

**Aus der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und
Transplantationschirurgie Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Königsrainer**

**VacA vom Helicobacter pylori
induzierte Zell - Zyklus - Arretierung
am Modell der Jurkat-Zelle**

**INAUGURAL DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Jörg Plauschin
aus
Dundee/Südafrika**

2008

**Aus der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und
Transplantationschirurgie Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Königsrainer**

**VacA vom Helicobacter pylori
induzierte Zell - Zyklus - Arretierung
am Modell der Jurkat-Zelle**

**INAUGURAL DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Jörg Plauschin
aus
Dundee/Südafrika**

2008

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. J. Sessler

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. G. Lamprecht

meiner Tochter Jamila Deborah

Ich kann singen, reden, lachen,
sogar mal dumme Sachen machen.
Jesus schützt mich, hilft und schaut,
deshalb sing ich – und zwar laut !
Was bin ich wohl?

Ich bin ein Kind, na sonnenklar!
Du kannst mir´s glauben, es ist war:
Gott machte mich ganz wunderbar!

Rose Williams „Was bin ich wohl?“
in Anlehnung an Psalm 139,14

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	5
1.1 Helicobacter pylori	9
1.1.1 Vorkommen	10
1.1.2 Prävalenz und geographische Verteilung	10
1.1.3 Übertragung und Infektionsquelle.....	11
1.1.4 Mögliche Erkrankungen.....	11
1.1.5 Atrophische Gastritis, intestinale Metaplasie und Magenkarzinom.	12
1.1.6 MALT (mucosa associated lymphoid tissue) Lymphom.....	13
1.1.7 Refluxkrankheit - GERD (gastroesophageal reflux disease)	14
1.1.8 Extragastrale Störungen.....	14
1.1.9 Diagnose	14
1.1.10 Therapie	15
1.1.11 Impfungen	15
1.1.12 Fragen nach symbiotischen Wechselwirkungen.....	16
1.1.13 Tiermodelle im Labor.....	16
1.1.14 Reaktionen des Immunsystems.....	17
1.1.15 Adaptative Immunantwort über Monozyten und Th ₁ Lymphozyten.	18
1.1.16 Aktivierung der angeborenen Immunantwort.....	18
1.1.17 Abwehr der Phagozytose und Modulation der Dendritischen Zellen	19
1.1.18 Regulatorische T-Zellen	20
1.1.19 Bedeutung des genetischen Polymorphismus beim Wirt.....	20
1.1.20 Interleukin-1 (IL-1)	20
1.1.21 Interleukin-8 (IL-8)	21
1.1.22 Weitere Zytokine.....	21
1.1.23 Virulenzfaktoren.....	22
1.1.24 Säuretoleranz	23

1.1.25	Adhäsine und äußere Membranproteine	23
1.2	Das Vakuolisierende Zyto-Toxin A (VacA)	25
1.2.1	Die Struktur des VacA Gens und seine Synthese	26
1.2.2	Die Wirkung von VacA auf Epithelzellen	27
1.2.3	VacA Bindung an Rezeptoren und / oder lipid rafts	28
1.2.4	Bildung von sauren Vacuolen	29
1.2.5	H. pylori und Apoptose	30
1.2.6	VacA als Auslöser der mitochondrialen Apoptose	31
1.2.7	VacA Wirkung auf die Zellen des Immunsystems.....	32
1.2.8	VacA Wirkung auf Epithelzellen und tight junctions.....	34
1.2.9	Interaktion mit Granulozyten, Monozyten und Makrophagen	35
1.2.10	VacA Einfluß auf den Kalziumspiegel in Mastzellen und Lymphozyten	35
1.2.11	Interaktion von H. pylori mit B-Zellen und Beeinflussung der Antigenprozessierung durch VacA	36
1.2.12	Immunsuppressive Wirkung von VacA	36
1.2.13	VacA hemmt die Aktivierung nativer T-Zellen.....	37
1.2.14	VacA hemmt die Proliferation von T-Lymphozyten und Jurkat-Zellen	38
1.2.15	Immunsuppression und proinflammatorische Aktivität von VacA ...	40
1.3	Ziele dieser Studie	41
2	MATERIAL UND METHODEN	43
2.1	Jurkat-Zellen als Untersuchungsmodell.....	43
2.1.1	Allgemeine Bemerkungen zu den Jurkat-Zellen	43
2.1.2	Kultivierung der Jurkat-Zellen	43
2.1.3	Rezeptur des Kulturmediums für die Jurkat-Zellen.....	44
2.1.4	Optimierung des Nährmediums und der Zelldichte.....	44
2.2	Zellfreie Extrakte als Untersuchungsgröße.....	44
2.2.1	Gewinnung der zellfreien Überstände	45

2.3	Durchführung des experimentellen Ansatzes in der Well-Platte.....	45
2.3.1	Allgemeines Beimpfungs-Schema.....	45
2.3.2	5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU).....	48
2.4	Variationen des Experimentaufbaus.....	49
2.4.1	Säureaktivierung der Überstände.....	49
2.4.2	Serumdeprivation	50
2.4.3	Mitogene Stimuli.....	51
2.5	Zeitversetzte Ernte.....	52
2.6	Erster Teil der Aufarbeitung	52
2.7	Zweiter Teil der Aufarbeitung	53
2.7.1	Versuchslösungen für die Aufarbeitung, Teil II	54
2.7.2	Aufreinigung in Einzelschritten	55
2.7.3	Denaturierung der doppelsträngigen DNA.....	55
2.7.4	Anfärben der DNA	56
2.7.5	Ribonuklease A (RNase A).....	57
2.7.6	Antikörper 1 (Anti-BrdU Antikörper)	57
2.7.7	Antikörper 2 (Anti-Maus Antikörper)	57
2.7.8	Propidium Jodid (PI)	58
2.7.9	5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) Negativ-Probe	58
2.8	Messung im Durchfluß-Zytometer (FACS)	58
2.8.1	Das FACS - Allgemein.....	59
2.8.2	Fluss- und Transporteinheit.....	59
2.8.3	Messeinrichtung	59
2.8.4	Datenspeicherung mit dem 5-Parameter-List-Mode.....	60
2.8.5	Prinzip der BrdU-freien G ₁ -Analyse am Zytometer	60
2.9	Liste der Verbrauchsmaterialien	65
3	ERGEBNISSE.....	66

4	DISKUSSION.....	82
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	89
6	ANHANG	91
6.1	Tabellen zu den BrdU-freien G₁-Populationen, aufgeschlüsselt nach Einzelmessungen	92
6.2	Literaturverzeichnis.....	106
6.3	Abkürzungen.....	139
6.4	Danksagung	147

1.1 Helicobacter pylori

Bereits 1899 wurde von spiralförmigen Mikroorganismen im menschlichen Magen berichtet (Pel, P.K. 1899). Hielt man die Keime über Jahrzehnte für Verunreinigungen aus der Nahrung (Kusters et al. 2006), so berichteten Marshall und Warren 1984 von ihren Arbeiten am *Camphylobacter pylori*: „Aus 11 Biopsien konnte ein gramnegatives, begeißeltes und microaerophiles Bakterium isoliert und kultiviert werden. Es scheint sich um eine neue, mit der Familie der *Camphylobacter* verwandte Spezies zu handeln. Das Bakterium konnte in fast jedem Patienten mit aktiver chronischer Gastritis, Ulcus duodeni oder Magenschleimhautulzera gefunden werden. Möglicherweise stellt es einen entscheidenden ätiologischen Faktor für diese Erkrankungen dar“ (Marshall et Warren 1984). Gezielte Selbstversuche zeigten das Bakterium kann sich im menschlichen Magen ansiedeln und eine Entzündung der Schleimhaut auslösen (Marshall et al. 1985). Nachdem Goodwin *Camphylobacter pyloridis* der neuen Gattung *Helicobacter* zugeordnet hatte (Goodwin, H.G. 1994), ehrte das Nobelkomitee die Forschungen von Warren und Marshall 2005 mit dem Nobelpreis für Medizin. Ihre Erkenntnisse haben das Bild der chronischen Gastritis und der Ulkusleiden grundlegend gewandelt. Die Kombinationstherapie mit Antibiotika und H₂-Blocker verdrängte zunehmend die Operation im therapeutischen Procedere. In der Zwischenzeit wird an wirksamen Impfstrategien geforscht.

1.1.1 Vorkommen

Der Mensch ist der einzige natürliche Wirt für *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Verschiedenste Virulenzfaktoren befähigen das Bakterium die Magenschleimhaut zu kolonisieren. Dies geschieht trotz eines niedrigen pH Wertes, wiederkehrender Peristaltik (Covacci et al. 1999) und einer hochfrequenten Epithelerneuerung (Lu et al. 2005 a). Ein kurzfristiges Überleben bei pH Werten < 4 ist möglich, doch wächst und vermehrt sich das Bacterium nur im pH Bereich von 5,5 bis 8, wobei das Optimum bei pH 7 liegt (Scott et al. 2002). Mit seinen 6 bis 8 Flagellen kann es aktiv neutrale Bereiche an der Epitheloberfläche aufsuchen (O'Toole et al. 2000). Eine ausgeprägte genetische Plastizität ermöglicht *H. pylori* die Anpassung an Veränderungen seines Lebensraums und wirtsspezifische Immunreaktionen (Krauss-Etschmann et al. 2003; Kuipers et al. 2000). Einige Forscher bezeichnen diese Anpassungsleistung als ein Beispiel für Mikroevolution (Aviles-Jimenez et al. 2004). Obwohl der menschliche Körper spezifisch auf eine *H. pylori* Infektion reagiert, etabliert sich eine lebenslange chronische Infektion (Krakowka et al. 1998) ohne Anstieg der allgemeinen Entzündungsparameter (Zumkeller et al. 2005). In seltenen Fällen scheinen Kinder die Infektion ohne Medikamententherapie zu überwinden (Thomas et al. 1999).

1.1.2 Prävalenz und geographische Verteilung

In Abhängigkeit von hygienischen Standards unterliegt die Prävalenz für *H. pylori* großen Schwankungen. In einigen Entwicklungsländern beträgt die Durchseuchungsrate mehr als 80 % (Perez-Perez et al. 2004). In den Industriestaaten liegt sie unter 40 % (Pounder et al. 1995) und nimmt weiter ab aufgrund der weit verbreiteten Medikamententherapie, verbesserter persönlicher Hygiene und sanitärer Einrichtungen, die einer Reinfektion vorbeugen (Ahmed et Sechi 2005). Insgesamt lässt sich eine Abhängigkeit von sozialem Status und Infektionsrate während der Kindheit beobachten (Malaty et Graham 1994 a). Bei 5- bis 8-jährigen Schulkindern in Deutschland findet sich

eine Prävalenz von 12,3 % (Rothenbacher et al. 2000), die bei einem Migrationshintergrund zunimmt (Krauss-Etschmann et al. 2003).

1.1.3 Übertragung und Infektionsquelle

Mehrfachinfektionen mit bis zu drei genetisch unterschiedlichen H.-pylori-Stämmen sind keine Seltenheit (Chen et al. 2005), wobei der genaue Infektionsweg unbekannt ist. Bedenkt man die spezifische Adaptation an den menschlichen Magen (Kusters et al. 1997), so ist die direkte Infektion im zwischenmenschlichen Kontakt die wahrscheinlichste (Kusters et al. 2006). Als wichtigste Infektionsquelle in der frühen Kindheit nimmt man enge Familienmitglieder an (Mourad-Baars et al. 2007; Rowland et al. 2006). Unterstützend werden wirtsspezifische Faktoren (Malaty et al. 1994 b) und diätetische Komponenten (Fox et al. 1999; Ohno et al. 2003) diskutiert.

1.1.4 Mögliche Erkrankungen

Obwohl histologisch die H. pylori Infektion immer eine Gastritis auslöst, entwickeln nur 10 bis 20 % der Patienten Ulzera (Ernst et Gold 2000) und bei 1 – 2 % muß die Entwicklung eines Magenkarzinoms angenommen werden (Kuipers, E.J. 1999). Die Manifestation klinischer Symptome hängt aber auch von Cofaktoren ab, z.B. genetische Ausstattung des Wirts (Hamlet et al. 1999) oder Ernährungsgewohnheiten.

Die akute H. pylori induzierte Gastritis ist oft mit einer Hypochlorhydrie, die über Monate anhalten kann, assoziiert.

Im Zuge der chronischen Gastritis vom Typ B kommt es zu Wechselwirkungen zwischen Bakterienbefall, Schleimhautentzündung und säuresekretierenden Abschnitten. Im Falle einer antrumbetonten Gastritis mit limitierter chronischer inaktiver Infektion bleibt die Säureproduktion erhalten. Dagegen steigt bei gleichmäßiger Besiedelung von Corpus und Antrum ventrikuli der pH gegen 6 (Kuipers et al. 1995 b). Die gestörte Säurebildung wird mit einer hemmenden

Wirkung von Entzündungsfaktoren wie IL-1 β auf die Belegzellen erklärt. Weiter hängt das Ausmaß der Symptome auch vom apoptotischen Potential des Keims ab (Cover et al. 2003).

H. pylori ist weltweit für ca. 95 % aller *Ulcus duodeni* Erkrankungen und 85 % aller *Ulcus ventriculi* Erkrankungen verantwortlich (Kuipers et al. 1995 a). Umfangreiche Untersuchungen identifizierten im Bakteriengenom das *dupA* (duodenal ulcer promoting) Gen mit einer signifikanten Korrelation zum *Ulcus duodeni* (Lu et al. 2005 d).

Darüber hinaus wird dem Antigen *VacA* bei der Pathogenese der peptischen Ulzera eine entscheidende Rolle zugeschrieben (Wada et al. 2004). Die kausale Verknüpfung zwischen Erreger und Erkrankung bestätigte sich mit Einführung der Eradikationstherapie (Rauws et Tytgat 1990). Seither sind *Ulcus*komplikationen wie Blutungen, Perforationen sowie Narben- und Strikturbildungen im Bereich des oberen Gastrointestinaltraktes stetig zurückgegangen (Gisbert et al. 2004) und Operationen mit ihren typischen Risiken stellen nur noch eine weitere Therapieoption dar.

1.1.5 Atrophische Gastritis, intestinale Metaplasie und Magenkarzinom

Die chronische *H. pylori* induzierte Entzündung kann zu einem Verlust der physiologischen Mucosaarchitektur mit Zerstörung der Drüsen, fibrotischem Umbau und Ausbildung von intestinalem Epithel führen. Ungefähr die Hälfte aller Infizierten entwickelt diese Form der atrophischen Gastritis mit intestinaler Metaplasie (Kuipers et al. 1995 c). Bei gestörter Säureproduktion ist der Krankheitsverlauf beschleunigt (Kuipers et al. 1996) mit einem vielfach erhöhten Risiko der malignen Entartung (Sipponen et al. 1985). Bereits vor Entdeckung des *H. pylori* wurde die atrophische Gastritis als Risikofaktor für das Magenkarzinom diskutiert (Correa, P. 1982). Nachdem mehrere epidemiologische Untersuchungen wiederholt diese Assoziation herausgearbeitet hatten, stufte die International Agency for Research on Cancer (IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994) der WHO das Bakterium als Karzinogen erster Ordnung ein (Asaka et al. 1998). So korreliert

z. B. der Anti-H.-pylori IgG-Titer hoch signifikant mit dem Risiko für das Magenkarzinom (Yamaoka et al. 1999). Die Infektion wird sowohl mit dem intestinalen wie auch diffusen Typ in Verbindung gebracht (Sugiyama et al. 2002). Uemura et al. untermauerten die Einschätzung zum Entartungsrisiko in einer langzeit endoskopischen prospektiven follow-up Studie (Uemura et al. 2002). In Japan waren 1993 von 60 Millionen mit H. pylori Infizierten Menschen 235 000 am Magenkarzinom erkrankt (Asaka et al. 1998). In der letzten Zeit wurde das Entartungsrisiko weiter differenziert z. B. in Abhängigkeit davon, ob H. pylori cagA positiv ist (Parsonnet et al 1997), der Wirt genetisch eine Disposition zur gesteigerten IL-1 Produktion hat (El-Omar et al. 2000) oder welcher Abschnitt des Magens befallen ist. Im Falle eines Ulcus ventriculi besteht ein erhöhtes Risiko, während bei einem Ulcus duodeni das Entartungsrisiko unverändert ist (Take et al. 2005). Für das colorectale Karzinom vermutet man ein leicht erhöhtes Risiko im Zusammenhang mit einer H. pylori Infektion (Zumkeller et al. 2006).

Die Modellvorstellung zur Pathogenese des Magenkarzinoms geht auf Correa et al. zurück (Correa et al. 1975). Sie nehmen an, daß als Folge einer fehlgeleiteten Entzündungsreaktion Th₁ Lymphozyten reaktiv die Mucosa infiltrieren, dort Sauerstoffradikale bilden und in den Epithelzellen über multiple Mutationen die Krebskaskade aktivieren.

1.1.6 MALT (mucosa associated lymphoid tissue) Lymphom

Im Falle einer chronischen Infektion kommt es in weniger als 1 % zur Bildung eines MALT-Lymphoms, eines niedrig malignen B-Zell-Lymphoms (Parsonnet et Isaacson 2004). Physiologisch findet sich in der Magenschleimhaut kein lymphatisches Gewebe. Dagegen kommt es nach Besiedelung durch H. pylori regelmäßig zur Ausbildung knotenförmiger Ansammlungen lymphatischer Zellen (MALT). Die H. pylori Infektion unterhält durch immunologische Stimulation die Proliferation aktivierter B-Zellen (Ahmad et al. 2003). Aktivierte Neutrophile können über freie Sauerstoffradikale Genveränderungen und maligne Transformationen in den aktivierten B-Zellen verursachen. Trisomie 3

oder Instabilitäten der Satelliten sind in Bezug auf ihre clonare Expansion von einer kontinuierlichen *H. pylori*-Stimulation abhängig. Deshalb kann im Frühstadium der Erkrankung die Eradikationstherapie zur vollständigen Remission führen (Du et Isaccson 2002). Im fortgeschrittenen Stadium bewirken zusätzliche Genveränderungen eine *H. pylori* unabhängige Expansion.

1.1.7 Refluxkrankheit - GERD (gastroesophageal reflux disease)

Sah man lange keinen Zusammenhang zwischen einer *H. pylori* Infektion und dem Auftreten der Refluxerkrankung (Werdmuller et Loffeld 1997), so belegen neuere Studien eine negative Korrelation (Fallone et al. 2000). Das Bakterium scheint seinen Wirt vor einer GERD zu schützen. Unterstützt wird diese These durch gehäuftes Auftreten von Refluxsymptomen im Anschluß an eine Eradikationstherapie (Labenz et al. 1997). Doch wird diese Frage noch immer kontrovers diskutiert (Vakil et al. 2000).

1.1.8 Extragastrale Störungen

Seit einigen Jahren werden immer wieder Vermutungen geäußert, *H. pylori* könne über kreuzreagierende Antikörper für Autoimmunerkrankungen verantwortlich sein (Gasbarrini et al. 2004). Im Falle der Thrombozytopenie purpura haben mehrere klinische Studien eine Verbesserung der Thrombozytenzahl nach einer Eradikationstherapie belegt (Suzuki et al. 2005).

1.1.9 Diagnose

Im klinischen Alltag haben sich drei Nachweisverfahren als sicher und praktikabel etabliert. Nach einer Gastroskopie mit Gewinnung einer Gewebeprobe kann der Erreger spezifisch durch Anzucht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse korrelieren sehr gut mit dem Urease-Schnelltest am

Biopsat oder histologischen Färbungen. Als nichtinvasives Verfahren steht der ^{13}C -Urease-Atemtest zur Verfügung (Hirschl, A.M. 2000). Dabei wird nach einer Testmahlzeit das nichtradioaktive Isotop ^{13}C in der Ausatemluft gemessen. Im Rahmen von epidemiologischen Studien kommt häufig ein serologischer Antikörper Suchtest zur Anwendung (Zagari et al. 1999).

1.1.10 Therapie

Die *H. pylori* Infektion wird heute meistens nach dem Italienischen-Tripel-Schema mit einem Protonenpumpeninhibitor und zwei Antibiotika über eine Woche behandelt. Die gebräuchlichsten Antibiotika sind Tetracykline, Amoxicilline und Imidazole (Megraud et Lamouliatte 2003). Beim Französischen-Quadripel-Schema wird ergänzend noch Wismut verabreicht. Warum Wismut, das Pei schon 1899 in der Gastritistherapie einsetzte, wirksam ist, kann bis heute nicht erklärt werden. Die Eradikationsquote liegt für beiden Schemata ohne signifikanten Unterschied knapp über 80 %. Das zunehmende Auftreten von resistenten Stämmen wird mit dem verbreiteten Einsatz von Antibiotika und dem daraus erwachsenden Selektionsdruck auf die Bakterien erklärt (Megraud, F. 2004) mit Herausbildung von Punktmutationen (Rüssmann et al 2001).

1.1.11 Impfungen

H. pylori löst beim Menschen eine ineffektive Th_1 betonte Immunreaktion aus. Neuere Impfkonzepte versuchen, die Th_2 CD4^+ betonte Immunreaktion zu aktivieren. Nach der Entwicklung erfolgreicher Impfkonzepte an der Mäusen (Lee et al. 1995; Rizos et al. 2003) werden jetzt erste klinische Studien durchgeführt (Volland et al. 2006).

1.1.12 Fragen nach symbiotischen Wechselwirkungen

Immer wieder wird die Vermutung geäußert, die Besiedelung mit *H. pylori* habe auch einen protektiven Effekt. Der Nachweis von Proteinen mit antibiotischer Potenz, die von *H. pylori* sezerniert werden, könnte ein Hinweis in diese Richtung sein (Bumann et al. 2002; Pütsep et al. 1999). Konkret wird auf einen Schutz vor gastrointestinalen Infektionen und Diarrhoen verwiesen (Rothenbacher et al. 2000). Ist der Bakterienbefall gleichmäßig über das Corpus ventriculi verteilt, werden die Belegzellen gehemmt und der pH des Magens steigt an. Das scheint die Patienten vor einer Refluxerkrankung zu schützen (Fallone et al. 2000).

Bakterium und Mensch verbindet eine lange Phase der Koexistenz. Die Angaben der Forscher schwanken zwischen 60.000 (Linz et al. 2007) und mehr als 200.000 Jahren (Eppinger et al. 2006). Deshalb wird von einigen Autoren zumindest die Möglichkeit einer Symbiose in Betracht gezogen. Die Debatte zur Co-Evolution wurde durch Studien intensiviert, die im Anschluß an eine Eradikationstherapie eine steigende Inzidenz der Refluxerkrankung (GERD), des Barrett-Ulkus und des Adenokarzinom am Ösophagus berichteten (Ahmed et Sechi 2005). Einige Ergebnisse lassen tatsächlich an ein symbiotisches Verhältnis zwischen Bakterium und Wirt denken. Wird die *H. pylori* Infektion von einem enteralen Wurmbefall begleitet, zeigen die *H. pylori* assoziierten Symptome eine geringere Ausprägung (Du et al. 2006; Fox et al. 2000; Macdonald, T.T. 2001).

1.1.13 Tiermodelle im Labor

Da der Mensch der einzige natürliche Wirt für *H. pylori* ist, stufen einige Autoren die Ergebnisse am Tiermodellen als unbefriedigend ein (Pritchard et Przemack 2004).

Die Labormaus stellt mit ihren vielen knockout Stämmen das gebräuchlichste Tiermodell dar (Kodama et al. 2004). *H. pylori* induziert in der Maus neben einer lymphozytären Gastritis keine Ulzera oder malignen Entartungen. Da die Maus

kein natürlicher Wirt ist, stellt schon die dauerhafte Ansiedelung ein technisches Problem dar.

Erste Berichte über die erfolgreiche und chronische Infektion der mongolischen Wüstenspringmaus (Yokota et al. 1991) waren vielversprechend. *H. pylori* induziert peptische Ulzera, intestinale Metaplasien und Adenokarzinome (Franco et al. 2005). Doch im Gegensatz zur Labormaus ist dieses Modell nicht so gründlich erforscht.

Der Magen des Meerschweinchens ähnelt in vielen Aspekten dem des Menschen (Keenan et al. 2003), entwickelt aber bei chronischer *H. pylori* Infektion nur eine Gastritis und keine weiteren, für den Menschen typischen Pathologien. An gnotobiotischen Ferkeln (Ferkel, deren Keimflora definiert und bekannt ist), deren Anatomie und Physiologie dem Menschen sehr verwandt sind, wurden viele Experimente zur Vaccinierung (Eaton et al. 1998) und Antibiotikatherapie (Krakowka et al. 1998) durchgeführt. Obwohl Ferkel unter einer *H. pylori* Infektion Gastritis, Ulzera und MALT Lymphome entwickeln, werden sie in den letzten Jahren nur noch selten eingesetzt. Ebenso wie Rhesusaffen, die eine Th₁ betonte atrophische Gastritis ausbilden. Nach einigen Studien zur Antibiotikatherapie (Dubois et al. 1998 a) und Vaccinierung (Dubois et al. 1998 b) an Rhesusaffen konzentriert man sich heute weitestgehend auf Mäuse.

1.1.14 Reaktionen des Immunsystems

Berichte über *H. pylori* Antikörper in der Muttermilch von infizierten Gepardinnen und den Infektionsschutz ihrer gesügten Nachkommen (Thomas et al. 2004) weckten Hoffnungen auf einen ähnlichen Schutzmechanismus beim Menschen. Allerdings stellte sich dann heraus, dass dieser Infektionsschutz auf das Tiermodell beschränkt ist (Nomura et al. 2005).

1.1.15 Adaptative Immunantwort über Monozyten und Th₁ Lymphozyten

Ein Grossteil der mit der Infektion assoziierten Pathologien werden durch die Immunreaktion und nicht vom Bakterium verursacht (Kusters et al. 2006). *H. pylori* scheint auf der einen Seite das Immunsystem zu hemmen und gleichzeitig die proinflammatorische Kaskade zu aktivieren. Die Übertragung von unfraktionierten Milzzellen von *H. pylori* positiven Mäusen auf negative Mäuse induziert in diesen eine Gastritis und intestinale Metaplasie (Eaton et al. 2001). Das legt die Vermutung nahe, dass die *H. pylori* induzierten Pathologien zum Teil durch reaktive T-Zell verursacht werden. Die Aktivierung nativer T-Zellen ist von IL-12 sezernierenden mononucleären Zellen abhängig. Passend hierzu findet sich in der *H. pylori* infizierten Schleimhaut eine hohe IL-12 Konzentration (Karttunen et al. 1997) bei auffälliger Infiltration mit Th₁ Leukozyten (Meyer et al. 2000). Die Virulenzfaktoren CagA und VacA scheinen keinen entscheidenden Einfluß auf die IL-12 Induktion zu haben (Viala et al. 2004).

1.1.16 Aktivierung der angeborenen Immunantwort

Die LPS der meisten gramnegativen Keime aktivieren die angeborene Immunantwort der Epithelzellen über den Toll-like receptor (TLR) 4. Obwohl *H. pylori* über TLR 2 den Transkriptionsfaktor NF- κ B induziert (Smith et al. 2003), spielen die TLR bei der *H. pylori* Infektion eine untergeordnete Rolle (Gewirtz et al. 2004). Wahrscheinlich wird die angeborene Immunantwort TLR unabhängig, z. B. über das bakterielle heat shock protein Hsp 60 aktiviert (Gobert et al. 2004).

Peptidoglycane werden über den PAI induzierten Sekretionsapparat Typ IV in die Epithelzellen translokiert. Diese Peptidoglycane könnten der entscheidende Schlüsselreiz für die angeborene Immunreaktion sein (Viala et al. 2004). Intrazellulär werden die Peptidoglycane von den Nod 1 (CARD 4) erkannt. Nod 1 und Nod 2 (CARD 15) erkennen Peptidoglycane von gramnegativen Bakterien und stellen intrazelluläre (Nod 1) und extrazelluläre (Nod 2)

Rezeptoren der Epithelzellen dar (Chamaillard et al. 2003). Untersuchungen am Mausmodell scheinen die *in vitro* Befunde der Nod 1 vermittelten Aktivierung des angeborenen Immunsystems zu bestätigen (Viala et al. 2004). Im Falle einer Infektion mit cag PAI positiven *H. pylori* könnte dieser Mechanismus die proinflammatorische Antwort der Epithelzellen erklären. Da aber nur ein kleiner Anteil der Bakterien tatsächlich an Epithelzellen anbindet (Yamaoka et al. 2002 b), muß dieser Mechanismus kritisch gesehen werden.

1.1.17 Abwehr der Phagozytose und Modulation der Dendritischen Zellen

Die *H. pylori* Infektion steigert in den Epithelzellen die Expression des MIP 3 α Gen. Angelockt vom chemotaktischen Cytokin MIP 3 α infiltrieren Monozyten die Lamina propria der Mucosa (Nishi et al. 2003). Ein unbekannter Mechanismus schützt *H. pylori* vor der Phagozytose durch Makrophagen (Ramarao et Meyer 2001). Daraus folgt eine unzureichende Präsentation von Bakterienantigenen. Da die B- und T-Zell-Aktivierung unter anderem von der Antigenpräsentation durch Makrophagen und Dendritische Zellen abhängt, wird die Immunkaskade gehemmt. Auch wenn der genaue Hemmmechanismus unklar ist, scheint der CD-SIGN (CD 209), ein spezifischer Oberflächenrezeptor der Dendritischen Zellen, beteiligt zu sein. CD-SIGN dient einigen Pathogenen als Rezeptor, z. B. HIV Typ I. Anti-CD-SIGN hemmt die Bindung von *H. pylori* an Makrophagen (Appelmek et al. 2003). Kontrastierend berichteten Kranzer et al. (2005) von einer gesteigerten Aktivierung und Ausreifung Dendritischer Zellen unter *H. pylori* Beimpfung unabhängig vom VacA Status. Auf CD14⁺ Monzyten, die Vorläufer der Dendritischen Zellen, wirken cag PAI positive *H.-pylori*-Stämme apoptotisch (Galgani et al. 2004). Wahrscheinlich ist der Sekretionsapparat Typ IV für diesen Mechanismus entscheidend.

Zusätzlich entwickelt *H. pylori* in Laborexperimenten eine apoptotische Wirkung auf Makrophagen mit Steigerung der mitochondrialen Permeabilität, Cytochrom c Freisetzung und Aktivierung der Caspasen Kaskade (Menaker et al. 2004).

1.1.18 Regulatorische T-Zellen

IL-10 produzierende T-Zellen scheinen entscheidend für die *H. pylori* induzierte Entzündung zu sein. Sie ermöglichen dem Bakterium die dauerhafte Besiedelung der Schleimhaut. In IL-10 knockout Mäusen kann *H. pylori* sich nicht dauerhaft ansiedeln (Ismail et al. 2003). CD25⁺ Regulatorische T-Zellen scheinen hierbei eine Schlüsselrolle zu spielen. Mäuse, denen CD25⁺ Zellen fehlen, entwickeln eine sehr ausgeprägte Gastritis (Raghavan et al. 2003). Eine *H. pylori* Infektion scheint unter Vermittlung der Regulatorischen T-Zellen die reaktive Immunantwort zu hemmen (Stromberg et al. 2003).

1.1.19 Bedeutung des genetischen Polymorphismus beim Wirt

Sowohl die Infektionsrate als auch die Symptomausprägung hängen mit der genetischen Ausstattung des Wirtes zusammen. Untersuchungen an Genmutationen, die für P450 oder Glutathion 3-Transferase (GTS) codieren, zeigten keine Korrelation mit der Besiedlungsrate (Palli et al. 2005). Viele pathologische Wirkungen einer *H. pylori* Infektion werden durch die chronisch aktive Entzündung mit komplexen Wechselwirkungen zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren unterhalten (Macarthur et al. 2004). Für viele dieser Mediatoren ist im Bezug auf ihre Expressionsrate ein genetischer Polymorphismus bekannt. In einigen unabhängigen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der Schwere einer *H. pylori* induzierten Erkrankung und einem Genpolymorphismen aufgezeigt werden: IL-1 (Rad et al 2003), IL-8 (Lu et al. 2005 b), IL-10 (Hellmig et al. 2005), TNF- α (Lu et al. 2005 c).

1.1.20 Interleukin-1 (IL-1)

Die Säureproduktion trägt zusammen mit proinflammatorischen Faktoren entscheidend zur Entstehung des Ulcus duodeni und der atrophischen Gastritis bei. IL-1 β ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin und einer der wirksamsten Säureinhibitoren (El-Omar et al. 2000) und wird von einem

Gencluster transkribiert, in dem mehrere Polymorphismen auftreten. Liegt ein Polymorphismus mit gesteigerter Genexpression vor, kommt es zur Hemmung der Säureproduktion. Die gesteigerte IL-1 β Konzentration ist assoziiert mit einer corpusbetonten *H. pylori* Besiedelung unter Ausbildung einer Pangastritis mit nachfolgender Entwicklung einer Atrophie und einem gesteigerten Entartungsrisiko (Machado et al. 2003).

1.1.21 Interleukin-8 (IL-8)

Bei Untersuchungen an Epithelzellen aus Ulcus-duodeni-Patienten fiel eine verminderte IL-8 Konzentration auf (Stromberg et al. 2005). Mehrere Experimente zeigten, dass die Ursache in der genetischen Ausstattung der Epithelzellen liegen muß und nicht, wie ursprünglich vermutet, beim Infektionskeim. Kontrastierend hierzu berichteten Yeo et al. von einer verstärkten IL-8 Freisetzung bei *H. pylori* positiven Patienten im Zusammenhang mit einer gesteigerten Angiogenese (Yeo et al. 2006).

1.1.22 Weitere Zytokine

Ähnliche Effekte in Bezug auf den Polymorphismus konnten auch bei entzündungsassoziierten Genen nachgewiesen werden, z. B. für TNF- α und IL-10.

Der Genotyp TNF-A*308A bewirkt ein hohes Sekretionslevel für TNF- α . Zusammen mit IL-1 fördert TNF- α die Gastrinproduktion und die Säurebildung der Belegzellen (Suzuki et al. 2001 b). Der Genotyp TNF-A*308A ist mit einem hohen *H. pylori* Infektionsrisiko und der Bildung von Magenkarzinomen verbunden (Ohyama et al. 2004). Ähnlich wird die Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 durch unterschiedliche Haptotypen beeinflusst. Der Haptotyp ATA führt zu einem verminderten IL-10 Niveau und einer proinflammatorischen Gewebesituation (Hamajima et al. 2003) mit einem erhöhten Entartungsrisiko (Hellmig et al. 2005). Und der Haptotyp GCC ist mit der Kolonisierung hoch virulenter *H. pylori*-Stämme assoziiert (Rad et al. 2004).

Insgesamt gibt es keine sichere Grundlage, um das Krebsrisiko einem spezifischen Polymorphismus zuzuordnen, da die H.-pylori-Stämme mit ihren speziellen Eigenheiten nicht pauschal eingestuft werden können (Queiroz et al. 2004). Die Krankheitsentwicklung hängt vom Zusammenspiel der Polymorphismen pro- und antiinflammatorischer Zytokine, dem Immunstatus des Wirtes und den besonderen Charakteristika des infizierenden H.-pylori-Stammes ab.

1.1.23 Virulenzfaktoren

Bei der Suche nach Virulenzfaktoren stieß man zuerst auf CagA (cytotoxin associated gene A). Das stark immunogene Protein kommt in mindestens drei Varianten vor (Backert et al. 2001). Das CagA Gen, in 50 – 70 % aller Stämme nachgewiesen, ist ein Marker für die PAI Gensequenz, die für 27 bis 31 Proteine codiert (Covacci et al. 1993). Stämme mit der Gensequenz cag PAI werden als CagA⁺ bezeichnet. Am Patienten wird im Allgemeinen nur der Anti-CagA Antikörper nachgewiesen. In westlichen Ländern haben CagA⁺ Menschen ein erhöhtes Risiko für eine symptomatische Krankheitsentwicklung (van Doorn et al. 1999 a). In der asiatischen Bevölkerung konnte dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden (Hamlet et al. 1999). PAI codiert unter anderem für 18 Proteine, die einen Typ IV Sekretionsapparat ausbilden. Damit kann das Bakterium mehrere Zelltypen penetrieren und CagA zusammen mit anderen Faktoren in die Zielzelle injizieren (Fischer et al. 2001). Die Injektion in professionelle Phagozyten konnte im Labor bewiesen werden, wobei der mögliche Nutzen für H. pylori bis jetzt noch unklar ist (Odenbreit et al. 2001). In Epithelzellen interagiert CagA nach initialer Phosphorylierung mit einer Reihe von Signalkaskaden und bewirkt eine Veränderung der Zellmorphologie (Bourzac et Guillemin 2005; Selbach et al. 2004) und in AGS-Zellen kommt es dadurch zur Apoptose (Peek et al. 1999). Andere Studien widersprechen diesen Ergebnissen (Shirin et al. 1999). An T-Zellen wirkt cag PAI apoptotisch (Wang et al. 2001). Über den Typ IV Sekretionsapparat gelangen Peptidoglykane in die T-Zelle und induzieren die proinflammatorische IL-8 Signalkaskade (Viala et al.

2004). CagA gilt als ein Risikofaktor für Magenkarzinome (Azuma et al. 2002). In klinischen Untersuchungen korreliert CagA⁺ auffällig mit der akuten und atrophischen Gastritis (Kaklikkaya et al. 2006), peptischen Ulzera ventrikuli (Chen et al. 2005) und Ulzera duodeni (Sezikli et al. 2006).

Einige Forscher zweifeln an der klinische Relevanz der Virulenzfaktoren CagA und VacA (Lu, Yamaoka, Graham 2005 a). Da die Wechselwirkungen zwischen CagA und VacA und den immunkompetenten Zellen nach dem heutigen Kenntnisstand nicht lückenlos erklärt werden kann, wird eine solche Beziehung grundsätzlich in Frage gestellt.

1.1.24 Säuretoleranz

Der pH-Wert der Magenschleimhaut schwankt zwischen 4,0 und 6,5 mit repetitiven Säureeinbrüchen (Schade et al. 1994). Dem Säuregradienten folgend sucht das nicht azidophile Bakterium aktiv die Schleimhautabschnitte mit annähernd neutralem Milieu auf (Schreiber et al. 2004). Zusätzlich kann H. pylori mittels seiner spezifischen Urease aktiv den pH-Wert neutralisieren (Stingl et De Reuse 2005). Das Enzym wandelt Harnstoff in Carbonat um. In anschließenden Reaktionsschritten entsteht Kohlendioxid und Ammoniak (Burne et Chen 2000). Die erfolgreiche und dauerhafte Infektion von Wüstenspringmäusen mit Urease negativen H.-pylori-Stämmen und anschließender Ulkusbildung relativiert die Bedeutung dieses Virulenzfaktors (Mine et al. 2005).

