortlich ist. Intakte *H.pylori* und insbesondere die *H. pylori*-Membran induzieren die Aktivierung bzw. Reifung von dendritischen Zellen und eine Th₁-Immunantwort im etablierten *in vitro* System.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Infektion mit *H. pylori* ein Th₁-Zytokinmuster in T-Zellen und eine NK-Zellaktivierung induziert. Hierfür wurde ein humanes *in-vitro* Modell etabliert, welches das unreife humane Immunsystem nachempfindet. Die Ausreifung der *in vitro* generierten Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen wurde durch 48 h Inkubation mit *H. pylori* (MOI 5) induziert, die Aktivierung der NK- und der naiven T-Zellen wurde durch die Kokultivierung mit *H. pylori*-gepulsten dendritischen Zellen erreicht. Es zeigte sich, dass in diesem System ein Th₁-Zytokinmuster und eine NK-Zellaktivierung mit IFN- γ -Produktion vorherrschend waren.

Die nach der Methode von Peters JH et al. angezüchteten dendritischen Zellen erwiesen sich als eine homogene Zellpopulation, die CD14-negativ und CD1a-positiv ist. Diese Monozytenabgeleiteten generierten dendritichen Zellen lassen sie sich gut mit *H. pylori* infizieren und exprimieren nach der Infektion spezifischen Reifungsmarker CD83, CD80 und CD83 und sezernieren IL-12.

In Kokulturen von *H. pylori*-infizierten dendritischen Zellen und NK-Zellen oder naive T-Zellen wurde ein signifikanter Anstieg der TNF- α - und IFN- γ -produzierenden Zellen festgestellt. Einerseits wurden bei der Kokultivierung mit NK-Zellen nur die CD56^{bright}-NK-Zellen aktiviert bzw. stimuliert, während die CD56^{dim} NK-Zellen, obwohl sie die Mehrheit der eingesetzten NK-Zellen präsentieren (88 %), nicht stimuliert wurden.

Diese einseitige Stimulation könnte durch die Horchregulation der Antigenpräsentierenden Moleküle (MHC-Klasse I) auf den Zelloberflächen der *H. pylori*-gepulsten dendritischen Zellen bedingt sein.

Andererseits wurden bei der Kokultivierung mit den naiven T-Zellen (Th₀) nur IFN- γ produzierenden T-Zellen (Th₁) festgestellt, während IL-4-produzierende T-Zellen (Th₂) nicht gefunden wurden.

Die Vermutung, dass eine Modulation der Immunantwort auf Transkriptionsfaktorsebene stattgefunden hat, bestätigte sich durch den selektiven Nachweis des Th₁-spezifischen Transkriptionsfaktors T-bet in den Zellkernen von T-Zellen aus Kokulturen mit *H. pylori*-infizierten dendritischen Zellen. Dieser Faktor begünstigt die Entwicklung von Th₁-Zellen und unterdrückt somit die Produktion von IL-4 und damit die Th₂-Immunantwort.

Die T-Zell-Aktivierung war deutlich schwächer als die NK-Zell-Aktivierung, was durch die Reifung und die Aktivierung der dendritischen Zellen durch die *H. pylori*-Infektion bedingt sein kann, da über die stärkere Expression der kostimulatorischen Moleküle (B7) und MHC-II-Moleküle die T-Zellen zuerst stimuliert werden konnten.

Die schwache Th₁-Immunatwort hing vermutlich mit dem MHC-Klasse II-Antigen Komplex zusammen, vermutlich ist die Zellzahl der spezifischen Vorläuferellen (naive T-Zellen) zu gering, die den exprimieren passenden TCR um die MHC-II-Peptid-Komplexe auf den dendritischen Zellen erkennen können.

Die vermutete Hochregulation von MHC-Klasse I bei den *H. pylori*-infizierten dendritischen Zellen hat die Zytotoxizität der CD56^{dim}-NK-zellen gehemmt und nur die CD56^{bright}-NK-Zellen aktiviert. Im Gegensatz dazu zeigt die Hochregulation des MHC-Klasse II-Peptidkomplexes auf die infizierten Mo-DCs nur ein schwache Th₁-Immunantwort, was nur an den naiven T-Zellen bedingt sein.

Die Arbeit zeigt eindrucksvoll die potente Aktivierung des innaten wie auch des adaptativen Immunsystems durch *H. pylori* im Magen.

