Analyse der Aktivierung von murinen und humanen Zellen des angeborenen Immunsystems durch *Helicobacter pylori*



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
–Biologie und Vorklinische Medizin–
der Universität Regensburg

Vorgelegt von
Alexander Eckhardt
aus Regensburg

Regensburg, 2005

Promotionsgesuch eingereicht am: 30.11.2005
Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Norbert Lehn
Prüfungsausschuss: Vorsitz: Prof. Dr. Günter Hauska
1. Prüfer: Prof. Dr. Widmar Tanner
2. Prüfer: Prof. Dr. Norbert Lehn
3. Prüfer: Prof. Dr. Michael Thomm

Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Prof. Dr. Norbert Lehn (als Betreuer dieser Arbeit)

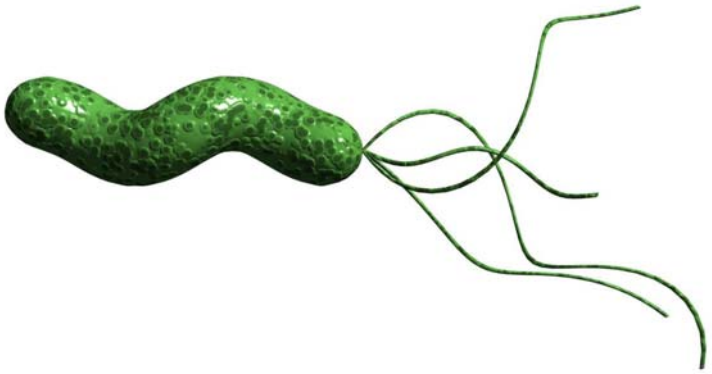
2. Dr. Wulf Schneider (als Arbeitsgruppenleiter und Projektleiter SFB 585 TP B3)

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Alexander Eckhardt

Regensburg, 25.11.2005



Dreidimensionale Rekonstruktion von *Helicobacter pylori* aus:
http://s99.middlebury.edu/BI330A/STUDENTS/KASSIS/kassis/helicobacter_pylori.htm

1 ZUSAMMENFASSUNG 4

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 8

3 EINLEITUNG 10

3.1 *Helicobacter* 10

3.2 *Helicobacter pylori* 11

3.2.1 Epidemiologie 11
3.2.2 Pathogenese und *H. pylori*-assoziierte Krankheiten 12
3.2.3 Diagnose 14
3.2.4 Therapie 15
3.2.5 Infektionsmodelle 15
3.2.6 Virulenzfaktoren 16
3.2.7 *Immune Evasion* 19

3.3 Angeborene Immunantwort 19

3.4 Makrophagen 21

3.5 Dendritische Zellen 21

3.6 *Toll-like*-Rezeptoren 23

3.7 MAP-Kinasen 26

3.8 Zytokine 28

3.9 Oberflächenproteine 29

3.10 Vorarbeiten 30

3.11 Zielsetzung 31

4 MATERIAL UND METHODEN 33

4.1 Verwendete Organismen 33

4.1.1 *H. pylori*-Stamm 33
4.1.2 Mäusestämme 33

4.2 Kultivierung von *Helicobacter pylori* 33

4.3 Immunologische Methoden 34

4.3.1 Stimulationsexperimente 34
4.3.2 Nachweis von Zytokinen durch ELISA 37
4.3.3 FACS-Analysen 37

4.4 Geräte 39

4.5 Puffer und Reagenzien 39

5 ERGEBNISSE 41

5.1 Kinetik der Zytokinsekretion von Maus-Splenozyten nach Stimulation mit *H. pylori* 41

5.2 Kinetik der Zytokinsekretion von RAW264.7-Makrophagen 44

5.3 Untersuchungen an primären murinen Makrophagen 46

5.4 Einfluss von TLR4 auf die *H. pylori*-Stimulation von murinen Makrophagen und dendritischen Zellen 49

5.4.1 Untersuchung von primären Makrophagen nach Stimulation mit *H. pylori* 49
5.4.2 Untersuchungen von murinen DCs nach Stimulation mit *H. pylori* 52

5.5 Versuche mit humanen dendritischen Zellen 57

5.5.1 Reifung humaner DCs durch Stimulation mit *H. pylori* 57
5.5.2 Untersuchungen zum Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf humane DCs nach Stimulation mit *H. pylori* 61