1.1.25 Adhäsine und äußere Membranproteine

Schon Mitte der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts war bekannt, dass die Bindungsfähigkeit von H. pylori an Epithelzellen genetisch codiert sein muß (Odenbreit et al. 1996). Doch erst in den letzten Jahren konnte eine Gruppe von vielgestaltigen Adhäsinen nachgewiesen werden (Edwards et al. 2000). Zu drei Hop-Proteinen liegen erste Forschungsergebnisse vor.

Bab A (HopS), ein 78 kDa Protein, bindet wahrscheinlich an fucosylierte Lewis b (Le^b) Blutgruppenantigene auf Epithelzellen (Ilver et al. 1998). Diese Affinität konnte in jüngerer Zeit nicht verifiziert werden (Torrado et al. 2000). Tierexperimente weisen Bab A eine entscheidende Rolle bei der Kolonisierung mit und Pathogenität durch *H. pylori* zu (Rad et al. 2002). Einige Untersuchungen finden eine deutliche Assoziation von Bab A mit peptischen Ulzera und Adenokarzinomen (Yamaoka et al. 2002 a). Die Ergebnisse anderer Forschergruppen widersprechen dieser These (Zheng et al. 2006).

Oip A (HepH) wurde ursprünglich als ein proinflammatorischer Faktor eingestuft (Yamaoka et al. 2000). Das 34 kDa Protein gehört von seiner Struktur her zur Hop Familie.

Sab A (HopP) vermittelt die Bindung an sialylierte säurehaltige Glykogenverbindungen (Roche et al. 2004). Sab A scheint eine wichtige Rolle bei der chronischen Entzündung und der atrophischen Gastritis zu spielen (Mahdavi et al. 2002). Humane Granulozyten präsentieren auf ihrer Oberfläche sialylierte Kohlenhydrate. Das Adhäsine Sab A bindet an diese Kohlehydrate und verhindert wahrscheinlich die Oponisierung der Bakterien (Unemo et al. 2005).

Lipopolysaccharide (LPS) werden von den meisten *H.-pylori*-Stämmen gebildet. Diese fucosylierten oligosacchariden Antigene entsprechen mit einer großen Variationsbreite menschlichen Blutgruppenantigenen und behindern nach Art der Mimikry eine suffiziente Immunantwort (Appelmeik et al. 2000).

1.2 Das Vakuolisierende Zyto-Toxin A (VacA)

Von den mehr als 30 Proteinen, die *H. pylori* sezerniert (Bumann et al. 2002; Kim et al. 2002) identifizierten und beschrieben Leunk et al. 1988 das vacuolating cytotoxin A (VacA) (Leunk et al. 1988). Seit seiner erfolgreichen Aufreinigung (Cover et Blaser 1992) wurden seine zytotoxischen Wirkungen in einer Vielzahl von Studien untersucht. Als Virulenzfaktor eingestuft konnte VacA in ca. 50 % aller *H.-pylori*-Stämme nachgewiesen werden (Atherton et al. 1995). Besonders die Wirkung auf die Epithelzellen erfuhr eine detaillierte Beschreibung.

Zunächst zeigten sich ulzera-artige Erosionen bei Mäusen, die mit großen Mengen aufgereinigtem VacA behandelt wurden (Marchetti et al. 1995). In Bezug auf die Vacuolenbildungsaktivität fielen starke Schwankungen zwischen den einzelnen *H.-pylori*-Stämmen auf (Leunk, R.D. 1991). Atherton et al. beschrieben 1995 eine enge Korrelation von bestimmten VacA Genotypen, die eine hohe Vacuolenbildungs-Aktivität zeigten, mit klinischen Erkrankungen. Die deutlichste genetische Diversität bezieht sich im VacA codierenden Gen auf zwei Regionen. Am 5' Ende, dem Signalbereich, findet sich die Allel-Familie s1a, s1b, s1c oder s2 und in der Mittelregion die Allel-Familie m1 oder m2 (van Doorn et al. 1999 b). Das s2 Allel codiert am NH₂- oder p33 Terminus für ein hydrophiles Kettensegment, die s1 Allel-Teilfamilie dagegen für ein ausgesprochen hydrophobes Proteinsegment (McClain et al. 2001 a). Diese Unterscheidung zeigt sich in einer hohen Bildungsaktivität für Vacuolen in Epithelzellen beim Genotyp s1/m1 im Vergleich zu s1/m2 und einem vollständigen Fehlen beim Genotyp s2/m2 (Atherton et al 1995). Folgerichtig ist VacA mit dem Genotyp s1/m1 auffallend häufiger mit peptischen Ulzera und Magenkarzinomen in westlichen Ländern assoziiert (Wang et al. 1998). Für asiatische Länder konnte dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden (Chen et al. 2005). Die Korrelation mit atrophischer und akuter Gastritis wird von einigen Klinikern in Frage gestellt (Kaklikkaya et al. 2006). Weiter fällt das

erhöhte VacA Bildungs- und Sekretionsniveau des Genotyps s1/m1 gegenüber s2/m2 auf. Als Beispiel für den virulenten s1/m1 Genotyp wurde in der hier vorgestellten Studie zellfreies Extrakt vom H.-pylori-Stamm P12 (Schmitt et al. 1994) experimentell untersucht.

1.2.1 Die Struktur des VacA Gens und seine Synthese

Das hoch immunogene VacA Protein entsteht auf dem Wege der posttranslatorischen Prozessierung aus einem 140 kDa precursor Protein (Cover et al. 1994, Telford et al. 1994). Dieses precursor Protein besteht aus einer N-terminalen Signalsequenz, dem dominant toxischen Mittelabschnitt und einem C-terminalen Anhang mit ca. 50 kDa. Das Ende dieses C-terminalen Anhangs ermöglicht die Sekretion in das extrazelluläre Medium über einen autotransporter Mechanismus (Letley et al. 2006). Extrazellulär besteht VacA (95 kDa) aus zwei zusammengelagerten, nicht kovalent gebundenen Eiweißketten (Telford et al. 1994). Nach Proteolyse können diese beiden Aminosäuren nachgewiesen werden. Das NH₂-terminale 33 kDa Protein (p33, manchmal auch als p37 gebildet), ist die Grundlage zur Bildung der Anionenkanäle (Kim et al. 2004). Und das zweite COOH-terminale 55 kDa Protein (p55, manchmal auch als p58 gebildet) ermöglicht die Zellbindung (Torres et al. 2005). Wobei die Aufnahme und die toxische Aktivität in der Zielzelle beide Ketten voraussetzt (Reyrat et al. 1999). Die Aminosäuren 351 bis 360 auf dem p55 Terminus sind entscheidend für die spontane nicht kovalente Aneinanderlagerung dieser beiden VacA Untereinheiten (Torres et al. 2006).

Aufgereinigtes VacA bildet spontan hexamere, heptamere oder dodecamere Strukturen (Lupetti et al. 1996). Diese oligomeren Komplexe haben eine Molekülmasse von bis zu 1.000 kDa. Mutante VacA Proteine, die keine Oligomere bilden, entfalten auch keine vacuolenbildende Aktivität mit Ausnahme der isogenen Mutation VacA Δ (6-27) (Vinion-Dubiel et al. 1999). Werden die Oligomere mit Säuren pH < 5,5 (de Bernard et al. 1995) oder Laugen pH > 9,5 behandelt (Yahiro et al. 1999), zerfallen diese in Monomere

mit einem gesteigerten Aktivitätsniveau (Molinari et al. 1998 a), erhöhter Vacuolendichte (von 20 %, nach Säureaktivierung auf 70 % in AZ-521) (Yahiro et al. 1999) und beschleunigter Internalisierungsrate (McClain et al. 2000). Da VacA ins Kulturmedium sezerniert oder den *H. pylori* Bakterien direkt anhaftend, ebenfalls eine deutliche Aktivität zeigt (Leunk et al. 1988, Pelicic et al. 1999), nimmt man die monomere Struktur als aktive Form *in vivo* an (Cover et al. 1997). Die oligomeren Komplexe stellen wahrscheinlich *in vitro* Artefakt des aufgereinigten Proteins dar (Ilver et al. 2004).

1.2.2 Die Wirkung von VacA auf Epithelzellen

Als auffallendste Wirkung des Toxins *in vitro* beschrieben Leunk et al. (1988) die Vacuolenbildung in Epithelzellen. Wobei dieser Bildungsprozess im Detail noch nicht aufgeklärt werden konnte. Bei *in vivo* Untersuchungen fehlt bis jetzt jeder Nachweis auf eine Vacuolenbildung (Cover et Blanke 2005). Da es in Epithelzellen nach Transfektion und selbstständiger VacA Synthetisierung zur Vacuolenbildung kommt (de Bernard et al. 1997), vermutet man eine intrazelluläre Angriffsstruktur. Später wurde die Fähigkeit von VacA zur Ausformung von anionenselektiven Membrankanälen sowohl in Lipid-Doppelschicht-Membranen (Czajkowsky et al. 1999; Iwamoto et al. 1999) als auch in Plasma-Membranen von Epithelzellen (Szabo et al. 1999) beschrieben. Die Struktur dieser Kanäle scheint sich bei beiden Membrantypen zu unterscheiden (Adrian et al. 2002). Durch diese Poren verlieren die Epithelzellen Anionen, Nährstoffe und Kationen (Montecuccio et al. 2003 b). Vermutlich induzieren diese Kanäle die Depolarisation des Membranpotentials (Iwamoto et al. 1999; Schraw et al. 2002) und sind wahrscheinlich entscheidend für die Vacuolenbildung. Wird VacA mit einem Anionen-Kanal-Blocker kokultiviert, treten keine Vacuolen in den Epithelzellen auf (Szabo et al. 1999; Tombola et al. 1999). Diese Beobachtungen bestätigten sich später an Jurkat-Zellen, die als Beispiele für Lymphozyten dienten (Boncristiano et al. 2003). Als weiteren Hinweis für diesen Zusammenhang bleibt die Poren- und Vacuolenbildung aus, wenn die hydrophobe Region am N-terminalen Ende, wie

beim H.-pylori-Stamm P12Δ(6-27) fehlt (Sundrud et al. 2004) oder in den Seitenketten strukturelle Veränderungen vorliegen (McClain et al. 2003; Vinion-Dubiel et al. 1999). Die Kanäle werden aus membrangebundenen VacA Monomeren gebildet, die sich in der Membran zu Oligomeren formieren (Vinion-Dubiel et al. 1999). Entscheidend für diesen Prozess ist das hydrophobe aminoterminal Segment, das Transmembran Segment (Kim et al. 2004; McClain et al. 2001 b, 2003). Die N-terminale Sequenz des s2 codierten VacA Proteins bildet im Gegensatz zum s1 codiertem Protein eine hydrophile Verlängerung und entfaltet keine toxische Wirkung (Letley et al. 2000, 2003; McClain et al. 2001 a).

1.2.3 VacA Bindung an Rezeptoren und / oder lipid rafts

Wie Ilver et al. 2004 berichteten, verbleibt ein Großteil des VacA Toxins locker am Bakterium gebunden (Kim et al. 2002) und organisiert sich zu spezifischen Domänen. Die biologische Aktivität dieser Toxine konnte nachgewiesen werden. Vermutlich werden sie durch direkten Zellkontakt auf die Zielzellen übertragen (Ilver et al. 2004). Der eigentliche Mechanismus dieser Übertragung auf eukaryontische Zellen ist noch unklar, ebenso ein möglicher Zusammenhang mit Rezeptoren (Fitchen et al. 2005). Für sezerniertes und gelöstes VacA konnten spezifische Proteinrezeptoren nachgewiesen werden. Gleichzeitig beobachtete man die Interaktion von VacA mit künstlichen Lipid-Membranen ohne Proteinrezeptoren (Molinari et al. 1998 a; Moll et al. 1995; Pagliaccia et al. 2000). Vermutlich kann VacA sowohl mit spezifischen Rezeptoren als auch mit unspezifischen Strukturen der Zelloberfläche interagieren (Boncristiano et al. 2003). Am Beispiel der HeLa Zellen konnte nach der Bindung die vollständige Internalisierung des säureaktivierten Proteins zeitabhängig bei 37 °C unter ATP-Verbrauch nachgewiesen werden (McClain et al. 2000).

Seto et al. identifizierten 1998 als erstes Rezeptorprotein für VacA den epithel growth factor (EGF) Rezeptor. 1999 bestimmten Yahiro et al. das receptor like protein tyrosin phosphatase (RPTP) β-A, ein 250 kDa Oberflächen-

Glykoprotein, als weiteren Rezeptor. War dieser Rezeptor ursprünglich auf der Zell-Linie AZ-521, einem gastralen Adenokarzinom gefunden worden (für HL-60 Zellen: Padilla et al. 2000), so zeigte sich später eine allgemeine Bedeutung bei der VacA induzierten Ulkusbildung an tumorfreien Epithelien. Fujikawa et al. (2003) verglichen die Toxinwirkung auf Wildtyp-Mäusen mit der auf RPTP β depletierten (RPTP- $\beta^{-/-}$) Labormäusen. Erstere entwickelten Schleimhautschäden und Ulzera, letztere ohne RPTP- β Rezeptoren zeigten keine Pathologien. Neuere *in vitro*-Untersuchungen an HeLa, HL-60 und RK 13 Zellen bestätigten die Ergebnisse aus den Tierexperimenten nur teilweise (Skibinski et al. 2006). RPTP- β könnte vielleicht für HL-60 in Bezug auf die VacA Toxizität eine untergeordnete Rolle spielen. Für HeLa und RK 13 ließ sich kein Zusammenhang zwischen RPTP- β und VacA induzierter Vacuolendichte nachweisen.

Co-Immunoprecipitations-Experimente mit RPTP- β negativen und dennoch VacA sensiblen Zellen führten zur Identifizierung des rezeptorartigen Proteins RPTP- α (Yahiro et al. 2003). Neben diesen spezifischen Rezeptoren konnte die VacA Bindung an detergent-resitenten Microdomänen (lipid rafts) auf Zellmembranen nachgewiesen werden (Kuo et al. 2003; Patel et al. 2002; Schraw et al. 2002).

1.2.4 Bildung von sauren Vacuolen

Die VacA induzierten Vacuolen stellen eine Verschmelzung überreifer Endosomen und Lysosomen dar mit Membranmarkern, die für beide Organellen typisch sind (Molinari et al. 1997). Die Bildung sichtbarer Blasen durch osmotische Schwellung ist gebunden an die Präsenz schwacher Basen. Fehlen diese, induziert VacA perinucleär eine Neuverteilung und Clusterbildung überreifer endosomaler Kompartimente. Diese könnten die Keimstruktur für die Vacuolenbildung sein (Li et al. 2004). Eine Vielzahl zellulärer Moleküle sind an der Vacuolenentstehung beteiligt, z. B. Vacuolar (V)-ATPase (Papini et al. 1993), Rab 7 (Papini et al. 1997), Rac 1 (Hotchin et al. 2000) wie auch Dynamin

(Suzuki et al. 2001 a). Die Bedeutung des SNARE Proteins für diesen Bildungsprozess wird kontrovers diskutiert (de Bernard et al. 2002; Suzuki et al. 2003).

Die Vacuolenbildung kann nicht allein durch den p33 Terminus des Toxins induziert werden. Die minimale Struktur, die diesen Prozess anstößt, umfasst neben der NH₂-terminalen p33 Kette, ein 100 Aminosäuren langes Endstück der p55 Kette (de Bernard et al. 1998 a; Ye et al. 1999). Als weitere Voraussetzung müssen die beiden Proteinketten miteinander interagieren können (Torres et al. 2004; Willhite et al. 2002; Ye et Blanke 2002).

1.2.5 H. pylori und Apoptose

Viele Studien sehen einen Zusammenhang zwischen der H. pylori Infektion beim Menschen und einer erhöhten Apoptoserate der Magenschleimhaut (Mannick et al. 1996; Moss et al. 1996; Rudi et al. 1998), der Makrophagen (Menaker et al. 2004) und der T-Lymphozyten (Ganten et al. 2007). Am Tiermodell konnte die apoptotische Wirkung auf Epithelzellen bestätigt werden, z. B. an der mongolischen Wüstenspringmaus (Israel et al. 2001) oder an Labormäusen (Jones et al. 2002). Als Verursacher der Apoptose wurden mehrere Antigene des Bakteriums benannt, z. B. Urease (Fan et al. 2000), Proteine des cag PAI (Peek et al. 1999), Lipopolysaccharide (LPS) (Kawahara et al. 2001), Proteasen und Lipasen (Smoot, D.T. 1997) oder der zellfreie Medienüberstand (Kuck et al. 2001). Vielleicht ist die apoptotische Wirkung von H. pylori *in vivo* ein Ergebnis all dieser Faktoren (Wagner et al. 1997)? Für VacA konnten einige Studien einen apoptotischen Einfluß unabhängig von anderen H. pylori Faktoren belegen (für Epithelzellen / AGS-Zellen: Cover et al. 2003; Galmiche et al. 2000; Kuck et al. 2001).

1.2.6 VacA als Auslöser der mitochondrialen Apoptose

Einige Forscher identifizierten das Mitochondrium als eine Zielstruktur für die N-terminale Sequenz der p33 Untereinheit. Das galt sowohl für intrazellulär gebildetes VacA, nach Transfektion als auch für extrazellulär appliziertes Toxin. VacA wurde oft auf der inneren Membran des Mitochondriums nachgewiesen. Hier aktiviert es durch Freisetzung von Cytochrom c die Caspase 3 abhängige Apoptosekaskade (Galmiche et al. 2000; Willhite et Blanke 2004). Da eine experimentelle Überexpression anti-apoptotischer Bcl-2 Cytokine den programmierten Zelltod verhindert (Galmiche et al. 2000), wird ein mitochondrial abhängiger Reaktionsweg, möglicherweise über Aktivierung von Bax, einem pro-apoptotischen Bcl-2 Protein (Yamasaki et al. 2006) angenommen. Willhite et al. (2003) untersuchten den Zusammenhang zwischen Vacuolenbildung und Cytochrom c Freisetzung. Obwohl Bafilomycin A1 einseitig die Blasenbildung blockiert, wird die VacA induzierte Freisetzung von Cytochrom c nicht behindert. Vermutlich verlaufen beide Reaktionswege unabhängig (Yamasaki et al. 2006), haben aber als gemeinsame Voraussetzung die Internalisierung des Toxins und die Ausformung anionenselektiver Membrankanäle (Kuck et al. 2001). Mutante VacA Proteine, die keine Membrankanäle und Vacuolen bilden oder solche, die keinen Einfluß auf Cytochrom c haben, sind trotzdem wie der Wildtyp auf der Mitochondrienmembran nachweisbar (Willhite et Blanke 2004). Weiter konnten die Autoren eine Depolarisation der Mitochondrienmembran ($\Delta\Psi_m$) nachweisen (Willhite et Blanke 2004). In $CD4^+$ Zellen kommt es in Folge dieser Depolarisation zum ATP Abfall (Oswald-Richter et al. 2006) der einen G_1/S -Phasenblock erklären könnte.

Die Induktion des programmierten Zelltods scheint an bestimmte Zelltypen gebunden zu sein. Stellvertretend für Epithelzellen konnte an AGS Zellen die apoptotische Potenz sowohl für natives VacA als auch in *E. coli* gebildetes rekombinantes VacA nachgewiesen werden (Kuck et al. 2001). Passend zur Kolonisierung der Magenschleimhaut mit *H. pylori* beschrieben Neu et al. 2002 den programmierten Zelltod an Belegzellen mit Senkung der Säuresekretion. An aktivierten $CD4^+$ T_h Zellen fand sich dagegen keine erhöhte Apoptoserate unter VacA-Behandlung (Gebert et al. 2003; Oswald-Richter et al. 2006;

Sundrud et al. 2004). Ebenso schloß Boncristiano eine apoptotische Wirkung auf Jurkat-Zellen bei einer Proteinendkonzentration von 40 µg/ml aus (Boncristiano et al. 2003).

1.2.7 VacA Wirkung auf die Zellen des Immunsystems

Der Zell-zu-Zell-Kontakt, wie ihn Ilver et al. 2004 beschrieben, könnte die Übertragung von VacA auf die Epithelzellen erklären. Dagegen macht die Sekretion des vacuolenbildenden Cytotoxins in das extrazelluläre Milieu (Bumann et al. 2002; Cover et al. 1992; Leunk et al. 1988) eine Fernwirkung auf die Zellen des Immunsystems möglich (siehe Abbildung 1).

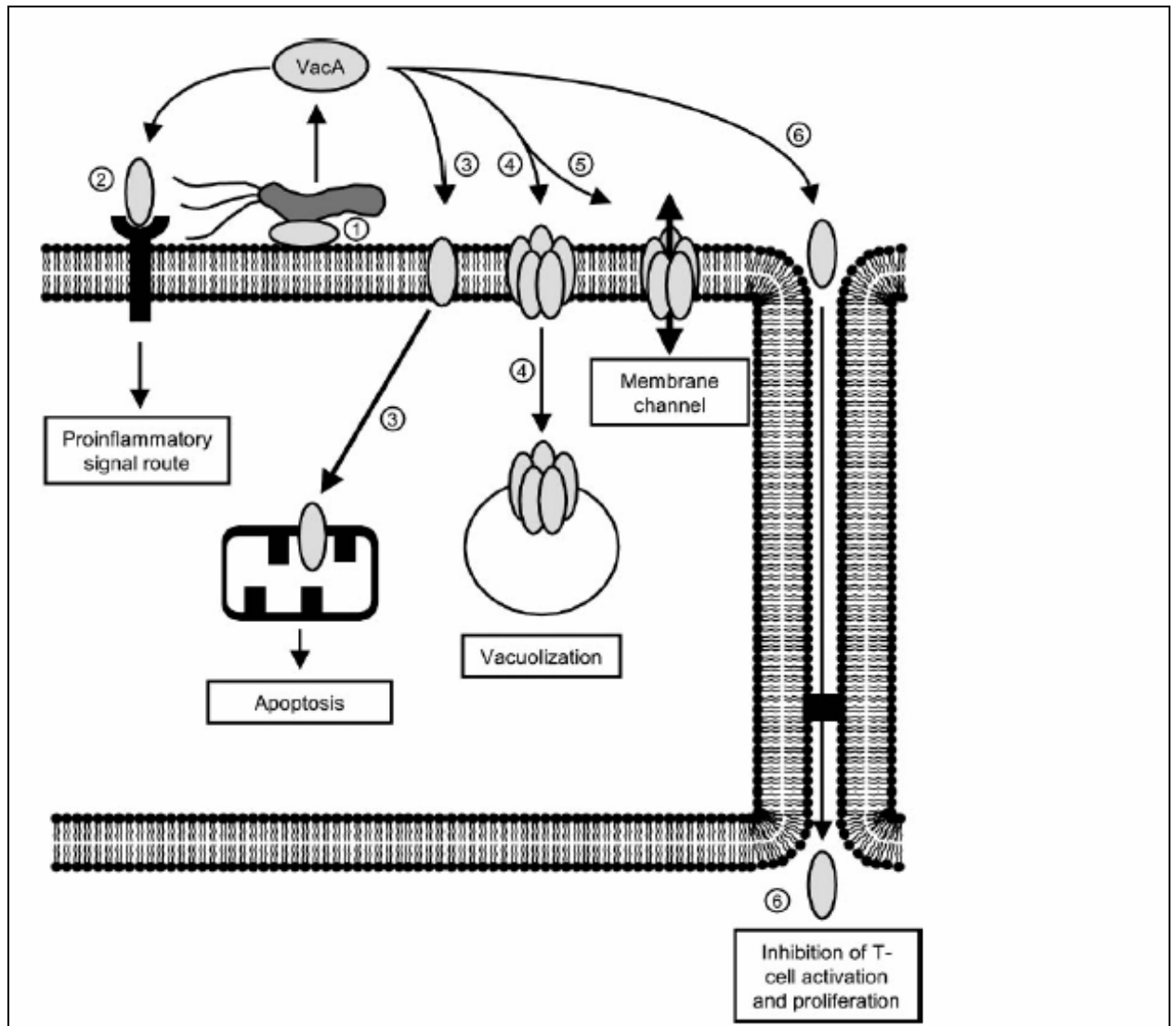


Abb. 1. Das VacA Protein beeinflusst zelluläre Prozesse über verschiedene Mechanismen und unterstützt *H. pylori* bei der chronischen Besiedelung der Magenschleimhaut. (1) Oberflächengebundenes VacA könnte durch direkten Zellkontakt übertragen werden. Sezerniertes VacA könnte entweder (2) an Membranrezeptoren binden und proinflammatorische Reaktionen initiieren, (3) direkt von der Zelle aufgenommen zum Mitochondrium transferiert werden und dort die Apoptose-Kaskade auslösen, (4) nach Pinozytose Vacuolenbildung bewirken, (5) Membrankanäle mit Verlust von Nährstoffen in den extrazellulären Raum ausformen oder (6) die tight junctions überwinden und die T-Zell Aktivierung und Proliferation behindern (Kusters et al. 2006).

1.2.8 VacA Wirkung auf Epithelzellen und tight junctions

Zwischen den Epithelzellen schützen die tight junctions die Submucosa vor dem aggressiven Mageninhalt. *H. pylori* kann diese Zellkontakte partiell lösen (Suzuki et al. 2002; Terres et al. 1998). Zusätzlich konnte für einige *H.-pylori*-Stämme eine VacA und CagA unabhängige Steigerung der parazellularen Permeabilität nachgewiesen werden (Fedwick et al. 2005).

Zunächst bezogen sich die Untersuchungen auf den transepithelialen elektrischen Widerstand (TER). Unter VacA Beimpfung zeigte sich ein Verlust des TER an polarisierten Einzel-Zell-Schicht-Membranen (monolayers) (Papini et al. 1998). Parallel zur Widerstandssenkung nahm die Permeabilität für Verbindungen mit einem Molekulargewicht < 350 - 440 um das Drei- bis Vierfache zu. Das könnte *in vivo* die Versorgung des *H. pylori* Bakteriums mit Fe^{3+} und Ni^{2+} durch die Epithelschicht ermöglichen. Sowohl m1 als auch m2 codiertes VacA kann den TER senken (Pelicic et al. 1999).

Die Integrität der tight junctions zwischen den Epithelzellen wird vom CagA gestört. Sowohl *in vitro* (Odenbreit et al. 2000) als auch *in vivo* (Azuma et al. 2003) konnte die direkte Injektion von CagA in polarisierte Epithelzellen via Sekretionssystem Typ IV demonstriert werden. In den Epithelzellen greift CagA die Verankerungen der tight junctions, die junctional adhesion molecules (JAM) an (Amieva et al. 2003). So scheinen sich VacA und CagA in ihrer virulenten Aktivität gegenseitig zu ergänzen. CagA öffnet die tight junctions, VacA diffundiert im Sinne der Fernwirkung in die Submucosa und greift dort immunologische Zellen an (siehe Abbildung 1). Mehrere Eigenschaften des VacA Proteins machen eine Fernwirkung im gelösten Zustand möglich. An die Umgebung angepasst ist VacA säureresistent bis pH 1,5, im sauren Milieu bindungs- und aktivitätsgesteigert und mit sinkendem pH zunehmend pepsinresistent (de Bernard et al. 1995).

1.2.9 Interaktion mit Granulozyten, Monozyten und Makrophagen

Die *H. pylori* Infektion löst systemisch eine spezifische Immunreaktion aus, abzulesen am Titeranstieg der Anti-*H. pylori* Antikörper (AK) (Blanchard et al. 1999; Sezikli et al. 2006; Yamaoka et al. 1999) und induziert lokal eine reaktive Infiltration der gastralen Mucosa mit immunkompetenten Zellen (Blaser et al. Parsonnet 1994; Kaklikkaya et al. 2006; Supajatura et al. 2002; Telford et al. 1997).

Eine Überlebensstrategie für *H. pylori* könnte das „Verstecken“ in körpereigenen Zellen sein. *In vitro* konnte ein verlängertes Überleben von *H. pylori* Bakterien in Epithelzellen (Kwok et al. 2002) und in professionellen Phagozyten (Odenbreit et al. 2001) beschrieben werden. In Epithelzellen fanden sich vitale, bewegliche Bakterien in großen zytoplasmatischen Vesikeln (Amieva et al. 2002). Ob und wenn ja, in welchem Maße diese Überlebenskompartimente den VacA induzierten Vacuolen entsprechen ist eine in der Forschung kontrovers diskutierte Frage (Amieva et al. 2002; Petersen et al. 2001). Innerhalb professioneller Phagozyten scheint die Überlebensdauer mit der VacA Sekretion zusammenzuhängen (Zheng et al. Jones 2003).

1.2.10 VacA Einfluß auf den Kalziumspiegel in Mastzellen und Lymphozyten

VacA steigert oszillierend den cytosolischen Kalziumspiegel in Mastzellen (RBL-2H3) und aktiviert auf diesem Wege die Sekretion proinflammatorischer Cytokine, z. B. TNF- α (de Bernard et al. 2005). Es kommt zu einer Zelldegeneration mit Freisetzung von Granula, die ihren Inhalt, die Cytokine, in die Umgebung abgeben (de Bernard et al. 2004). In Jurkat-Zellen als Beispiel für Lymphozyten kommt es unter Einwirkung von VacA zu einer starken Hemmung des Ca²⁺-Einstroms (Boncristiano et al. 2003).

1.2.11 Interaktion von *H. pylori* mit B-Zellen und Beeinflussung der Antigenprozessierung durch VacA

Molinari et al. veröffentlichten erste Hinweise für Wechselwirkungen zwischen dem Toxin und B-Lymphozyten (Molinari et al. 1998 b). Sie verwiesen auf eine behinderte Antigenprozessierung in B-Zellen mit Blockierung der Präsentation gegenüber CD4⁺ T-Helferzellen nach VacA Behandlung. Die Neusynthesisierung der major histo compatibility complexes (MHC) Klasse II ist behindert, die Reaktivierung schon bestehender wird dagegen nicht beeinträchtigt.

1.2.12 Immunsuppressive Wirkung von VacA

Regelmäßig treten in den Magenschleimhautbiopsien *H. pylori* infizierter Patienten CD4⁺ T_h Infiltrationen auf (D'Elis et al. 1997; Krauss-Etschmann et al. 2003). Für einigen T-Zellen in der Magenschleimhaut konnte sogar eine spezifische Anti-*H. pylori* Sensitivität nachgewiesen werden (D'Elis et al. 1997; Di Tommaso et al. 1995). Und trotzdem kann *H. pylori* die Immunantwort umgehen. Es liegen deutliche Hinweise für eine Unterdrückung der antigenspezifischen T-Zell-Proliferation durch *H. pylori* vor (Fan et al. 1994; Knipp et al. 1994). Wang et al. vertraten 2001 die These, VacA könnte durch induzierte Apoptose der gastralen T-Zellen die Expression der Fas Liganden unterbinden und so die chronische *H. pylori* Infektion ermöglichen. Vaccinierungsexperimente an *H. pylori* positiven Modellmäusen belegen den entscheidenden Einfluß der CD4⁺ Helferzellen bei der Infektionskontrolle (Aebischer et al. 2000; Akhiani et al. 2002; Lucas et al. 2001; Saldinger et al. 1998). Zum Beispiel besteht eine direkte Korrelation zwischen dem Infektionsrisiko mit *H. pylori* und der T-Zelldichte in der Magenschleimhaut. Im Gegensatz zu MHC Klasse I und B-Zell knockout Mäusen, konnten MHC Klasse II knockout Mäuse nicht erfolgreich vacciniert werden. Diese Beobachtung unterstützt die Bedeutung der MHC II zellgebundenen Immunantwort im Falle einer *H. pylori* Infektion. Es ist nicht klar, ob VacA als

Virulenzfaktor *in vivo* diese immunsuppressive Wirkung entfaltet? Klinische Daten, vorgelegt von Fan et al. 1994, zeigen eine deutlich abgeschwächte proliferative Antwort der peripheren Lymphozyten gegen *H. pylori* bei *H. pylori* positiven Patienten verglichen zu negativen. Einen weiteren Hinweis legten Shirai et al. 1998 vor. Sie beobachteten bei *H. pylori* positiven Mäusen eine reduzierte vaccinspezifische cytotoxische T-Zellantwort auf Virusvaccinierung und eine verlängerte Dauer der Virusinfektion.

Da diese Ergebnisse die bevorzugte Manipulation der T-Zellen durch *H. pylori* nahelegten, fokussierten einige Arbeitsgruppen in den letzten Jahren ihre Forschungen in diese Richtung (Boncristiano et al. 2003; Gebert et al. 2003; Gerhard et al. 2005).

1.2.13 VacA hemmt die Aktivierung nativer T-Zellen

Die Hemmung der klonalen Expansion nativer T-Zellen durch *H. pylori* konnte auf zwei Verursacher zurückgeführt werden: auf VacA und einen unbekanntem membranassoziierten Faktor. Sundrud et al. unterschieden 2004 die T-Zell-Aktivierung von der nachfolgenden Proliferation bei Erhaltung der Vitalität. Während VacA bei Jurkat-Zellen die Aktivierung hemmt, kommt es bei CD4⁺ T_h Zellen zur Unterdrückung der anschließenden Proliferation. Einige Studien untersuchten die VacA induzierte Hemmung des Cytokins IL-2 und die unvollständige Ausbildung des IL-2 Rezeptors (IL-2R) auf der T-Zellmembran. Bisher sah man IL-2 als T-Zellwachstumsfaktor, der über autokrine Stimulierung des IL-2R den Phasenwechsel G₁/S mit anschließender Differenzierung hin zu bewaffneten T-Effektorzellen gewährleistet (Kabelitz et al. 1993). Neuere Studien zeigen dagegen auf, daß IL-2 und der IL-2 Rezeptor in einer komplexeren Wechselbeziehung stehen (Ellery et Nicholls 2002 a). Als Heterotrimer setzt sich der hochaffine IL-2 Rezeptor aus einer α - (CD25), einer β - (CD122) und einer γ_c -Untereinheit zusammen. Die α -Untereinheit wird erst nach TCR/CD28 Stimulierung in der T-Zelle gebildet. Das Heterodimer CD122 und γ_c ist ein mittelaffiner Rezeptor sowohl für IL-2 als auch für IL-15. Die α -Untereinheit für den spezifischen IL-15R wird ebenfalls erst nach TCR/CD28

Stimulation gebildet. Die autokrine Stimulation durch IL-2 kann in Abhängigkeit der verschiedenen Rezeptorausformungen und im Wechselspiel mit IL-15 die Proliferation der T-Zelle mit Phasenwechsel fördern. Durch Induktion antiapoptischer Mechanismen kann IL-2 die Vitalität der T-Zellen erhalten oder den activation-induced cell death (AICD) auslösen (Ellery et Nicholls 2002 b).

Sowohl die IL-2 Sekretion als auch die Synthese der α -Kette (CD25) werden in der CD4⁺ T_h Zellen durch VacA blockiert, mithin die autokrine Stimulation (Gebert et al. 2003). Dabei ist bemerkenswert, daß schon eine bis fünf H.-pylori-Bakterien pro T-Zelle die IL-2 Sekretion senken (Gebert et al. 2003). Zieht man diese hohe toxische Potenz in Betracht, liegt die Annahme eines spezifischen VacA-Rezeptors auf der T-Zellmembran nahe (Boncristiano et al. 2003). Gleichzeitig wäre die lokale Hemmung des Immunsystems im Falle einer bakteriellen Gastritis bei physiologisch niedriger VacA Konzentration denkbar.

An peripheren Blut-Lymphozyten senkte die VacA Behandlung deutlich die Produktion von Cyclin D₃ und E (Gerhard et al. 2005). Diese Cykline kontrollieren die Phosphorylierung und Aktivierung des Retinoblastom Proteins (pRb), einem Zell-Zyklusregulator für den G₁/S Phasenprogress (Gebert et al. 2003), Cyclin D in der frühen G₁ Phase und Cyclin E in der späten (Ahmed et al. 2000). Oswald-Richter et al. verifizierten 2006 die VacA Wirkung auf Cyclin D₃ und Rb in nativen T-Lymphozyten. Dieser Mechanismus könnte die Unterdrückung einer effektiven Immunreaktion durch Teilungshemmung aktivierter T-Zellen erklären. Die Zellen wären im Phasenübergang G₁/S arretiert und die T-Zellproliferation behindert.

1.2.14 VacA hemmt die Proliferation von T-Lymphozyten und Jurkat-Zellen

Die Sekretion und autokrine Stimulation mit IL-2 legt fest, ob eine T-Zelle proliferieren und eine bewaffnete Effektorzelle werden kann (Janeway et Travers 2002). Der aus zwei Untereinheiten bestehende Transkriptionsfaktor nucleären Faktor aktivierter T-Zellen (NFAT) kontrolliert die IL-2 Synthese im Lymphozyten. Im aktivierten Zustand setzt sich der Faktor aus einer nucleären

(NFAT_n) und einer cytoplasmatischen (NFAT_c) Komponente zusammen. Im Zuge der T-Zell-Aktivierung führt eine TCR assoziierte Thyrosinkinase binnen einer Stunde zu einer gesteigerten NFAT_n Synthese. Gleichzeitig kommt es zu einem massiven Ca²⁺ Einstrom, der sich primär aus internen Kompartimenten und sekundär extrazellulär herleitet. Dieser Einstrom wird von Ca²⁺-releas-activated-Ca²⁺ (CRAC) channels kontrolliert. Der Ca²⁺ Einstrom befähigt die Ca²⁺-aktivierte Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin dazu, die cytosolische Untereinheit des NFAT zu dephosphorelieren. Das so aktivierte NFAT_c transloziert in den Zellkern und bildet zusammen mit NFAT_n den aktiven NFAT-Komplex. Dieser Komplex induziert nachfolgend die Transkription von T-Zell-aktivierenden Genen, unter anderem auch das Gen für IL-2.