6. Literaturverzeichnis

- 1. Aderem A et al. (1999): Mechanisms of phagocytosis in macrophages, Annu Rev Immunol (17), 593-623.
- 2. Aderem A et al. (2000): Toll-like receptors in the induction of the innate immune response, Nature (406), 782-7.
- 3. Afkarian M et al. (2002) T-bet is a STAT1-induced regulation of IL-12R expression in naiven CD4+ T cells. Nat. Immunol. 3:549
- 4. Aihara M et al (1997). Mechanisms involved in Helicobacter pylori-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45.Infect Immun. 1997 Aug; 65(8):3218-24.
- 5. Akira S et al. (2003). Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. ELSEVIER Immunology Letter 85: 85-95
- 6. Albert ML et al. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells vie alphavbeta5 und CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes J.Exp.Med. 188: 1359-68
- Al-Alwan M et al (2001). Cutting Edge : The dendritic cell cytoskeleton is critical for the Formation of the immunological Synapse. The Journal of Immunology. 166: 1452-1456.
- 8. Allen LA (2000). Modulating phagocyte activation: the pros and cons of Helicobacter pylori virulence factors. J. Exp. Med. 2000. 191:1451-4
- 9. Amieva MR et al (2003). Disruption of the epithelial apical-junctional complex by Helicobacter pylori CagA. Science 300:1430–1434.
- Andre P et al (2000). Modification of P-selectin glycoprotein ligand 1 with a naturalkiller-cell-restricted sulphated lactosamine creates an alternates ligand for L-selectin. Proc Natl Acad Sci USA 97: 3400-3405
- 11. **Baggiolini M** Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. J Clin Invest 1989;84:1045-1049.
- 12. **Bamford KB** et al. (1998). Lymphocytes in the human gastric mucosa during Helicobacter pylori have a T helper cell 1 phenotype. Gastroenterology 114: 482-492
- 13. **Banchereau J** et al (1998). Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392 (6673): 245-2552
- 14. **Banchereau J** et al. (2000). Immunobiology of dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. 18:767–811.
- 15. **Bayerdorffer E** et al (1992). Diffrence in expression of Helicobacter pylori gastritis in antrum and body. Gstroenterology. 102 (5): 1575-82
- 16. **Bird JJ** et al (1998). Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. Immunity, 9: 229-237
- 17. **Biron CA** (1997). Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. Curr. Opin Immunol 9:24
- 18. **Blaser MJ** (1995). The role of Helicobacter pylori in gastritis and its progression to peptic ulcer disease. Aliment. Pharmacol. Ther. 9 Suppl 1:27-30:27-30
- Blaser MJ (1997). Ecology of Helicobacter pylori in the human stomach. J. Clin. Invest. 100:759-62
- 20. **Bliss CM** et al (1998). Helicobacter pylori lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemotactic protein 1 by human monocytes. Infect. Immun. 66:5357.
- 21. **Blumberg RS** et al. (1995). Structure and function of the CD1 family of MHC-loke cell surface proteins. Immunol. Rev. 147: 5-29
- 22. **Bode G** et al (1993). Ultrastructural localisation of urease of Helicobacter pylori. Med Micro Immunol. 182 (5): 233-42