6 DISKUSSION 88

6.1 Kinetik der Zytokinsekretion von Maus-Splenozyten nach Stimulation mit *H. pylori* 88

6.2 Kinetik der Zytokinsekretion von RAW264.7-Makrophagen 90

6.3 Untersuchungen an primären murinen Makrophagen 93

6.4 Einfluss von TLR4 auf die *H. pylori*-Stimulation von murinen Makrophagen und dendritischen Zellen 94

6.5 Versuche mit humanen dendritischen Zellen 98

6.5.1 Reifung humaner DCs durch Stimulation mit *H. pylori* 98
6.5.2 Untersuchungen zum Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf humane DCs nach Stimulation mit *H. pylori* 99

7 ANHANG I

7.1 Eigene Veröffentlichungen und Kongressbeiträge I

7.1.1 Veröffentlichungen I
7.1.2 Kongressbeiträge I

7.2 Verzeichnisse III

7.2.1 Abbildungsverzeichnis III
7.2.2 Tabellenverzeichnis V
7.2.3 Literaturverzeichnis VI

8 DANKSAGUNG XXXIII

1 Zusammenfassung

Das humanpathogene, gramnegative Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) besiedelt den menschlichen Magen und persistiert ohne Antibiotikatherapie lebenslang. Es kommt zu einer chronischen Gastritis mit oder ohne klinische Symptomatik. Es können sich jedoch auch Ulzera oder maligne Erkrankungen, wie Magenkarzinom oder MALT-Lymphom, bilden. Unter welchen Umständen die einzelnen Krankheitsbilder entstehen, ist noch nicht völlig geklärt. Es spielen aber sowohl Wirts- als auch Virulenzfaktoren eine Rolle.

Ziel der Arbeit war die Analyse der immunmodulatorischen Einflüsse von *H. pylori* auf die Zellen des angeborenen Immunsystems.
Die immunstimulatorischen Eigenschaften von *H. pylori* wurden zunächst im Modellsystem der Maus-Splenozyten anhand eines detaillierten Sekretionsprofils analysiert. Die Milz dieser Säuger eignet sich besonders gut für solche Untersuchungen, zum einen weil alle wesentlichen Immunzellen vorhanden sind, und zum anderen wegen der umfassenden immunologischen Charakterisierung von Mäusen. Außerdem sind für die beabsichtigten Untersuchungen alle erforderlichen Reagenzien erhältlich.
In den Experimenten wurde die Sekretion der pro-inflammtorischen Zytokine TNF-α, IL-6, der Th1-polarisierenden Zytokine IFN-γ und IL-12 sowie des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 als Reaktion auf die Stimulation mit *H. pylori* über einen Zeitraum von 36 Stunden untersucht. Die immunstimulatorischen Eigenschaften von *H. pylori* zeigten sich darin, dass es zur Sekretion aller untersuchten Zytokine kam. Es konnte festgestellt werden, dass die Konzentration von TNF-α bereits nach 6 Stunden ihren Höhepunkt erreichte und danach zurückging. Die Sekretion der Zytokine IL-6, IFN-γ und IL-10 setzte später ein, die Konzentration stieg dann bis zum Ende des Versuchs. Die Konzentration von IL-12 war vergleichsweise niedrig, sie lag nicht immer eindeutig über der Nachweisgrenze.

Die Untersuchung im Splenozytenmodell ermöglicht die Analyse der Reaktion verschiedener Zellpopulationen auf die Stimulation mit *H. pylori*. Im nächsten Abschnitt dieser Arbeit wurde der Beitrag einzelner Zellpopulationen zur *H. pylori*-induzierten Immunantwort analysiert. Hierzu wurden Makrophagen und dendritische Zellen (DCs) als wichtige Effektorzellpopulationen der angeborenen Immunantwort ausgewählt. In den Versuchen mit der Makrophagenzelllinie RAW264.7 wurden im Vergleich zu Experimenten mit Splenozyten unterschiedliche Sekretionsprofile der Zytokine gemessen. So war z. B. die Sekretion von TNF-α schon nach einer Stunde nachweisbar, die Konzentration stieg im Gegensatz zu den Versuchen mit

Splenozyten über den gesamten Versuchszeitraum an. Da die Verwendung einer immortalisierten Zelllinie immer das Risiko einer gewissen Degeneration dieser Zellen birgt, wurden nach der Etablierung des Systems die weiteren Versuche mit primären Makrophagen, die aus Knochenmark von Mäusen gewonnen worden waren, fortgesetzt.