In Jurkat-Zellen verhindert VacA die NFAT_c Translokation in den Nucleus indem das Toxin spezifisch die Aktivierung von Calcineurin blockiert (Gebert et al. 2003; Sundrud et al. 2004). Die blockierte NFAT Aktivität wird durch aktivierte Ras-Allele kompensiert und die Vitalität der Zellen bleibt erhalten (Knickerbein et al. 2006). In Jurkat-Zellen zeigt VacA eine Wechselbeziehung wie sie von den Immunsuppressiva Cyclosporin A und FK 506 mit Blockierung der Calcineurinaktivierung bekannt ist. Eine mögliche Erklärung für die Blockierung der Calcineurinaktivierung könnte in den aus VacA Monomeren gebildeten Anionenkanälen liegen (Szabo et al. 1999). In Gegenwart von NPPB, einem unspezifischen Chloridkanal-Blocker, hat VacA keinen Einfluss auf den durch Stimulation mit Ionomycin induzierten Ca²⁺ Einstrom. Ionomycin und A23187 erleichtern als Ionophoren den Ca²⁺ Einstrom allgemein in Zellen und speziell in Jurkat-Zellen. Es könnte sein, dass die aus VacA-Monomeren gebildeten Anionenkanäle die CRAC Kanäle negativ beeinflussen und den Ca²⁺ Einstrom hemmen (Boncristiano et al. 2003). Weitere Möglichkeiten einer direkten Interaktion zwischen VacA und Calcineurin können nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung nicht ausgeschlossen werden.

In aktivierten CD4⁺ T_h Zellen kommt es im Gegensatz zu Jurkat-Zellen, zu keiner Behinderung der NFAT Aktivität. Unter VacA-Beimpfung konnte keine Hemmung der IL-2 Sekretionsrate gefunden werden (Sundrud et al. 2004). Wie

aktivierte CD4⁺ T_h Zellen durch VacA an der Proliferation gehindert werden, ist derzeit unklar?

Neueste Studien zeigen einen unerwarteten Einfluss auf die HIV Infektion. Primäre ruhende CD4⁺ T_h Zellen sind nach Aktivierung über TCR und Cytokine empfänglich für HIV. In Anwesenheit von VacA stoppt die HIV Infektion nach der Phase der viralen reversen Transkription und vor der viralen Integration in die Wirts DNA (Oswald-Richter et al. 2006). Ein dem Rapamycin vergleichbarer Einfluss auf p70 S6 konnte ausgeschlossen werden; stattdessen wird die VacA induzierte ATP Depletion als eine Ursache in den Fokus der Betrachtung gerückt.

1.2.15 Immunsuppression und proinflammatorische Aktivität von VacA

Neben der Immunsuppression berichteten Boncristiano et al. 2003 von einer zweiten Einflussmöglichkeit. VacA könnte von außen mit dem COOH terminalen Ende der p58 Kette an unbekannte hoch sensible Rezeptoren binden. Diese Bindung könnte zum einen Rac aktivieren und zum zweiten Streßkinasen phosphorylieren, z. B. p38. Dies könnte über eine Reorganisation der Actinmoleküle die Proliferation verhindern und die T-Zelle in einen Zustand der Anergie überführen (Boncristiano et al. 2003; Montecuccio et de Bernard 2003 a).

Neben der Immunsuppression wird für VacA auch eine proinflammatorische Aktivität postuliert z. B. durch Stimulierung des Enzyms Cyclo-Oxygenase (Cox)-2, sowohl in T-Zellen als auch in Granulozyten und Macrophagen (Boncristiano et al. 2003). Zusätzlich berichten Supajatura et al. 2002 von chemotaktisch aktivierten Mastzellen. Diese produzierten nach Cokultivierung mit VacA proinflammatorische Cytokine wie TNF- α , IL-1 β oder IL-6. Klinisch könnten die mukosal lokalisierten Mastzellen durch ihre unspezifische Immunreaktion zur Entstehung der atrophischen Gastritis beitragen.

1.3 Ziele dieser Studie

Das primäre Ziel dieser Studie war es, die von einigen Forschergruppen beschriebene Proliferationshemmung des Zytotoxins VacA (Gebert et al. 2003) genauer zu quantifizieren. Am Modell der Jurkat-Zelle, einer transformierten T-Zell-Linie, sollte der G₁/S Phasenblock untersucht werden.

Zur Anwendung kamen H. pylori Kulturmedien nach Entfernung der Bakterien mittels Zentrifugation und Aussalzung in Ammonium-Sulfat. Der so gewonnenen zellfreien Überstand enthielt in löslicher Form die von den Bakterien sezernierten Proteine mit dem Toxin VacA. Die durchgeführten Experimente bezogen sich auf drei H.-pylori-Stämme, den Wildtypen P12 und zwei biotechnologisch veränderte, isogene Mutanten: P12Δ(VacA) und P12Δ(6/27).

Backert et al. (2001) beschrieben P12 als einen cagA⁺ H.-pylori-Stamm, der ein funktionstüchtiges VacA Protein mit dem Genotyp s1/m1 transkribiert und via Sekretion ins Kulturmedium sezerniert. In verschiedenen Untersuchungen zeigte P12 die typische VacA Wirkungen (Schmitt et Haas 1994). In AGS-Zellen (Epithelzellen) induzierte das im zellfreie Überstand gelöste VacA Protein von P12 nach 48 Stunden die namensgebende Vacuolenbildung. Und die Analyse im Zytometer zeigte eine gesteigerte Apoptoserate (Kuck et al. 2001).

Mit dem von Copass, Grandi und Rappuoli 1997 am VacA-Gen etablierten Verfahren zur gezielten und stabilen Chromosomenmanipulation entwickelten Vinion-Dubiel et al. 1999 den isogene knock-out Mutation P12Δ(6-27). Dem Δ(6-27)p88-VacA-Protein fehlt im Gegensatz zum Wild-Typ-VacA-Protein die besondere hydrophobe Region auf dem Aminoterminus. Am Modell der HeLa-Zellen zeigte der isogene Mutant P12Δ(6-27) in Vergleich zum vollständigen Vac Toxin eine verlangsamte Ausbildung von Ionenkanälen, die weniger anionenselektiv waren. Des weiteren blieb die Vacuolenbildung aus und in Mischung mit dem Wildtyp-VacA-Protein zeigte sich eine dominant negative Wirkung.

Im Referenzartikel zum zweiten isogenen knock out Mutanten P12Δ(VacA) berichten Gebert et al. 2003 über Experimente sowohl mit dem Bakterium als

auch mit dem zellfreien Extrakt. Der VacA-Null Mutant zeigte im Vergleich zum Wildtyp P12 in Jurkat-Zellen keine Hemmung der IL-2 Sekretion und konnte in HeLa-Zellen die NFAT Translokation in den Nukleus nicht unterbinden.

Nach Durchsicht der bisher publizierten Forschungsergebnisse kristallisierten sich folgende Fragestellungen heraus, die die Grundlage für die im folgenden Teil beschriebenen Experimente bildeten:

- o Kann das im Kulturmedium gelöste VacA den Zellzyklus der Jurkat-Zellen in der G₁-Phase arretieren?
- o Findet sich ein deutlicher Unterschied bezogen auf die Proliferationshemmung zwischen den zellfreien Extrakten der Stämme P12 und P12Δ(VacA) in dem Sinne, dass der zellfreie Extrakt des Wildtyps den Phasenwechsel G₁/S hemmt und der Extrakt von P12Δ(VacA) nicht?
- o Lässt sich dieser Unterschied in den G₁-Populationen unter P12 und P12Δ(VacA) Einwirkung quantifizieren?
- o Wie beeinflusst das unvollständige Δ(6-27)-VacA-Protein den Anteil der Jurkat-Population in der G₁-Phase?
- o Wie kann die phasenhemmende Wirkung des Wildtyp VacA verstärkt werden, wenn zwei Stellgrößen optional zur Verfügung stehen: direkt das Wildtyp-Protein zu modifizieren oder den Wirkmechanismus in der Jurkat-Zellen zu beeinflussen?
- o Kann Wildtyp-VacA durch Säureaktivierung bezogen auf seine hemmende Wirkung verstärkt werden?
- o Wie verhalten sich die Jurkat-Zellen, wenn sie zeitgleich mit zwei entgegengesetzten Stimuli inkubiert werden? VacA bremst den Zellzyklus und die mitogen Substanzen Concanavalin A oder PMA/Ionomycin forcieren ihn.
- o Können Jurkat-Zellen durch Serumdeprivation partiell im Zellzyklus synchronisiert werden?
- o Kann P12-Wildtyp-VacA serumdeprivierte Jurkat-Zellen in der G₁-Phase hemmen?

2 Material und Methoden

2.1 Jurkat-Zellen als Untersuchungsmodell

2.1.1 Allgemeine Bemerkungen zu den Jurkat-Zellen

Die Jurkat-Zellen der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland) mit der Nummer ACC 282 dienten in dieser Studie als Modell. Diese Mitte der 1970er Jahre isolierten Leukämiezellen vom T-Lymphoblastoiden Typ wachsen einzeln oder clusterbildend in Suspension. Schneider et al. beschrieben 1977 als besondere Merkmale dieser Zell-Linie, die auch „JM“ genannt wird, eine Verdoppelungszeit von 25 bis 35 Stunden im Brutschrank mit 5 % CO₂ Atmosphäre bei + 37 °C. Die optimale Zelldichte im Medium liegt zwischen 0,5 – 1,5 x 10⁶ Zellen/ml.

2.1.2 Kultivierung der Jurkat-Zellen

Nachdem die Jurkat-Zellen aus dem Stickstofftank (Großraum-Gefrierbehälter, K Serie, Cryolagerungs-Systeme, Typ 10K, Serien Nr. 562-006-U3, Taylor-Wharton Harsco GmbH, Mildstedt, Deutschland) entnommen und im Wasserbad (Typ 3047, Fabr. Nr. 720396, Köttermann GmbH & Co.KG Labortechnik, Uetze, Deutschland) zellschonend aufgetaut waren, folgte die Anzucht. Der Kultivierung der Jurkat-Zellen diene RPMI-Nährlösung mit 10 % FCS-Anteil. Unter Berücksichtigung der von Schneider genannten Parameter erfolgte die Zellvermehrung in 75 cm³ Kulturflaschen in einem Feuchtbrutschrank vom Typ B 5060 EK-CO₂ (Heraeus, Osterode, Deutschland). Bei zwei- bis dreitägigem Mediumswechsel stand nach 10 bis 14

Tagen eine ausreichende Zellmenge zur Verfügung. Alle Arbeiten im Rahmen der Zellkultivierung wie auch des späteren Experimentansatzes in den Wellplatten erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Werkbank vom Typ Lamin Air HA 2448 GS (Heraeus, Osterode, Deutschland).

2.1.3 Rezeptur des Kulturmediums für die Jurkat-Zellen

Das Kulturmedium setzte sich aus 500 ml RPMI-1640 (Lot Nr. 0609 H, Biochrom, Berlin, Deutschland) und 5,5 ml L-Glutamin (N-Acetyl-L-ananyl-L-glutamin (Ac-ala-glu) 200 mM, Lot Nr. 1097G, Biochrom, Berlin, Deutschland) zusammen. Als unspezifischer Wachstumsstimulus für die Jurkat-Zellen wurde das Medium mit 5 ml fötalem Kälberserum (FCS) (Fetal Bovine Serum, Lot Nr. 0830G, Biochrom, Berlin, Deutschland) angereichert und entsprach einer 10 % FCS Lösung.

2.1.4 Optimierung des Nährmediums und der Zelldichte

Drei Tage vor Durchführung des Experiments kamen die Jurkat-Zellen in ein frisches Nährmedium mit einem FCS Anteil von 10 % oder 0,2 %. Unter Verwendung der Neubauer-Zählkammer konnte die optimale Aussaatdichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt werden. Im Mikroskop wurde bei einer 1:1 Verdünnung mit Trypan Blau (0,5 % (w/v) Lot Nr 0533K, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) der Anteil vitaler Zellen von mehr als 95 % sicher gestellt. Anschließend verblieben die Zellsuspensionen 72 Stunden lichtgeschützt im 5 % CO₂ Wärmeschrank bei + 37 °C und 100 % Wassersättigung .

2.2 Zellfreie Extrakte als Untersuchungsgröße

In der hier vorgestellten Studie wurden die zellfreien Extrakte des H.-pylori-Stamms P12 und seiner isogenen Mutanten P12Δ(VacA) und P12Δ(6-27) in

ihrer Wirkung auf Jurkat-Zellen speziell der Zell-Zyklus hemmung in der G₁-Phase untersucht. Die Überstände stellen eine Suspension verschiedenster von den vitalen Bakterien ins Nährmedium exkretierter Zytokine dar und entfalten eine biologische, für *H. pylori* typische Aktivität in T-Lymphozyten (Chen et al. 2000). Herr Professor Dr. Reiner Haas am Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München, Deutschland, war so freundlich, die Überstände nach Prüfung ihrer biologischen Aktivität zur Verfügung zu stellen.

2.2.1 Gewinnung der zellfreien Überstände

Gemäß den Angaben von Gebert et al. aus 2003 wurden die *H. pylori*-Stämme im Max- von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie für 24 Stunden bei leichtem Schütteln in Flüssigkulturen inkubiert. Nach Zentrifugieren und Pelletieren der Bakterien schloss sich eine sterile Filtration des Überstandes mit einem 0,2-µm-Poren-Sieben an und anschließender Aussalzung der Proteine in 50 % Ammonium-Sulfat-Lösung. Die so gewonnenen Proteine wurden in PBS (Phosphate Buffered Saline) resuspendiert und über Nacht gegen PBS dialysiert. Nach abschließender Bestimmung der Proteinkonzentration in der Bradford-Reaktion erfolgte die Verschickung der zellfreien Extrakte bei – 20 °C.

2.3 Durchführung des experimentellen Ansatzes in der Well-Platte

2.3.1 Allgemeines Beimpfungs-Schema

Nach Einstellung der Zelldichte auf 1×10^6 /ml und erneuter Vitalitätsprüfung mit Trypan blau (siehe 2.1.4), wurden die Flachboden-Zellkulturplatten mit vier mal

vier Wells beschickt. In jede Kulturkammer kam 1 ml Jurkat-Zellsuspension mit 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) (Endkonzentration $c = 20 \mu\text{M}$) (siehe Abb. 2 auf der folgenden Seite). In die Wells der Spalten 2 bis 4 kamen die Überstände der unterschiedlichen *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) Stämme, in Spalte 2 der Extrakt des Wildtyps P12, in Spalte 3 der P12 Δ (VacA) Extrakt und in Spalte 4 der P12 Δ (6-27) Extrakt. Die Proteinendkonzentration betrug $250 \mu\text{g/ml}$. Die Spalte 1 wurde als Kontrolle (Co) ohne zellfreien Überstand inkubiert. Abschließend kamen in die Reihen 2 bis 4 mitogene Stimuli. Die Suspensionen in Reihe 2 und 3 wurden mit Concanavalin A (Con A) (Endkonzentration $c = 0,1 \text{ mg/ml}$), die in Reihe 4 mit Phorbol 12-myristate 13-acetat (PMA) und Ionomycin (Iono) (Endkonzentration: PMA $c = 150 \text{ ng/ml}$, Iono $c = 3 \mu\text{M}$) stimuliert.

Die Inkubation erfolgte bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$ Atmosphäre und 100% Wassersättigung im Brutschrank (siehe Abb. 3 auf der Seite 48).

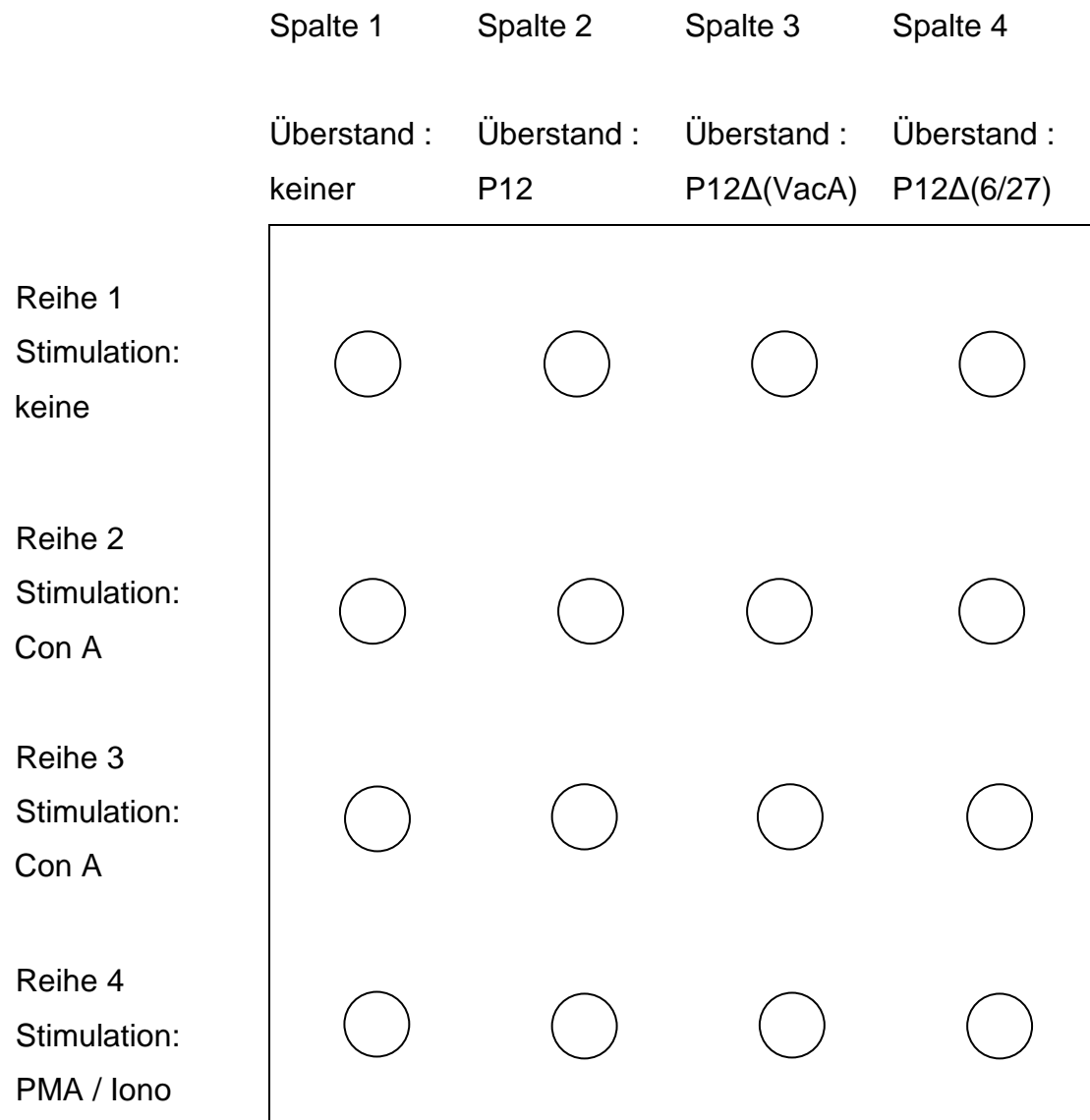


Abb. 2: Schemazeichnung einer Well-Platte mit 4 x 4 Kulturkammern.

Jedes Well enthielt 1 ml Suspension mit 1×10^6 Jurkat-Zellen und BrdU (5-Bromo-2'-Deoxyuridin) (Endkonzentration $c = 20 \mu\text{M}$). Die Reihen wurden entsprechend der Beschriftung am linken Rand stimuliert (ConA Endkonzentration $c = 0,1 \text{ mg/ml}$, PMA Endkonzentration $c = 150 \text{ ng/ml}$ und Ionomycin Endkonzentration $c = 3 \mu\text{M}$). Der obere Rand gibt die H.-pylori-Stämme an, deren zellfreie Extrakte in die Spalten 2 bis 4 gegeben wurden (Eiweißendkonzentration in jeder Kulturkammer $c = 250 \mu\text{g/ml}$).

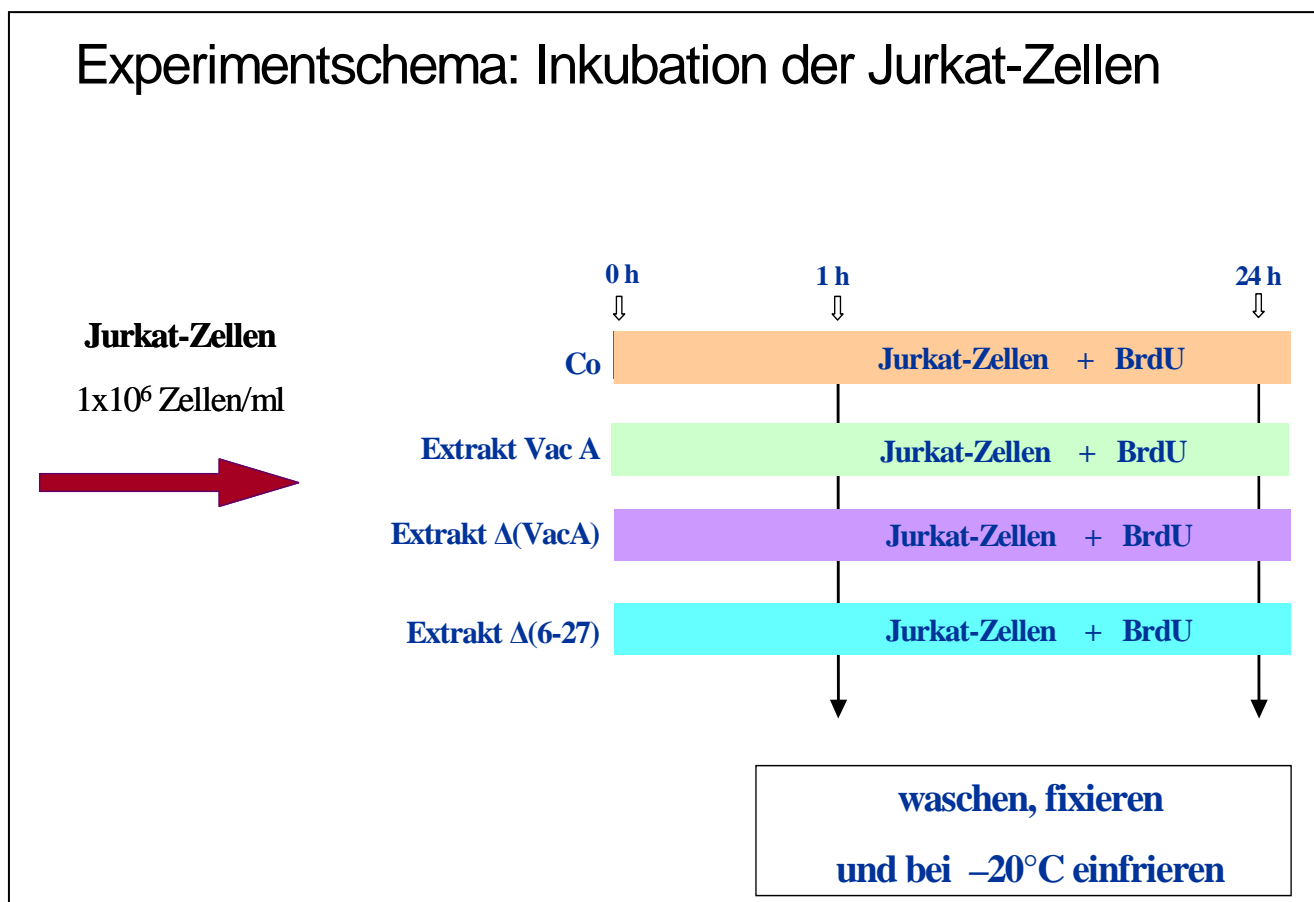


Abb. 3: Schema zum Experimentansatz. Zur Stunde 0 wurden vier Proben angesetzt mit 1×10^6 Jurkat-Zellen/ml plus BrdU und den zellfreien Extrakten VacA, Δ (VacA) und Δ (6-27) sowie in der Kontrolle (Co) ohne Extrakt. Nach einer Stunde erfolgte die erste Abnahme, nach 24 Stunden die zweite. Es folgte ein Waschgang mit PBS. Dem Fixieren der Zellen schloss sich die Lagerung bei -20°C für mindestens 24 Stunden an.

2.3.2 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU)

Den Angaben des Herstellers folgend konnte mit BrdU (B9285, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) die *de novo* DNA Synthese nachgewiesen werden. Das Uridinderivat BrdU wurde selektiv als Thymidinanalogon in der S-Phase des Zellzyklusses, der semikonservativen Replikation der Chromosomen, in die Doppelhelix inkorporiert. Mit Anti-BrdU Antikörper (Antikörper 1) konnte im Zuge

der Probenaufarbeitung eingebautes BrdU demarkiert und mit einem zweiten fluoreszierenden Antikörper indirekt sichtbar gemacht werden. Thymidin zeigte laut den Angaben des Herstellers keine Wechselwirkung mit Antikörper 1.

Inkorporiertes BrdU demarkierte spezifisch die Zellen, die zum Zeitpunkt der Chromosomenreplikation, dem S-Phasen Durchgang, einem BrdU-haltigen Medium ausgesetzt waren.

2.4 Variationen des Experimentaufbaus

Verschiedene Stellgrößen im Experimentaufbau wurden gezielt verändert in der Absicht, die VacA induzierte G₁-Arretierung zu verstärken. Die Variationen bezogen sich auf drei Größen:

- Säureaktivierung vs. nicht Aktivierung des VacA haltigen Überstands
- Deprivation der Jurkart-Zellen durch Kultivierung im serumarmen Medium für 72 Stunden
- Co-Kultivierung mit den mitogenen Stimuli Con A oder PMA/Ionomycin.

2.4.1 Säureaktivierung der Überstände

Alternativ konnten die Überstände der H.-pylori-Stämme P12 und P12 Δ (6-27) vor Beschickung der Well-Platte eine Stunde lang bei pH 2-3 im Brutschrank aktiviert werden. Kontrolliert im pH-Meter steigerte (1N) HCl Lösung den Säuregehalt. Nach 1 Stunde mit anschließender Neutralisierung mittels (1N) NaOH Lösung entsprach das weitere Prozedere dem Beimpfungsschema der Well-Platten wie unter 2.3.1 beschrieben (siehe Abb. 4 auf der nächsten Seite). Das Suffix **a** kennzeichnete die aktivierten Überstände.

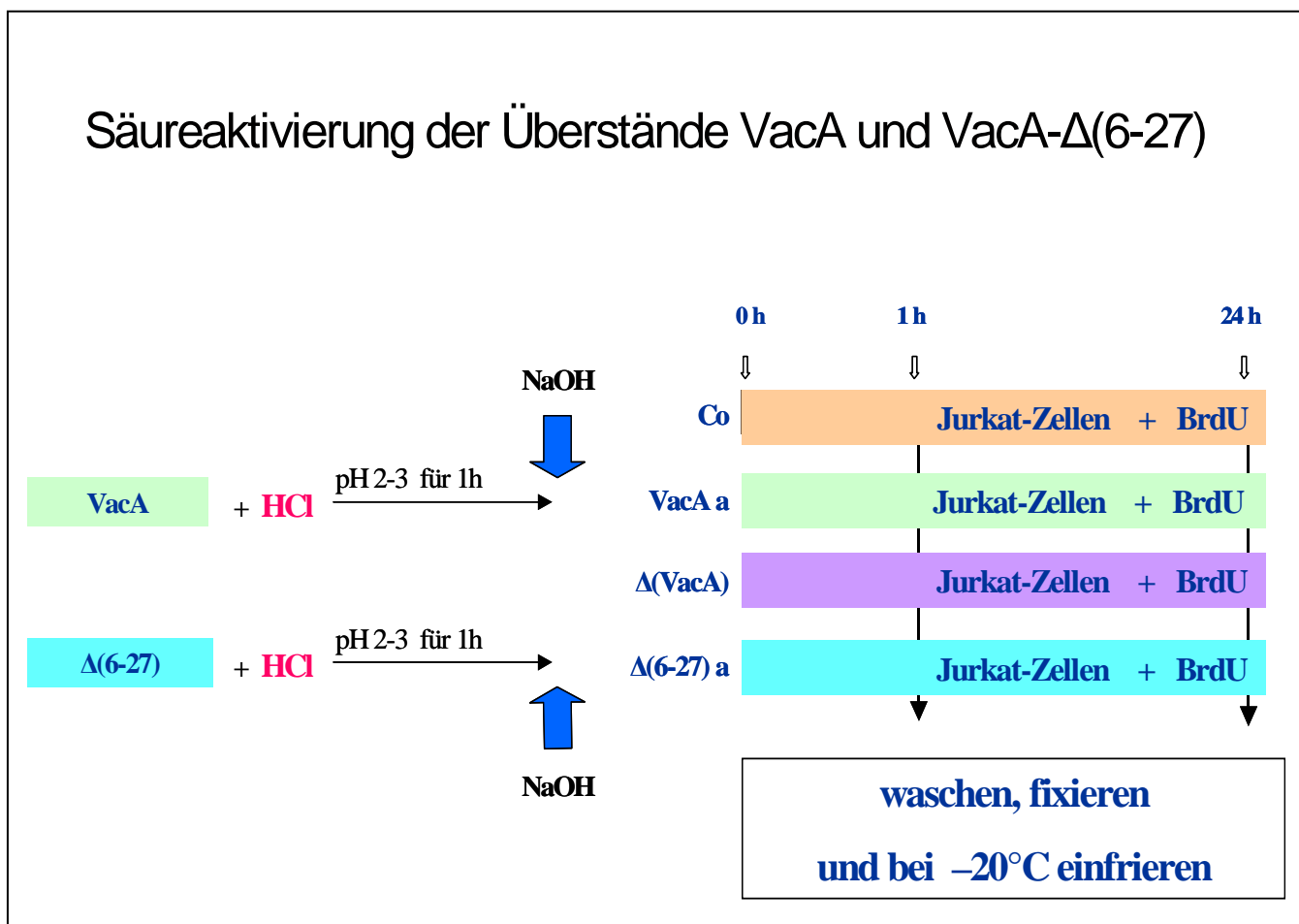


Abb. 4: Schema zum Experimentsetting mit säureaktivierten Überständen der H.-pylori-Stämme P12 und P12 Δ (6-27) (knock out Mutant). Nach einer Stunde Säureaktivierung mit Salzsäure unterlagen die zellfreien Extrakte VacA a und $\Delta(6-27)$ a demselben Ansatzschema wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben.

2.4.2 Serumdeprivation

Vor dem Experimentansatz wurden die Jurkat-Zellen 72 Stunden wahlweise in Nährmedien mit 10 % oder 0,2 % FCS Anteil kultiviert. Ansonsten entsprachen die Mediumzusammensetzung und die Experimentdurchführung dem Prozedere wie unter 2.1.3 und 2.3.1 beschrieben. Die Kulturlösung RPMI-1640 mit 10 % FCS bot die optimalen Voraussetzungen für die Jurkat-Zellen. Die mit

0,2 % FCS angereicherte RPMI-Lösung stellte ein suboptimales „Hungermedium“ dar. Angeregt durch die Arbeit von Shirin et al. (1999) sollte diese Serumdeprivation die Jurkat-Zellen partiell in der G₁ Zell-Zyklusphase synchronisieren.

2.4.3 Mitogene Stimuli

Einige Arbeitsgruppen berichten von deutlicheren Arretierungsergebnissen nach Co-Kultivierung mit mitogenen Substanzen (Chen, Shu, Chadwick 2000). Sowohl Phorbol-Myristate-Acetat (PMA) und Ionomycin (Iono) als auch Concanavalin A (ConA) forcieren als exogene Stimuli den Zellzyklus. Die Arbeitshypothese ging davon aus, die VacA induzierte Zyklushemmung im Kontrast zu diesen mitogenen Stimuli deutlicher hervortreten zu lassen.

Die Ergebnisse der Arbeit von Gebert et al. (2003) aufgreifend kam Phorbol 12-myristate 13-acetat (PMA) (Sigma, Kat. Nr. P1585, Taufkirchen, Deutschland) bei einer Endkonzentration von $c = 150$ ng/ml zusammen mit $3 \mu\text{M}$ Ionomycin (Iono) (Sigma, Kat. Nr. 10634, Taufkirchen, Deutschland) zur Anwendung.

PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetat) ist auch bekannt unter dem Kürzel: TPA (Tetradecanoylphorbol 13-Acetat). Mit PMA stand nach Angaben des Herstellers eine exogene Substanz mit folgenden Eigenschaften zu Verfügung: potenter Tumorpromotor, aktiviert die Proteinkinase c *in vivo* und *in vitro* und stimuliert als rezeptorunabhängiger Zellaktivator in Jurkat-Zellen die Interleukinproduktion.

Mit Ionomycin (Iono) wurde in dieser Studie einer der gebräuchlichsten Ca²⁺-Ionophoren eingesetzt. Ionomycin transportierte Ca²⁺, Pb²⁺ und andere divalente Kationen in Jurkat-Zellen. Verglichen mit A-23187 entfaltete Ionomycin eine gesteigerte Wirkung.

Die Stimulierung der Jurkat-Zellen mit PMA und Ionomycin ahmte den dualen Aktivierungsmechanismus der T-Zellen nach. Der Calciumionophor Ionomycin aktivierte NFAT über Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. PMA beeinflusste die NFAT-Aktivität indem es die Synthese und Aktivität von Fos und Jun, zwei Komponenten der Transkriptionsfamilie AP-1, stimulierte. Diese Proteine integrierten mit der DNA bindenden Domäne (DBD) von NFAT indem

sie kooperativ mit NFAT an komplementäre DNA-Elemente in regulatorischen Regionen banden und die Transkription von Zielgenen auslösten (Garcia-Rodriguez et Rao 2000).

Der Extrakt der Schwertbohne Con A (Sigma, Kat. Nr. C 0412-5MG, Taufkirchen, Deutschland) aktivierte die Jurkat-Zellen mit einer Endkonzentration von $c = 0,1$ mg/ml. Das Lectin stimulierte die Jurkat-Zellen wahrscheinlich über CD3/CD28 Komplexbildung und stellte im Vergleich zu PMA/Ionomycin eine physiologische Stimulierung der Jurkat-Zellen dar.

2.5 Zeitversetzte Ernte

Die erste Abnahme (500 μ l) erfolgte nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank. Die verbliebenen 500 μ l Zellsuspension mit experimentellem Kulturmedium wurden 24 Stunden nach Ansetzen der Probenplatten entnommen.

Die Messergebnisse der Zellen, die eine Stunde nach Ansatz der Kultur-Platten geerntet wurden, dienten als Basiswerte mit denen die Analysedaten der Proben nach 24 Stunden Inkubation verglichen wurden.

2.6 Erster Teil der Aufarbeitung

Der erste Teil der Aufarbeitung verfolgte zwei Ziele:

1. Entfernung des Mediums mit den gelösten Reagenzien und Extrakten
2. Fixierung der Jurkat-Zellen

Die Zellen beider Abnahmen wurden der gleichen Behandlungsabfolge unterzogen:

- Pelletieren der Proben bei 200 x g (1435 U/min) für 3 Minuten
- Dekantieren der Überstände

- zweimaliges Waschen mit PBS Puffer, Pelletieren und Dekantieren
- Fixieren der Zellmembranen mit 250 µl Ethanol (70 %)
- Einfrieren der Proben bei – 20 °C

2.7 Zweiter Teil der Aufarbeitung

Nachdem die Proben mindestens 24 Stunden bei – 20 °C geruht hatten (Labor-Gefrierschrank, Froster-720-CR, Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, Deutschland), folgte der zweite Aufarbeitungsteil mit anschließender Messung im Durchflusszytometer (FACS).

Die 1 und 24 Stunden Proben einer Kulturplatte wurden zeitgleich mit folgenden Zielen behandelt:

- Aufreinigung der Jurkat-Zellen → 2.7.2
- Denaturierung der Doppelstrang-Helix → 2.7.3
- Doppelfärbung der DNA nach Dolbeare et al. (1983) → 2.7.4:
 - a) indirektes Anfärben des inkorporierten BrdU mit Anti-BrdU-Antikörpern der Maus (Antikörper 1) und Antikörper 2 (Anti-Maus Antikörper vom Kaninchen, konjugiert mit dem Fluoreszenz-Marker Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat (FITC))
 - b) direktes Anfärben aller Nukleinsäuren mit Propidium Jodid (PI)

2.7.1 Versuchslösungen für die Aufarbeitung, Teil II

Versuchslösung	Endkonzentration	Signatur / Hersteller	Lösungsmittel
RNase A	c = 0,1 mg/ml	R4875 (100 mg) Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	PBS Puffer
Pepsin	c = 0,552 mg/ml entspricht 386,74 FIP Units/ml	EC 3.4.23.1 (100 g) Merk, Darmstadt, Deutschland	85,5 % Aqua dest. 5 % (1N) HCl
Antikörper 1 Monoclonal Anti-BrdU Pure von der Maus	c = 0,382 µg/ml	Cat.Nr. 347580 Lot 37037 Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA	PBS / BSA Puffer
Antikörper 2 Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulin/ FITC	c = 10 µl/ml	F 0313 FITC.F(ab') ₂ Lot 00015066 (2 ml), DAKO Cytomation, Hamburg, Deutschland	PBS / BSA Puffer
Propidium Jodid	c = 20 µg/ml	P 4170 (10 mg) Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	PBS / BSA Puffer
PBS - Dulbecco Puffer	unverdünnt	Biochrom, Berlin, Deutschland	
BSA - Albumin from bovine serum	c = 10 mg/ml	A 2153-50G Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	PBS Puffer
Propidium Jodid / RNase A	c = 20 µg/ml c = 2 µg/ml	aus oben genannten Versuchslösungen	

2.7.2 Aufreinigung in Einzelschritten

- Waschen mit 2 ml PBS Puffer
- Pelletieren in der Zentrifuge mit 275 x g, bei RT für 6 min, Bremse 2 (Rotixa/RP, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland)
- Dekantieren und Resuspendieren in PBS mit dem Tischvortex (VF2, Janke und Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen i. Br., Deutschland)

Verdauung der RNA:

- kalte RNase A (+ 4 °C) (c = 0,1 mg/ml) für 10 min im Wasserbad bei + 37 °C (+/- 0,4 °C)
- Pelletieren (Parameter s.o.), Dekantieren, Resuspendieren mit Vortex

Verdauung der Eiweißbestandteile:

- 1 ml kaltes Pepsin (c = 0,552 mg/ml) für 10 min im Wasserbad (Typ 3047, Köttermann, Uetze-Hänigsen, Deutschland) bei + 37 °C
- zur Deaktivierung 5 min auf Crush-Eis Lagern (ZIEGRA-Eismaschine, ZBE 70 – 100, Isernhagen, Deutschland)
- Waschen mit 3 ml PBS (+ 4 °C)
- Pelletieren, Dekantieren, Resuspendieren

2.7.3 Denaturierung der doppelsträngigen DNA

Aufspaltung der doppelsträngigen DNA (dsDNA) nach Sasaki et al. (1988):

- 1 ml (2N) HCl, 10 min, lichtgeschützt bei RT
- drei Waschschritte (2 x mit 3 ml PBS, 1 x mit 2 ml PBS/BSA)
- Pelletieren, Dekantieren

2.7.4 Anfärben der DNA

Die hier durchgeführte immunozytochemische Doppelfärbung ermöglichte in der FACS-Analyse die quantitative Messung der Chromosomenmenge über Propidium Iodid-Fluoreszenz bei gleichzeitiger Bestimmung des Anteiles an inkorporiertem BrdU. Diese Bearbeitungsschritte folgten den Angaben von Dolbeare et al. (1983).