- 24. **Boren T** et al. (1993). Attachment of Helicobacter pylori to human gastric epithelium mediated by blood group antigens [see comments]. Science 262:1892-5
- 25. **Boren T** et al. (1994). Helicobacter pylori: molecular basis for host recognition and bacterial adherence. Trends. Microbiol. 2:221-8
- 26. **Borrego F** et al. (1999). CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and is cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. Immunology, 97: 159-66
- Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgramm quantities of proteins, utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal.Biochem. 72: 248-252
- 28. **Burnette WN** (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem. 112(2):195-203
- 29. **Byaerdörffer E** et al (1992). Diffrence in expression of Helicobacter pylori gastritis in antrum and body. Gastroenterology 102: 1575-1582
- Censini S et al. (1996). cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I- specific and disease-associated virulence factors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:14648-53
- 31. **Censini S** et al (1996). cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A ;93:14648-14653.
- 32. **Chan SH** et al. (1991). Induction of interferon g production by natural killer cell stimulatory actor: characterisation of the responder cells and synergy with other inducers. J Exp Med. 173: 869-879
- 33. Clevers H et al (1988). The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. Annu Rev Immunol; 6: 629-662
- 34. **Colino J** et al (2003). Two distinct mechanisms for induction of dendritic cell apoptosis in response to intact Strptococcus pneumoniae. The journal of Immunology 171: 2354-2365.
- 35. **Colonna M** et al (1997). A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells, J Exp Med 186: 1809-1818
- 36. **Cooper JA** (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. J cell Biol. 105: 1473
- 37. **Corinti S** et al (1999). Human denritic cells very efficiently present a heterologus antigen expressed on the surface of recombinant gram-positive bacteria to CD4+ T lymphocytes. The journal of Immunology. 163: 3029-3036.
- 38. Corinti S et al (2001). Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. J Immunol;166 (7):4312-8.
- 39. **Coyle AJ** et al (2001). The expanding of B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. Nat Immunol. 2: 203-209
- 40. **Crabtree JE** et al. (1994). CagA/cytotoxic strains of Helicobacter pylori and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines. J. Clin. Pathol. 47:945-50
- 41. **Crabtree JE** et al. (1994). DS. CagA/cytotoxic strains of Helicobacter pylori and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines. J Clin Pathol;47:945-950.
- 42. **Crabtree JE** et al (1991). Mucosal IgA recognition of Helicobacter pylori 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. Lancet;338:332-335.
- 43. **De Jonge R** et al. (2001). The role of Helicobacter pylori virulence factors in interleukin production by monocytic cells. FEMS Microbiol. Lett. 196:235–238.

- 44. **De Smedt TM** et al (1997). Effect of interleukin 10 on dendritic cell maturation and function. Eur J Immunol 27(5): 1229-1235
- 45. **D'Elios MM** et al. (1997). T helper 1 effector cells specific for Helicobacter pylori in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. J Immunol;158:962-967.
- 46. **Dixon G** et al (2001). Dendritic cell activation and cytokine production induced by group B Neisseria meningitidis: interleukin-12 production depends on lipopolysaccharide expression in intact bacteria. Infect. Immun. 69:4351–4357.
- 47. **Dunn BE** et al. (1997). Localisation of Helicobacter pylori Urease and Heat Shock Protein in Human Gastric Biopsies. Infection ans Immunity. Vol 65 No. 4: 1181-1188
- 48. **Dunn BE** et al. (1998). Structure, function and localisation of Helicobacter pylori urease. Yale J Biol Med 71 (2) 63-73
- 49. **Egner R** et al (1993). Tracing Intracellular proteolytic pathways. J Biol Chem 268: 27269-27276
- 50. Ehlers S et al (1991). Differentiation of T cell lymphokine gene expression: in vitro acquisition of T cell memory. J Exp Med 173: 25-36
- Engering AJ et al. (1997). The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. Eur J. Immunol. 27: 2417-25
- 52. Ernst P (1999). Review article: the role of inflammation in the pathogenesis of gastric cancer. Aliment Pharmacol;13 Suppl 1:13-18.
- 53. **Ernst PB** and Gold BD (2000). The disease spectrum of Helicobacter pylori: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. Annu Rev Microbiol; 54:615-640.
- 54. **Fan XJ** et al (1994). Gastric T Lymphocyte responses to Helicobacter pylori in patients with H. pylori colonisation.. Gut, 35: 1379-1384
- 55. **Fanger NA** et al (1996). Type I (CD64) and Type II (CD32) Fc Receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. J of Immunol. 157: 541-548.
- 56. Ferlazzo G et al. (2002). Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. J Exp Med 195: 343.
- 57. Ferlazzo G et al. (2003). The interaction between NK cells and dendritic cells in bacterial infections results in rapid induction of NK cell activation and the lysis of uninfected dendritic cells. Eur. J. Immunol. 33: 306.
- 58. Gajewski TF et al (1996). Tumor rejection requires a CTLA4 ligand provided by the host or expressed on the tumor: superiority of B7-1 over B7-2 for active tumor immunization. J Immunol. Apr 15;156(8):2909-17.
- 59. Goodwin CS et al (1990). Microbiological aspects of Helicobacter pylori (Campylobacter pylori).Eur J Clin Microbiol Infect Dis. (1):1-13
- 60. **Grakoui A** et al (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. Science 285:221
- 61. **Grogan JL** et al. (2002). T helper cell differentiation: on again. Off again. Current Opinion in Immunology. 14: 366-372
- 62. **Grouad G** et al (1996). Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. Nature,; 384: 364-367
- 63. **Guermonprez P** et al. (2002). Antigen presentation and T-cell stimulation by dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. 20:621–667.
- 64. **Guiney DG** et al. (2003). Helicobacter pylori preferentially induces interleukin 12 (IL-12) rather than IL-6 or IL-10 in human dendritic cells. Infect. Immun. 71:4163–4166.