Die Modulation der Immunantwort erfolgt nicht nur über Zytokine, sondern auch durch direkte Zell-Zell-Kontakte, die von kostimulatorischen Molekülen wie CD40 und CD54 vermittelt werden. Zytokine zeigen eine Aktivierung der Antigen-präsentierenden Zellen, die kostimulatorischen Moleküle geben zusätzlich Aufschluss über die Reifung.
In den Experimenten mit primären Makrophagen konnte gezeigt werden, dass die Stimulation durch *H. pylori* die Sekretion der untersuchten Zytokine (TNF-α, IL-6 und IL-10) sowie die Expression von CD40 und CD54 steigert. Die Stärke dieser Veränderungen ist abhängig von der verwendeten MOI.

Die bisher gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass die Stimulation von Zellen der angeborenen Immunantwort mit *H. pylori* eine Alarmkaskade induziert. Wichtiger Bestandteil dieser Alarmkaskade sind die *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs), welche konservierte Antigene von Bakterien oder Viren erkennen. Deshalb wurde im folgenden Abschnitt der Arbeit die Bedeutung von TLR4 für die Immunstimulation durch *H. pylori* ermittelt. Dazu wurden die Veränderungen der Zytokinsekretion und der Expression von Oberflächenproteinen in Makrophagen und DCs aus Mäusen der Stämme C3H/HeJ (TLR4-Defektmutante) und C3H/HeN (isogener Wildtyp) nach Stimulation mit *H. pylori* verglichen.
Sowohl bei Makrophagen als auch bei DCs der Defektmutante war eine Reduktion der Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-6 im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Eine Verringerung der Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 konnte nicht gemessen werden.
Bei den untersuchten Oberflächenproteinen (CD11c, CD40, CD54, CD80 und CD86) war dagegen bei der Defektmutante stets eine Reduktion der Expression im Vergleich zum Wildtyp festzustellen. Dies zeigte, dass die Erkennung von bakteriellen Bestandteilen durch TLR4 eine erhebliche Rolle bei der Sekretion von Zytokinen und der Expression von Oberflächenantigen und somit bei der Immunreaktion auf *H. pylori* spielt.

Da *H. pylori* ein wichtiges humanpathogenes Bakterium ist, sollte untersucht werden, ob die im Mausmodell gemachten Beobachtungen auf humane Zellen übertragbar sind. Diese Versuche wurden mit humanen DCs durchgeführt. Hierbei wurde der

Einfluss von *H. pylori* auf die Entwicklung von unreifen zu reifen DCs untersucht. Die Stimulation mit *H. pylori* zeigte, dass eine MOI zwischen 1 und 10 am besten geeignet war, um einerseits den Reifungsprozess in DCs zu induzieren, anderseits jedoch diese Zellen nicht zu schädigen. In diesem MOI-Bereich kam es zu einer optimalen Sekretion von IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit *H. pylori* zu einer Erhöhung der Oberflächenexpression von CD80, CD83, CD86 und MHC-II führt. Die Sekretion der genannten Zytokine und die gesteigerte Expression der Oberflächenantigene waren messbare Anzeichen dafür, dass die Stimulation unreifer DCs mit *H. pylori* zu deren Reifung führte. Dies zeigte auch, dass die Stimulation mit *H. pylori* in humanen und murinen DCs zu einer vergleichbaren Immunaktivierung führt.