Indirektes Anfärben des eingebauten BrdU am denaturierten Chromosomenstrang:

- 200 µl Antikörper 1 (IgG₁ Anti-BrdU-AK der Maus) (c = 0,382 µg/ml)
- Resuspendieren
- 30 min Proben mit AK 1 lichtgeschützt Inkubieren bei Raumtemperatur
- Waschen mit 2 ml PBS/BSA
- Pelletieren, Dekantieren

- 200 µl Antikörper 2 (polyklonaler Anti-Maus-AK vom Kaninchen konjugiert mit Fluoreszenz-Isothiocyanat (FITC)) (c = 10 µl/ml)
- Resuspendieren
- 30 min Proben mit AK 2 lichtgeschützt Inkubieren bei Raumtemperatur

Demarkieren der gesamten DNA:

- 500 µl Propidium Jodid (c = 20 µg/ml)
- Inkubationszeit < 5 min
- Pelletieren, Dekantieren, Resuspendieren

Trägerlösung zur Messung der fixierten Jurkat-Zellen im FACS:

- 250 µl Propidium Jodid (c = 20 µg/ml) / RNase A Lösung (c = 2 µg/ml)

2.7.5 Ribonuklease A (RNase A)

Das aus Rinderpankreas gewonnene einsträngige Polypeptid RNase A (Pancreatic ribonuclease) denaturierte spezifisch RNA. Dieser Aufreinigungsschritt gewann seine Bedeutung im Zusammenhang mit der Propidium Jodid-Färbung. In der abschließenden FACS Auswertung sollte nur die Jurkat DNA nicht aber die RNA gemessen werden. Da Propidium Jodid alle Nukleinsäuren anfärbt, war die RNA-Denaturierung zur Sicherung eines spezifischen Ergebnisses entscheidend.

2.7.6 Antikörper 1 (Anti-BrdU Antikörper)

Beim Antikörper 1 (Anti-BrdU) handelte es sich um monoklonale Immunglobuline der Klasse IgG₁. Dieses Immunglobulin wurde aus Labormäusen nach Immunisierung mit Iodouridin gewonnen. Antikörper 1 demarkierte „neue“ DNA-Ketten, die in BrdU-haltigem Medium *de novo* synthetisiert worden waren (Gratzner, H.G. 1982). So konnte im Zytometer bestimmt werden, wie viele Jurkat-Zellen im Verlauf des Probenansatzes von der G₁- in die S-Phase gewechselt waren. Zellen, die für die Dauer der Bebrütung die S-Phase nicht durchlaufen hatten, zeigten keine Wechselwirkung mit Antikörper 1.

2.7.7 Antikörper 2 (Anti-Maus Antikörper)

Bei Antikörper 2 (AK 2) handelte es sich um gereinigte und F(ab')₂-fragmentierte Immunglobulin-Anteile aus Kaninchen-Antiserum. Da diese F(ab')₂-Fragmente mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) konjugiert waren, ließ sich unter Laseranregung eine zytometrische Darstellung und Messung durchführen. Dieser Antikörper 2, der mit allen murinen IgG-Unterklassen interagiert, verband sich mit dem Fc-Teil der Anti-BrdU Antikörper (Antikörper 1). So konnte inkorporiertes BrdU indirekt immunozytochemisch nachgewiesen werden. Im FACS leuchtete die während des Probenansatzes

neu synthetisierte DNA grün mit einem Emissionsmaximum von $\lambda = 518$ nm und unterschied sich deutlich von der rot fluoreszierenden Propidium Jodid-Färbung.

2.7.8 Propidium Jodid (PI)

Mit PI kam einer der gebräuchlichsten Fluoreszenzmarker für Nukleinsäuren zur Anwendung. Da er in die Doppelhelix sowohl von RNA (dsRNA) als auch DNA (dsDNA) inkaliert, mussten die Proben vor der FACS-Analyse mit RNase A behandelt werden. Das Anregungsmaximum von PI lag bei einer Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm und das Emissionsmaximum bei $\lambda = 617$ nm. Im Zuge der FACS Messung erlaubte die PI Färbung die Bestimmung des Chromosomengehalts der Zellen und somit die Zuordnung in die drei Zyklusabschnitte: G₀/G₁, S und G₂/M.

2.7.9 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) Negativ-Probe

Die BrdU-Autofluoreszenz wurde mit der Negativprobe bestimmt. Diese zusätzliche Jurkat-Suspension-Probe unterlag, abgesehen von der Inkubierung mit Antikörper 1, dem gleichen Aufarbeitungsprotokoll wie die anderen Proben (siehe 2.7).

2.8 Messung im Durchfluß-Zytometer (FACS)

Die Messung der Einzelstrang-DNA erfolgte am FACSort-Gerät (FACSort, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Dieses war mit einem Computer (Appel Macintosh Quadra 650, Apple Inc., Cupertino, California, USA) mit dem Softwareprogramm Cell Quest, Version 1.11 (Becton-Dickinson, San Jose, NJ, USA) und einem Drucker (HP Deskjet 5740, Hewlett-Packard GmbH,

Böblingen, Germany) verknüpft. Ziel waren 10.000 Messereignisse je Probe bei einer Flussgeschwindigkeit von 90 – 150 Ereignisse/sec.

2.8.1 Das FACS - Allgemein

Mit dem in den 1970er Jahren entwickelten fluorescence-activated cell sorter (FACS) können physikalische und chemische Eigenschaften von Einzelzellen gemessen werden. Grundlage ist ein optisches Verfahren, das Lichtbrechung und Fluoreszenzen erfasst. Es werden drei Funktionsbereiche unterschieden:

- Fluss- und Transporteinheit
- Messeinrichtung
- Datenspeicherung

2.8.2 Fluss- und Transporteinheit

In einer Trägerflüssigkeit mussten zunächst die zu messenden Einheiten als Einzelsuspensionen gelöst vorliegen. Mit Überdruck wurde die Trägerflüssigkeit in einem laminaren Strom in die Messkammer transportiert. Die hydrodynamische Fokussierung war genau auf den Messpunkt in der Messkammer ausgerichtet. Druck und Konzentration der Suspension waren so eingestellt, dass die Jurkat-Zellen bildlich gesprochen wie an einer Schnur aufgereiht, als Einzelereignisse vom Laserstrahl im Messpunkt erfasst wurden.

2.8.3 Messeinrichtung

Für diese Studie kam ein luftgekühlter Argonionen-Laser mit einer Wellenlänge von $\lambda = 488 \text{ nm}$ zur Anwendung. Erhoben wurden Analysewerte für drei Parameter:

die Lichtbeugung entlang der Achse des einfallenden Lasers, dessen Wellenlänge unverändert bleibt. Sie wurde mit dem forward-scatter (FCS)

bestimmt. Hierbei war die Lichtbeugung proportional zur Größe des Messereignisses.

Mit dem sideward-scatter (SSC) konnten die Lichtbrechungen im 90° Winkel zur Laserachse gemessen werden. Auch diese Wellenlänge blieb unverändert. Die 90° Lichtbrechung war unter anderem abhängig von internen Strukturen.

Als dritte Größe wurden Fluoreszenzen im 90° Winkel zur Laserachse detektiert. Fluoreszenzkanal 1 erfasste bei einer Spannung von 538 V und einem Bandenfilter der Wellenlänge $\lambda = 530 \text{ nm}$ ($\pm 30 \text{ nm}$) Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat (FITIC), d. h. Antikörper 2, mithin indirekt inkorporiertes BrdU. Fluoreszenzkanal 2 bestimmte die Propidium Jodid Emission mit einer Spannung von 345 V und einem Bandenfilter von $\lambda = 578 \text{ nm}$ ($\pm 28 \text{ nm}$). Die Emissionsintensität der beiden Marker entsprach der Anzahl der gebundenen Fluoreszenzmoleküle.

2.8.4 Datenspeicherung mit dem 5-Parameter-List-Mode

Entscheidender Bestandteil des CellQuest Programms war der 5-Parameter-List-Mode. Dieser listete zu jedem Messereignis die Messwerte auf und speicherte diese einzeln ab. Da alle gemessenen Parameter als Originaldaten erfasst wurden und die direkte Beziehung zum jeweiligen Messereignis erhalten blieb, waren die verschiedensten Korrelationen möglich. Am Computer konnten durch Setzen von gates (engl. für Rahmen) nur solche Messereignisse (z. B. Jurkat-Zellen) zur Darstellung in einer Parameterkombination zugelassen werden, die in einer anderen Parameterkombination innerhalb eines definierten Wertebereichs lagen.

2.8.5 Prinzip der BrdU-freien G₁-Analyse am Zytometer

Zu jedem Messereignis erfasste das Durchflusszytometer unter anderem die Parameter: Größe (forward-scatter) sowie Emissionsintensität der Marker für BrdU (Fluoreszenzkanal 1) und PI (Fluoreszenzkanal 2).

Im ersten Analyseschritt wurden die Messpunkte mit der entsprechenden Größe für Jurkat-Zellen ausgewählt. Daran schloss sich die Auswertung der PI Intensität an.

Die Intensität der Propidium Iodid Emission war abhängig von der Gesamtmenge an Nukleinsäure pro Messereignis. Die Fluoreszenz-Intensität in der G₁-, Präsynthese-Phase war kleiner als die in der G₂-, Postsynthese-Phase. Die Intensität der S-Phase lag zwischen der G₁- und G₂-Phase (siehe Abb. 5 auf der nächsten Seite).

Die BrdU Emission zeigte als dritter Parameter nach Größe und PI Gehalt an, ob die Jurkat-Zellen die Synthese-Phase nach Zusatz von VacA und BrdU durchlaufen hatten (siehe Abb. 6). Mit der Negativprobe (siehe 2.7.9) konnte die Autofluoreszenz bestimmt und deutlich von der Antikörper 2-Fluoreszenz unterschieden werden.

Gesucht waren die Zellen mit niedriger PI Emission und einer BrdU Strahlung im Bereich der Autofluoreszenz (siehe Abb. 7). Diese Zellen entsprachen der G₁-Phase (Dolbeare et al. 1983).

Abschließend ermittelte eine weitere CellQuest Rechenfunktion den prozentualen Anteil der G₁-Population bezogen auf die Gesamtheit aller Zellen. Sie beantwortete die Frage wie viel Prozent der Jurkat-Zellen für die Dauer des experimentellen Ansatzes in der Flachboden-Zellkulturplatte in der G₁-Phase verblieben waren. Die statistische Auswertung mit Bestimmung der Mittelwerte, der Standardabweichung und des p-Wertes im Student's t Test erfolgte mit dem JMP Programm (Version: 4.0.0, SAS Institute, Cary, NC, USA, <http://www.JMPdiscovery.com>).

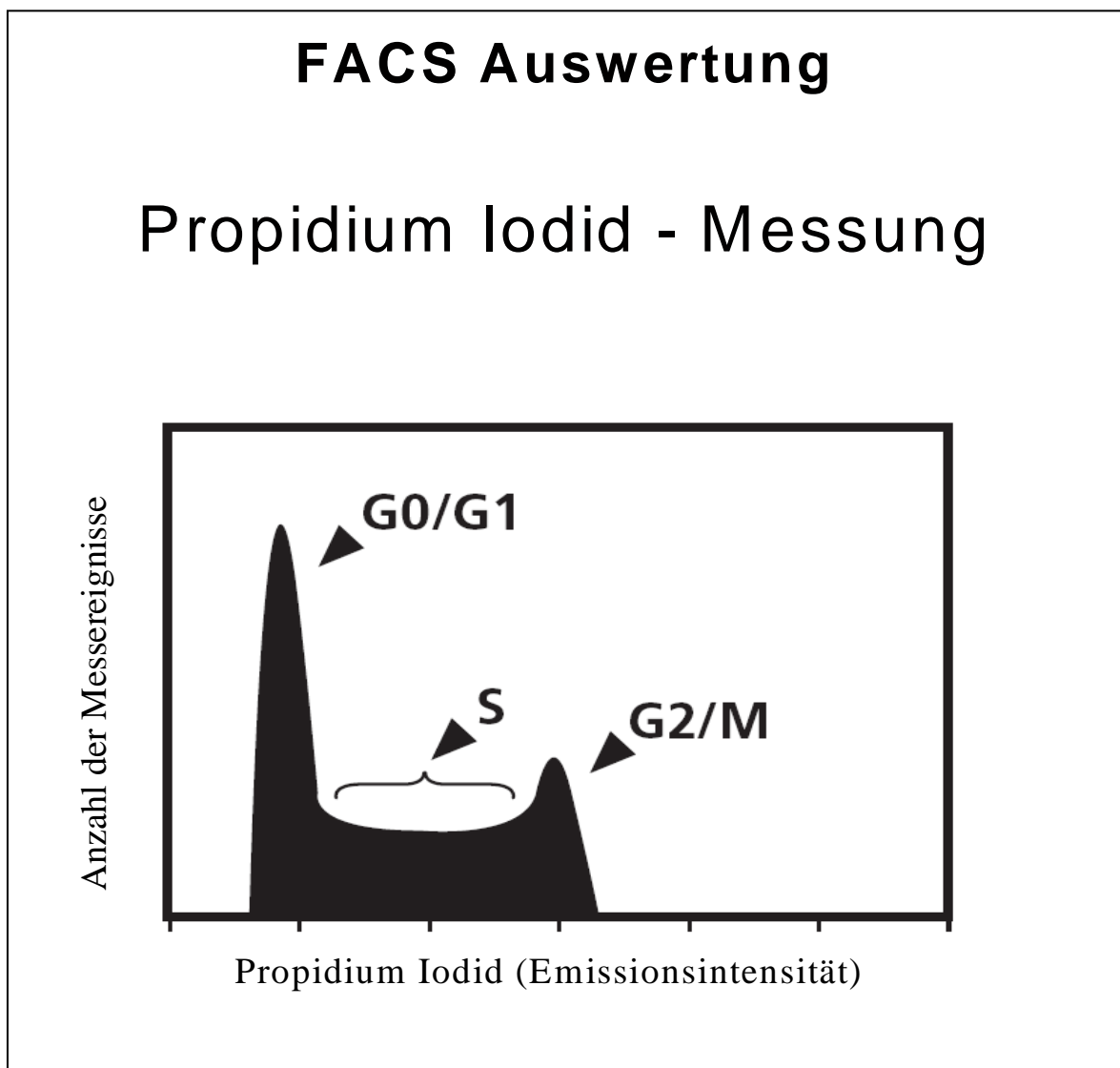


Abb. 5: Modellhaftes Histogramm zur Propidium Iodid Messung: Anzahl der Messereignisse (Ordinate) gegen Intensität der Fluoreszenz-Emission für den Nukleinsäuremarker Propidium Iodid (Abszisse). Zellen in der G₁-, Präsynthese-Phase zeigten eine niedrige Emissionsintensität. In der G₂-, Postsynthese-Phase mit replizierter DNA wurde beim Färben mehr PI angelagert und die Emissionsintensität war höher. Zellen in der S-Phase mit heterogener DNA Replikation lagen von der Emissionsintensität dazwischen.

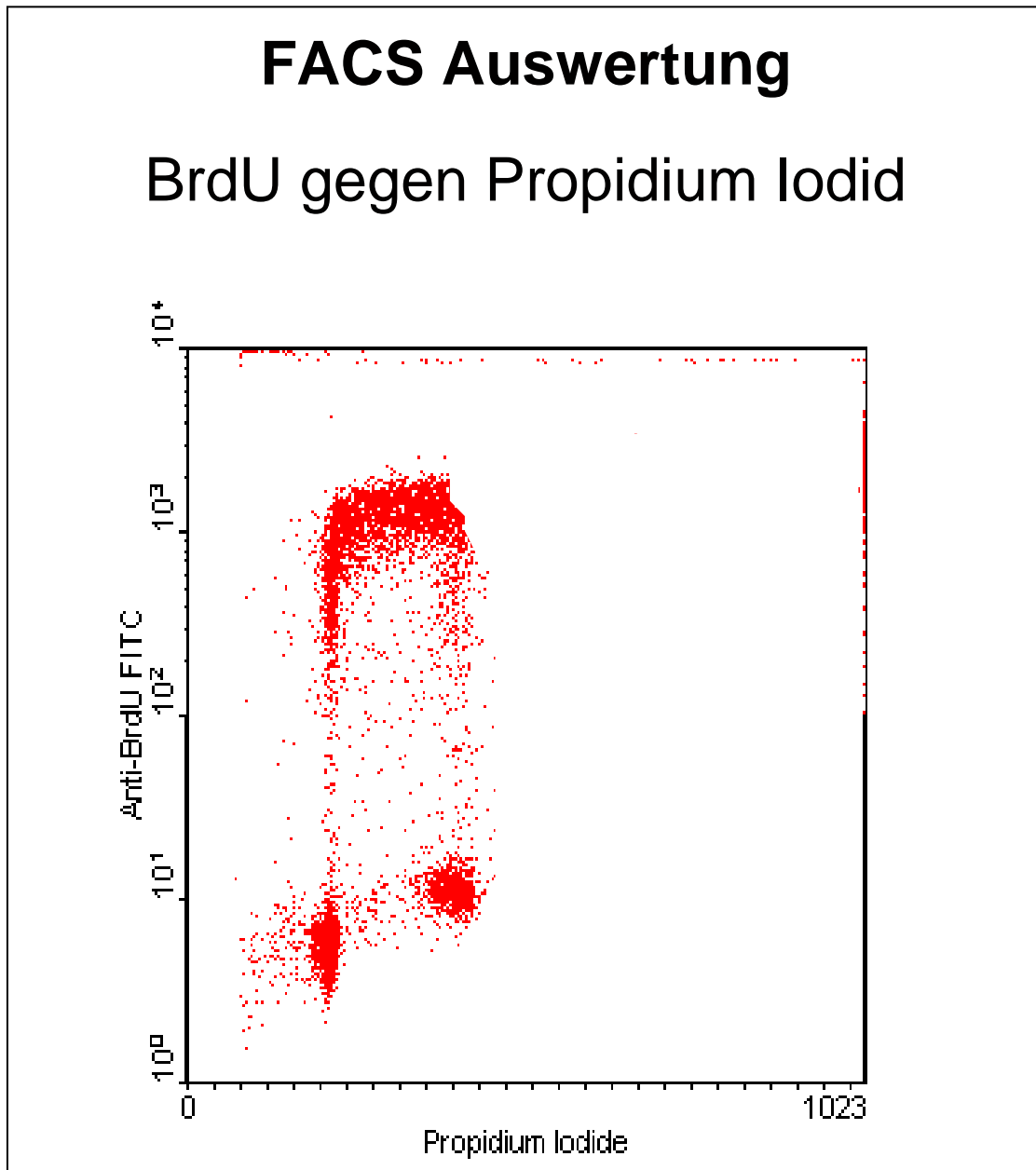


Abb. 6: Original Dotplot aus dieser Arbeit: FACS Auswertung – BrdU gegen Propidium Iodid. Die Abszisse gibt in linearer Skalierung die Emissionsintensität für Propidium Iodid und die Ordinate in logarrhythmischer Skalierung die Emissionsintensität für Antikörper 2 (Anti-Maus Antikörper gekoppelt mit FITC) wieder. Im Dotplot lassen sich deutlich drei Populationen unterscheiden. Die zwei Populationen mit niedriger BrdU Intensität entsprechen den Zellen, die im Laufe des Probenansatzes die S-Phase nicht durchlaufen haben und kein BrdU inkorporiert haben, also Zellen in der G₁- und Zellen in der G₂-Phase. Alle Zellen mit einer hohen BrdU Emissionsintensität haben die S-Phase mindestens einmal durchlaufen.

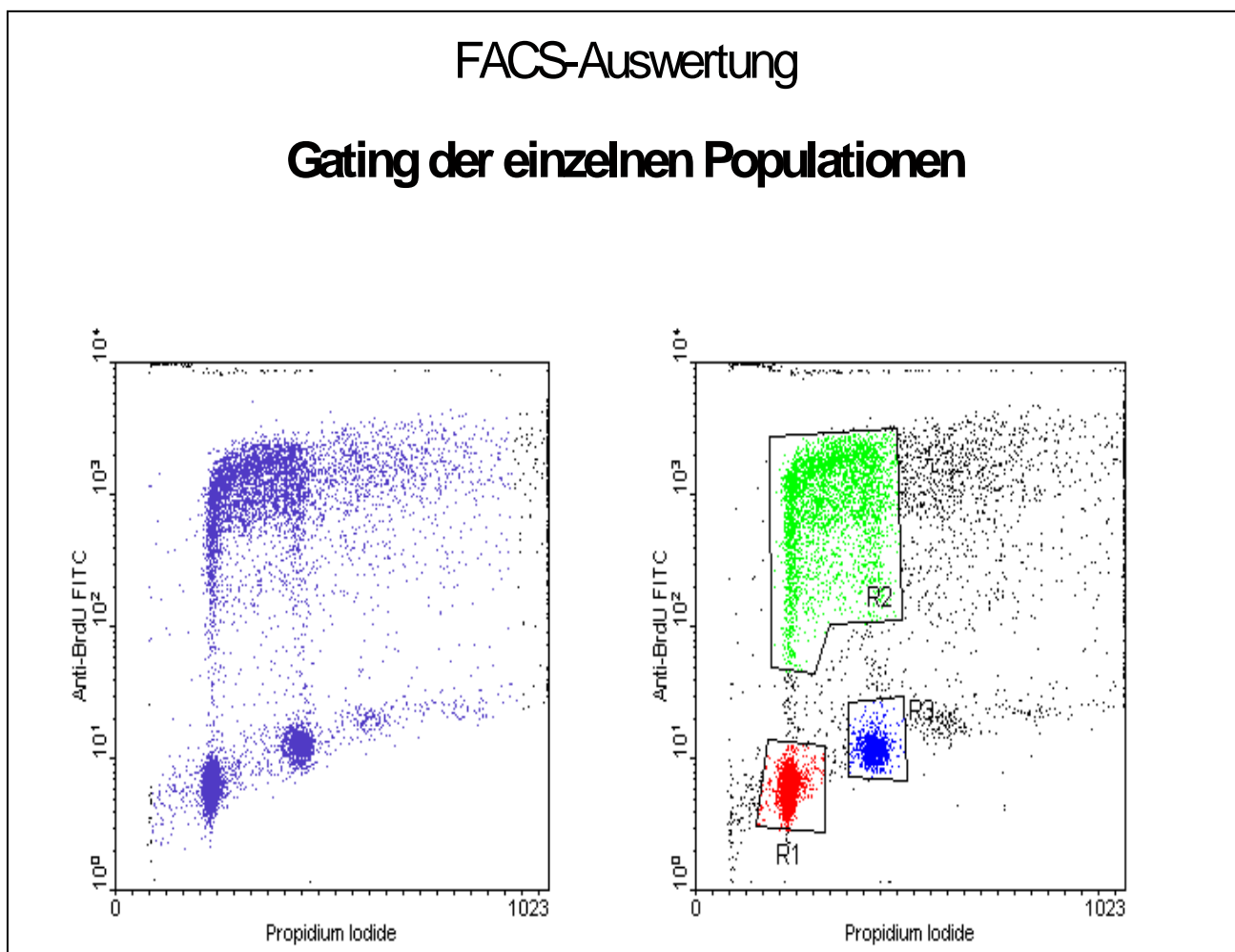


Abb. 7: Original Punktdiagramm aus dieser Arbeit: gating der einzelnen Populationen, links ohne gates, rechts mit gates. BrdU Emissionsintensität (Ordinate) gegen PI Emissionsintensität (Abszisse). Mit „R“ sind drei gates (Rahmungen) beschriftet. Die Populationen in R1 und R3 zeigen eine niedrige BrdU Emissionsintensität und liegen somit im Autofluoreszenz-Bereich. R1 mit niedriger PI Intensität entspricht der G₁-Phase, R3 mit intensiver PI Anfärbung der G₂-Phase. R2 zeigt eine hohe BrdU Emissionsrate. Die Zellen in diesem gate hatten in der Synthese-Phase aktiv das Thymidinanalogon BrdU in die DNA eingebaut und somit den G₁/S Phasenwechsel mindestens einmal durchlaufen.

2.9 Liste der Verbrauchsmaterialien

<u>Artikel</u>	<u>Typ</u>	<u>Hersteller</u>
Combitips plus	2,5; 10; 50 ml	Eppendorf
Conical Tube	15; 50 ml (Polypropylen)	Falcon
Deckgläschen für Haemacytometer	20 x 26 mm	Menzel
Handschuhe	Safeskin	Kimberly-Clark
Kryobox mit Rastereinsatz	10 x 10 cm (Pappe)	VWR
Kulturflaschen	75 cm ³ (Polysterol)	Falcon
Neubauer Zählkammer	Improved	Assistent
Pipettenspitzen	10; 200; 1000 µl	Sarstedt
Rundbodenröhrchen	5 ml (Polysterol)	Falcon
Safe-Lock Tubes	0,5; 1,5 ml	Eppendorf
Serologische Pipetten	5; 10; 25 ml, steril	Costar
Zellkulturplatten	24 Well (Polysterol)	Falcon

3 Ergebnisse

Dieser Arbeit lag die grundsätzliche Fragestellung zu Grunde, kann im Kulturüberstand gelöste VacA-Protein den Zellzyklus der Jurkat-Zellen hemmen? Die FACS-Auswertung nach 24 Stunden belegte eine arretierende Wirkung. In der Zellpopulation, die mit zellfreiem Extrakt des P12 Überstandes (Wildtyp) behandelt wurde, fanden sich 12,8 % der Zellen in der G₁-Phase. Im Vergleich dazu konnten nur 8,0 % in der Kontrolle, 8,3 % nach Beimpfung mit P12Δ(VacA) Extrakt und 8,3 % im P12Δ(6-27) Ansatz arretiert werden (vgl. Abb. 8).

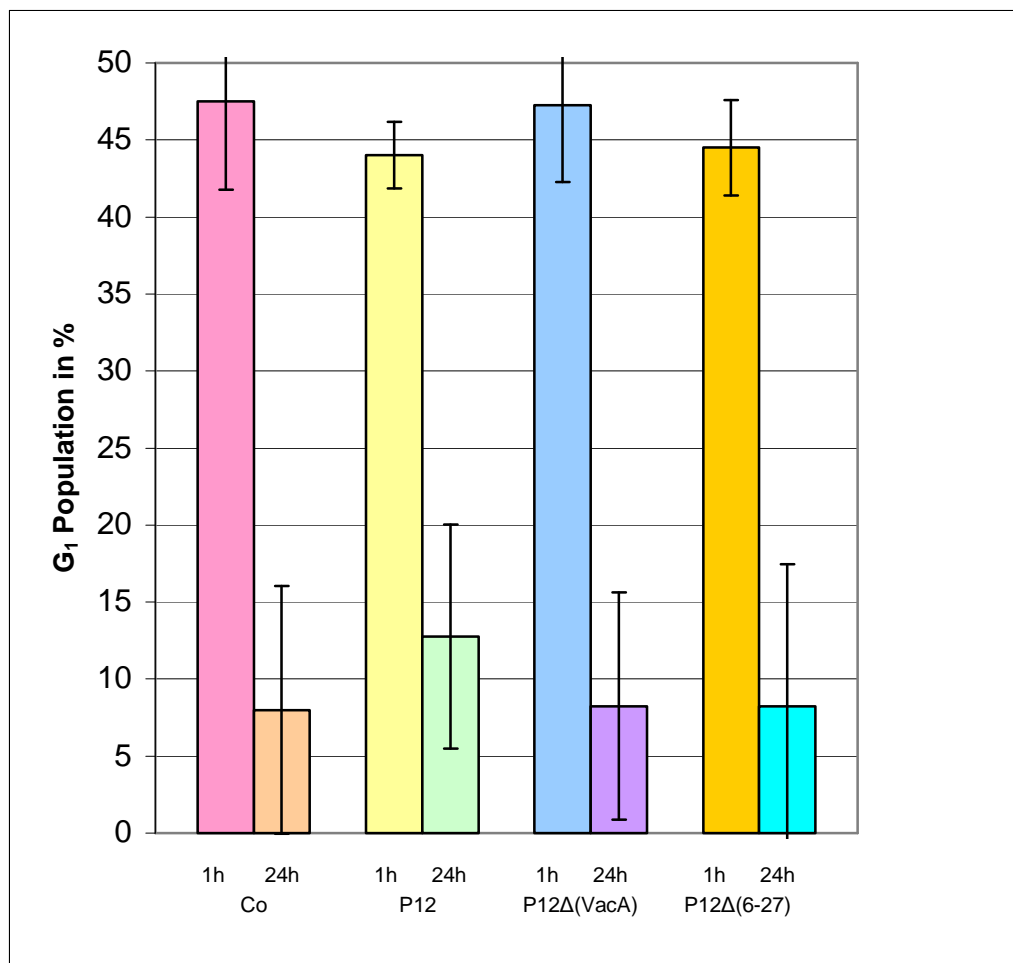


Abb. 8: BrdU-freie G₁-Population gemessen 1h und 24h nach Experimentansatz.

Das Säulendiagramm gibt die Mittelwerte mit Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten wieder ($n = 4$). Zur Zellsuspension mit 10^6 Jurkat-Zellen/ml kam im Kontrollansatz (Co) BrdU mit einer Endkonzentration $c = 20 \mu\text{M}$. Die weiteren Proben wurden zusätzlich mit den Überständen von *H. pylori* P12 oder seinen isogenen Mutanten, P12 Δ (VacA) oder P12 Δ (6-27) inkubiert. Die resultierende Proteinkonzentration der Überstände betrug $c = 250 \mu\text{g/ml}$.

Ansatzschema kursorisch: Jurkat-Zellen aus 10 % FCS, keine Säureaktivierung, kein Mitogen.

Tabelle 1 im Anhang gibt die Einzelwerte mit Mittelwert und Standardabweichung wieder.

In der Literatur wird allgemein berichtet, die zyklushemmende Wirkung von VacA sei nach Säureaktivierung verstärkt (z. B. Cover et al. 2003; Oswald-Richter et al. 2006). In vier unabhängigen Versuchen konnten wir die Aktivitätssteigerung nach Säureaktivierung mit einem signifikanten Unterschied

der Mittelwerte nach 24h Inkubation bestätigen. Die G_1 -Population im P12a Ansatz sank von 36,8 %, gemessen eine Stunde nach Experimentansatz, auf 12,5 % binnen 24h. Bei annähernd gleich hoher 1h Population fiel der G_1 -Anteil unter P12 Δ (VacA) (3,8 %) und P12 Δ (6-27)a (5,8 %) Einwirkung und im Kontrollansatz (3,3 %) signifikant deutlich ab (vgl. Abb. 9, Säulendiagramm und Abb. 10, Punktdiagramm).

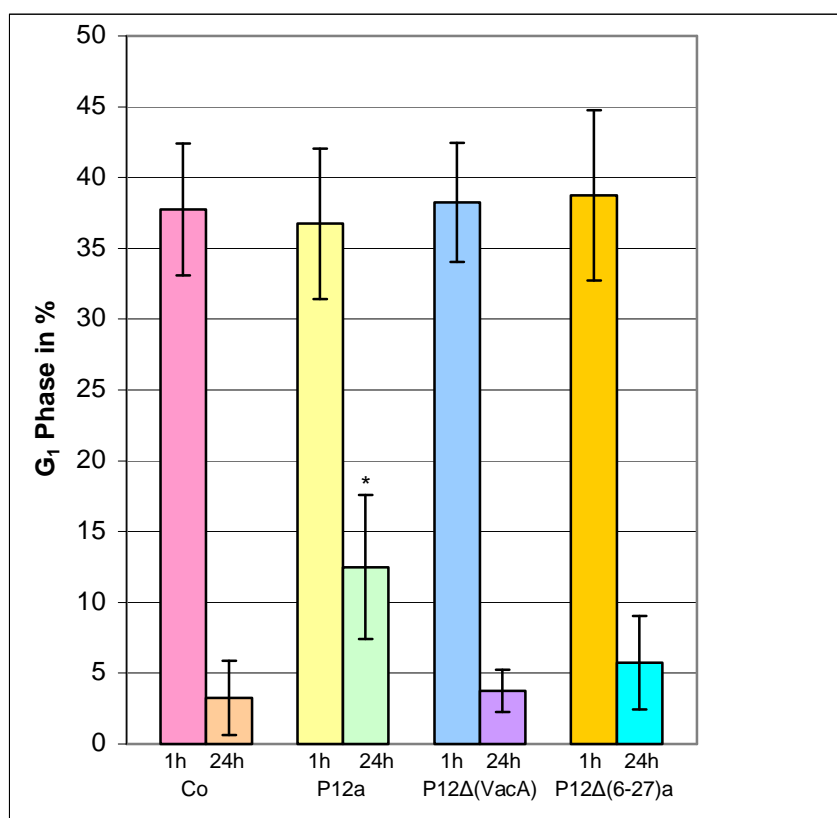


Abb. 9: Säulendiagramm zu den Mittelwerten mit Standardabweichung der BrdU-freien G_1 -Populationen aus vier unabhängigen Experimenten ($n = 4$). * für P12a vs. Co und für P12a vs. P12 Δ (VacA) ist $p < 0,01$ (Student's t Test, JMP Programm, Version: 4.0.0). Für P12a vs. P12 Δ (6-27)a ist $p < 0,05$. Es wurden 10^6 Jurkat-Zellen/ml mit BrdU ($c = 20 \mu\text{M}$) und zellfreien Extrakten der H.-pylori-Stämme P12, P12 Δ (VacA) oder P12 Δ (6-27) inkubiert (Protein-Endkonzentration $c = 250 \mu\text{g/ml}$). Zur Säureaktivierung der Überstände P12 und P12 Δ (6-27) kam (1N) HCl Lösung zum Einsatz mit anschließender Neutralisierung mittels (1N) NaOH Lösung. Ansatzschema cursorisch: Jurkat-Zellen aus 10 % FCS, mit Säureaktivierung, kein Mitogen. Tabelle 2 im Anhang gibt die Einzelwerte mit Mittelwert und Standardabweichung wieder.

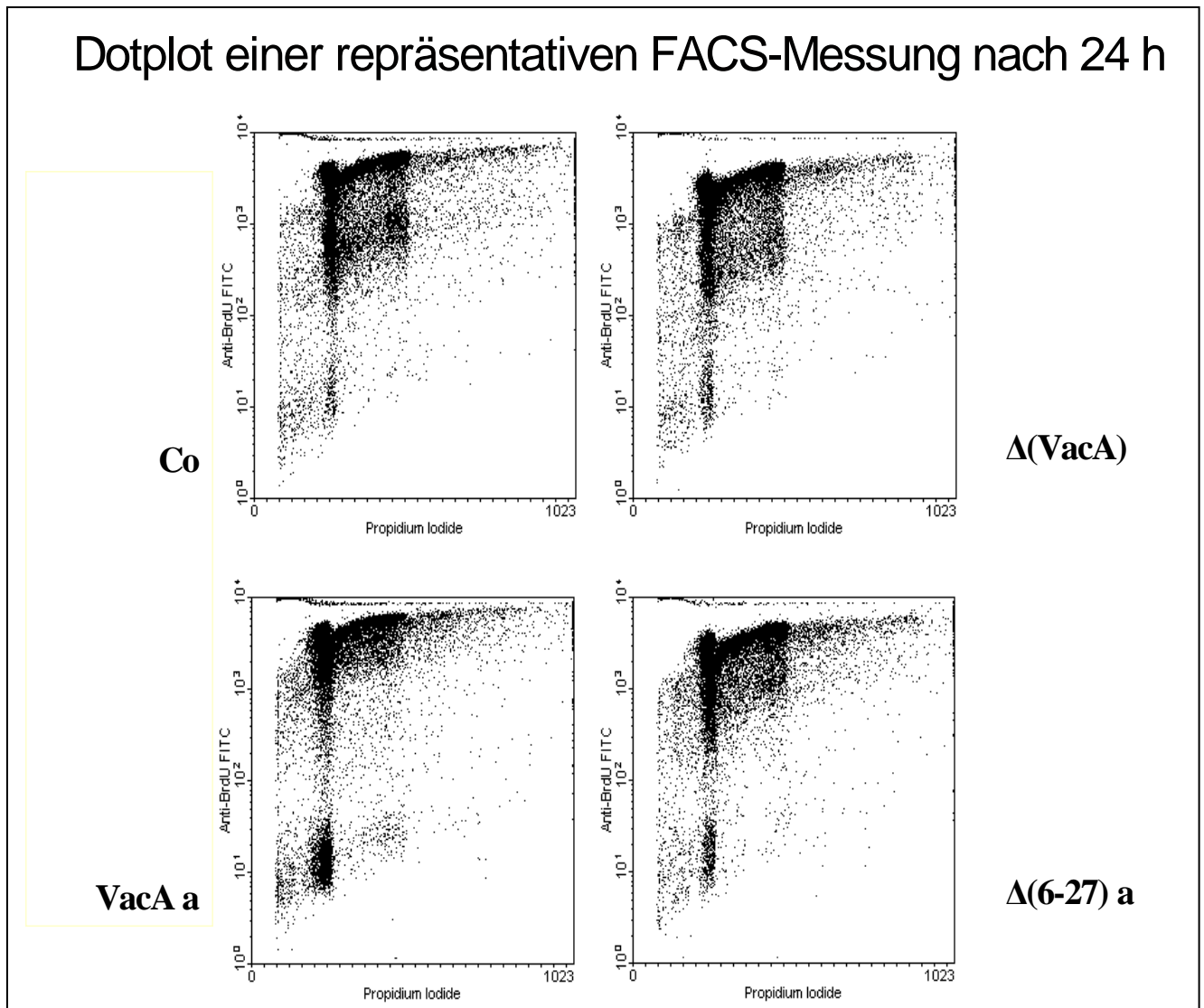


Abb. 10: Vier originale Dotplots aus dieser Arbeit – repräsentative FACS-Messung nach 24 Stunden. In jedem Diagramm ist Propidium Iodid (Abszisse) gegen Anti-BrdU (Ordinate) aufgetragen. Dargestellt sind die FACS Messungen eines Experimentansatzes nach 24 Stunden Inkubation mit dem zellfreien Extrakt des *H. pylori* P12 nach Säureaktivierung (Extrakt Vac a), der isogenen Mutanten P12Δ(VacA) (Extrakt Δ(VacA)), und nach Säureaktivierung P12Δ(6-27) (Extrakt Δ(6-27) a), gegen den Kontrollansatz (Co). Im Vergleich dieser vier Dotplots fällt die vergrößerte G₁-Population in der VacA a Messung deutlich auf.