- 65. **Hafsi N** et al. (2004). Human dendritic cells respond to Helicobacter pylori, promoting NK cell and Th1-Effector Responses In Vitro. The Journal of Immunology 173:1249-1257.
- 66. **Hart DNJ** (1997). Dendritic Cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. Blood 90: 3245
- 67. **Hawtin PR** et al (1990). Investigation of the structure and localisation of the urease of Helicobacter pylori using monoclonal antibodies. J Gen Microbiol 136 (Pt 10) 1995-20000
- 68. **Heukeshoven J** et al (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamid gels and the mechanism of silver staining. Electrophoresis 6: 103-112
- 69. **Hoffmann J** et al. (1999):Phylogenetic perspectives in innate immunity, Science (284), 1313-8.
- 70. **Hsieh CS** et al. (1993). Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. Science 260: 547-549
- 71. **Ilver D** et al. (1998). Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. Science 279:373-7
- 72. **Innocenti M** et al. (2001). Helicobacter pylori lipopolysaccharides preferentially induce CXC chemokine production in human monocytes. Infect. Immun. 69:3800.
- 73. Iwasaki A et al (1999). Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells.J. Exp. Med. 190:229
- 74. **Janeway CA** Jr. (1999). The role of self-recognition in receptor repertoire development members of the Janeway Laboratory. Immunol Res 19(2-3): 107-18
- 75. Janeway CA (1989): Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology, Cold Spring Harb Symp Quant Biol (54), 1-13.
- 76. **Jansen JH** et al (1989). Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4. J Exp Med.. 170: 577-582
- 77. Jeannin P et al (2000). OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway. Nat. Immunol.. Dec ;1. (6):502. -9. 1:502-9
- 78. **Jiang W** et al (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithial cells is involved in antigen processing. Nature. 375: 151-5
- 79. Jones AC et al. (1997). A flagellar sheath protein of Helicobacter pylori is identical to HpaA, a putative N-acetylneuraminyllactose-binding hemagglutinin, but is not an adhesin for AGS cells. J. Bacteriol. 179:5643–5647.
- 80. **Kalinski P** et al (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. Immunol. Today 20:561–567.
- 81. **Kamogawa Y** et al. (1993). The relationship of IL-4-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells. Cell 75: 985-995
- 82. **Kaplan et al** (1996). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. Nature 382: 174-177
- 83. **Kaplan MH** et al. (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. Immunity 4 (3) 313-319
- 84. **Kapsenberg ML** (2003).Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nature Immunology 3: 984-993
- 85. Karttunen R et al (1995). Interferon gamma and interleukin 4 secreting cells in the gastric antrum in Helicobacter pylori positive and negative gastritis. Gut.. 36: 341-345
- 86. **Karttunen RA** et al (1997). 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;32:22-27.