Für die Regulation der Reifung von DCs spielen die MAP-Kinasen p38, ERK und JNK eine wichtige Rolle und können deshalb für die Untersuchung der Stimulation von DCs mit *H. pylori* dienen. Zur Untersuchung des Beitrages einzelner MAP-Kinasen wurden diese mit den spezifischen Inhibitoren SB203580 (p38), U0126 (ERK) und JNK-Inhibitor-II (JNK) blockiert. Durch Titration wurden 20µM als optimale Konzentration für die Inhibitoren der jeweiligen MAP-Kinasen bestimmt.
Anschließend wurde die Kinetik der Sekretion von TNF-α, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 sowie die Veränderung der Expression der Oberflächenproteine CD1a, CD80, CD83, CD86, HLA-ABC und HLA-DR in Abhängigkeit von den eingesetzten Inhibitoren bei Stimulation mit *H. pylori* gemessen.
Es konnte gezeigt werden, dass die p38-MAP-Kinase den größten Einfluss auf die Sekretion der untersuchten Zytokine und somit die Reifung der DCs hatte. Eine Hemmung von p38 führte in den Versuchen zu allen Zeitpunkten zu einer signifikanten Reduktion der Zytokinfreisetzung. Auch die Inhibition von ERK und JNK führte in den meisten Fällen zu einer Reduktion, die jedoch weniger deutlich ausfiel. Die Sekretion von IL-12 wurde dagegen durch die Inhibition von ERK und JNK erhöht. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass IL-12 durch ERK und JNK negativ reguliert sein könnte. Wie aus der Literatur bekannt ist, wird die IL-12-Sekretion durch IL-10 negativ reguliert. In unseren Versuchen mit den Inhibitoren von ERK und JNK konnte dieser Sachverhalt bestätigt werden. Ebenso konnten wir zeigen, dass die IL-12-Sekretion keinen Einfluss auf die IL-10-Produktion hat.
Bei der Regulation der Oberflächenproteine kam es durch die Inhibitoren nur selten zu signifikanten Unterschieden im Vergleich zur Stimulation mit *H. pylori* ohne Inhibitor. Auch in diesem Teilversuch war der Einfluss von p38 am größten, die Inhibition von ERK führte dagegen zu keiner signifikanten Veränderung. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die untersuchten MAP-Kinasen nur

eine geringe Bedeutung bei der Regulation von Oberflächenproteinen haben und die Regulation stattdessen über andere Signalwege erfolgt.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass *H. pylori* zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt. Diese Aktivierung zeigte sich, abhängig vom stimulierten Zelltyp und der verwendeten MOI, in der Sekretion unterschiedlicher Zytokine wie TNF-α, IL-6, IL-8 und IFN-γ. Neben der Aktivierung kommt es auch zu einem Reifungsprozess, der durch eine gesteigerte Expression von Oberflächenproteinen (z. B. CD40, CD54, CD80, MHC-II) zum Ausdruck kommt.
Durch die Untersuchungen an Mäusen mit defektem TLR4 wurde gezeigt, dass die Funktionalität dieses Rezeptors einen wichtigen Beitrag zur Immunreaktion auf *H. pylori* leistet. In Folge des TLR4-Defekts kam es zu einer geringeren Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, sowie zur Verringerung der Expression von Oberflächenproteinen im Vergleich zu Wildtyp.
Einen noch größeren Einfluss auf die Aktivierung der Immunzellen durch *H. pylori* hatte die p38-MAP-Kinase. Ihre Inhibition führte zu einer signifikant geringeren Zytokinfreisetzung der DCs, einer geringeren T-Zell-Aktivierung durch kostimulatorische Moleküle und somit zu einer schwächeren Reaktion des Immunsystems auf *H. pylori*. Bei den ebenfalls untersuchten MAP-Kinasen ERK und JNK war dieser Einfluss zwar auch gegeben, aber nicht so deutlich wie bei p38. Die herausragende Bedeutung von p38 für die Immunantwort auf *H. pylori* konnte in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden.

2 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	*antigen presenting cells*
AW	Ausgangswert
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin
cag	*cytotoxicity-associated-genes*
cat	Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase
CD	*cluster of differentiation*
DCs	dendritische Zellen
dd	doppelt destilliert
DENT	Antibiotikamix aus Vancomycin, Trimethoprim, Cefsulodin und Amphotericin B
DM	Defektmutante
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
ELISA	*enzyme linked immunosorbent assay*
ERG	Eppendorf Reaktionsgefäß
ERK	*extracellular signal regulated kinase* 1/2
FACS	*fluorescence activated cell sorting*
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
GF	Gesamtfluoreszenz (nur in Abbildungen)
GM-CSF	*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*
Hcp	*Helicobacter cysteine-rich protein*
HLA	*human lymphocyte antigen*
H. pylori	*Helicobacter pylori*
Hp	*Helicobacter pylori* (nur in Abbildungen)
ICAM	*intracellular adhesion molecule*
IFN	Interferon
Inh	Inhibitor
Iono	Ionomycin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	Mukosa assoziiertes lymphatisches Gewebe
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
M-CSF	*macrophage-colony stimulating factor*
MHC	*major histocompatibility complex*