Mit Hilfe des Lektins Concanavalin A (ConA) sollte die hemmende Wirkung von VacA auf den Phasenwechsel verstärkt werden. Das Experimentsetting folgte dem oben genannten Protokoll. Sowohl für native Überstände (vgl. Abb. 11) als auch für die säureaktivierten Überstände (vgl. Abb. 12) konnten keine Arretierungsunterschiede der einzelnen H.-pylori-Stämme auf die G₁-Population in der 24h-Auswertung nachgewiesen werden.

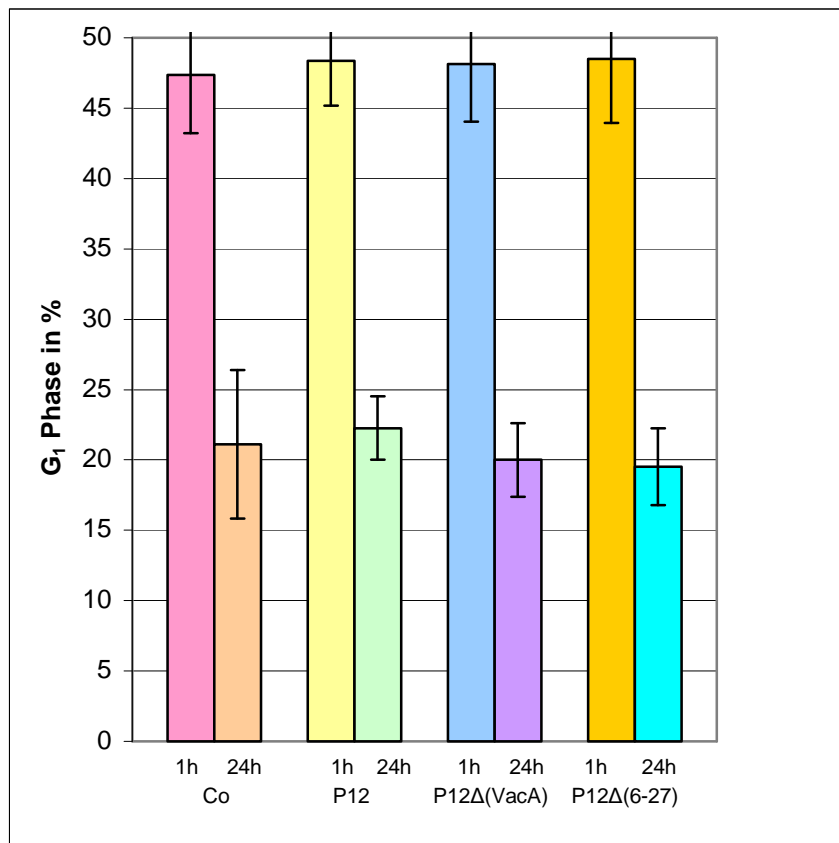


Abb. 11: Säulendiagramm mit Standardabweichung zu den Mittelwerten der BrdU-freien G₁-Populationen aus acht unabhängigen Experimenten (n = 8) ohne Säureaktivierung.

Ansatzschema kursorisch: Jurkat-Zellen aus 10 % FCS, keine Säureaktivierung, Mitogen: ConA.

Tabelle 3 im Anhang gibt die Einzelwerte mit Mittelwert und Standardabweichung wieder.

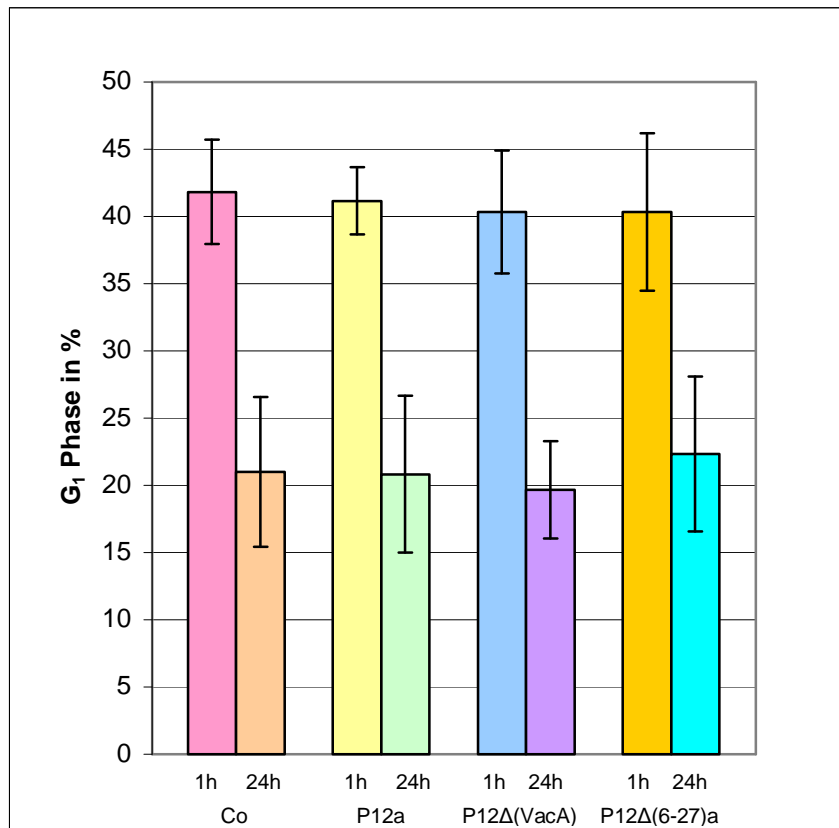


Abb. 12: Säulendiagramm mit Standardabweichung zu den Mittelwerten der BrdU-freien G1-Populationen aus sechs unabhängigen Experimenten (n = 6). Ansatzschema kursorisch: Jurkat-Zellen aus 10 % FCS, mit Säureaktivierung, Mitogen: ConA. Tabelle 4 im Anhang gibt die Einzelwerte mit Mittelwert und Standardabweichung wieder.

Alternativ zu ConA kam in einer weiteren Experimentstaffel als mitogener Stimulus PMA/Iono zum Einsatz. Publikationen anderer Forschergruppen berichteten von deutlichen Ergebnissen an Jurkat-Zellen nach Stimulierung mit PMA und dem Ionophor Ionomycin. P12 Bakterien hemmten in Jurkat-Zellen die IL-2 Sekretion trotz mitogener Aktivierung.

In Ergänzung des Experimentaufbaus beimpften wir Jurkat-Zellen zeitgleich zu den Überständen mit PMA (Endkonzentration $c = 150 \text{ ng/ml}$) und Iono ($c = 3 \text{ }\mu\text{M}$). In der ersten Experiment-Gruppe ohne säureaktivierte Überstände fand sich in der G_1 -Population 24h nach Experimentansatz kein Unterschied zwischen P12 und den isogenen H.-pylori-Stämmen oder dem Kontrollansatz (vgl. Abb. 13).

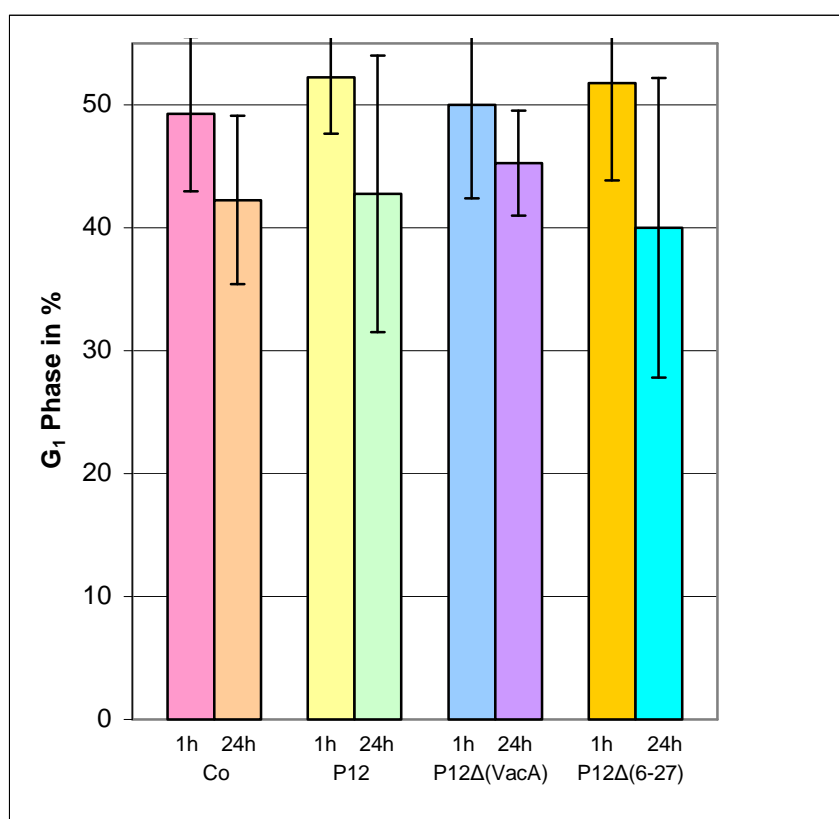


Abb. 13: Säulendiagramm mit Standardabweichung zu den Mittelwerten der BrdU-freien G_1 -Populationen aus vier unabhängigen Experimenten ($n = 4$). PMA ($c = 150 \text{ ng/ml}$) und Ionomycin ($c = 3 \text{ }\mu\text{M}$) kamen als aktivierende Stimuli zur Anwendung. Auffällig ist die hohe G_1 -Quote in jedem der vier Ansätze sowohl in der 1h als auch in der 24h Auswertung. Ansatzschema cursorisch: Jurkat-Zellen aus 10 % FCS, ohne Säureaktivierung, Mitogene: PMA/Iono. Tabelle 5 im Anhang gibt die Einzelwerte mit Mittelwert und Standardabweichung wieder.

Nach Säureaktivierung des Wild-Typ- und des $\Delta(6-27)$ -VacA Proteins zeigte sich in der G_1 -Population nach 24h Bebrütung ein signifikanter Unterschied. P12a hemmte 46,3 % der Jurkat-Zellen am Phasenwechsel die Kontrolle dagegen nur 32,5 % ($p < 0,05$ im Student's t Test, JMP Programm, Version: 4.0.0). Auch gegenüber dem isogenen Mutanten P12 Δ (VacA) fand sich eine deutliche Abweichung, die aber keine statistische Signifikanz entfaltetete (vgl. Abb. 14).

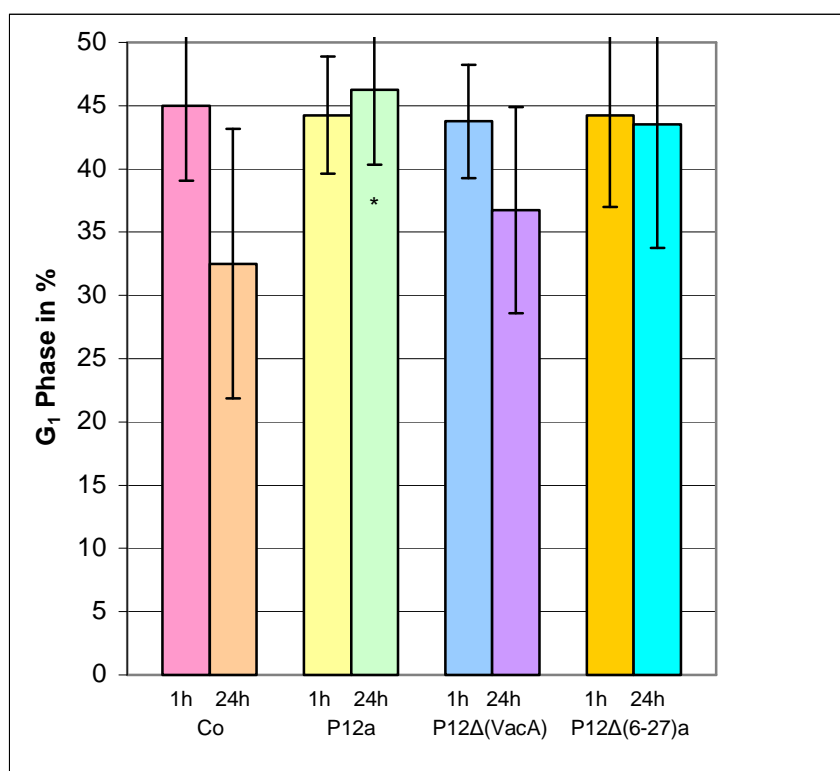


Abb. 14: Säulendiagramm mit Standardabweichung zu den Mittelwerten der BrdU-freien G_1 -Populationen aus vier unabhängigen Experimenten ($n = 4$). * Die Mittelwerte der G_1 -Population unter Einwirkung von P12a weichen mit 46,3 % signifikant von der Kontrolle (Co) mit 32,5 % ($p < 0,05$ im Student's t Test, JMP Programm, Version: 4.0.0) und deutlich von P12 Δ (VacA) ab.

Ansatzschema kursorisch: Jurkat-Zellen aus 10 % FCS, mit Säureaktivierung, Mitogene: PMA/Iono.

Tabelle 6 im Anhang gibt die Einzelwerte mit Mittelwert und Standardabweichung wieder.

Bezugnehmend auf Veröffentlichungen zur partiellen Zellzyklus-Synchronisation am Modell der AGS-Zellen nach 48 Stunden Serumdeprivation stand die Frage im Raum, ob diese Synchronisation auch mit Jurkat-Zellen erreicht werden kann? Und im Übertrag sollte sich die phasenhemmende Wirkung des s1/m1-VacA Proteins auch an diesen serumdeprivierten Jurkat-Zellen nachweisen lassen. So kamen die Jurkat-Zellen vor Durchführung der einzelnen Experimente für 72 Stunden in Kulturmedium mit 0,2 % FCS Anteil. Nach einer Vitalitätsprüfung mit Trypan Blau (Vitalitätsanteil > 95 %) schlossen sich zum besseren Vergleich dieselben Experimentprotokolle wie oben an.

Am Anfang der VacA Experimente mit serumdeprivierten Jurkat-Zellen stand die Frage, ob nach dreitägigem Serumentzug eine partielle Synchronisation im Zellzyklus am Modell der Jurkat-Zellen verifiziert werden kann? Wir führten acht unabhängige Experimente an Jurkat-Zellen aus 10 % FCS-Medium und weitere acht an Zellen nach 72 Stunden Kultivierung in 0,2 % FCS-Medium durch. Die Auswertung der G₁-Population nach 1h Inkubation mit Vergleich der Mittelwerte falsifizierte die Arbeitshypothese (vgl. Abb. 15). Die in 10 % FCS gezüchteten Jurkat-Zellen waren im Mittel zu 42,6 % in der G₁-Phase arretiert, die aus Kulturmedium mit 0,2 % FCS-Anteil nur zu 36,3 % mit deutlich verbreiteter Standardabweichung.

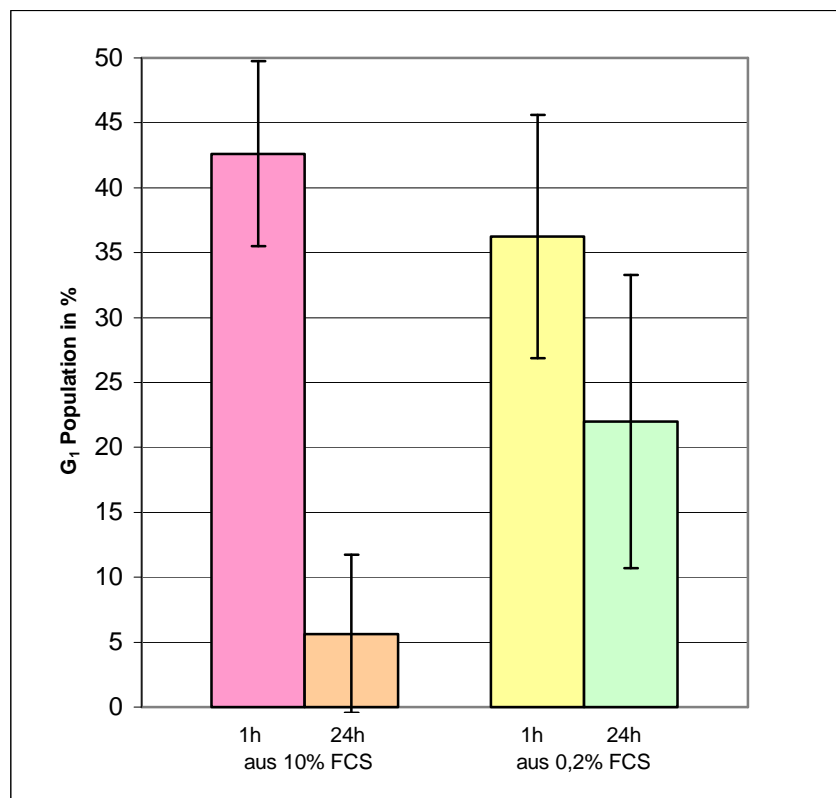


Abb. 15: Säulendiagramm mit Standardabweichung zu den Mittelwerten der BrdU-freien G₁-Populationen aus acht unabhängigen Experimenten (n = 8) mit Jurkat-Zellen, die 72 Stunden vor dem Versuch in Kulturmedium mit 10 % FCS gezüchtet wurden und 8 unabhängigen Experimenten mit Zellen aus 0,2 % FCS-Kulturmedium.
 Ansatzschema kursorisch: Jurkat-Zellen aus 10 % FCS vs. 0,2 % FCS, ohne Säureaktivierung, ohne Mitogen.
 Tabelle 7 im Anhang gibt die Einzelwerte mit Mittelwert und Standardabweichung wieder.

Eine partielle Synchronisation der Modell-Zellen ließ sich mit Serumentzug über drei Tage nicht erzielen. Aus diesen Vorversuchen leitete sich die Fragestellung ab:

1. Wie würde sich die G₁-Population von durchschnittlich 22 % nach 24h Inkubation in den oben vorgestellten Protokollen verhalten?
2. Läßt sich eine den nativen Jurkat-Zellen vergleichbare Phasenarretierung erzielen?

Nach 24 Stunden Inkubation mit Überständen ohne Säureaktivierung zeigte sich kein Unterschied zwischen den einzelnen zellfreien Extrakten und der Kontrolle (vgl. Abb. 16). Im Diagramm fiel erneut die große Standardabweichung sowohl in der 1h- als auch 24h-Auswertung auf. Im Vergleich hierzu erschienen die Jurkat-Zellen, die in normalen 10 % FCS Medium kultiviert worden sind in einem größeren Umfang synchronisiert (vgl. hierzu Abb. 8 auf Seite 67). Die scheinbare Unruhe, abzulesen an den hohen Standardabweichungen, zeigte sich auch im weiteren Verlauf bei allen Experimenten mit deprivierten Jurkat-Zellen.

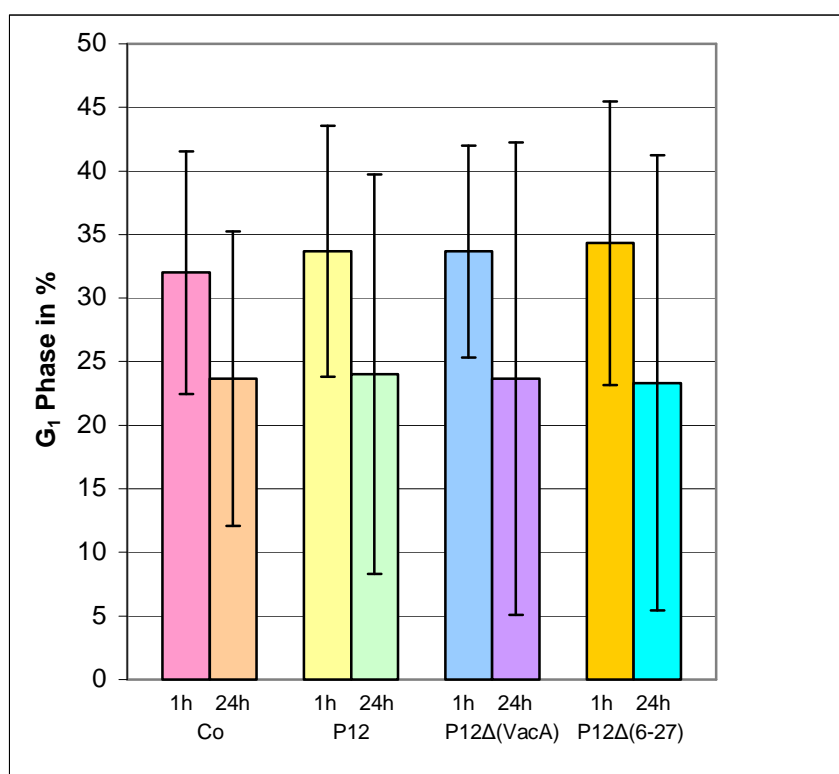


Abb. 16: Säulendiagramm mit Standardabweichung zu den Mittelwerten der BrdU-freien G₁-Populationen aus drei unabhängigen Experimenten (n = 3). Im Sinne der Serumdeprivation waren die nativen Jurkat-Zellen 72 Stunden vor dem Probenansatz in Nährmedium mit 0,2 % FCS Anteil kultiviert worden. Ansatzschema cursorisch: Jurkat-Zellen aus 0,2 % FCS, ohne Säureaktivierung, kein Mitogen. Tabelle 8 im Anhang gibt die Einzelwerte mit Mittelwert und Standardabweichung wieder.

In den anschließenden Experimenten mit säureaktivierten Überständen des H.-pylori-Stamms P12 und seines isogenen Mutanten P12 Δ (6-27) zeigte sich nach 24 Stunden Bebrütung ein angedeuteter Unterschied (vgl. Abb. 17). Die Mittelwerte aus fünf einzelnen Experimenten zeigten für P12a 23 % der Zellen in G₁ verhaftet, für die Kontrolle 21 % und für Δ (VacA) und Δ (6-27)a 16,8 % und 18,2 %. Der Student's t Test weist für alle Mittelwerte mit $p > 0,1$ keine statistische Signifikanz aus.

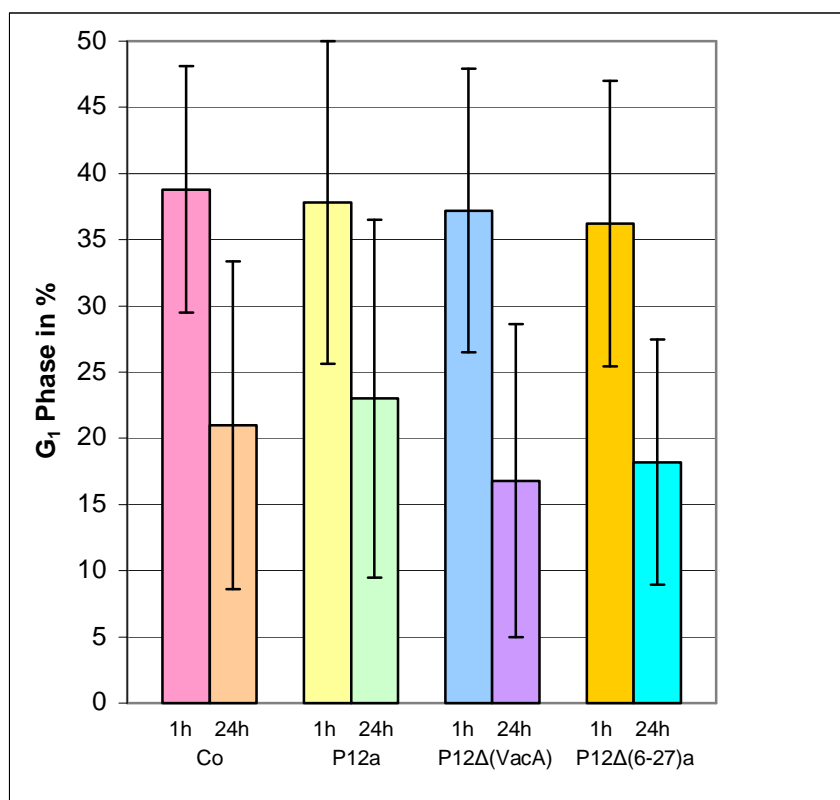


Abb. 17: Säulendiagramm mit Standardabweichung zu den Mittelwerten der BrdU-freien G₁-Populationen aus fünf unabhängigen Experimenten (n = 5). Vor Experimentansatz waren die Jurkat-Zellen drei Tage lang in serumdepriviertem Nährmedium kultiviert worden (0,2 % FCS). Ansatzschema kursorisch: Jurkat-Zellen aus 0,2 % FCS, mit Säureaktivierung, kein Mitogen. Tabelle 9 im Anhang gibt die Einzelwerte mit Mittelwert und Standardabweichung wieder.

Die zusätzliche Stimulation mit ConA ergab ähnliche Ergebnisse. Die Inkubation mit nativen Überständen erbrachte auf die Mittelwerte bezogen keine Differenz zwischen der Kontrolle und den einzelnen H.-pylori-Stämmen (vgl. Abb. 18). Die Säureaktivierung bewirkte einen Unterschied, der aber im Student's t Test keine signifikante Qualität entwickelte (vgl. Abb. 19).

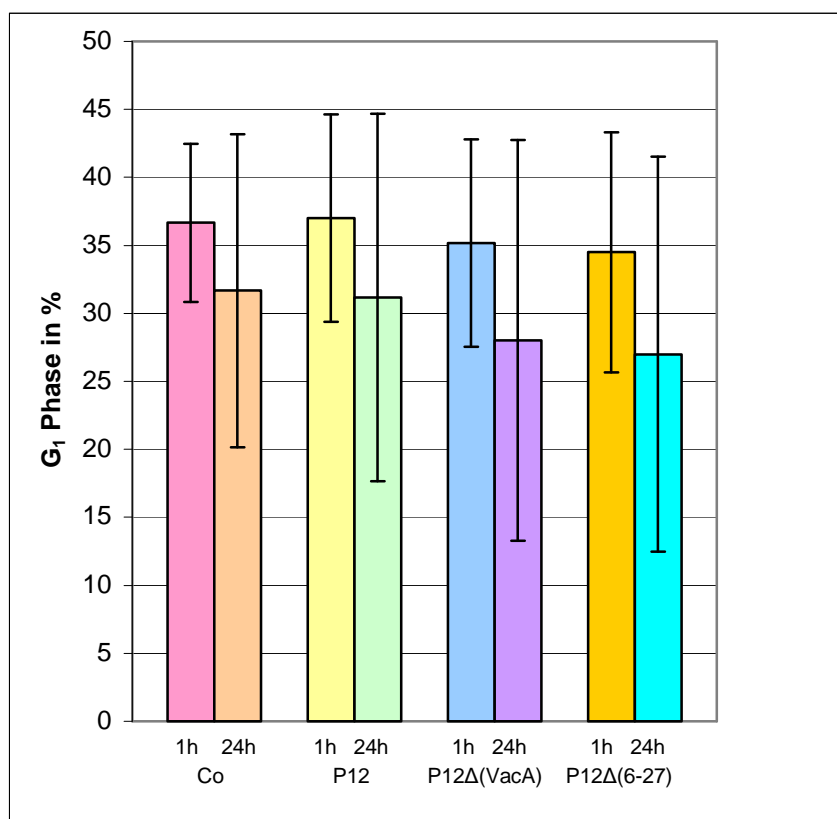


Abb. 18: Säulendiagramm mit Standardabweichung zu den Mittelwerten der BrdU-freien G₁-Populationen aus sechs unabhängigen Experimenten (n = 6). Vor Experimentansatz waren die Jurkat-Zellen 72 Stunden lang in serumdeprivierten Nährmedium kultiviert worden (0,2 % FCS). Ansatzschema kursorisch: Jurkat-Zellen aus 0,2 % FCS, ohne Säureaktivierung, Mitogen: ConA. Tabelle 10 im Anhang gibt die Einzelwerte mit Mittelwert und Standardabweichung wieder.

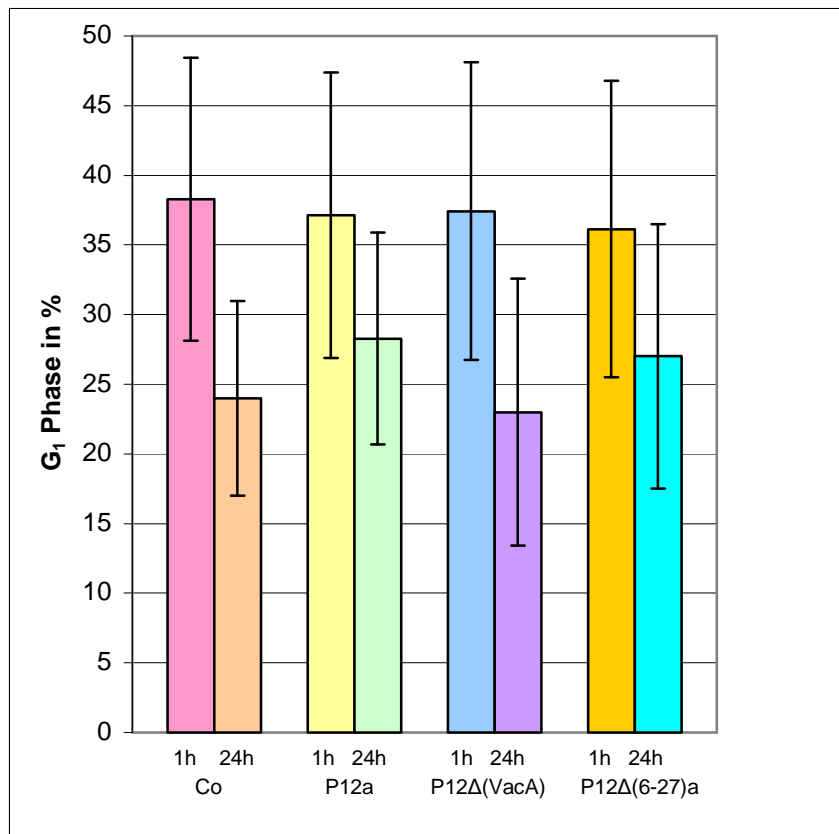


Abb. 19: Säulendiagramm mit Standardabweichung zu den Mittelwerten der BrdU-freien G₁-Populationen aus sieben unabhängigen Experimenten (n = 7). Vor Experimentansatz waren die Jurkat-Zellen 72 Stunden lang in serumdeprivierten Nährmedium kultiviert worden (0,2 % FCS). Ansatzschema cursorisch: Jurkat-Zellen aus 0,2 % FCS, mit Säureaktivierung, Mitogen: ConA. Tabelle 11 im Anhang gibt die Einzelwerte mit Mittelwert und Standardabweichung wieder.

Die abschließende Experimentstaffel befragte die Wirkung der zellfreien Extrakte auf deprivierte Jurkat-Zellen bei gleichzeitiger Stimulation mit PMA/Iono. In der statistischen Auswertung dieser Experimente mit dem JMP Programm, Version: 4.0.0 fällt der deutliche aber nicht signifikante Unterschied unter P12 Beimpfung vs. Kontrollansatz und isogenen Mutanten im nicht säureaktivierten Setting auf (vgl. Abb. 20). Dieses positive Ergebnis nivellierte sich jedoch nach Säureaktivierung (vgl. Abb. 21). P12a arretierte nach 24 Stunden Inkubation 34,8 % der Jurkat-Zellen in der G₁-Zyklusphase. Dies lag

nur leicht über den Mittelwerten der Kontrolle (33,5 %) oder der isogenen Mutanten $\Delta(\text{VacA})$ (33,0 %) und $\Delta(6-27)a$ (28,8 %).

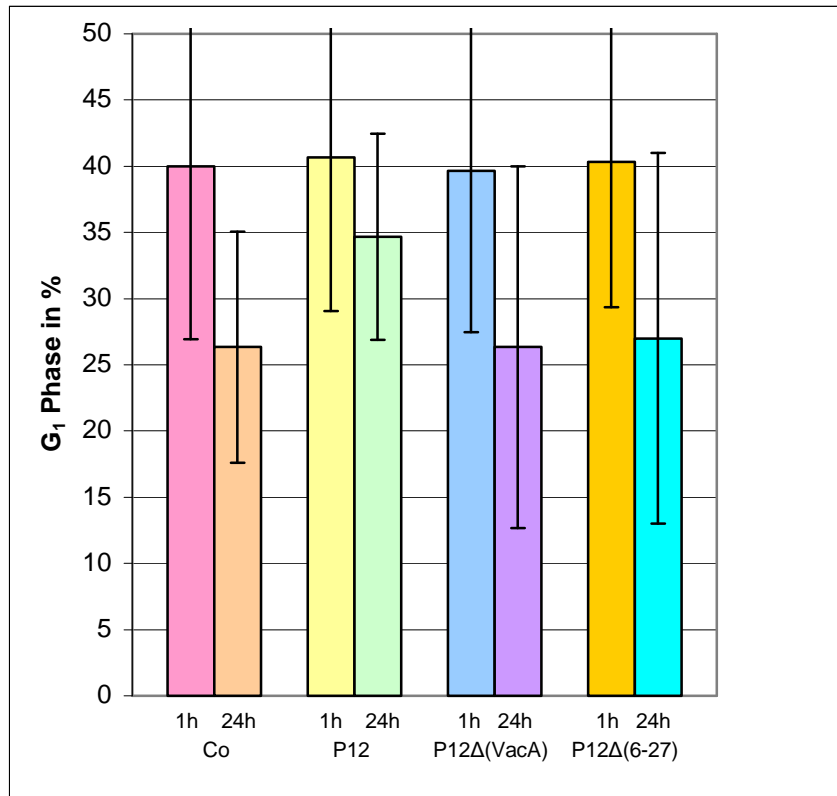


Abb. 20: Säulendiagramm mit Standardabweichung zu den Mittelwerten der BrdU-freien G₁-Populationen aus drei unabhängigen Experimenten (n = 3).

Ansatzschema kursorisch: Jurkat-Zellen aus 0,2 % FCS, ohne Säureaktivierung, Mitogene: PMA/Iono.

Tabelle 12 im Anhang gibt die Einzelwerte mit Mittelwert und Standardabweichung wieder.

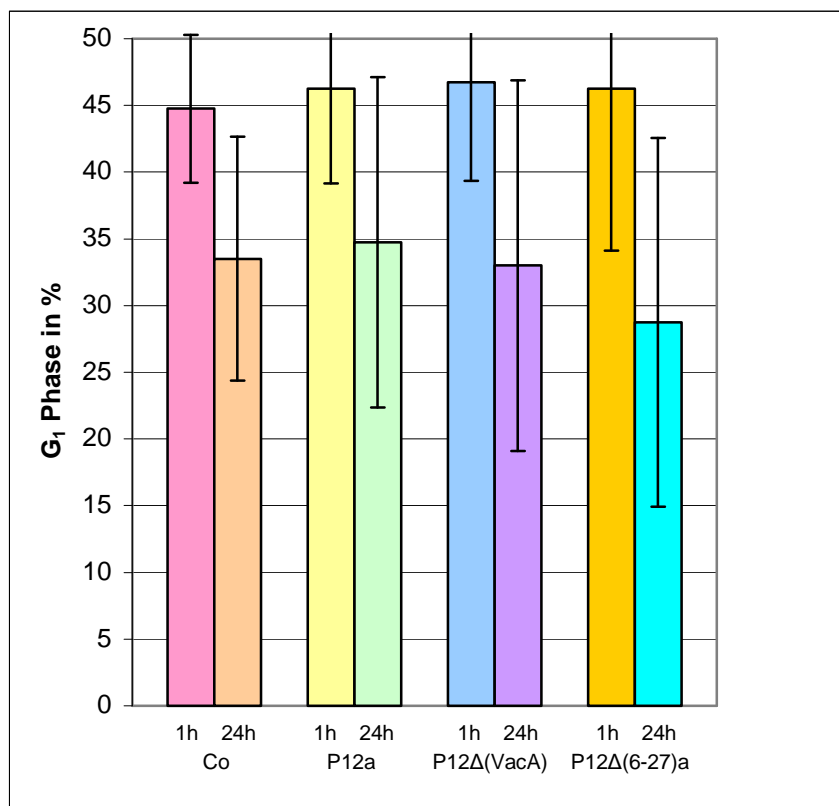


Abb. 21: Säulendiagramm mit Standardabweichung zu den Mittelwerten der BrdU-freien G₁-Populationen aus vier unabhängigen Experimenten (n = 4).

Ansatzschema kursorisch: Jurkat-Zellen aus 0,2 % FCS, mit Säureaktivierung, Mitogene: PMA/Iono.

Tabelle 13 im Anhang gibt die Einzelwerte mit Mittelwert und Standardabweichung wieder.

4 Diskussion

Bisher gab es nur wenige Studien, die den Einfluss von Bakterien und ihrer Toxine auf den Zellzyklus von Säugetierzellen zum Gegenstand hatten. Die Hemmung des G₁-S Transient durch *H. pylori*, wie sie in dieser Studie gezeigt wurde, setzt sich deutlich von der G₂ Arretierung durch die Toxine von *Escherichia coli* (Peres et al. 1997), *Camphylobacter jejuni* (Whitehouse et al. 1998) und HIV (Stewart et al. 1999) ab. Es scheint, dass Mikroorganismen eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt haben, um den Zyklus eukaryontischer Zellen im Sinne einer Pathogenität zu beeinflussen (Shirin et al. 1999). Und besonders das Vac Toxin stellt mit seiner Aminosäuresequenz, seiner ultrastrukturellen Morphologie und seiner zellularen Wirkung eine Besonderheit im Vergleich zu allen bisher bekannten Bakterientoxinen dar (Vinion-Dubiel et al. 1999). Wie schon Massari et al. (1998) an HeLa-Zellen zeigen konnten und Boncristiano et al. (2003) bestätigten, bindet sich im zellfreien Überstand gelöstes VacA an Zielzellen und entfaltet dort seine typische Wirkung. Kuck et al. (2001) konnten im zellfreien Überstand die spezifische VacA Aktivität nachweisen. Nach Immunopräzipitation mit Anti-Vac Antikörpern verlor der Überstand seine spezifische VacA Aktivität.

In der hier vorgestellten Studie, konnte die hemmende Wirkung von VacA auf den Zell-Zyklus der Jurkat-Zellen gezeigt werden. Getestet wurde der zellfreie Überstand von P12 mit dem Wildtyp s1/m1 codierten Toxin gegen die Extrakte von P12Δ(VacA), P12Δ(6-27) und einem Kontrollansatz. Als Messgröße dienten die Jurkat-Zellen in der G₁-Phase ohne inkorporiertem BrdU. Der prozentuale Anteil dieser Teilpopulation bezogen auf die Gesamtzahl aller Zellen drückte die phasenarretierende Wirkung der einzelnen Überstände bzw. der Kontrolle aus.