- 88. **Kist M** (1991). Isolation and identification of bacteria of the genera Campylobacter and Helicobacter Zentralbl Bakteriol. 276(1):124-39. Review. German. No abstract available.
- Knipp U et al (1994). Suppression of human mononuclear cell response by Helicobacter pylori: effects on isolated monocytes and lymphocytes. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 8:157–166.
- 90. **Kopf M** et al. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks TH2 cytokine responses. Nature 362: 245-248
- 91. Kosunen TU et al (1992). Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of Helicobacter pylori. Lancet;339:893-895.
- 92. Kranzer K et al (2004). Induction of Maturation and Cytokine Release of Human dendritic cells by Helicobacter pylori. Infection and Immunity. Vol. 72 (8): 4416-4423
- 93. Kumiko M et al (2004). Effects of protein transport inhibitor on the distribution and secretion of the fusin protein RntA-EGFP in Aspergillus oryzae. Biosci. Biotechnol. Biochem., 68 (7), 1569-1573
- 94. Lambert MA et al (1987). Differentiation of Campylobacter and Campylobacter-like organisms by cellular fatty acid composition. J Clin Microbiol.;25(4):706-13
- 95. Lander ES et al. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome, Nature (409), 860-921.
- 96. Landmann A et al (2001): Maturation of Dendritic Cells Is Accompanied by Rapid Transcriptional Silensing of Class II Transactivator (CIITA) Expression. J. Exp. Med. Vol. 194, Number 4: 379-391.
- 97. Lanier A et al, (1998). NK cell receptors. Annu Rev Immunol 16: 359-393
- 98. Lanier LL et al (2000). Turning on natural killer cells. J Exp Med. 191: 1259-1262
- 99. Lanier LL et al. (1985). Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3+ t Lymphocytes that express Fc receptors for IgG (CD16/Leu-11 antigen). J Exp Med, 162: 2089
- 100. **Lanier LL** et al. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T Lymphocytes. J. Immunol. 136: 4480-4486.
- 101. **Lanier LL** et al. (1989). Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neutral cell adhesion molecule. J. Exp. Med, 196: 2233-2238
- 102. Lanzavecchia A et al (2001). Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. Nat Immunol, 2: 487-492
- 103. Lanzavecchia A et al. (2001). Regulation of T cell immunity by dendritic cells. Cell 106:263
- 104. **Ledbetter JA** et al (1981). Evolutionary concervation of surface molecules that distinguish T-Lymphocytes helper/inducer and T cytotoxic/suppressor subpopulation in mouse and man. J Exp Med.; 153: 310-323.
- 105. **Lee DH** et al (1998). Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in Saccharomyces cervisiae. Molecular and cellular biology. 30-38
- 106. Lee HJ et al. (2000). GATA-3 induces T helper cell type 2 (TH2) cytokine expression and chromatin remodelling in committed Th1 cells. J Exp Med 2000. 192: 105-115
- 107. Lee SK et al (2003). Helicobacter pylori flagellins have a very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. ELSEVIER,

- 109. Lezzi G et al (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naïve and effector T cells. J Immunity 8: 89
- 110. Liu YJ (2001). Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. Cell; 106 (3):259-62. Review. No abstract available.
- 111. Lundgren A et al. (2003). Helicobacter pylori-Specific CD4+ CD25high Regulatory T Cells Suppress Memory T-Cell Responses to H. pylori in infected Individuals. Inferction and Immunity, 41: 1755-1762
- 112. **Lundstrom AM** et al. (2001). HpaA shows variable surface localization but the gene expression is similar in different Helicobacter pylori strains. Microb. Pathog. 31:243–253
- 113. Luther SA et al (2001). Chemokines as regulators of T cell differentiation. Nt Immunol 2: 102-107
- 114. **Malide D** et al (2001). The export of major histocompatibility complex class I molecules from the endoplasmic reticulum of rat brown adipose cells is acutely stimulated by insulin. Molecular Biology of the cell (12) 101-114
- 115. Mathijs PB et al. (2004). Helicobacter pylori Modulates the T Helper 1/ T Helper Cell 2 Ballance through Phase-variable Interaction between Lipopolysaccharide and DC-SIGN. J Exp Med. 200: 979-990
- 116. **Mattapallil JJ** et al (2000). A predominant Th1 type of immune response is induced early during acute Helicobacter pylori infection in rhesus macaques. GASTROENTEROLOGY;118:307-315.
- 117. **Mattsson A** et al (1998). Antibody-secreting cells in the stomachc of symptomatic Helicobacter pylori-in infected subjects. Infect. Immun. 66: 2705-2712
- 118. **Medzhitov R** et al (2000): Innate immunity, N Engl J Med (343), 338-44.
- 119. **Medzhitov R** et al. (1997): Innate immunity: impact on the adaptive immune response, Curr Opin Immunol (9), 4-9.
- 120. **Megan A Cooper** et al (2001). NK cell and DC interaction. Trends in immunology Vol. 22 No. 11
- 121. **Megan A Cooper** et al (2001). The biology of human natural killer-cell subset. Trends in immunology Vol. 22 No. 11.
- 122. **Melian A** et al (1996) Antigen presentation by CD1 and MHC-encoded class Ilike molecules. Curr Opin Immunol 8 (1): 82-88
- 123. **Meyer F** et al (2000). Modulation of innate cytokine responses by products of Helicobacter pylori. Infect. Immun. 68: 6265–6272.
- 124. **Mohammadi** M et al (1996). 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;156:4729-4738.
- 125. **Molinari M** et al. (1998). Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by Helicobacter pylori toxin VacA. J. Exp. Med. 187:135–140. 165:1022–1029.
- 126. **Morimoto** C et al (1985). The isolation and characterization of human suppressor inducer T-cell subset. J Immunol; 134: 1508-1515
- 127. **Morreta** A et al. (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cells cytolysis. Annu. Rev. Immunol 19: 197-223
- 128. **Morreta** A et al (1991). CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor anpha/beta. J. Exp. Med., 97: 159-66