MOI	*multiplicity of infection*
NK	Natürliche Killerzellen
PAI	Pathogenitätsinsel
PAMP	*pathogen associated molecular pattern*
PBMC	*peripheral blood mononuclear cells*
PBS	*phosphate buffered saline*
PE	Phycoerythrin
PMA	4-α-Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	*pathogen recognition receptor*
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp., spp.	Spezies (Singular, Plural)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
üN	über Nacht
WC	Wilkins Chalgren
WT	Wildtyp

3 Einleitung

3.1 *Helicobacter*

Helicobacter pylori wurde 1982 durch Warren et al. (1983) erstmals kultiviert. Beschrieben wurde das Bakterium jedoch schon 1893 von Bizzozero (1893), eine Kultivierung war damals aber noch nicht möglich. Nachdem das Bakterium am Anfang als *Campylobacter pyloridis* der Gattung *Campylobacter* zugeordnet wurde, erfolgte 1987 die Schaffung des neuen Genus *Helicobacter* mit *H. pylori* als Typspezies (Anonym, 1994; Romaniuk et al., 1987). *Helicobacter* ist ein gramnegatives, spiraliges Stäbchen, das mikroaerophil lebt und durch Geißeln beweglich ist (Marshall, 2002).

Inzwischen wurden viele andere Spezies dierse Gattung beschrieben (Solnick, 2003). Die Gattung *Helicobacter* besteht gegenwärtig aus 28 Spezies (Tabelle 1), die mit Ausnahme von „*H. heilmannii*“ und „*H. winghamensis*“ alle kultiviert werden können (Solnick et al., 2001). Da „*H. heilmannii*“ bisher nur morphologisch beschrieben wurde, ist nicht auszuschließen, dass es sich bei unterschiedlichen Beschreibungen in Wirklichkeit um mehrere Spezies handelt (Solnick, 2003).

Die verschiedenen *Helicobacter*-Arten konnten aus einer Vielzahl von Wirten isoliert werden, wobei jeder Wirt mit einer eigenen *Helicobacter*-Spezies infiziert ist, aber eine *Helicobacter*-Art verschiedene Wirte besiedeln kann. Ein Beispiel hierfür ist *H. felis*, der in Mensch, Hund und Katze gefunden wurde. Seit der Isolation von *H. pametensis* aus Vögeln weiß man, dass sich die Infektion durch das Bakterium nicht nur auf Säugetiere beschränkt. Eine Infektion kann je nach *Helicobacter*-Spezies auch in der Leber erfolgen (Tabelle 1)

Obwohl *H. pylori* die größte klinische Relevanz hat, sind auch die anderen aus dem Menschen isolierten *Helicobacter*-Arten humanpathogen (Solnick, 2003). Am bedeutendsten sind hiervon die Spezies „*H. heilmannii*“, der eine Gastritis verursacht und *H. cinaedi*, der für enterische oder vaskuläre Infektionen verantwortlich gemacht wird (Solnick, 2003).

Für die Entdeckung und Erforschung von *H. pylori* wurde den Australiern Robin Warren und Barry Marshall im Jahr 2005 der Nobelpreis für Medizin verliehen (http://nobelprize.org/medicine/laureates/2005/index.html).