Der zellfreie Extrakt des *H.-pylori*-Stammes P12 hemmte mit dem vollständigen und nicht säureaktiven VacA-Protein 12,8 % aller Zellen am Phasenwechsel.

Sowohl die Kontrolle als auch die Überstände der isogenen Mutanten P12 Δ (VacA) und P12 Δ (6-27) zeigten eine deutlich schwächere Wirkung. Diese Ergebnisse, besonders die Arretierung durch VacA-Extrakt und die aufgehobene Arretierung durch Δ (VacA)-Extrakt, bestätigen die Ergebnisse von Gebert et al. (2003). In deren Studie wurde die Proliferationshemmung der Jurkat-Zellen gemessen an der Zelldichte beschrieben. Sowohl die Beimpfung mit dem Wildtyp-Bakterium P12 als auch mit dessen zellfreiem Überstand bewirkte jeweils eine Teilungshemmung. Der isogene Mutant P12 Δ (VacA) war sowohl als Bakterium als auch als Überstand wirkungslos. Gebert et al. untersuchten nicht, in welcher Zyklusphase das Toxin die Arretierung induzierte.

Gerhard et al. (2005) wiesen in ihren Untersuchungen mit den zellfreien Überständen der Stämme P12 (codiert s1/m1 VacA) und Tx30a (codiert s2/m2 VacA, ohne zytotoxischer Aktivität (Atherton et al. 1995)) keinen Unterschied bei der Proliferationshemmung an peripheren Blutlymphozyten nach. Beide Stämme hemmten nach Messung im [³H]-Thymidin Assay die Proliferation in gleichen Umfang. In diesem Zusammenhang ist auf die Arbeit von Sundrud et al. (2004) an Jurkat-Zellen im Vergleich zu peripheren Blutlymphozyten zu verweisen. Sie zeigten, dass VacA die Proliferation der Jurkat-Zellen durch Blockierung der NFAT_c-Phosphatase Calcineurin hemmt. Daraus folgt die Hemmung der IL-2 Transkription in den Jurkat-Zellen. Bei peripheren Blutlymphozyten greift VacA über einen anderen nachgeordneten Mechanismus in die Zellproliferation ein, wobei die IL-2 Sekretion als solches nicht beeinflusst wird (Sundrud et al. 2004).

Einige Forschergruppen beschrieben eine apoptotische Wirkung des zellfreien Überstandes auf AGS-Zellen, z. B. für den H.-pylori-Stamm P12 bei einer Proteinendkonzentration von 200 μ g/ml (Kuck et al. 2001). Diese Beobachtungen scheinen sich aber auf Epithelzellen zu beschränken. So fanden Gebert et al. (2003) keine gesteigerte Apoptose an Jurkat-Zellen nach 22 Stunden Inkubation mit zellfreiem Extrakt der Stämme P12 oder

P12 Δ (VacA). Für CD4⁺ Zellen schlossen Oswald-Richter et al. (2006) ebenfalls eine VacA induzierte Apoptose aus.

Die Säureaktivierung verändert die dreidimensionale Struktur von VacA, mithin das Fluoreszenzspektrum und das proteolytische Verhalten (de Bernard et al. 1995). Und trotz der anschließenden Neutralisierung scheint die Konformitätsänderung erhalten zu bleiben (Yahiro et al. 1999). Wir fanden nach Säureaktivierung für eine Stunde bei pH 2 - 3 für P12-VacA a-Extrakt eine Zyklusarretierung mit statistischer Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle und Δ (VacA)-Extrakt von $p < 0,01$ (Student's t Test) und gegenüber säureaktiviertem $\Delta(6-27)$ a-Extrakt von $p < 0,5$ (Student's t Test). Die gesteigerte VacA-Wirkung, wie sie von vielen Forscherteams beschrieben wurde spiegelt sich in diesem Ergebnis sehr gut wieder. Yahiro et al. (1999) konnten nach Aktivierung eine verstärkte Vacuolenbildungsaktivität in AZ-521-Zellen in der FACS-Messung nachweisen. Sie beschrieben eine gesteigerte Bindungsaktivität, die mit einer Verdreifachung der Vacuolendichte einherging. Ilver et al. (2004) konnten die verstärkte Toxizität schon nach 5 min Aktivierungszeit bei pH 2 am Modell der AGS-Zellen messen. In Bezug auf epitheliale AGS-Zellen verstärkt die Säureaktivierung des VacA-Proteins seine apoptotische Wirkung (Cover et al. 2003). Ebenso verhielt es sich beim HIV Infektionsschutz. Säureaktiviertes VacA hemmte ähnlich wie Rapamycin die vollständige HIV Infektion von TCR stimulierten primären humanen T-Zellen. Ohne Aktivierung konnte VacA die Infektion der T-Zellen nicht verhindern (Oswald-Richter et al. 2006). In den letzten Jahren setzten die meisten Forschungsgruppen zellfreie Extrakte nach Säureaktivierung ein (Sundrud et al. 2004).

In dem hier vorgestellten Experimentsetting stellte die BrdU-freie G₁-Population eine endliche Größe dar. Diese Zellpopulation konnte nicht mehr mit weiteren Zellen aus der S-Phase aufgefüllt werden. Der Zusatz der mitogenen Substanzen ConA oder PMA/Ionomycin sollten den Phasenwechsel vorantreiben und die VacA-Arretierung deutlicher hervorheben.

Das Lektin ConA (Endkonzentration $c = 0,1$ mg/ml) bindet an den TCR/CD28 Komplex und induziert in Jurkat-Zellen die IL-2 Freisetzung (Gillis et Watson 1980). In Co-Kultivierung mit ConA hemmte der zellfreie Überstand von P12 ohne Säureaktivierung eine deutlich größere Population als die isogenen Mutanten oder die Kontrolle. Nach Säureaktivierung verlor sich dieser Unterschied. Chen et al. (2000) stufen ConA als kontrastverstärkenden Stimulus ein. In Co-Kultivierung mit ConA werde die VacA Wirkung sehr viel deutlicher verstärkt als unter PMA/Ionomycin Stimulierung.

An HL-60 Zellen, einer humanen promyeloische Leukämie Zell-Linie, steigerte PMA die Bindungsaktivität von im Überstand gelöstem VacA (Boncristiano et al. 2003; de Bernard et al. 1998 b). Die mit PMA behandelten HL-60 Zellen bildeten vermehrt RPTP β Rezeptoren (Padilla et al. 2000). An diese Rezeptoren bindend entfaltete VacA eine gesteigerte Vacuolenbildungs-Aktivität (Ogura et al. 2000; Skibinski et al. 2006). Ebenso bilden HeLa-Zellen unter PMA Behandlung vermehrt RPTP β Rezeptoren, wobei die Sensitivität dieser Zellen gegenüber VacA dadurch nicht gesteigert wurde (Skibinski et al. 2006).

Zur Wirkung des Ionophoren Ionomycin berichteten Boncristiano et al. (2003), es komme in Jurkat-Zellen zu einem massiven Ca^{2+} Einstrom, der unter VacA Einwirkung gehemmt werde.

Wie die hier vorgestellten Daten zeigten bei gleichzeitiger Stimulation mit den mitogenen Substanzen PMA/Ionomycin entfaltete säureaktiviertes VacA im Vergleich zum nativen VacA-Protein eine deutlich stärkere Aktivität. Nativer, zellfreier Überstand von P12 arretierte nicht mehr Zellen in der G_1 -Phase als die Kontrolle oder die Extrakte der Mutanten. Gebert et al. (2003) berichteten von einer Hemmung der IL-2 Sekretion in Jurkat-Zellen. Wurden diese zusammen mit *H. pylori* P12 Bakterien unter PMA/Ionomycin Stimulierung inkubiert kam es zum Abfall der IL-2 Sekretion. Wenn die IL-2 Sekretion der Kontrolle und P12 Δ (VacA) mit 100% gleichgesetzt wurden, so fiel die Sekretion unter Wildtypen P12 Einwirkung auf ca. 40 % ab. Sundrud et al. (2004) verglichen die Wirkung des VacA-Extraktes mit $\Delta(6-27)$ -Extrakt unter PMA/Ionomycin

Stimulierung an Jurkat-Zellen. Kam es unter VacA zum Sistieren der IL-2 Sekretion, so konnten die Autoren sowohl im Kontrollansatz als auch im P12 Δ (6-27)-Ansatz 1200 pg/ml IL-2 nachweisen. Unabhängig von VacA berichteten schon Flanagan et al. 1992 von einer PMA/Ionomycin induzierten IL-2 Sekretion in Jurkat-Zellen. Und Knickelbein et al. (2006) fanden eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und AP-1. Lissy et al. (1998) berichteten von ihren Untersuchungen an Jurkat-Zellen. Sie inkubierten Jurkat-Zellen mit 10 nM PMA und 2 μ M Ionomycin ohne weitere Zusätze. Fast die gesamte Zellpopulation ging nach 18 Stunden Inkubation von einer G₁-Arretierung in den antigen induced cell death (AID) über.

In unserer Studie hinderte säureaktiviertes VacA-Protein in Co-Kultivierung mit PMA/Ionomycin 46,3 % aller Zellen am Zyklusprogress. Das war ein deutlich größerer Anteil als in der Kontrolle oder unter Δ (VacA) oder Δ (6-27)a Beimpfung. Der Unterschied der G₁-Population VacAa vom Stamm P12 gegen Kontrolle (Co) wies mit $p < 0,05$ im Student's t Test eine statistische Signifikanz auf. Gebert et al. berichteten 2003 von einer verringerten Zelldichte nach Inkubierung mit dem zellfreien Überstand des H.-pylori-Stamms P12. Wobei die Jurkat-Zellen in dieser Studie mit PHA/PMA stimuliert wurden. Setzte man die Zelldichte der Kontrolle und des Überstandes Δ (VacA) gleich 100, so sank die Zelldichte des P12 Überstandes auf 50.

Eine partielle G₁-Synchronisation konnte mit Hilfe der Serumdeprivation nicht erreicht werden. Die meisten publizierten Untersuchungen zur Serumdeprivation an Jurkat-Zellen zielten auf die Induktion und anschließende Auswertung der Apoptose z. B. durch Serumentzug über Nacht mit anschließender Bestimmung der Cycline (Yunta et Lazo 2003) oder Messung des progressiven Verlust des Membranpotenzials an den Mitochondrien ($\Delta\Psi_m$) (Beltran et al. 2000). In der hier vorgestellten Studie sollten die Jurkat-Zellen nach 72 Stunden Serumentzug im anschließenden Experimentansatz den Zellzyklus vital durchlaufen. Bei angestrebter Deprivation und gleichzeitig erhaltener Vitalität enthielt die Kulturlösung einen Restanteil FCS von 0,2 %.

Nach drei Tagen Anzucht im „Hungermedium“ folgte eine Vitalitätsprüfung mit Trypan Blau (Vitalität > 95 %) und anschließende Überführung in den Experimentansatz.

Eine Stunde nach Probenansatz fanden sich 42,3 % BrdU-freie G₁-Zellen in der Jurkat-Suspension aus 10 % FCS-Kulturmedium (Standardabweichung: 7,1). Die Jurkat-Population aus 0,2 % FCS Medium wies nach derselben Zeit mit 36,3 % einen deutlich kleineren G₁-Anteil auf. Betrachtet man die auffallend breite Standardabweichung von 9,4 so kann man hier keinesfalls von einer Synchronisation sprechen. Diese Ergebnisse stehen in auffallendem Kontrast zu den Synchronisationsraten an AGS-Zellen von Shirin et al. (1999) und Ahmed et al. (2000). Sie berichten von G₁-Populationen, die als Folge von 48h Serumentzug 60 – 75 % aller vitalen Zellen entsprachen. Andere Forschergruppen berichteten von Synchronisations-Experimenten an Jurkat-Zellen mit doppelten reversiblen Thymidin-Block in der G₁-Phase (Brattsand et al. 1994; Li et al. 1992), Nodium n-Butyrat im G₁/S Transient (Viallard et al. 2000) oder Methotrexat (Erba et al. 1992). Hier sollte der Einwand von Gong et al. (1995) berücksichtigt werden. Sie gaben zu bedenken, ob ein pharmakologischer Zellzyklus-Block das Modell der Jurkat-Zelle in einem Ausmaß verändern könne, dass die Bewertung der gewonnenen Ergebnisse kaum noch möglich sei.

Im nicht säureaktivierten Zustand hemmt Wildtyp VacA serumdeprivierte Jurkat-Zellen nur unbedeutend. Mit 24,0 % BrdU-freier G₁-Population nach 24h Inkubation und einer Standardabweichung von 15,7 ist der Unterschied zur Kontrolle und zu den Überständen $\Delta(\text{VacA})$ und $\Delta(6-27)$ unbedeutend. Es konnte keine spezielle VacA Aktivität angenommen werden.

Nach Säureaktivierung konnte der Überstand von P12 23,0 % der Zellen in der postmitotischen Phase fixieren. Gegenüber dem Kontrollansatz stellte das einen gewissen Unterschied dar, der sich gegenüber $\Delta(\text{VacA})$ und $\Delta(6-27)$ noch vergrößerte. An der serumdeprivierten AGS-Zell-Linie konnten Shirin et al.

(1999) unter VacA Beimpfung einen sehr viel deutlicheren Phasenblock beschreiben. Nach 48 Stunden Serumdeprivation betrug die partielle G₁ Synchronisation ca. 60 %. Die anschließende Co-Kultivierung mit VacA⁺/CagA⁻H. pylori Bakterien fixierte nach weiteren 12 Stunden 50 % der Zellen in der postmitotischen Phase verglichen mit 35 % in alleiniger Serumkultivierung. Die Messung erfolgte wie in unserem Setting im FACS. Da Shirin et al. kein BrdU verwendeten, stiegen die G₁-Populationen bei der 24 Stunden Messung wieder an. Anscheinend lassen sich AGS-Zellen über die Serumkonzentration im Zellzyklus leichter beeinflussen als lymphoblastoide Jurkat-Zellen.

Die Mittelwerte von sechs unabhängigen Experimenten an deprivierten und ConA stimulierten nativen Jurkat-Zellen zeigten keinen Unterschied bezogen auf den Anteil der G₁-Population. Nach Säureaktivierung war der Unterschied deutlicher. P12a setzte sich mit 28,2 % deutlich von der Kontrolle (Co) mit 24,0 % und Δ (VacA) mit 23,0 % ab. In der Literatur finden sich zu diesem Experimentsetting, serumdeprivierte Jurkat-Zellen beimpt mit VacA und ConA oder PMA/Ionomycin stimuliert keine vergleichbaren Angaben.

P12 blockierte 24 Stunden nach dem Probenansatz in Co-Stimulation mit PMA / Ionomycin 34,7 % deprivierte Jurkat-Zellen am G₁-S Phasenwechsel. Im Vergleich zur Kontrolle (Co) und den isogenen Mutanten zeigte sich in diesem Experimentprotokoll ein deutlicher Unterschied.

Mit der Säureaktivierung der Überstände P12 und Δ (6-27) ebnete sich der Unterschied über vier unabhängige Experimente (n = 4) ein. Die Mittelwerte der 24h Messung für den BrdU-freie G₁-Anteil differierten nur unwesentlich.

5 Zusammenfassung

Helicobacter pylori (*H. pylori*) kann die Magenschleimhaut des Menschen trotz einer reaktiven Immunantwort chronisch infizieren. Das gramnegative Bakterium sezerniert das Vacuolating cytotoxin A (VacA) und hemmt damit die Proliferation der T-Lymphozyten. In die Zellumgebung gelöst diffundiert der Virulenzfaktor in die entzündete Mucosa und arretiert den Zellzyklus der Lymphozyten in der G₁-Phase. Am Modell der Jurkat-Zelle wurden die zellfreien Überstände der *H.-pylori*-Stämme P12 (Wildtyp), P12Δ(VacA) (knock out null Mutant) und P12Δ(6-27) gegen eine Kontrolle getestet. Unter Verwendung von BrdU ergab sich folgende Fragen: 1. Hemmt gelöstes VacA Jurkat-Zellen in der G₁-Phase? 2. Kann die Zyklusarretierung in Co-Kultivierung mit mitogenen Stimuli oder nach Säureaktivierung potenziert werden?

Jurkat-Zellen wurden mit den zellfreien Extrakten der *H. pylori* Kulturen unter Beifügung von BrdU ($c = 20 \mu\text{M}$) für 24 Stunden inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und Fixieren mit 70 % Äthanol ruhten die Proben für 24 Stunden bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Es folgte die Inkubation mit RNase und kaltem Pepsin, jeweils im Wasserbad, sowie die DNA-Denaturierung mit (2N) HCl bei RT. Anti-BrdU Antikörper der Maus demarkierte *de novo* synthetisierte Chromosomen und mit FITC konjugierte Anti-Maus Antikörper erlaubten diesbezüglich den indirekten Nachweis. Nach DNA-Färbung mit Propidium Iodid folgte die Auswertung im Zytometer. Dabei konnte die hemmende Wirkung des gelöstem VacA auf den Zellzyklus und zwar nach Säureaktivierung mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle und zu den Extrakten der isogenen Mutanten deutlich gezeigt werden. Bei gleichzeitiger ConA Stimulierung ohne Säureaktivierung war der Unterschied dagegen nur gering. Unter Stimulierung mit PMA/Ionomycin und Säureaktivierung arretierte VacA signifikant mehr Zellen in der G₁-Phase als in der Kontrolle und P12Δ(VacA). Diese Daten reihen sich gut in die Ergebnisse anderer Forschergruppen ein. In Übereinstimmung mit Gebert und Sundrud konnte diese Untersuchung aufzeigen, dass die phasenarretierende Wirkung auf den Virulenzfaktor VacA

zurückgeführt werden kann. Der zellfreie Überstand des null VacA Mutanten ließ keinen Unterschied zur Kontrollprobe erkennen. Diese Ergebnisse können somit einen Beitrag zum Verständnis der Pathogenität von *H. pylori* liefern.

6 Anhang

6.1 Tabellen zu den BrdU-freien G₁-Populationen, aufgeschlüsselt nach Einzelmessungen

Tabelle 1: Einzelwerte zur Abb. 8

BrdU-freie G₁-Population in Prozentanteilen zur Gesamtpopulation.

Kursorisches Ansatzschema: Jurkat-Zellen aus 10 % FCS, ohne Säureaktivierung, keine mitogene Stimulierung.

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba. Co	P12	ΔVacA	Δ6-27	
J 6	10 %	keine Akti	keine Stim	1 h	55 %	47 %	54 %	49 %
J 13	10 %	keine Akti	keine Stim	1 h	43 %	44 %	44 %	42 %
J 16	10 %	keine Akti	keine Stim	1 h	43 %	42 %	43 %	44 %
J 17	10 %	keine Akti	keine Stim	1 h	49 %	43 %	48 %	43 %
			Mittelwert		47,5 %	44 %	47,3 %	44,5 %
			Standardab		5,7446	2,16	4,99166	3,1091

n = 4 für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba. Co	P12	ΔVacA	Δ6-27	
J 6	10 %	keine Akti	keine Stim	24 h	19 %	20 %	16 %	21 %
J 13	10 %	keine Akti	keine Stim	24 h	9 %	16 %	13 %	9 %
J 16	10 %	keine Akti	keine Stim	24 h	2 %	12 %	3 %	2 %
J 17	10 %	keine Akti	keine Stim	24 h	2 %	3 %	1 %	1 %
			Mittelwert		8 %	12,8 %	8,3 %	8,3 %
			Standardab		8,0416	7,274	7,36546	9,215

n = 4 für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

(Student's t Test, JMP Programm, Version: 4.0.0)

Tabelle 2: Einzelwerte zur Abb. 9

BrdU-freie G₁-Population in Prozentanteilen zur Gesamtpopulation.

Kursorisches Ansatzschema: Jurkat-Zellen aus 10 % FCS, mit Säureaktivierung, keine mitogene Stimulierung.

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba.	Co	P12a	ΔVacA	Δ6-27a
J 8	10 %	Akti	keine Stim	1 h	32 %	31 %	34 %	31 %
J 12	10 %	Akti	keine Stim	1 h	36 %	34 %	37 %	37 %
J 14	10 %	Akti	keine Stim	1 h	42 %	43 %	44 %	44 %
J 15	10 %	Akti	keine Stim	1 h	41 %	39 %	38 %	43 %
			Mittelwert		37,8 %	36,8 %	38,3 %	38,8 %
			Standardab		4,6458	5,315	4,19325	6,0208

n = 4 für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba.	Co	P12a	ΔVacA	Δ6-27a
J 8	10 %	Akti	keine Stim	24 h	1 %	5 %	3 %	2 %
J 12	10 %	Akti	keine Stim	24 h	2 %	16 %	3 %	5 %
J 14	10 %	Akti	keine Stim	24 h	7 %	15 %	6 %	10 %
J 15	10 %	Akti	keine Stim	24 h	3 %	14 %	3 %	6 %
			Mittelwert		3,3 %	12,5 %	3,8 %	5,8 %
			Standardab		2,63	5,066	1,5	3,304

n = 4 P12a vs. Δ6-27a: **p < 0,05**

P12a vs. Co und ΔVacA : **p < 0,01**

(Student's t Test, JMP Programm, Version: 4.0.0)

Tabelle 3: Einzelwerte zur Abb. 11

BrdU-freie G₁-Population in Prozentanteilen zur Gesamtpopulation.

Kursorisches Ansatzschema: Jurkat-Zellen aus 10 % FCS, ohne Säureaktivierung, mitogene Stimulierung: ConA.

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba. Co	P12	ΔVacA	Δ6-27	
J 6 a	10 %	keine Akti	ConA	1 h	52 %	55 %	54 %	56 %
J 6 b	10 %	keine Akti	ConA	1 h	54 %	50 %	53 %	55 %
J 13 a	10 %	keine Akti	ConA	1 h	45 %	47 %	47 %	45 %
J 13 b	10 %	keine Akti	ConA	1 h	42 %	46 %	46 %	47 %
J 16 a	10 %	keine Akti	ConA	1 h	45 %	45 %	41 %	45 %
J 16 b	10 %	keine Akti	ConA	1 h	44 %	47 %	47 %	45 %
J 17 a	10 %	keine Akti	ConA	1 h	48 %	50 %	48 %	49 %
J 17 b	10 %	keine Akti	ConA	1 h	49 %	47 %	49 %	46 %
			Mittelwert		47,4 %	48,4 %	48,2 %	48,5 %
			Standardab		4,1382	3,204	4,08613	4,5356
			n = 8		für alle Mittelwerte: p > 0,1			

Der zweite Teil der Tabelle 3 mit den Einzelwerten für die 24h Messung findet sich auf der nächsten Seite.

Tabelle 3: Einzelwerte zur Abb. 11 (Fortsetzung)

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba. Co	P12	Δ VacA	Δ 6-27	
J 6 a	10 %	keine Akti	ConA	24 h	32 %	21 %	17 %	18 %
J 6 b	10 %	keine Akti	ConA	24 h	24 %	25 %	19 %	16 %
J 13 a	10 %	keine Akti	ConA	24 h	17 %	19 %	18 %	22 %
J 13 b	10 %	keine Akti	ConA	24 h	17 %	24 %	25 %	21 %
J 16 a	10 %	keine Akti	ConA	24 h	19 %	24 %	22 %	24 %
J 16 b	10 %	keine Akti	ConA	24 h	24 %	24 %	21 %	20 %
J 17 a	10 %	keine Akti	ConA	24 h	19 %	20 %	20 %	18 %
J 17 b	10 %	keine Akti	ConA	24 h	17 %	21 %	18 %	17 %
			Mittelwert		21,2 %	22,3 %	20 %	19,5 %
			Standardab		5,2763	2,252	2,61861	2,7255

n = 8für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

(Student's t Test, JMP Programm, Version: 4.0.0)

Tabelle 4: Einzelwerte zur Abb. 12

BrdU-freie G₁-Population in Prozentanteilen zur Gesamtpopulation.

Kursorisches Ansatzschema: Jurkat-Zellen aus 10 % FCS, mit Säureaktivierung, mitogene Stimulierung: ConA.

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba.	Co	P12a	ΔVacA	Δ6-27a
J 10 b	10 %	Akti	ConA	1 h	45 %	45 %	47 %	47 %
J 12 a	10 %	Akti	ConA	1 h	38 %	40 %	39 %	40 %
J 12 b	10 %	Akti	ConA	1 h	39 %	41 %	40 %	40 %
J 14 a	10 %	Akti	ConA	1 h	45 %	43 %	44 %	47 %
J 15 a	10 %	Akti	ConA	1 h	38 %	38 %	38 %	33 %
J 15 b	10 %	Akti	ConA	1 h	46 %	40 %	34 %	35 %
			Mittelwert		41,8 %	41,2 %	40,3 %	40,3 %
			Standardab		3,8687	2,483	4,58984	5,8538

n = 6 für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba.	Co	P12a	ΔVacA	Δ6-27a
J 10 b	10 %	Akti	ConA	24 h	28 %	28 %	14 %	25 %
J 12 a	10 %	Akti	ConA	24 h	21 %	23 %	20 %	27 %
J 12 b	10 %	Akti	ConA	24 h	23 %	25 %	23 %	25 %
J 14 b	10 %	Akti	ConA	24 h	25 %	21 %	24 %	27 %
J 15 a	10 %	Akti	ConA	24 h	14 %	13 %	19 %	15 %
J 15 b	10 %	Akti	ConA	24 h	15 %	15 %	18 %	15 %
			Mittelwert		21 %	20,8 %	19,7 %	22,3 %
			Standardab		5,5498	5,811	3,61478	5,7504

n = 6 für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

(Student's t Test, JMP Programm, Version: 4.0.0)

Tabelle 5: Einzelwerte zur Abb. 13

BrdU-freie G₁-Population in Prozentanteilen zur Gesamtpopulation.

Kursorisches Ansatzschema: Jurkat-Zellen aus 10 % FCS, ohne Säureaktivierung, mitogene Stimulierung: PMA/Iono.

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba.	Co	P12	ΔVacA	Δ6-27
J 6	10 %	keine Akti	PMA/Iono	1 h	55 %	58 %	56 %	61 %
J 13	10 %	keine Akti	PMA/Iono	1 h	42 %	47 %	42 %	43 %
J 16	10 %	keine Akti	PMA/Iono	1 h	46 %	53 %	45 %	48 %
J 17	10 %	keine Akti	PMA/Iono	1 h	54 %	51 %	57 %	55 %
			Mittelwert		49,3 %	52,3 %	50 %	51,8 %
			Standardab		6,2915	4,573	7,61577	7,8899

n = 4 für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba.	Co	P12	ΔVacA	Δ6-27
J 6	10 %	keine Akti	PMA/Iono	24 h	37 %	55 %	50 %	51 %
J 13	10 %	keine Akti	PMA/Iono	24 h	36 %	28 %	40 %	23 %
J 16	10 %	keine Akti	PMA/Iono	24 h	46 %	46 %	47 %	46 %
J 17	10 %	keine Akti	PMA/Iono	24 h	50 %	42 %	44 %	40 %
			Mittelwert		42,3 %	42,8 %	45,3 %	40 %
			Standardab		6,8496	11,24	4,272	12,193

n = 4 für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

(Student's t Test, JMP Programm, Version: 4.0.0)

Tabelle 6: Einzelwerte zur Abb. 14

BrdU-freie G₁-Population in Prozentanteilen zur Gesamtpopulation.

Kursorisches Ansatzschema: Jurkat-Zellen aus 10 % FCS, mit Säureaktivierung, mitogene Stimulierung: PMA/Iono.

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba.	Co	P12a	ΔVacA	Δ6-27a
J 8	10 %	Akti	PMA/Iono	1 h	37 %	38 %	38 %	41 %
J 12	10 %	Akti	PMA/Iono	1 h	44 %	44 %	44 %	42 %
J 14	10 %	Akti	PMA/Iono	1 h	50 %	49 %	49 %	55 %
J 15	10 %	Akti	PMA/Iono	1 h	49 %	46 %	44 %	39 %
			Mittelwert		45 %	44,3 %	43,8 %	44,3 %
			Standardab		5,9442	4,646	4,5	7,2744

n = 4 für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba.	Co	P12a	ΔVacA	Δ6-27a
J 8	10 %	Akti	PMA/Iono	24 h	26 %	38 %	27 %	32 %
J 12	10 %	Akti	PMA/Iono	24 h	31 %	47 %	40 %	39 %
J 14	10 %	Akti	PMA/Iono	24 h	48 %	52 %	46 %	53 %
J 15	10 %	Akti	PMA/Iono	24 h	25 %	48 %	34 %	50 %
			Mittelwert		32,5 %	46,3 %	36,8 %	43,5 %
			Standardab		10,661	5,909	8,13941	9,7468

n = 4 P12a vs. Co: **p < 0,05**

alle anderen Mittelwerte: **p > 0,1**

(Student's t Test, JMP Programm, Version: 4.0.0)

Tabelle 7: Einzelwerte zur Abb. 15

BrdU-freie G₁-Population in Prozentanteilen zur Gesamtpopulation.

Kursorisches Ansatzschema: Jurkat-Zellen aus 10 % FCS vs. 0,2 % FCS, ohne Säureaktivierung, ohne mitogene Stimulierung.

FCS	1 h	24 h
10 %	55 %	19 %
10 %	43 %	9 %
10 %	43 %	2 %
10 %	49 %	2 %
10 %	32 %	1 %
10 %	36 %	2 %
10 %	42 %	7 %
10 %	41 %	3 %
Mittelwert	42,6 %	5,6 %
Standardabweichung	7,11010348	6,0930288
	n = 8	
FCS	1 h	24 h
0,2 %	45 %	21 %
0,2 %	40 %	24 %
0,2 %	24 %	10 %
0,2 %	37 %	10 %
0,2 %	48 %	40 %
0,2 %	42 %	37 %
0,2 %	23 %	16 %
0,2 %	31 %	18 %
Mittelwert	36,3 %	22,6 %
Standardabweichung	9,37702359	11,3010745
	n = 8	

Tabelle 8: Einzelwerte zur Abb. 16

BrdU-freie G₁-Population in Prozentanteilen zur Gesamtpopulation.

Kursorisches Ansatzschema: Jurkat-Zellen aus 0,2 % FCS, ohne Säureaktivierung, kein mitogene Stimulierung.

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba.	Co	P12	ΔVacA	Δ6-27
J 7	0,2 %	keine Akti	keine Stim	1 h	42 %	45 %	43 %	47 %
J 19	0,2 %	keine Akti	keine Stim	1 h	23 %	27 %	27 %	26 %
J 21	0,2 %	keine Akti	keine Stim	1 h	31 %	29 %	31 %	30 %
			Mittelwert		32 %	33,7 %	33,7 %	34,3 %
			Standardab		9,5394	9,866	8,32666	11,15

n = 3

für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba.	Co	P12	ΔVacA	Δ6-27
J 7	0,2 %	keine Akti	keine Stim	24 h	37 %	42 %	45 %	44 %
J 19	0,2 %	keine Akti	keine Stim	24 h	16 %	17 %	15 %	13 %
J 21	0,2 %	keine Akti	keine Stim	24 h	18 %	13 %	11 %	13 %
			Mittelwert		23,7 %	24 %	23,7 %	23,3 %
			Standardab		11,59	15,72	18,5831	17,898

n = 3

für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

(Student's t Test, JMP Programm, Version: 4.0.0)

Tabelle 9: Einzelwerte zur Abb. 17

BrdU-freie G₁-Population in Prozentanteilen zur Gesamtpopulation.

Experimentalschema kursorisch: Jurkat-Zellen aus 0,2 % FCS, mit Säureaktivierung und ohne mitogene Stimulierung.

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba. Co	P12a	ΔVacA	Δ6-27a	
J 5	0,2 %	Akti	keine Stim	1 h	45 %	47 %	44 %	42 %
J 9	0,2 %	Akti	keine Stim	1 h	40 %	45 %	45 %	44 %
J 9.1	0,2 %	Akti	keine Stim	1 h	48 %	48 %	46 %	46 %
J 18	0,2 %	Akti	keine Stim	1 h	24 %	24 %	25 %	24 %
J 20	0,2 %	Akti	keine Stim	1 h	37 %	25 %	26 %	25 %
			Mittelwert		38,8 %	37,8 %	37,2 %	36,2 %
			Standardab		9,3113	12,19	10,7098	10,78

n = 5

für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba. Co	P12a	ΔVacA	Δ6-27a	
J 5	0,2 %	Akti	keine Stim	24 h	21 %	15 %	12 %	17 %
J 9	0,2 %	Akti	keine Stim	24 h	24 %	31 %	22 %	22 %
J 9.1	0,2 %	Akti	keine Stim	24 h	40 %	43 %	35 %	32 %
J 18	0,2 %	Akti	keine Stim	24 h	10 %	14 %	6 %	9 %
J 20	0,2 %	Akti	keine Stim	24 h	10 %	12 %	9 %	11 %
			Mittelwert		21 %	23 %	16,8 %	18,2 %
			Standardab		12,369	13,51	11,8195	9,2574

n = 5

für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

(Student's t Test, JMP Programm, Version: 4.0.0)

Tabelle 10: Einzelwerte zur Abb. 18

BrdU-freie G₁-Population in Prozentanteilen zur Gesamtpopulation.

Kursorisches Ansatzschema: Jurkat-Zellen aus 0,2 % FCS, ohne Säureaktivierung, mitogene Stimulierung: ConA.

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba. Co	P12	ΔVacA	Δ6-27	
J 7 a	0,2 %	keine Akti	ConA	1 h	40 %	44 %	42 %	40 %
J 7 b	0,2 %	keine Akti	ConA	1 h	47 %	49 %	47 %	50 %
J 19 a	0,2 %	keine Akti	ConA	1 h	32 %	30 %	32 %	27 %
J 19 b	0,2 %	keine Akti	ConA	1 h	33 %	32 %	32 %	31 %
J 21 a	0,2 %	keine Akti	ConA	1 h	33 %	34 %	31 %	30 %
J 21 b	0,2 %	keine Akti	ConA	1 h	35 %	33 %	27 %	29 %
			Mittelwert		36,7 %	37 %	35,2 %	34,5 %
			Standardab		5,8195	7,642	7,62671	8,8261

n = 6

für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba. Co	P12	ΔVacA	Δ6-27	
J 7 a	0,2 %	keine Akti	ConA	24 h	46 %	46 %	47 %	45 %
J 7 b	0,2 %	keine Akti	ConA	24 h	43 %	47 %	44 %	45 %
J 19 a	0,2 %	keine Akti	ConA	24 h	23 %	17 %	14 %	13 %
J 19 b	0,2 %	keine Akti	ConA	24 h	16 %	16 %	12 %	14 %
J 21 a	0,2 %	keine Akti	ConA	24 h	33 %	28 %	27 %	23 %
J 21 b	0,2 %	keine Akti	ConA	24 h	29 %	33 %	24 %	22 %
			Mittelwert		31,7 %	31,2 %	28 %	27 %
			Standardab		11,518	13,53	14,7377	14,519

n = 6

für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

(Student's t Test, JMP Programm, Version: 4.0.0)

Tabelle 11: Einzelwerte zur Abb. 19

BrdU-freie G₁-Population in Prozentanteilen zur Gesamtpopulation.

Kursorisches Ansatzschema: Jurkat-Zellen aus 0,2 % FCS, mit Säureaktivierung, mitogene Stimulierung: ConA.

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba. Co	P12a	ΔVacA	Δ6-27a	
J 9 a	0,2 %	Akti	ConA	1 h	47 %	46 %	47 %	47 %
J 9.1 a	0,2 %	Akti	ConA	1 h	51 %	48 %	47 %	45 %
J 9.1 b	0,2 %	Akti	ConA	1 h	49 %	50 %	52 %	50 %
J 18 a	0,2 %	Akti	ConA	1 h	31 %	29 %	30 %	29 %
J 18 b	0,2 %	Akti	ConA	1 h	28 %	29 %	29 %	27 %
J 20 a	0,2 %	Akti	ConA	1 h	30 %	28 %	27 %	26 %
J 20 b	0,2 %	Akti	ConA	1 h	32 %	30 %	30 %	29 %
			Mittelwert		38,3 %	37,2 %	37,4 %	36,1 %
			Standardab		10,161	10,24	10,6904	10,621

n = 7 für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba. Co	P12a	ΔVacA	Δ6-27a	
J 9.a	0,2 %	Akti	ConA	24 h	24 %	35 %	27 %	29 %
J 9.1 a	0,2 %	Akti	ConA	24 h	33 %	39 %	42 %	42 %
J 9.1 b	0,2 %	Akti	ConA	24 h	34 %	34 %	25 %	36 %
J 18 a	0,2 %	Akti	ConA	24 h	18 %	21 %	15 %	15 %
J 18 b	0,2 %	Akti	ConA	24 h	17 %	20 %	15 %	19 %
J 20 a	0,2 %	Akti	ConA	24 h	23 %	26 %	18 %	25 %
J 20 b	0,2 %	Akti	ConA	24 h	19 %	23 %	19 %	23 %
			Mittelwert		24 %	28,2 %	23 %	27 %
			Standardab		6,9761	7,61	9,57427	9,4692

n = 7 für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

(Student's t Test, JMP Programm, Version: 4.0.0)

Tabelle 12: Einzelwerte zur Abb. 20

BrdU-freie G₁-Population in Prozentanteilen zur Gesamtpopulation.

Kursorisches Ansatzschema: Jurkat-Zellen aus 0,2 % FCS, ohne Säureaktivierung, mitogene Stimulierung: PMA/Iono.

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba. Co	P12	ΔVacA	Δ6-27	
J 7	0,2 %	keine Akti	PMA/Iono	1 h	55 %	54 %	53 %	53 %
J 19	0,2 %	keine Akti	PMA/Iono	1 h	34 %	33 %	29 %	34 %
J 21	0,2 %	keine Akti	PMA/Iono	1 h	31 %	35 %	37 %	34 %
			Mittelwert		40 %	40,7 %	39,7 %	40,3 %
			Standardab		13,077	11,59	12,2202	10,97

n = 3

für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba. Co	P12	ΔVacA	Δ6-27	
J 7	0,2 %	keine Akti	PMA/Iono	24 h	36 %	41 %	42 %	43 %
J 19	0,2 %	keine Akti	PMA/Iono	24 h	19 %	26 %	17 %	17 %
J 21	0,2 %	keine Akti	PMA/Iono	24 h	24 %	37 %	20 %	21 %
			Mittelwert		26,3 %	34,7 %	26,3 %	27 %
			Standardab		8,7369	7,767	13,6504	14

n = 3

für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

(Student's t Test, JMP Programm, Version: 4.0.0)

Tabelle 13: Einzelwerte zur Abb. 21

BrdU-freie G₁-Population in Prozentanteilen zur Gesamtpopulation.