- 129. **Moser M** et al. (2000). Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. Nat. Immunol, 1: 199.
- 130. **Mullen AC** et al, (2001). Role of T-bet in commitment of Th1 cells befor IL-12 dependet selction. Science. 292: 1907-1910
- 131. **Muotiala A** et al. (1992). Low biological activity of Helicobacter pylori Lipopolysaccharide. Infect. Immun. 60:1714.
- 132. **Newell K** et al. (1989) Antigenes for the serodiagnosis of campylobacter pylori. Gastroenterol. Clin. Biol 13: 37B-41B
- 133. **Nielson H** et al (1994). Neutrophil activation by Helicobacter pylori lipopolysaccharides. J Infect. Dis. 170: 135-139.
- 134. Nitta T et al. (1989). Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural-killer-target-cell interaction. J Exp Med. 170: 1757-1761
- 135. **Norment AM** et al (1988). Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. Nature; 336(6194):79-81.
- 136. O'Doherty U et al (1994). Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. Immunology, 153: 4016-4027
- 137. **O'Toole PW** et al (1995). The putative neuraminyllactose-binding hemagglutinin HpaA of Helicobacter pylori CCUG 17874 is a lipoprotein. J. Bacteriol. 177:6049–6057.
- 138. **Odenbreit S** et al. (2001). Interaction of Helicobacter pylori with professional phagocytes: role of the cag pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. Cell Microbiol. 2001. Jan; 3. (1):21-31. 3:21-31
- 139. **Ozinsky A** et al. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between tool-like receptors. Proc Natl Acad Sci USA, 97(25): 13766-71
- 140. **Parrello T** et al (2000). Up-regulation of the IL-12 receptor beta 2 chain in Crohn's disease. J Immunol;165:7234-7239.
- 141. **Patel BKR** et al. (1998). Regulation of Interleukin 4 mediated signalling by naturally occurring dominant negative and attenuated forms of human Stat6. Proc Natl Acad Sci USA 95: 172-177
- 142. **Paul WE** and RA Seder. (1994). Lymphocytes responses and cytokines. Cell. 76: 241-251
- 143. **Penfold SS** et al. (1988), 157(4):850-1. No abstract available.
- 144. **Peretti J** et al (2001): Expression of the three human major histocompatibility complex classe II isotypes exhibits a differential dependence on the transcription factor RFXAP. Mol Cell Biol, 21 (17) : 5699-5709.
- 145. **Perez-Perez GI** et al (1989). Diagnosis of Campylobacter pylori infection by serologic methods. Blaser M. J. Med
- 146. **Peters JH** et al (1993). Signals requiered for differentiation of dendritic cells from human monocytes in vitro. Adv Exp Med Biol; 329: 275-80
- 147. **Pickl WF** et al (1996). Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. J Immunol; 157: 3850-9
- 148. **Pietschmann P** et al (2000). Functional and phenotypic characteristics of dendritic cells generated in human plasma supplemented medium. Scand. J. Immunol. 51, 377-383.
- 149. **Presky DH** et al (1996). A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. Proc Natl Acad Sci U S A;93:14002-14007.

- 151. **Prinz C** et al. (2001). Key importance of the Helicobacter pylori blood group antigen binding adhesin for chronic gastric inflammation. Cancer Res. 61:1903-9
- 152. **Pruul H** (1989) Hydrophobisc characterization of campylobacter pylori Excerpta. Medica., Amsterdam: 379-383
- 153. **Pulendran B** et al. (1997). Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localisation of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. J. Immunol. 159: 2222
- 154. **Qureshi N** et al (2003). The proteasome as a lipopolysaccharide-binding protein in macrophages: Differential effects of proteasome inhibition on lipopolysaccharide-induced signalling events. The journal of immunology (171) 1515-1525
- 155. **Ramarao N** et al. (2000). Helicobacter pylori inhibits phagocytosis by professional phagocytes involving type IV secretion components. Mol. Microbiol. 2000. Sep; 37. (6):1389. -404. 37:1389-404
- 156. **Ramarao N** et al. (2001). Resists phagocytosis by macrophages: quantitative assessment by confocal Helicobacter pylori microscopy and fluorescence-activated cell sorting. Infect. Immun. 2001. Apr. ;69. (4.):2604. -11. 69:2604-11
- 157. Reid CD et al. Interaction of tumor necrosis factor with granulocytemacrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors human bone marrow. 1992. J Immunl. 149: 2003-2016
- 158. **Rescigno M** et al (2001): The Host-Pathogen Interaction: New Themes from Dendritic Cell Biology. Cell, Vol. 106, 267-270, August 10, 2001.
- 159. **Rescigno M** et al. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. Nat. Immunol. 2:361–367. pathway. J. Immunol. 158:2919–2925.
- 160. **Risso A** et al. (1991). CD69 in resting and activated T lymphocytes. Its association with a GTP binding protein and biochemical requirements for its expression. J. Immunol 146(12) 4105-14
- 161. **Robertson MJ** and Ritz J. (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. Blood 76: 2421-2438
- 162. **Rocken M** et al. (1992). A common precursor for CD4+ T cells producing IL2 and IL4. J Immunol 148: 1031-1036
- 163. **Rogge L** et al (1997). Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. J Exp Med;185:825-831.
- 164. **Rubartelli** A et al. (1997). The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells in mediated by the alpha (v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium. Eur J Immunol. 27: 1893-900
- 165. Sad S et al. (1995). Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+Tcells into Cytokine CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. Immunity 2: 271-279
- 166. **Sallusto F** et al (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultred human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and downregulated by tumor necrosis alpha. J Exp Med; 179: 1109-18
- 167. Sallusto F et al (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha J Exp Med. 179: 1109-18

- 168. Schagger H et al (1988). Coomassie blue-sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. Anal Biochem. 173(1):201-5.
- 169. **Scheinecker** C et al. (2002). Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. J. Exp. Med. 196:1079–1090.
- 170. Schweitzer AN et al (1997) Role of costimulators in T cell differentiation studies using antigen-presenting cells lacking expression of CD80 or CD86. J. Immunol. 158, 2173-2722
- 171. Schweitzer AN et al (1998) Studies using antigen-presenting cells lacking expressing of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production. J. Immunol. 161, 2762-2771
- 172. **Seder RA** et al. (1992). The presence of IL4 during priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. J Exp Med 176: 1091-1098
- 173. Seder RA et al. (1993). Interleukin 12 acts directly on CD4+T cells to enhance priming for interferon γ production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. Proc Natl Acad Sci USA 90: 10188
- 174. Seder RA et al. (1994). CD28-mediated costimulation of Interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and Interferon γ production. J Exp Med 179:299-304
- 175. **Shimazu R** et al., (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. J Exp Med, 189 (11): 1777-82
- 176. **Shimoyama T** and Crabtree JE (1998). Bacterial factors and immune pathogenesis in Helicobacter pylori infection. GUT; 43 Suppl 1:S2-S5.
- 177. **Simmons DL** et al (1989). " Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchores membrane protein", Blood 73 (1) : 284-289
- 178. **Smith MF** et al (2003). Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for helicobacter pylori-induced NFκB activation and chemokine expression by epithelial cells. J. Biol. Chem. 278:32552–32560
- 179. **Smythies LE** et al (2000). Helicobacter pylori-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN-gamma, gene-deficient mice. J Immunol;165:1022-1029.
- 180. Sommer F et al. (1998). Antrum- and corpus mucosa-infiltrating CD4+lyphocytes in Helicobacter pylori gastritis display a Th1 phenotyp. Infect. Immun. 66:5543-5546
- 181. **Stassi G** et al. (2002). Different modulation by live or killed Helicobacter pylori on cytokine production from peripheral blood mononuclear cells. New Microbiol. 25:247–252.
- 182. **Steinman RM** (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity Annu Rev Immunol
- 183. **Stober D** et al (2002). Dendritic cells pulsed with exogenous hepatitis B surface antigen particles efficiently present epitopes to MHC class I-restricted cytotoxic T cells. Eur. J. Immunol, 32: 1099-1108
- 184. Suerbaum A and P Michetti (2002). Helicobacter pylori infection. N. Engl. J. Med. 347 : 1175-1186
- 185. Suerbaum S et al (1993). Cloning and genetic characterization of the Helicobacter pylori and Helicobacter mustelae flaB flagellin genes and construction of H. pylori flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. J Bacteriol. Jun;175(11):3278-88.