Kursorisches Ansatzschema: Jurkat-Zellen aus 0,2 % FCS, mit Säureaktivierung, mitogene Stimulierung: PMA/Iono.

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba. Co	P12a	ΔVacA	Δ6-27a	
J 9	0,2 %	Akti	PMA/Iono	1 h	50 %	56 %	51 %	57 %
J 9.1	0,2 %	Akti	PMA/Iono	1 h	49 %	47 %	55 %	55 %
J 18	0,2 %	Akti	PMA/Iono	1 h	41 %	41 %	40 %	42 %
J 20	0,2 %	Akti	PMA/Iono	1 h	39 %	41 %	41 %	31 %
			Mittelwert		44,8 %	46,3 %	46,8 %	46,3 %
			Standardab		5,5603	7,089	7,41058	12,148

n = 4 für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

	FCS	Säureakti.	Stimulus	Inkuba. Co	P12a	ΔVacA	Δ6-27a	
J 9	0,2 %	Akti	PMA/Iono	24 h	43 %	51 %	52 %	43 %
J 9.1	0,2 %	Akti	PMA/Iono	24 h	35 %	21 %	26 %	15 %
J 18	0,2 %	Akti	PMA/Iono	24 h	35 %	35 %	34 %	38 %
J 20	0,2 %	Akti	PMA/Iono	24 h	21 %	32 %	20 %	19 %
			Mittelwert		33,5 %	34,8 %	33 %	28,8 %
			Standardab		9,1469	12,39	13,9044	13,817

n = 4 für alle Mittelwerte: **p > 0,1**

(Student's t Test, JMP Programm, Version: 4.0.0)

6.2 Literaturverzeichnis

- Adrian M, Cover TL, Dubochet J, Heuser JE.
Multiple oligomeric states of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin demonstrated by cryo-electron microscopy.
J Mol Biol. 2002;318(1):121-33.
- Aebischer T, Lucas B, Koesling J, Bumann D, Meyer TF.
How CD4(+) T cells may eliminate extracellular gastric *Helicobacter*?
J Biotechnol. 2000;83(1-2):77-84.
- Ahmad A, Govil Y, Frank BB.
Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma.
Am J Gastroenterol. 2003;98(5):975-86.
- Ahmed A, Smoot D, Littleton G, Tackey R, Walters CS, Kashanchi F, Allen CR, Ashktorab H.
Helicobacter pylori inhibits gastric cell cycle progression.
Microbes Infect. 2000;2(10):1159-69.
- Ahmed N, Sechi LA.
Helicobacter pylori and gastroduodenal pathology: new threats of the old friend.
Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2005;4:1.
- Akhiani AA, Pappo J, Kabok Z, Schon K, Gao W, Franzen LE, Lycke N.
Protection against *Helicobacter pylori* infection following immunization is IL-12-dependent and mediated by Th1 cells.
J Immunol. 2002;169(12):6977-84.
- Amieva MR, Salama NR, Tompkins LS, Falkow S.
Helicobacter pylori enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells.
Cell Microbiol. 2002;4(10):677-90.
- Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S.
Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA.
Science. 2003;300(5624):1430-4.
- Appelmeik BJ, Monteiro MA, Martin SL, Moran AP, Vandenbroucke-Grauls CM.
Why *Helicobacter pylori* has Lewis antigens.
Trends Microbiol. 2000;8(12):565-70.

Appelmeik BJ, van Die I, van Vliet SJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y.

Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells.

J Immunol. 2003;170(4):1635-9.

Asaka M, Kudo M, Kato M, Sugiyama T, Takeda H.

Review article: Long-term *Helicobacter pylori* infection--from gastritis to gastric cancer.

Aliment Pharmacol Ther. 1998;12 Suppl 1:9-15.

Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL.

Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration.

J Biol Chem. 1995;270(30):17771-7.

Aviles-Jimenez F, Letley DP, Gonzalez-Valencia G, Salama N, Torres J, Atherton JC.

Evolution of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin in a human stomach.

J Bacteriol. 2004;186(15):5182-5.

Azuma T, Yamakawa A, Yamazaki S, Fukuta K, Ohtani M, Ito Y, Dojo M, Yamazaki Y, Kuriyama M.

Correlation between variation of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* and disease outcome in Japan.

J Infect Dis. 2002;186(11):1621-30.

Azuma T, Yamazaki S, Yamakawa A, Ito Y, Ohtani M, Dojo M, Yamazaki Y, Higashi H, Hatakeyama M.

The effects of cure of *Helicobacter pylori* infection on the signal transduction of gastric epithelial cells.

Aliment Pharmacol Ther. 2003;18 Suppl 1:39-44.

Backert S, Muller EC, Jungblut PR, Meyer TF.

Tyrosine phosphorylation patterns and size modification of the *Helicobacter pylori* CagA protein after translocation into gastric epithelial cells.

Proteomics. 2001;1(4):608-17.

Beltran B, Mathur A, Duchon MR, Erusalimsky JD, Moncada S.

The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(26):14602-7.

Blanchard TG, Nedrud JG, Czinn SJ.

Local and systemic antibody responses in humans with *Helicobacter pylori* infection.

Can J Gastroenterol. 1999;13(7):591-4.

- Blaser MJ, Parsonnet J.
Parasitism by the "slow" bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia.
J Clin Invest. 1994;94(1):4-8.
- Boncristiano M, Paccani SR, Barone S, Ulivieri C, Patrussi L, Ilver D, Amedei A, D'Elia MM, Telford JL, Baldari CT.
The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms.
J Exp Med. 2003;198(12):1887-97.
- Bourzac KM, Guillemin K.
Helicobacter pylori-host cell interactions mediated by type IV secretion.
Cell Microbiol. 2005;7(7):911-9.
- Brattsand G, Marklund U, Nylander K, Roos G, Gullberg M.
Cell-cycle-regulated phosphorylation of oncoprotein 18 on Ser16, Ser25 and Ser38.
Eur J Biochem. 1994;220(2):359-68.
- Bumann D, Aksu S, Wendland M, Janek K, Zimny-Arndt U, Sabarth N, Meyer TF, Jungblut PR.
Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*.
Infect Immun. 2002;70(7):3396-403.
- Burne RA, Chen YY.
Bacterial ureases in infectious diseases.
Microbes Infect. 2000;2(5):533-42.
- Chamaillard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ.
Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation.
Cell Microbiol. 2003;5(9):581-92.
- Chen W, Shu D, Chadwick VS.
Inhibition of mitogen-induced murine lymphocyte proliferation by *Helicobacter pylori* cell-free extract.
J Gastroenterol Hepatol. 2000;15(9):1000-6.
- Chen XJ, Yan J, Shen YF.
Dominant *cagA/vacA* genotypes and coinfection frequency of *H. pylori* in peptic ulcer or chronic gastritis patients in Zhejiang Province and correlations among different genotypes, coinfection and severity of the diseases.
Chin Med J (Engl). 2005;118(6):460-7.

- Copass M, Grandi G, Rappuoli R.
Introduction of unmarked mutations in the *Helicobacter pylori* vacA gene with a sucrose sensitivity marker.
Infect Immun. 1997;65(5):1949-52.
- Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M.
A model for gastric cancer epidemiology.
Lancet. 1975;2(7924):58-60.
- Correa P.
Precursors of gastric and esophageal cancer.
Cancer. 1982;50(11 Suppl):2554-65.
- Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N, et al.
Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(12):5791-5.
- Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R.
Helicobacter pylori virulence and genetic geography.
Science. 1999;284(5418):1328-33.
- Cover TL, Blaser MJ.
Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*.
J Biol Chem. 1992;267(15):10570-5.
- Cover TL, Tummuru MK, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ.
Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains.
J Biol Chem. 1994;269(14):10566-73.
- Cover TL, Hanson PI, Heuser JE.
Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly.
J Cell Biol. 1997;138(4):759-69.
- Cover TL, Krishna US, Israel DA, Peek RM Jr.
Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin.
Cancer Res. 2003;63(5):951-7.
- Cover TL, Blanke SR.
Helicobacter pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality.
Nat Rev Microbiol. 2005;3(4):320-32.

- Czajkowsky DM, Iwamoto H, Cover TL, Shao Z.
The vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(5):2001-6.
- de Bernard M, Papini E, de Filippis V, Gottardi E, Telford J, Manetti R, Fontana A, Rappuoli R, Montecucco C.
Low pH activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*, which becomes acid and pepsin resistant.
J Biol Chem. 1995;270(41):23937-40.
- de Bernard M, Arico B, Papini E, Rizzuto R, Grandi G, Rappuoli R, Montecucco C.
Helicobacter pylori toxin VacA induces vacuole formation by acting in the cell cytosol.
Mol Microbiol. 1997;26(4):665-74.
- de Bernard M, Moschioni M, Papini E, Telford J, Rappuoli R, Montecucco C.
Cell vacuolization induced by *Helicobacter pylori* VacA toxin: cell line sensitivity and quantitative estimation.
Toxicol Lett. 1998 a;99(2):109-15.
- de Bernard M, Burrioni D, Papini E, Rappuoli R, Telford J, Montecucco C.
Identification of the *Helicobacter pylori* VacA toxin domain active in the cell cytosol.
Infect Immun. 1998 b;66(12):6014-6.
- de Bernard M, Moschioni M, Habermann A, Griffiths G, Montecucco C.
Cell vacuolization induced by *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin does not depend on late endosomal SNAREs.
Cell Microbiol. 2002;4(1):11-8.
- de Bernard M, Cappon A, Del Giudice G, Rappuoli R, Montecucco C.
The multiple cellular activities of the VacA cytotoxin of *Helicobacter pylori*.
Int J Med Microbiol. 2004;293(7-8):589-97.
- de Bernard M, Cappon A, Pancotto L, Ruggiero P, Rivera J, Del Giudice G, Montecucco C.
The *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin activates RBL-2H3 cells by inducing cytosolic calcium oscillations.
Cell Microbiol. 2005;7(2):191-8.
- D'Elios MM, Manghetti M, De Carli M, Costa F, Baldari CT, Burrioni D, Telford JL, Romagnani S, Del Prete G.
T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease.
J Immunol. 1997;158(2):962-7.

Di Tommaso A, Xiang Z, Bugnoli M, Pileri P, Figura N, Bayeli PF, Rappuoli R, Abrignani S, De Magistris MT.

Helicobacter pylori-specific CD4+ T-cell clones from peripheral blood and gastric biopsies.

Infect Immun. 1995;63(3):1102-6.

Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini MG, Gray JW.

Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1983;80(18):5573-7.

Drumm B, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Sherman PM.

Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection.

N Engl J Med. 1990;322(6):359-63.

Du MQ, Isaccson PG.

Gastric MALT lymphoma: from aetiology to treatment.

Lancet Oncol. 2002;3(2):97-104.

Du Y, Agnew A, Ye XP, Robinson PA, Forman D, Crabtree JE.

Helicobacter pylori and *Schistosoma japonicum* co-infection in a Chinese population: helminth infection alters humoral responses to *H. pylori* and serum pepsinogen I/II ratio.

Microbes Infect. 2006;8(1):52-60.

Dubois A, Berg DE, Fiala N, Heman-Ackah LM, Perez-Perez GI, Blaser MJ.

Cure of *Helicobacter pylori* infection by omeprazole-clarithromycin-based therapy in non-human primates.

J Gastroenterol. 1998 a;33(1):18-22.

Dubois A, Lee CK, Fiala N, Kleanthous H, Mehlman PT, Monath T.

Immunization against natural *Helicobacter pylori* infection in nonhuman primates.

Infect Immun. 1998 b;66(9):4340-6.

Eaton KA, Ringler SS, Krakowka S.

Vaccination of gnotobiotic piglets against *Helicobacter pylori*.

J Infect Dis. 1998;178(5):1399-405.

Eaton KA, Mefford M, Thevenot T.

The role of T cell subsets and cytokines in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* gastritis in mice.

J Immunol. 2001;166(12):7456-61.

Edwards NJ, Monteiro MA, Faller G, Walsh EJ, Moran AP, Roberts IS, High NJ.

Lewis X structures in the O antigen side-chain promote adhesion of *Helicobacter pylori* to the gastric epithelium.

Mol Microbiol. 2000;35(6):1530-9.

Ellery JM, Nicholls PJ.

Alternate signalling pathways from the interleukin-2 receptor.

Cytokine Growth Factor Rev. 2002 a;13(1):27-40.

Ellery JM, Nicholls PJ.

Possible mechanism for the alpha subunit of the interleukin-2 receptor (CD25) to influence interleukin-2 receptor signal transduction.

Immunol Cell Biol. 2002 b;80(4):351-7.

El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS.

Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer.

Nature. 2000;404(6776):398-402.

Eppinger M, Baar C, Linz B, Raddatz G, Lanz C, Keller H, Morelli G, Gressmann H, Achtman M, Schuster SC.

Who ate whom? Adaptive *Helicobacter* genomic changes that accompanied a host jump from early humans to large felines.

PLoS Genet. 2006;2(7):e120.

Erba E, Sen S, Lorico A, D'Incalci M.

Potentiation of etoposide cytotoxicity against a human ovarian cancer cell line by pretreatment with non-toxic concentrations of methotrexate or aphidicolin.

Eur J Cancer. 1992;28(1):66-71.

Ernst PB, Gold BD.

The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer.

Annu Rev Microbiol. 2000;54:615-40.

Fallone CA, Barkun AN, Gottke MU, Best LM, Loo VG, Veldhuyzen van Zanten S, Nguyen T, Lowe A, Fainsilber T, Kouri K, Beech R.

Association of *Helicobacter pylori* genotype with gastroesophageal reflux disease and other upper gastrointestinal diseases.

Am J Gastroenterol. 2000;95(3):659-69.

Fan XJ, Chua A, Shahi CN, McDevitt J, Keeling PW, Kelleher D.

Gastric T lymphocyte responses to *Helicobacter pylori* in patients with *H pylori* colonisation.

Gut. 1994;35(10):1379-84.

Fan X, Gunasena H, Cheng Z, Espejo R, Crowe SE, Ernst PB, Reyes VE.

Helicobacter pylori urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis.

J Immunol. 2000;165(4):1918-24.

- Fedwick JP, Lapointe TK, Meddings JB, Sherman PM, Buret AG.
Helicobacter pylori activates myosin light-chain kinase to disrupt claudin-4 and claudin-5 and increase epithelial permeability.
Infect Immun. 2005;73(12):7844-52.
- Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R.
Systematic mutagenesis of the Helicobacter pylori cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8.
Mol Microbiol. 2001;42(5):1337-48.
- Fischer W, Gebert B, Haas R.
Novel activities of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin: from epithelial cells towards the immune system.
Int J Med Microbiol. 2004;293(7-8):539-47.
- Fitchen N, Letley DP, O'Shea P, Atherton JC, Williams P, Hardie KR.
All subtypes of the cytotoxin VacA adsorb to the surface of Helicobacter pylori post-secretion.
J Med Microbiol. 2005;54(Pt 7):621-30.
- Flanagan WM, Crabtree GR.
In vitro transcription faithfully reflecting T-cell activation requirements.
J Biol Chem. 1992;267(1):399-406.
- Fox JG, Dangler CA, Taylor NS, King A, Koh TJ, Wang TC.
High-salt diet induces gastric epithelial hyperplasia and parietal cell loss, and enhances Helicobacter pylori colonization in C57BL/6 mice.
Cancer Res. 1999;59(19):4823-8.
- Fox JG, Beck P, Dangler CA, Whary MT, Wang TC, Shi HN, Nagler-Anderson C.
Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy.
Nat Med. 2000;6(5):536-42.
- Franco AT, Israel DA, Washington MK, Krishna U, Fox JG, Rogers AB, Neish AS, Collier-Hyams L, Perez-Perez GI, Hatakeyama M, Whitehead R, Gaus K, O'Brien DP, Romero-Gallo J, Peek RM Jr.
Activation of beta-catenin by carcinogenic Helicobacter pylori.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(30):10646-51.
- Fujikawa A, Shirasaka D, Yamamoto S, Ota H, Yahiro K, Fukada M, Shintani T, Wada A, Aoyama N, Hirayama T, Fukamachi H, Noda M.
Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of Helicobacter pylori.
Nat Genet. 2003;33(3):375-81.

Galgani M, Busiello I, Censini S, Zappacosta S, Racioppi L, Zarrilli R.
Helicobacter pylori induces apoptosis of human monocytes but not monocyte-derived dendritic cells: role of the cag pathogenicity island.
Infect Immun. 2004;72(8):4480-5.

Galmiche A, Rassow J, Doye A, Cagnol S, Chambard JC, Contamin S, de Thillot V, Just I, Ricci V, Solcia E, Van Obberghen E, Boquet P.
The N-terminal 34 kDa fragment of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release.
EMBO J. 2000;19(23):6361-70.

Ganten TM, Aravena E, Sykora J, Koschny R, Mohr J, Rudi J, Stremmel W, Walczak H.
Helicobacter pylori-induced apoptosis in T cells is mediated by the mitochondrial pathway independent of death receptors.
Eur J Clin Invest. 2007;37(2):117-25.

Garcia-Rodriguez C, Rao A.
Requirement for integration of phorbol 12-myristate 13-acetate and calcium pathways is preserved in the transactivation domain of NFAT1.
Eur J Immunol. 2000;30(8):2432-6.

Gasbarrini A, Carloni E, Gasbarrini G, Chisholm SA.
Helicobacter pylori and extragastric diseases--other Helicobacters.
Helicobacter. 2004;9 Suppl 1:57-66.

Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R.
Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation.
Science. 2003;301(5636):1099-102.

Gebert B, Fischer W, Haas R.
The Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin: from cellular vacuolation to immunosuppressive activities.
Rev Physiol Biochem Pharmacol. 2004;152:205-20.

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

Gewirtz AT, Yu Y, Krishna US, Israel DA, Lyons SL, Peek RM Jr.
Helicobacter pylori flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity.
J Infect Dis. 2004;189(10):1914-20.

- Gillis S, Watson J.
Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules.
V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line.
J Exp Med. 1980;152(6):1709-19.
- Gisbert JP, Khorrami S, Carballo F, Calvet X, Gene E, Dominguez-Munoz JE.
H. pylori eradication therapy vs. antisecretory non-eradication therapy (with or without long-term maintenance antisecretory therapy) for the prevention of recurrent bleeding from peptic ulcer.
Cochrane Database Syst Rev. 2004;(2):CD004062.
- Gobert AP, Bambou JC, Werts C, Balloy V, Chignard M, Moran AP, Ferrero RL.
Helicobacter pylori heat shock protein 60 mediates interleukin-6 production by macrophages via a toll-like receptor (TLR)-2-, TLR-4-, and myeloid differentiation factor 88-independent mechanism.
J Biol Chem. 2004;279(1):245-50.
- Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z.
Threshold expression of cyclin E but not D type cyclins characterizes normal and tumour cells entering S phase.
Cell Prolif. 1995;28(6):337-46.
- Goodwin CS.
How Helicobacter pylori acquired its name, and how it overcomes gastric defence mechanisms.
J Gastroenterol Hepatol. 1994;9 Suppl 1:S1-3.
- Gratzner HG.
Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication.
Science. 1982;218(4571):474-5.
- Haas R, Meyer TF, van Putten JP.
Aflagellated mutants of Helicobacter pylori generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis.
Mol Microbiol. 1993;8(4):753-60.
- Hamajima N, Katsuda N, Matsuo K, Saito T, Hirose K, Inoue M, Zaki TT, Tajima K, Tominaga S.
High anti-Helicobacter pylori antibody seropositivity associated with the combination of IL-8-251TT and IL-10-819TT genotypes.
Helicobacter. 2003;8(2):105-10.
- Hamlet A, Thoreson AC, Nilsson O, Svennerholm AM, Olbe L.
Duodenal Helicobacter pylori infection differs in cagA genotype between asymptomatic subjects and patients with duodenal ulcers.
Gastroenterology. 1999;116(2):259-68.

- Hellmig S, Hampe J, Folsch UR, Schreiber S.
Role of IL-10 promoter haplotypes in Helicobacter pylori associated gastric inflammation.
Gut. 2005;54(6):888.
- Hirschl AM.
[Diagnosis of Helicobacter pylori infections]
Acta Med Austriaca. 2000;27(4):112-6.
- Hotchin NA, Cover TL, Akhtar N.
Cell vacuolation induced by the VacA cytotoxin of Helicobacter pylori is regulated by the Rac1 GTPase.
J Biol Chem. 2000;275(19):14009-12.
- IARC (International Agency for Research on Cancer)
Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France 7-14 June 1994.
IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994;61:1-241.
- Iiver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L, Boren T.
Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging.
Science. 1998;279(5349):373-7.
- Iiver D, Barone S, Mercati D, Lupetti P, Telford JL.
Helicobacter pylori toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism.
Cell Microbiol. 2004;6(2):167-74.
- Ismail HF, Fick P, Zhang J, Lynch RG, Berg DJ.
Depletion of neutrophils in IL-10(-/-) mice delays clearance of gastric Helicobacter infection and decreases the Th1 immune response to Helicobacter.
J Immunol. 2003;170(7):3782-9.
- Israel DA, Salama N, Arnold CN, Moss SF, Ando T, Wirth HP, Tham KT, Camorlinga M, Blaser MJ, Falkow S, Peek RM Jr.
Helicobacter pylori strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses.
J Clin Invest. 2001;107(5):611-20.
- Iwamoto H, Czajkowsky DM, Cover TL, Szabo G, Shao Z.
VacA from Helicobacter pylori: a hexameric chloride channel.
FEBS Lett. 1999;450(1-2):101-4.

- Janeway C, Travers P.
Immunologie. Spektrum Lehrbuch
Spektrum-Akademischer Vlg, Heidelberg, 5. Auflage, 2002
- Jones NL, Day AS, Jennings H, Shannon PT, Galindo-Mata E, Sherman PM.
Enhanced disease severity in Helicobacter pylori-infected mice deficient in Fas signaling.
Infect Immun. 2002;70(5):2591-7.
- Kabelitz D, Pohl T, Pechhold K.
Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes.
Immunol Today. 1993;14(7):338-9.
- Kaklikkaya N, Cubukcu K, Aydin F, Bakir T, Erkul S, Tosun I, Topbas M, Yazici Y, Buruk CK, Erturk M.
Significance of cagA status and vacA subtypes of Helicobacter pylori in determining gastric histopathology: virulence markers of H. pylori and histopathology.
J Gastroenterol Hepatol. 2006;21(6):1042-7.
- Karttunen RA, Karttunen TJ, Yousfi MM, el-Zimaity HM, Graham DY, el-Zaatari FA.
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. 1997;32(1):22-7.
- Kawahara T, Teshima S, Kuwano Y, Oka A, Kishi K, Rokutan K.
Helicobacter pylori lipopolysaccharide induces apoptosis of cultured guinea pig gastric mucosal cells.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001;281(3):G726-34.
- Keenan JI, Rijpkema SG, Durrani Z, Roake JA.
Differences in immunogenicity and protection in mice and guinea pigs following intranasal immunization with Helicobacter pylori outer membrane antigens.
FEMS Immunol Med Microbiol. 2003;36(3):199-205.
- Kim N, Weeks DL, Shin JM, Scott DR, Young MK, Sachs G.
Proteins released by Helicobacter pylori in vitro.
J Bacteriol. 2002;184(22):6155-62.
- Kim S, Chamberlain AK, Bowie JU.
Membrane channel structure of Helicobacter pylori vacuolating toxin: role of multiple GXXXG motifs in cylindrical channels.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(16):5988-91.
- Knickelbein JE, de Souza AJ, Tosti R, Narayan P, Kane LP.
Cutting edge: inhibition of T cell activation by TIM-2.
J Immunol. 2006;177(8):4966-70.

- Knipp U, Birkholz S, Kaup W, Mahnke K, Opferkuch W.
Suppression of human mononuclear cell response by *Helicobacter pylori*: effects on isolated monocytes and lymphocytes.
FEMS Immunol Med Microbiol. 1994;8(2):157-66.
- Kodama M, Murakami K, Nishizono A, Fujioka T.
Animal models for the study of *Helicobacter*-induced gastric carcinoma.
J Infect Chemother. 2004;10(6):316-25.
- Krakovka S, Eaton KA, Leunk RD.
Antimicrobial therapies for *Helicobacter pylori* infection in gnotobiotic piglets.
Antimicrob Agents Chemother. 1998;42(7):1549-54.
- Kranzer K, Sollner L, Aigner M, Lehn N, Deml L, Rehli M, Schneider-Brachert W.
Impact of *Helicobacter pylori* virulence factors and compounds on activation and maturation of human dendritic cells.
Infect Immun. 2005;73(7):4180-9.
- Krauss-Etschmann S, Sammler E, Koletzko S, Konstantopoulos N, Aust D, Gebert B, Luckow B, Reinhardt D, Schendel DJ.
Chemokine receptor 5 expression in gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected and noninfected children.
Clin Diagn Lab Immunol. 2003;10(1):22-9.
- Kuck D, Kolmerer B, Iking-Konert C, Krammer PH, Stremmel W, Rudi J.
Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS.
Infect Immun. 2001;69(8):5080-7.
- Kuipers EJ, Thijs JC, Festen HP.
The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease.
Aliment Pharmacol Ther. 1995 a;9 Suppl 2:59-69.
- Kuipers EJ, Uytterlinde AM, Pena AS, Hazenberg HJ, Bloemena E, Lindeman J, Klinkenberg-Knol EC, Meuwissen SG.
Increase of *Helicobacter pylori*-associated corpus gastritis during acid suppressive therapy: implications for long-term safety.
Am J Gastroenterol. 1995 b;90(9):1401-6.
- Kuipers EJ, Uytterlinde AM, Pena AS, Roosendaal R, Pals G, Nelis GF, Festen HP, Meuwissen SG.
Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis.
Lancet. 1995 c;345(8964):1525-8.

Kuipers EJ, Lundell L, Klinkenberg-Knol EC, Havu N, Festen HP, Liedman B, Lamers CB, Jansen JB, Dalenback J, Snel P, Nelis GF, Meuwissen SG. Atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux esophagitis treated with omeprazole or fundoplication. *N Engl J Med.* 1996;334(16):1018-22.

Kuipers EJ.
Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer.
Aliment Pharmacol Ther. 1999;13 Suppl 1:3-11.

Kuipers EJ, Israel DA, Kusters JG, Gerrits MM, Weel J, van Der Ende A, van Der Hulst RW, Wirth HP, Hook-Nikanne J, Thompson SA, Blaser MJ. Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host.
J Infect Dis. 2000;181(1):273-82.

Kuo CH, Wang WC.
Binding and internalization of *Helicobacter pylori* VacA via cellular lipid rafts in epithelial cells.
Biochem Biophys Res Commun. 2003;303(2):640-4.

Kusters JG, Gerrits MM, Van Strijp JA, Vandenbroucke-Grauls CM. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death.
Infect Immun. 1997;65(9):3672-9.

Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ.
Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection.
Clin Microbiol Rev. 2006;19(3):449-90.

Kwok T, Backert S, Schwarz H, Berger J, Meyer TF.
Specific entry of *Helicobacter pylori* into cultured gastric epithelial cells via a zipper-like mechanism.
Infect Immun. 2002;70(4):2108-20.

Labenz J, Blum AL, Bayerdorffer E, Meining A, Stolte M, Borsch G. Curing *Helicobacter pylori* infection in patients with duodenal ulcer may provoke reflux esophagitis.
Gastroenterology. 1997;112(5):1442-7.

Lee CK, Weltzin R, Thomas WD Jr, Kleanthous H, Ermak TH, Soman G, Hill JE, Ackerman SK, Monath TP.
Oral immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease induces secretory IgA antibodies and protects mice from challenge with *Helicobacter felis*.
J Infect Dis. 1995;172(1):161-72.

- Letley DP, Atherton JC.
Natural diversity in the N terminus of the mature vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* determines cytotoxin activity.
J Bacteriol. 2000;182(11):3278-80.
- Letley DP, Rhead JL, Twells RJ, Dove B, Atherton JC.
Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*.
J Biol Chem. 2003;278(29):26734-41.
- Letley DP, Rhead JL, Bishop K, Atherton JC.
Paired cysteine residues are required for high levels of the *Helicobacter pylori* autotransporter VacA.
Microbiology. 2006;152(Pt 5):1319-25.
- Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR.
Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*.
J Med Microbiol. 1988;26(2):93-9.
- Leunk RD.
Production of a cytotoxin by *Helicobacter pylori*.
Rev Infect Dis. 1991;13 Suppl 8:S686-9.
- Li LL, Yeh NH.
Cell cycle-dependent migration of the DNA-binding protein Ku80 into nucleoli.
Exp Cell Res. 1992;199(2):262-8.
- Li Y, Wandinger-Ness A, Goldenring JR, Cover TL.
Clustering and redistribution of late endocytic compartments in response to *Helicobacter pylori* vacuolating toxin.
Mol Biol Cell. 2004;15(4):1946-59.
- Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW, Yamaoka Y, Graham DY, Perez-Trallero E, Wadstrom T, Suerbaum S, Achtman M.
An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*.
Nature. 2007;445(7130):915-8.
- Lissy NA, Van Dyk LF, Becker-Hapak M, Vocero-Akbani A, Mendler JH, Dowdy SF.
TCR antigen-induced cell death occurs from a late G1 phase cell cycle check point.
Immunity. 1998;8(1):57-65.
- Lu H, Yamaoka Y, Graham DY.
Helicobacter pylori virulence factors: facts and fantasies.
Curr Opin Gastroenterol. 2005 a;21(6):653-9.

- Lu W, Pan K, Zhang L, Lin D, Miao X, You W.
Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor {alpha} and risk of gastric cancer in a Chinese population.
Carcinogenesis. 2005 b;26(3):631-6.
- Lu CC, Sheu BS, Chen TW, Yang HB, Hung KH, Kao AW, Chuang CH, Wu JJ.
Host TNF-alpha-1031 and -863 promoter single nucleotide polymorphisms determine the risk of benign ulceration after H. pylori infection.
Am J Gastroenterol. 2005 c;100(6):1274-82.
- Lu H, Hsu PI, Graham DY, Yamaoka Y.
Duodenal ulcer promoting gene of Helicobacter pylori.
Gastroenterology. 2005 d;128(4):833-48.
- Lucas B, Bumann D, Walduck A, Koesling J, Develioglu L, Meyer TF, Aebischer T.
Adoptive transfer of CD4+ T cells specific for subunit A of Helicobacter pylori urease reduces H. pylori stomach colonization in mice in the absence of interleukin-4 (IL-4)/IL-13 receptor signaling.
Infect Immun. 2001;69(3):1714-21.
- Lupetti P, Heuser JE, Manetti R, Massari P, Lanzavecchia S, Bellon PL, Dallai R, Rappuoli R, Telford JL.
Oligomeric and subunit structure of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin.
J Cell Biol. 1996;133(4):801-7.
- Macarthur M, Hold GL, El-Omar EM.
Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004;286(4):G515-20.
- Macdonald TT.
The worm turns on Helicobacter pylori.
Gut. 2001;48(1):10-1.
- Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S, Castro Alves C, Campos ML, Van Doorn LJ, Caldas C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M.
A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma.
Gastroenterology. 2003;125(2):364-71.

Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Angström J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraja S, Wadström T, Kersulyte D, Berg DE, Dubois A, Petersson C, Magnusson KE, Norberg T, Lindh F, Lundskog BB, Arnqvist A, Hammarström L, Boren T.

Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation.

Science. 2002;297(5581):573-8.

Malaty HM, Graham DY.

Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection.

Gut. 1994 a;35(6):742-5.

Malaty HM, Engstrand L, Pedersen NL, Graham DY.

Helicobacter pylori infection: genetic and environmental influences. A study of twins.

Ann Intern Med. 1994 b;120(12):982-6.

Mannick EE, Bravo LE, Zarama G, Realpe JL, Zhang XJ, Ruiz B, Fontham ET, Mera R, Miller MJ, Correa P.

Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants.

Cancer Res. 1996;56(14):3238-43.

Marchetti M, Arico B, Burrone D, Figura N, Rappuoli R, Ghiara P.

Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease.

Science. 1995;267(5204):1655-8.

Marshall BJ, Warren JR.

Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration.

Lancet. 1984;1(8390):1311-5.

Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ.

Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*.

Med J Aust. 1985;142(8):436-9.

Massari P, Manetti R, Burrone D, Nuti S, Norais N, Rappuoli R, Telford JL.

Binding of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin to target cells.

Infect Immun. 1998;66(8):3981-4.

McClain MS, Schraw W, Ricci V, Boquet P, Cover TL.

Acid activation of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) results in toxin internalization by eukaryotic cells.

Mol Microbiol. 2000;37(2):433-42.

- McClain MS, Cao P, Cover TL.
Amino-terminal hydrophobic region of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) mediates transmembrane protein dimerization.
Infect Immun. 2001 a;69(2):1181-4.
- McClain MS, Cao P, Iwamoto H, Vinion-Dubiel AD, Szabo G, Shao Z, Cover TL.
12-amino-acid segment, present in type s2 but not type s1 *Helicobacter pylori* VacA proteins, abolishes cytotoxin activity and alters membrane channel formation.
J Bacteriol. 2001 b;183(22):6499-508.
- McClain MS, Iwamoto H, Cao P, Vinion-Dubiel AD, Li Y, Szabo G, Shao Z, Cover TL.
Essential role of a GXXXG motif for membrane channel formation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin.
J Biol Chem. 2003;278(14):12101-8.
- Megraud F, Lamouliatte H.
Review article: the treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection.
Aliment Pharmacol Ther. 2003;17(11):1333-43.
- Megraud F.
Basis for the management of drug-resistant *Helicobacter pylori* infection.
Drugs. 2004;64(17):1893-904.
- Menaker RJ, Ceponis PJ, Jones NL.
Helicobacter pylori induces apoptosis of macrophages in association with alterations in the mitochondrial pathway.
Infect Immun. 2004;72(5):2889-98.
- Meyer F, Wilson KT, James SP.
Modulation of innate cytokine responses by products of *Helicobacter pylori*.
Infect Immun. 2000;68(11):6265-72.
- Mine T, Muraoka H, Saika T, Kobayashi I.
Characteristics of a clinical isolate of urease-negative *Helicobacter pylori* and its ability to induce gastric ulcers in Mongolian gerbils.
Helicobacter. 2005;10(2):125-31.
- Molinari M, Galli C, Norais N, Telford JL, Rappuoli R, Luzio JP, Montecucco C.
Vacuoles induced by *Helicobacter pylori* toxin contain both late endosomal and lysosomal markers.
J Biol Chem. 1997;272(40):25339-44.

Molinari M, Galli C, de Bernard M, Norais N, Ruyschaert JM, Rappuoli R, Montecucco C.

The acid activation of *Helicobacter pylori* toxin VacA: structural and membrane binding studies.

Biochem Biophys Res Commun. 1998 a;248(2):334-40.

Molinari M, Salio M, Galli C, Norais N, Rappuoli R, Lanzavecchia A, Montecucco C.

Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA.

J Exp Med. 1998 b;187(1):135-40.

Moll G, Papini E, Colonna R, Burrioni D, Telford J, Rappuoli R, Montecucco C. Lipid interaction of the 37-kDa and 58-kDa fragments of the *Helicobacter pylori* cytotoxin.

Eur J Biochem. 1995;234(3):947-52.

Montecucco C, de Bernard M.

Immunosuppressive and proinflammatory activities of the VacA toxin of *Helicobacter pylori*.

J Exp Med. 2003 a;198(12):1767-71.

Montecucco C, de Bernard M.

Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*.

Microbes Infect. 2003 b;5(8):715-21.

Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR.

Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*.

Gut. 1996;38(4):498-501.

Mourad-Baars PE, Verspaget HW, Mertens BJ, Luisa Mearin M.

Low prevalence of *Helicobacter pylori* infection in young children in the Netherlands.

Eur J Gastroenterol Hepatol. 2007;19(3):213-6.

Neu B, Randlkofer P, Neuhofer M, Volland P, Mayerhofer A, Gerhard M, Schepp W, Prinz C.

Helicobacter pylori induces apoptosis of rat gastric parietal cells.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2002;283(2):G309-18.

Nishi T, Okazaki K, Kawasaki K, Fukui T, Tamaki H, Matsuura M, Asada M, Watanabe T, Uchida K, Watanabe N, Nakase H, Ohana M, Hiai H, Chiba T. Involvement of myeloid dendritic cells in the development of gastric secondary lymphoid follicles in *Helicobacter pylori*-infected neonatally thymectomized BALB/c mice.

Infect Immun. 2003;71(4):2153-62.

- Nomura S, Suzuki H, Masaoka T, Kurabayashi K, Ishii H, Kitajima M, Nomoto K, Hibi T.
Effect of dietary anti-urease immunoglobulin Y on *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils.
Helicobacter. 2005;10(1):43-52.
- Odenbreit S, Till M, Haas R.
Optimized BlaM-transposon shuttle mutagenesis of *Helicobacter pylori* allows the identification of novel genetic loci involved in bacterial virulence.
Mol Microbiol. 1996;20(2):361-73.
- Odenbreit S, Püls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R.
Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion.
Science. 2000;287(5457):1497-500.
- Odenbreit S, Gebert B, Puls J, Fischer W, Haas R.
Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the *cag* pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA.
Cell Microbiol. 2001;3(1):21-31.
- Ogura K, Maeda S, Nakao M, Watanabe T, Tada M, Kyutoku T, Yoshida H, Shiratori Y, Omata M.
Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil.
J Exp Med. 2000;192(11):1601-10.
- Ohno T, Kita M, Yamaoka Y, Imamura S, Yamamoto T, Mitsufuji S, Kodama T, Kashima K, Imanishi J.
Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*.
Helicobacter. 2003;8(3):207-15.
- Ohyama I, Ohmiya N, Niwa Y, Shirai K, Taguchi A, Itoh A, Hirooka Y, Wakai K, Hamajima N, Mori N, Goto H.
The association between tumour necrosis factor- α gene polymorphism and the susceptibility to rugal hyperplastic gastritis and gastric carcinoma.
Eur J Gastroenterol Hepatol. 2004;16(7):693-700.
- Oswald-Richter K, Torres VJ, Sundrud MS, Vancompernelle SE, Cover TL, Unutmaz D.
Helicobacter pylori VacA Toxin Inhibits Human Immunodeficiency Virus Infection of Primary Human T Cells.
J Virol. 2006;80(23):11767-75.
- O'Toole PW, Lane MC, Porwollik S.
Helicobacter pylori motility.
Microbes Infect. 2000;2(10):1207-14.

- Padilla PI, Wada A, Yahiro K, Kimura M, Niidome T, Aoyagi H, Kumatori A, Anami M, Hayashi T, Fujisawa J, Saito H, Moss J, Hirayama T. Morphologic differentiation of HL-60 cells is associated with appearance of RPTPbeta and induction of Helicobacter pylori VacA sensitivity. *J Biol Chem.* 2000;275(20):15200-6.
- Pagliaccia C, Wang XM, Tardy F, Telford JL, Ruyschaert JM, Cabiliaux V. Structure and interaction of VacA of Helicobacter pylori with a lipid membrane. *Eur J Biochem.* 2000;267(1):104-9.
- Palli D, Saieva C, Gemma S, Masala G, Gomez-Miguel MJ, Luzzi I, D'Errico M, Matullo G, Ozzola G, Manetti R, Nesi G, Sera F, Zanna I, Dogliotti E, Testai E. GSTT1 and GSTM1 gene polymorphisms and gastric cancer in a high-risk Italian population. *Int J Cancer.* 2005;115(2):284-9.
- Papini E, Bugnoli M, De Bernard M, Figura N, Rappuoli R, Montecucco C. Bafilomycin A1 inhibits Helicobacter pylori-induced vacuolization of HeLa cells. *Mol Microbiol.* 1993;7(2):323-7.
- Papini E, Satin B, Bucci C, de Bernard M, Telford JL, Manetti R, Rappuoli R, Zerial M, Montecucco C. The small GTP binding protein rab7 is essential for cellular vacuolation induced by Helicobacter pylori cytotoxin. *EMBO J.* 1997;16(1):15-24.
- Papini E, Satin B, Norais N, de Bernard M, Telford JL, Rappuoli R, Montecucco C. Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by Helicobacter pylori vacuolating toxin. *J Clin Invest.* 1998;102(4):813-20.
- Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelstein H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection. *Gut.* 1997;40(3):297-301.
- Parsonnet J, Isaacson PG. Bacterial infection and MALT lymphoma. *N Engl J Med.* 2004;350(3):213-5.
- Patel HK, Willhite DC, Patel RM, Ye D, Williams CL, Torres EM, Marty KB, MacDonald RA, Blanke SR. Plasma membrane cholesterol modulates cellular vacuolation induced by the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin. *Infect Immun.* 2002;70(8):4112-23.

Peek RM Jr, Blaser MJ, Mays DJ, Forsyth MH, Cover TL, Song SY, Krishna U, Pietenpol JA.

Helicobacter pylori strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle.

Cancer Res. 1999;59(24):6124-31.

Pel PK.

De ziekten van de maag. First edition. Met het oog op de behoeften der geneeskundige praktijk geschetst.

Haarlem, 1899.227p.

Pelicic V, Reyrat JM, Sartori L, Pagliaccia C, Rappuoli R, Telford JL, Montecucco C, Papini E.

Helicobacter pylori VacA cytotoxin associated with the bacteria increases epithelial permeability independently of its vacuolating activity.

Microbiology. 1999;145 (Pt 8):2043-50.

Peres SY, Marches O, Daigle F, Nougayrede JP, Herault F, Tasca C, De Rycke J, Oswald E.

A new cytolethal distending toxin (CDT) from Escherichia coli producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase.

Mol Microbiol. 1997;24(5):1095-107.

Perez-Perez GI, Rothenbacher D, Brenner H.

Epidemiology of Helicobacter pylori infection.

Helicobacter. 2004;9 Suppl 1:1-6.

Petersen AM, Sorensen K, Blom J, Krogfelt KA.

Reduced intracellular survival of Helicobacter pylori vacA mutants in comparison with their wild-types indicates the role of VacA in pathogenesis.

FEMS Immunol Med Microbiol. 2001;30(2):103-8.

Poon B, Jowett JB, Stewart SA, Armstrong RW, Rishton GM, Chen IS.

Human immunodeficiency virus type 1 vpr gene induces phenotypic effects similar to those of the DNA alkylating agent, nitrogen mustard.

J Virol. 1997;71(5):3961-71.

Pounder RE, Ng D.

The prevalence of Helicobacter pylori infection in different countries.

Aliment Pharmacol Ther. 1995;9 Suppl 2:33-9.

Pritchard DM, Przemeck SM.

Review article: How useful are the rodent animal models of gastric adenocarcinoma?

Aliment Pharmacol Ther. 2004;19(8):841-59.

Pütsep K, Bränden CI, Boman HG, Normark S.
Antibacterial peptide from *H. pylori*.
Nature. 1999;398(6729):671-2.

Queiroz DM, Guerra JB, Rocha GA, Rocha AM, Santos A, De Oliveira AG, Cabral MM, Nogueira AM, De Oliveira CA.
IL1B and IL1RN polymorphic genes and *Helicobacter pylori* cagA strains decrease the risk of reflux esophagitis.
Gastroenterology. 2004;127(1):73-9.

Rad R, Gerhard M, Lang R, Schoniger M, Rosch T, Schepp W, Becker I, Wagner H, Prinz C.
The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response.
J Immunol. 2002;168(6):3033-41.

Rad R, Prinz C, Neu B, Neuhofer M, Zeitner M, Voland P, Becker I, Schepp W, Gerhard M.
Synergistic effect of *Helicobacter pylori* virulence factors and interleukin-1 polymorphisms for the development of severe histological changes in the gastric mucosa.
J Infect Dis. 2003;188(2):272-81.

Rad R, Dossumbekova A, Neu B, Lang R, Bauer S, Saur D, Gerhard M, Prinz C.
Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection.
Gut. 2004;53(8):1082-9.

Raghavan S, Fredriksson M, Svennerholm AM, Holmgren J, Suri-Payer E.
Absence of CD4+CD25+ regulatory T cells is associated with a loss of regulation leading to increased pathology in *Helicobacter pylori*-infected mice.
Clin Exp Immunol. 2003;132(3):393-400.

Ramarao N, Meyer TF.
Helicobacter pylori resists phagocytosis by macrophages: quantitative assessment by confocal microscopy and fluorescence-activated cell sorting.
Infect Immun. 2001;69(4):2604-11.

Rauws EA, Tytgat GN.
Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*.
Lancet. 1990;335(8700):1233-5.

Reyrat JM, Lanzavecchia S, Lupetti P, de Bernard M, Pagliaccia C, Pelicic V, Charrel M, Olivieri C, Norais N, Ji X, Cabiaux V, Papini E, Rappuoli R, Telford JL.

3D imaging of the 58 kDa cell binding subunit of the *Helicobacter pylori* cytotoxin.

J Mol Biol. 1999;290(2):459-70.

Rizos K, Lattemann CT, Bumann D, Meyer TF, Aebischer T.

Autodisplay: efficacious surface exposure of antigenic UreA fragments from *Helicobacter pylori* in *Salmonella* vaccine strains.

Infect Immun. 2003;71(11):6320-8.

Roche N, Angstrom J, Hurtig M, Larsson T, Boren T, Teneberg S.

Helicobacter pylori and complex gangliosides.

Infect Immun. 2004;72(3):1519-29.

Rothenbacher D, Blaser MJ, Bode G, Brenner H.

Inverse relationship between gastric colonization of *Helicobacter pylori* and diarrheal illnesses in children: results of a population-based cross-sectional study.

J Infect Dis. 2000;182(5):1446-9.

Rowland M, Daly L, Vaughan M, Higgins A, Bourke B, Drumm B.

Age-specific incidence of *Helicobacter pylori*.

Gastroenterology. 2006;130(1):65-72; quiz 211.

Rudi J, Kuck D, Strand S, von Herbay A, Mariani SM, Krammer PH, Galle PR, Stremmel W.

Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis.

J Clin Invest. 1998;102(8):1506-14.

Rüssmann H, Adler K, Haas R, Gebert B, Koletzko S, Heesemann J.

Rapid and accurate determination of genotypic clarithromycin resistance in cultured *Helicobacter pylori* by fluorescent in situ hybridization.

J Clin Microbiol. 2001;39(11):4142-4.

Salama NR, Otto G, Tompkins L, Falkow S.

Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection.

Infect Immun. 2001;69(2):730-6.

Saldinger PF, Porta N, Launois P, Louis JA, Waanders GA, Bouzourene H, Michetti P, Blum AL, Corthesy-Theulaz IE.

Immunization of BALB/c mice with *Helicobacter urease B* induces a T helper 2 response absent in *Helicobacter* infection.

Gastroenterology. 1998;115(4):891-7.

- Sasaki K, Adachi S, Yamamoto T, Murakami T, Tanaka K, Takahashi M.
Effects of denaturation with HCl on the immunological staining of
bromodeoxyuridine incorporated into DNA.
Cytometry. 1988;9(1):93-6.
- Schade C, Flemstrom G, Holm L.
Hydrogen ion concentration in the mucus layer on top of acid-stimulated and -
inhibited rat gastric mucosa.
Gastroenterology. 1994;107(1):180-8.
- Schmitt W, Haas R.
Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural
similarities with the IgA protease type of exported protein.
Mol Microbiol. 1994;12(2):307-19.
- Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G.
Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from
children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-
Hodgkin lymphoma.
Int J Cancer. 1977;19(5):621-6.
- Schraw W, Li Y, McClain MS, van der Goot FG, Cover TL.
Association of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) with lipid rafts.
J Biol Chem. 2002;277(37):34642-50.
- Schreiber S, Konradt M, Groll C, Scheid P, Hanauer G, Werling HO, Josenhans
C, Suerbaum S.
The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(14):5024-9.
- Scott DR, Marcus EA, Weeks DL, Sachs G.
Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*.
Gastroenterology. 2002;123(1):187-95.
- Selbach M, Moese S, Backert S, Jungblut PR, Meyer TF.
The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of
ezrin.
Proteomics. 2004;4(10):2961-8.
- Seto K, Hayashi-Kuwabara Y, Yoneta T, Suda H, Tamaki H.
Vacuolation induced by cytotoxin from *Helicobacter pylori* is mediated by the
EGF receptor in HeLa cells.
FEBS Lett. 1998;431(3):347-50.
- Sezikli M, Guliter S, Apan TZ, Aksoy A, Keles H, Ozkurt ZN.
Frequencies of serum antibodies to *Helicobacter pylori* CagA and VacA in a
Turkish population with various gastroduodenal diseases.
Int J Clin Pract. 2006;60(10):1239-43.

- Shirai M, Arichi T, Nakazawa T, Berzofsky JA.
Persistent infection by *Helicobacter pylori* down-modulates virus-specific CD8+ cytotoxic T cell response and prolongs viral infection.
J Infect Dis. 1998;177(1):72-80.
- Shirin H, Sordillo EM, Oh SH, Yamamoto H, Delohery T, Weinstein IB, Moss SF.
Helicobacter pylori inhibits the G1 to S transition in AGS gastric epithelial cells.
Cancer Res. 1999;59(10):2277-81.
- Sipponen P, Kekki M, Haapakoski J, Ihamaki T, Siurala M.
Gastric cancer risk in chronic atrophic gastritis: statistical calculations of cross-sectional data.
Int J Cancer. 1985;35(2):173-7.
- Skibinski DA, Genisset C, Barone S, Telford JL.
The cell-specific phenotype of the polymorphic *vacA* midregion is independent of the appearance of the cell surface receptor protein tyrosine phosphatase beta.
Infect Immun. 2006;74(1):49-55.
- Smith MF Jr, Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S, Goldberg JB.
Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells.
J Biol Chem. 2003;278(35):32552-60.
- Smoot DT.
How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? Direct mechanisms.
Gastroenterology. 1997;113(6 Suppl):S31-4; discussion S50.
- Stewart SA, Poon B, Jowett JB, Xie Y, Chen IS.
Lentiviral delivery of HIV-1 Vpr protein induces apoptosis in transformed cells.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(21):12039-43.
- Stingl K, De Reuse H.
Staying alive overdosed: how does *Helicobacter pylori* control urease activity?
Int J Med Microbiol. 2005;295(5):307-15.
- Stromberg E, Lundgren A, Edebo A, Lundin S, Svennerholm AM, Lindholm C.
Increased frequency of activated T-cells in the *Helicobacter pylori*-infected antrum and duodenum.
FEMS Immunol Med Microbiol. 2003;36(3):159-68.

Stromberg E, Edebo A, Lundin BS, Bergin P, Brisslert M, Svennerholm AM, Lindholm C.

Down-regulation of epithelial IL-8 responses in *Helicobacter pylori*-infected duodenal ulcer patients depends on host factors, rather than bacterial factors. *Clin Exp Immunol.* 2005;140(1):117-25.

Sugiyama T, Hige S, Asaka M.

Development of an *H. pylori*-infected animal model and gastric cancer: recent progress and issues.

J Gastroenterol. 2002;37 Suppl 13:6-9.

Sundrud MS, Torres VJ, Unutmaz D, Cover TL.

Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(20):7727-32.

Supajatura V, Ushio H, Wada A, Yahiro K, Okumura K, Ogawa H, Hirayama T, Ra C.

Cutting edge: VacA, a vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines.

J Immunol. 2002;168(6):2603-7.

Suzuki J, Ohnsihi H, Shibata H, Wada A, Hirayama T, Iiri T, Ueda N, Kanamaru C, Tsuchida T, Mashima H, Yasuda H, Fujita T.

Dynamin is involved in human epithelial cell vacuolation caused by the *Helicobacter pylori*-produced cytotoxin VacA.

J Clin Invest. 2001 a;107(3):363-70.

Suzuki T, Grand E, Bowman C, Merchant JL, Todisco A, Wang L, Del Valle J. TNF-alpha and interleukin 1 activate gastrin gene expression via MAPK- and PKC-dependent mechanisms.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001 b;281(6):G1405-12.

Suzuki K, Kokai Y, Sawada N, Takakuwa R, Kuwahara K, Isogai E, Isogai H, Mori M.

SS1 *Helicobacter pylori* disrupts the paracellular barrier of the gastric mucosa and leads to neutrophilic gastritis in mice.

Virchows Arch. 2002;440(3):318-24.

Suzuki J, Ohnishi H, Wada A, Hirayama T, Ohno H, Ueda N, Yasuda H, Iiri T, Wada Y, Futai M, Mashima H.

Involvement of syntaxin 7 in human gastric epithelial cell vacuolation induced by the *Helicobacter pylori*-produced cytotoxin VacA.

J Biol Chem. 2003;278(28):25585-90.

Suzuki T, Matsushima M, Masui A, Watanabe K, Takagi A, Ogawa Y, Shirai T, Mine T.

Effect of *Helicobacter pylori* eradication in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura—a randomized controlled trial.

Am J Gastroenterol. 2005;100(6):1265-70.

Szabo I, Brutsche S, Tombola F, Moschioni M, Satin B, Telford JL, Rappuoli R, Montecucco C, Papini E, Zoratti M.

Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity.

EMBO J. 1999;18(20):5517-27.

Take S, Mizuno M, Ishiki K, Nagahara Y, Yoshida T, Yokota K, Oguma K, Okada H, Shiratori Y.

The effect of eradicating *Helicobacter pylori* on the development of gastric cancer in patients with peptic ulcer disease.

Am J Gastroenterol. 2005;100(5):1037-42.

Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burroni D, Bugnoli M, Tecce MF, Censini S, Covacci A, Xiang Z, et al.

Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease.

J Exp Med. 1994;179(5):1653-58.

Telford JL, Covacci A, Rappuoli R, Chiara P.

Immunobiology of *Helicobacter pylori* infection.

Curr Opin Immunol. 1997;9(4):498-503.

Terres AM, Pajares JM, Hopkins AM, Murphy A, Moran A, Baird AW, Kelleher D.

Helicobacter pylori disrupts epithelial barrier function in a process inhibited by protein kinase C activators.

Infect Immun. 1998;66(6):2943-50.

Thomas JE, Dale A, Harding M, Coward WA, Cole TJ, Weaver LT.

Helicobacter pylori colonization in early life.

Pediatr Res. 1999;45(2):218-23.

Thomas JE, Bunn JE, Kleanthous H, Monath TP, Harding M, Coward WA, Weaver LT.

Specific immunoglobulin A antibodies in maternal milk and delayed *Helicobacter pylori* colonization in Gambian infants.

Clin Infect Dis. 2004;39(8):1155-60.

- Tombola F, Oregna F, Brutsche S, Szabo I, Del Giudice G, Rappuoli R, Montecucco C, Papini E, Zoratti M.
Inhibition of the vacuolating and anion channel activities of the VacA toxin of *Helicobacter pylori*.
FEBS Lett. 1999;460(2):221-5.
- Torrado J, Plummer M, Vivas J, Garay J, Lopez G, Peraza S, Carillo E, Oliver W, Munoz N.
Lewis antigen alterations in a population at high risk of stomach cancer.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000;9(7):671-4.
- Torres VJ, McClain MS, Cover TL.
Interactions between p-33 and p-55 domains of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA).
J Biol Chem. 2004;279(3):2324-31.
- Torres VJ, Ivie SE, McClain MS, Cover TL.
Functional properties of the p33 and p55 domains of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin.
J Biol Chem. 2005;280(22):21107-14.
- Torres VJ, McClain MS, Cover TL.
Mapping of a domain required for protein-protein interactions and inhibitory activity of a *Helicobacter pylori* dominant-negative VacA mutant protein.
Infect Immun. 2006;74(4):2093-101.
- Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S.
H. pylori infection and the development of gastric cancer.
Keio J Med. 2002;51 Suppl 2:63-8.
- Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, Bergstrom J, Boren T, Danielsson D, Teneberg S.
The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils.
J Biol Chem. 2005;280(15):15390-7.
- Vakil N, Hahn B, McSorley D.
Recurrent symptoms and gastro-oesophageal reflux disease in patients with duodenal ulcer treated for *Helicobacter pylori* infection.
Aliment Pharmacol Ther. 2000;14(1):45-51.
- van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Blaser MJ, Quint WG.
Distinct variants of *Helicobacter pylori* cagA are associated with vacA subtypes.
J Clin Microbiol. 1999 a;37(7):2306-11.

van Doorn LJ, Figueiredo C, Megraud F, Pena S, Midolo P, Queiroz DM, Carneiro F, Vanderborght B, Pegado MD, Sanna R, De Boer W, Schneeberger PM, Correa P, Ng EK, Atherton J, Blaser MJ, Quint WG.

Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*.
Gastroenterology. 1999 b;116(4):823-30.

Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Memet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL.

Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island.
Nat Immunol. 2004;5(11):1166-74.

Viallard JF, Lacombe F, Dupouy M, Ferry H, Belloc F, Reiffers J.

Different expression profiles of human cyclin B1 in normal PHA-stimulated T lymphocytes and leukemic T cells.
Cytometry. 2000;39(2):117-25.

Vinon-Dubiel AD, McClain MS, Czajkowsky DM, Iwamoto H, Ye D, Cao P, Schraw W, Szabo G, Blanke SR, Shao Z, Cover TL.

A dominant negative mutant of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (*VacA*) inhibits *VacA*-induced cell vacuolation.
J Biol Chem. 1999;274(53):37736-42.

Voland P, Zeitner M, Hafsi N, Prinz C.

Human immune response towards recombinant *Helicobacter pylori* urease and cellular fractions.
Vaccine. 2006;24(18):3832-9.

Wada A, Yamasaki E, Hirayama T.

Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin, *VacA*, is responsible for gastric ulceration.
J Biochem (Tokyo). 2004;136(6):741-6.

Wagner S, Beil W, Westermann J, Logan RP, Bock CT, Trautwein C, Bleck JS, Manns MP.

Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: evidence for a major role of apoptosis.
Gastroenterology. 1997;113(6):1836-47.

Wang HJ, Kuo CH, Yeh AA, Chang PC, Wang WC.

Vacuolating toxin production in clinical isolates of *Helicobacter pylori* with different *vacA* genotypes.
J Infect Dis. 1998;178(1):207-12.

- Wang J, Brooks EG, Bamford KB, Denning TL, Pappo J, Ernst PB.
Negative selection of T cells by *Helicobacter pylori* as a model for bacterial strain selection by immune evasion.
J Immunol. 2001;167(2):926-34.
- Weinberg RA.
The retinoblastoma protein and cell cycle control.
Cell. 1995;81(3):323-30.
- Wermuller BF, Loffeld RJ.
Helicobacter pylori infection has no role in the pathogenesis of reflux esophagitis.
Dig Dis Sci. 1997;42(1):103-5.
- Weyermann M, Adler G, Brenner H, Rothenbacher D.
The mother as source of *Helicobacter pylori* infection.
Epidemiology. 2006;17(3):332-4.
- Whitehouse CA, Balbo PB, Pesci EC, Cottle DL, Mirabito PM, Pickett CL.
Campylobacter jejuni cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block.
Infect Immun. 1998;66(5):1934-40.
- Willhite DC, Ye D, Blanke SR.
Fluorescence resonance energy transfer microscopy of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin within mammalian cells.
Infect Immun. 2002;70(7):3824-32.
- Willhite DC, Cover TL, Blanke SR.
Cellular vacuolation and mitochondrial cytochrome c release are independent outcomes of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin activity that are each dependent on membrane channel formation.
J Biol Chem. 2003;278(48):48204-9.
- Willhite DC, Blanke SR.
Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity.
Cell Microbiol. 2004;6(2):143-54.
- Yahiro K, Niidome T, Kimura M, Hatakeyama T, Aoyagi H, Kurazono H, Imagawa K, Wada A, Moss J, Hirayama T.
Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase beta.
J Biol Chem. 1999;274(51):36693-9.

Yahiro K, Wada A, Nakayama M, Kimura T, Ogushi K, Niidome T, Aoyagi H, Yoshino K, Yonezawa K, Moss J, Hirayama T.
Protein-tyrosine phosphatase alpha, RPTP alpha, is a Helicobacter pylori VacA receptor.

J Biol Chem. 2003;278(21):19183-9.

Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham DY.
Antibody against Helicobacter pylori CagA and VacA and the risk for gastric cancer.

J Clin Pathol. 1999;52(3):215-8.

Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY.

A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of Helicobacter pylori.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(13):7533-8.

Yamaoka Y, Kikuchi S, el-Zimaity HM, Gutierrez O, Osato MS, Graham DY.
Importance of Helicobacter pylori oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production.

Gastroenterology. 2002 a;123(2):414-24.

Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Imamura S, Ohno T, Sawai N, Ishimaru A, Imanishi J, Graham DY.

Helicobacter pylori infection in mice: Role of outer membrane proteins in colonization and inflammation.

Gastroenterology. 2002 b;123(6):1992-2004.

Yamasaki E, Wada A, Kumatori A, Nakagawa I, Funao J, Nakayama M, Hisatsune J, Kimura M, Moss J, Hirayama T.

Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation.

J Biol Chem. 2006;281(16):11250-9.

Ye D, Willhite DC, Blanke SR.

Identification of the minimal intracellular vacuolating domain of the Helicobacter pylori vacuolating toxin.

J Biol Chem. 1999;274(14):9277-82.

Ye D, Blanke SR.

Mutational analysis of the Helicobacter pylori vacuolating toxin amino terminus: identification of amino acids essential for cellular vacuolation.

Infect Immun. 2000;68(7):4354-7.

Ye D, Blanke SR.

Functional complementation reveals the importance of intermolecular monomer interactions for Helicobacter pylori VacA vacuolating activity.

Mol Microbiol. 2002;43(5):1243-53.

Yeo M, Kim DK, Han SU, Lee JE, Kim YB, Cho YK, Kim JH, Cho SW, Hahm KB.

Novel action of gastric proton pump inhibitor on suppression of *Helicobacter pylori* induced angiogenesis.
Gut. 2006;55(1):26-33.

Yokota K, Kurebayashi Y, Takayama Y, Hayashi S, Isogai H, Isogai E, Imai K, Yabana T, Yachi A, Oguma K.

Colonization of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of Mongolian gerbils.
Microbiol Immunol. 1991;35(6):475-80.

Yunta M, Lazo PA.

Apoptosis protection and survival signal by the CD53 tetraspanin antigen.
Oncogene. 2003;22(8):1219-24.

Zagari RM, Bazzoli F, Pozzato P, Fossi S, De Luca L, Nicolini G, Berretti D, Roda E.

Review article: non-invasive methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection.

Ital J Gastroenterol Hepatol. 1999;31(5):408-15.

Zheng PY, Jones NL.

Helicobacter pylori strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein.

Cell Microbiol. 2003;5(1):25-40.

Zheng PY, Tang FA, Qi YM, Li J.

Association of peptic ulcer with increased expression of Lewis antigens, but not vacuolating cytotoxin activity or *babA2* gene status, in *Helicobacter pylori* strains from China.

Chin J Dig Dis. 2006;7(1):61-5.

Zumkeller N, Koenig W, Hoffmann MM, Kolb H, Brenner H, Rothenbacher D.

Helicobacter pylori seropositive subjects do not show a pronounced systemic inflammatory response even in the presence of the interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism.

Epidemiol Infect. 2005;133(3):569-72.

Zumkeller N, Brenner H, Zwahlen M, Rothenbacher D.

Helicobacter pylori infection and colorectal cancer risk: a meta-analysis.

Helicobacter. 2006;11(2):75-80.

6.3 Abkürzungen

60190	H. pylori Stamm, codiert s1/m1 VacA (Cover et al. 1994)
A23187	Ionophor wie Ionomycin für Ca^{2+} , aber nicht so wirksam
Abb.	Abbildung
AGS	humane Zell-Linie, ausgehend vom Magenkarzinom; sie gilt als Beispiel für Epithelzellen
AICD	engl.: activation-induced cell death (programmierter Zelltod der T-Zelle) ausgelöst durch IL-2 Aktivierung
AID	engl.: antigen induced cell death
AP-1	Alkalische Phosphatase-1
Apaf-1	Apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
ATP	Adenosintriphosphat
AZ-521	engl.: human gastric adenocarcinoma cell line
Bab A	von H. pylori exprimiertes Adhäsion, (HopS)
Bcl-2	B-cell-lymphoma/leucemia-2
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridin, ein Thymidinanalogon
BSA	engl.: Albumin from bovine serum (Albumin aus Rinderserum)
bzw.	beziehungsweise
^{13}C	nicht-radioaktives Isotop des Kohlenstoffatom
c	Endkonzentration
ca.	lat.: circa, ungefähr
cagA	Gensequenz, codiert für das Protein CagA
CagA	engl.: cytotoxin associated gene A; Virulenzfaktor und Protein

CagA ^{+/-}	H.-pylori-Stämme mit/ohne Gensequenz cag PAI
cag PAI	Gensequenz einiger H.-pylori-Stämme; codiert 27 bis 31 Proteine (unter anderem den Virulenzfaktor CagA). Die H.-pylori-Stämme werden in Typ I mit cag PAI und in Typ II ohne cag PAI unterteilt.
CD	engl.: Cluster of differentiation
CD4	Co-Rezeptor auf T-Helferzellen; Lymphozyten
CD4 ⁺ T _h Zellen	T-Helferzellen
CD25	α Untereinheit des IL-2 Rezeptors
CD28	Untereinheit des T-Zell Rezeptors
CD95	Fas-R = Fas-Rezeptor
CD122	β Untereinheit des IL-2 Rezeptors
CD-SIGN	(CD209); spezifischer Oberflächenrezeptor der Dendritischen Zellen
Co	steht im Experimentsetting für: Kontrolle = Probe ohne zellfreien Überstand
ConA	Concanavalin A (Lektin aus der Schwertbohne)
Cox-2	Cyclo-Oxygenase 2 (Enzym)
CRAC	engl.: Ca ²⁺ releas-activated Calcium channel
Cyklin A	Cyklin im G ₁ -S Phasenwechsel; wahrscheinlich positiver Regulator des Zell-Zyklus
Cyklin E	Cyklin der späten G ₁ -Phase; wahrscheinlich positiver Regulator des Zell-Zyklus
Cyklin E - cdk2	Cytokin-Kinase-Koplex, der pRb durch Hyperphosphorelierung inaktiviert und wahrscheinlich den G ₁ -S Transient positiv reguliert
Δ6-27	steht im Experimentsetting für den zellfreien Extrakt des isogenen H. pylori P12 Mutanten: P12Δ(6-27)

$\Delta 6-27a$	steht im Experimentsetting für den zellfreien Extrakt des isogenen <i>H. pylori</i> P12 Mutanten: P12 Δ (6-27), nach einer Stunde Säureaktivierung
$\Delta VacA$	steht im Experimentsetting für den zellfreien Extrakt des isogenen <i>H. pylori</i> P12 Mutanten: P12 Δ (Vac)
dest.	Destilliert
dl	Volumenangabe in Deziliter
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: Deoxyribonucleic acid
dsDNA	engl.: double-stranded DNA (doppelsträngige DNA)
dsRNA	engl.: double-stranded RNA (doppelsträngige RNA)
dup A	duodenal ulcer promoting A (Gensequenz in einigen <i>H.-pylori</i> -Stämmen)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (humanes Darmbakterium; gentechnisch verändert kann es rekombinantes VacA sezernieren)
EGF	engl.: epithel growth factor
engl.	englisch
et al.	lat.: et alii (bzw. et aliae oder et alia) „und andere“ (männlicher, weiblicher oder sächlicher Plural)
FACS	engl.: fluorescence-activated cell sorter (Durchflußzytometer)
FCS	engl.: fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FCS	engl.: forward-scatter (ein Detektor im FACS-Gerät)
FITC	Fluorescein-isothiocyanat (Marker für histologische Färbungen)
g	Gewichtsangabe in Gramm
G ₁ -Phase	postmitotische Phase des Zellzyklus

G ₂ -Phase	prämitotische Phase des Zellzyklus
GERD	engl.: gastroesophageal reflux disease (Refluxkrankheit)
h	Zeitangabe in Stunden
HeLa Zellen	menschliche Zell-Linie aus den Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HIV	engl.: human immunodeficiency virus
HL-60 Zellen	humane Zell-Linie, abgeleitet aus eine promyeloischen Leukämie Zelle
H. pylori	Helicobacter pylori
Hsp 60	von H. pylori sezerniertes heat shock protein
IgG	Immunglobulin G mit vier isotypischen Subklassen
Ionomycin	Ionophor für Ca ²⁺ , das wirkungsvoller als A23187 ist
Ionophor	Substanz, die den ungehinderten Transport von K ⁺ , Na ⁺ , Ca ²⁺ u.a. durch Membranen gestattet. Zu den Ionophoren gehören auch einige Antibiotika, z.B. Valinomycin und Gramidicidin.
IL	Interleukin (von Leukozyten produzierte Cytokine)
IL-2	Interleukin 2, Synonym: T cell growth factor. Es wird von T-Helferzellen produziert und aktiviert T-Lymphozyten und Killerzellen. Gentechnisch hergestelltes rekombinantes IL-2 wurde erfolgreich in der Therapie einiger Krebserkrankungen eingesetzt.
IL-2R	Interleukin-2 Rezeptor (besteht aus drei Untereinheiten)
IL-2R α	α Untereinheit des IL-2 Rezeptors; entspricht CD25
IL-10	Interleukin 10. Es wird von Th ₂ -Zellen produziert und hemmt antigenpräsentierende Zellen.
Iono	im Experimentsetting das Kürzel für Ionomycin
JAM	engl.: junctional adhesion molecules
Kato III	onkogen entartete Epithelzell-Linie der humanen Magenschleimhaut, der das Gen für p53 fehlt

kDa	Kilodalton
lat.	lateinisch
Le ^b	Lewis b (Blutgruppenantigen, z. B. auf humanen Epithelzellen)
LPS	Lipopolysaccharide
MALT	engl.: mucosa associated lymphoid tissue
mg	Gewichtsangabe in Milligramm
MHC	engl.: major histo compatibility complexes
min	Zeitangabe in Minuten
MIP 3 α	CC-Chemokin (wirkt chemotaktisch bei Infektionen)
ml	Volumenangabe in Milliliter
mm	Längenangabe in Millimeter
M-Phase	Mitose-Phase des Zellzyklus
μ l	Volumenangabe in Mikroliter
n	Anzahl der durchgeführten Einzelerperimente
NF κ B	engl.: nuclear factor κ B
NFAT	engl.: nuclear factor of activated T cells (Transkriptionsfaktor unter anderem für IL-2)
NFAT _c	cytoplasmatische Untereinheit des NFAT
NFAT _n	nucleäre Untereinheit des NFAT
Nod 1	(CARD 4); intraepithelialer Rezeptor für Peptidoglycane
Nod 2	(CARD 15); Oberflächenrezeptor für Peptidoglycane auf Epithelzellen
NPPB	engl.: 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (unspezifischer Chloridkanalblocker)
Oip A	(HepH); von <i>H. pylori</i> exprimiertes Protein. Es gehört zur Hop Familie

p	Signifikanzniveau
P12	H. pylori Stamm; cagA positiv. Es exprimiert VacA mit dem Genotyp: s1/m1
p21	Inhibitor für Cyklin abhängige Kinasen. (Der Inhibitor kann wahrscheinlich den Zellzyklus hemmen oder zur Apoptose beitragen. Kann wahrscheinlich in AGS-Zellen an den Cytokin E-cdk2 Komplex binden und den Zellzyklus in der G ₁ -Phase arretieren.)
p33	NH ₂ -terminale Untereinheit des Exotoxins VacA. (Wird manchmal auch als p37 gebildet.)
p37	Untereinheit des Exotoxins VacA, meist als p33 gebildet
p38	Streßkinase
p53	Inhibitor für Cyklin abhängige Kinasen. (Der Inhibitor kann wahrscheinlich den Zellzyklus hemmen oder zur Apoptose beitragen, indem es an den Kinase-Cyklin Komplex bindet. Scheint in AGS-Zellen p21 positiv zu kontrollieren.)
p55	COOH-terminale Untereinheit des Exotoxins VacA. (Wird manchmal auch als p58 gebildet.)
p58	Untereinheit des Exotoxins VacA meistens als p55 gebildet
p70 S6	eine mitogen-aktivierte Ser/Thr Proteinkinase, die den G ₁ /S Progress unter IL-2 Wirkung reguliert
PAI	engl.: pathogenicity island; Gensequenz, sie für einige Virulenzfaktoren des H. pylori codiert
PBL	engl.: human peripher blood lymphocytes
PBS	engl.: Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PI	engl.: propidium iodide (färbt Nukleinsäuren an und kann tote Zellen nachweisen)
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetat. Synonym: TPA (Tetradecanoylphorbol 13-Acetat)
pRb	engl.: retinoblastoma tumor suppressor gene product. (Wahrscheinlich negativer Regulator am G ₁ -S Phasenwechsel im Zell-Zyklus der Lymphozyten.)

Rb	engl.: retinoblastoma protein (Schlüsselprotein für den G ₁ Transit nach TCR/CD28 Aktivierung in T Zellen, wahrscheinlich negativer Regulator im Zell-Zyklus)
RK 13	Zell-Linie aus Kaninchennieren
RNA	engl.: ribonucleic acid
RNase A	Ribonuklease A aus Rinderpankreas
RPMI-1640	Zellkulturmedium. Es wurde Mitte der 1960´er Jahre am Roswell Park Memorial Institute entwickelt (daher RPMI).
RPTP α	receptor protein-tyrosine phosphatase α
RPTP β	receptor protein-tyrosine phosphatase β
RPTP β -A	engl.: receptor like protein tyrosin phosphatase β -A (eine von drei Isoformen des RPTP β)
RT	Raumtemperatur
Sab A	(HopP), von H. pylori exprimiertes Adhäsion
sec	Zeitangabe in Sekunden
s.o.	siehe oben
S-Phase	Synthese Phase im Zellzyklus
SSC	engl.: sideward scatter (Detektor im FACS-Gerät)
ssDNA	engl.: single-stranded DNA (Einzelstrang DNA)
ssRNA	engl.: single-stranded RNA (Einzelstrang RNA)
TCR	T-Zellrezeptor
TCR/CD28	Komplex aus T-Zellrezeptor mit der Untereinheit CD28
TER	transepithelialer elektrischer Widerstand
Th ₁	periphere T-Lymphocyten vom Typ 1
Th ₂	periphere T-Lymphocyten vom Typ 2
TLR	engl.: toll-like receptor

TPA	Tetradecanoylphorbol 13-Acetat ; Synonym: PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetat)
TNF- α	Tumor Nekrosefaktor α
Tx30a	H.-pylori-Stamm (codiert s2/m2 VacA, ohne zytotoxische Aktivität (Atherton et al. 1995))
U/min	Umdrehungen pro Minute
VacA	engl.: vacuolating cytotoxin A
Vac a	steht im Experimentsetting für den zellfreien Extrakt des H. pylori P12 nach einer Stunde Säureaktivierung
VacA ⁻	H.-pylori-Stamm, der kein vacuolating cytotoxin A sezerniert
VacA ⁺	H.-pylori-Stamm, der vacuolating cytotoxin A sezerniert
vgl.	vergleiche
vs.	lat.: versus für: gegen, gegenüber gestellt
WHO	eng.: World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

6.4 Danksagung

Herrn Professor Dr. M. J. Sessler danke ich für die Iniziiierung der VacA Forschung in der Klinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie am Universitätsklinikum Tübingen und Überlassung des interessanten Themas.

Herrn Professor Dr. rer. nat. Rainer Haas und Frau Dr. rer. nat. Bettina Gebert-Vogel am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die freundliche Überlassung der verschiedenen VacA Proben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Martin Schenk für die Bereitstellung des Laborplatzes. Er war trotz seiner zahlreichen Verpflichtungen als Ansprechpartner stets präsent und hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen. Er ermöglichte einen reibungslosen Ablauf meiner Dissertation nicht zuletzt durch die fundierte Beratung bei der statistischen Aufarbeitung der Ergebnisse.

Herrn Diplom Biologen Roland Klaffschenkel danke ich für seine hervorragende Didaktik. Seine kompetente Betreuung dieser Arbeit ermöglichte es mir, umfangreiche Labormethoden sicher zu erlernen. Sein Fachwissen aus der Etablierung der VacA Forschung am hiesigen Hause ergänzt mit langjähriger Erfahrung in der FACS-Analyse waren eine große Hilfe. Gemeinsame Diskussionen und zahlreiche Anregungen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Andrea Hunder und Herrn Olaf Kupka danke ich für ihre Unterstützung in meinem Kampf mit dem Computer (dem unbekanntem Wesen).

Frau Maria Seitzer möchte ich für die kompetente und unkomplizierte Atmosphäre im Labor danken. Neben vielen praktischen Tipps war ihre motivierende Unterstützung eine große Hilfe.

Herrn Juan Canal und Herrn Robert Gomringer danke ich für ausführlichste Korrekturen. Ausgehend von ihren Vorschlägen verschwanden verschraubte Formulierungen und gewann der Text an Geschmeidigkeit.