- 186. Suhas H P et al (1996). Surface localisation of Helicobacter pylori Urease and Heat shock Protein Homolog Requires Bacterial Autolysis. Infection and Immunity. Vol 64, No. 3: 905-912
- 187. Suzuki N et al (1991). Evidence for the involvement of CD56 molecules in alloantigenspecific recognition by human natural killer cells. J Exp Med. 173: 1451-1461
- 188. **Szabo SJ** et al. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. Cell 100: 655
- 189. **Szabo SJ** et al. (1997). Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. J Exp Med;185:817-824.
- 190. **Szabo SJ** et al. (2003). Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. Annu Rev Immunol; 21:713-758.
- 191. **Takeuchi O** et al., 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. Int Immunol, 13(7): 933-40
- 192. **Takeuchi O** et al. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. J Immunol. 169(1): 10-14
- 193. **Taylor DE** (1992) Genetic of Campylobacter and Helicobacter. Annu. Rev. Microbiol., 46: 35-64
- 194. **Testi R** et al (1988). Constitutive expression of a phosphorylated activation antigen (Leu23) by CD3bright human thymocytes. J. Immunol. 141(8): 2557-63.
- 195. **Testi R** et al (1989). T cell activation via Leu-23 (CD69). J Immunol 143 (4) : 1123-8
- 196. **Testi R** et al (1990). CD69 is expressed on platelets and Mediates platelet activation and aggregation. J Exp. Med 172(3): 701-7
- 197. **Thomas R** et al. Human peripheral blood dendritic cell subsets: isolation and characterization of precursor and mature antigen-presenting cells. J. Immunol. 1994; 153: 4016-4027
- 198. **Towbin H** et al (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.Proc Natl Acad Sci U S A ;76(9):4350-4
- 199. **Tummuru MK** et al (1995). Helicobacter pylori picB, a homologue of the Bordetella pertussis toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. Mol Microbiol; 18:867-876.
- 200. **Ulf Yrlid** et al (2002). Antigen presentation capacity and cytokine production by murine splenic dendritic cell subset upon Salmonella encounter. The Journal of Immunology, 169:108-116
- 201. **Valitutti S** et al (1995). Sustained signaling leading to cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy: role of T cell actin cytoskeleton. J Exp Med 181:577
- 202. Verhasselt V et al (1997). Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. J. Immunol. 158:2919–2925.
- 203. Voland P et al (2002). Specific identification of three low molecular weight membrane-associated antigens of Helicobacter pylori. Aliment Pharmacol Ther. 16 (3):533-44.
- 204. **Voland P** et al. (2003).Antigenic properties of HpaA and Omp18, two outer membrane proteins of Helicobacter pylori. Infect. Immun. 71:3837–3843.
- 205. **Voss SD** et al (1998). Paticipation of CD94 receptor complex in costimulation of human natural killer cells. J Immunol 160: 1618-1626.

- 206. **Warren JR** and Marshall BJ. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 4: 1273-1275
- 207. **Wilson KT** et al (1996). Helicobacter pylori stimulates inducible nitric oxide synthase expression and activity in a murine macrophage cell line. Gastroenterology. 1996 Dec;111(6):1524-33
- 208. **Xiang Z** et al. (1995). Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of Helicobacter pylori reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. Infect. Immun. 63:94-8
- 209. **Yamaoka Y** et al (1996). Helicobacter pylori cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. GASTROENTEROLOGY; 110:1744-1752.
- 210. **Yamaoka Y** et al (1997). Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive Helicobacter pylori strains. GUT; 41:442-451.
- 211. **Yang BB** et al (1996). The requirement for proteasome activity in class I mahorhistocompatibility complex antigen presentation is dictated by the length of preprocessed antigen. J. Exp. Med., (183) 1454-1552
- 212. **Yoshimura** S et al (2001). Role of NF κ B in antigen presentation and development of regulatory T cells elucidated by treatment of dendritic cells with the proteasome inhibitor PSI. Eur. J. Immunol (31) 1883-1893.
- 213. **Young HA** et al. Differentiation of the T helper phenotypes by the analysis of the methylation state of the IFN- γ gene. J. Immunol 1994. 153: 3603
- 214. **Zhang M** et al (1999). Expression of the IL-12 receptor beta 1 and beta 2 subunits in human tuberculosis. J Immunol;162:2441-2447.
- 215. **Zhou LJ** et al (1995). Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. J immunol 154 (8): 3821-3835