	Spezies	Wirt
Gastrisch	*H. acinonychis*	Gepard
	H. bizzozeronii	Mensch, Hund
	H. felis	Mensch, Katze, Hund
	„H. heilmannii“	Mensch, Hund Schwein
	H. mustelae	Frettchen
	H. nemestrinae	Makake
	Helicobacter pylori	**Mensch**
	H. salomonis	Hund
	H. suncus	Spitzmaus
Enterohepatisch	*H. bilis*	Maus, Hund
	H. canadensis	Mensch
	H. canis	Mensch, Hund
	H. cholecystus	Hamster
	H. cinaedi	Mensch, Hund, Katze, Hamster
	H. fennelliae	Mensch
	H. hepaticus	Maus
	H. mainz	Mensch
	H. mesocricetorum	Hamster
	H. muridarum	Nager
	H. pametensis	Vögel
	H. rodentium	Maus
	H. pullorum	Mensch, Geflügel
	H. sp. flexispira	Mensch, Nager, Hund
	H. sp. cotton top	Lisztäffchen
	H. trogontum	Ratte
	H. typhlonius	Maus
	H. westmeadii	Mensch
	„H. winghamensis“	Mensch

Tabelle 1: Übersicht der bekannten *Helicobacter*-Arten und ihrer Wirte zusammengestellt aus http://www.infek.lu.se/bakt/english/helicobacter/hag.html und Solnick (2003) und Solnick et al. (2001)

3.2 *Helicobacter pylori*

3.2.1 Epidemiologie

Helicobacter pylori (*H. pylori*) ist ein bedeutendes humanpathogenes Bakterium (Dixon, 1995; Marshall, 1995; Montecucco et al., 2001). Obwohl *H. pylori* weltweit verbreitet ist, schwankt die Durchseuchungsrate in den verschiedenen Regionen der Erde und in den einzelnen Bevölkerungsschichten sehr stark (Feldman, 2001; Marshall, 2002; Marshall, 1995). Etwa die Hälfte der Weltbevölkerung ist mit *H. pylori*

infiziert, wobei die Werte zwischen 20 und 50% in den Industrieländern und teilweise über 80% in den Entwicklungsländern liegen. Hauptursache für diesen Unterschied sind wohl die hygienischen Bedingungen (Marshall, 2002; Marshall, 1995; Parsonnet et al., 1991; Rowland et al., 1999; Suerbaum et al., 2002). Das Beispiel Japan zeigt, wie schnell eine Verbesserung der hygienischen Verhältnisse zu einer Reduktion der Infektionsrate führen kann: Während mehr als 50% der über 40-jährigen infiziert sind, wird *H. pylori* heute nur noch von 5% der Kinder erworben (Marshall, 2002).
Zu einer klinischen Manifestation kommt es jedoch nur bei 10-20% der Infizierten (Marshall, 1995; Nguyen et al., 1999). Die dabei entscheidenden Faktoren von Wirt, Bakterium und/oder Umwelt werden noch untersucht. Anzeichen für eine genetische Prädisposition ist die Tatsache, dass bei eineiigen Zwillingen die Konkordanzrate höher ist als bei zweieiigen (Malaty et al., 1994b). Zu den möglichen Wirtsfaktoren zählen Geschlecht, Blutgruppenantigene, humane Leukozytenantigentypen, Effektivität der Immunantwort und Magensäuresekretion (El Omar et al., 2000; Mähler et al., 2002).
H. pylori wird in der Regel im Kindesalter erworben (Marshall, 2002; Webb et al., 1993). Die Übertragung von *H. pylori* erfolgt in den Industrienationen wahrscheinlich über den direkten Kontakt von Mensch zu Mensch über Speichel, Vomitus oder Faeces, in den Entwicklungsländern kann auch infiziertes Wasser eine Rolle spielen (Goodman et al., 1996; Hulten et al., 1996; Parsonnet et al., 1999). Insgesamt ist das Vorkommen von *H. pylori* stark mit dem sozioökonomischen Status verknüpft (Malaty et al., 1994a; Webb et al., 1993).

3.2.2 Pathogenese und *H. pylori*-assoziierte Krankheiten

Im menschlichen Magen muss *H. pylori* ein extrem saures Milieu überstehen. *Helicobacter* ist das einzige bekannte Bakterium, das den ansonsten sterilen Magen dauerhaft besiedeln kann (Schreiber et al., 2005). Das Enzym Urease spielt dabei eine wichtige Rolle. Es spaltet Harnstoff in Ammoniak und CO_2, was zur Neutralisierung der sauren Umgebung führt (Mobley, 2001). Eine weitere wichtige Rolle bei der Besiedelung des Magens spielt die Beweglichkeit von *H. pylori*, die es dem Bakterium ermöglicht, den Mukus zu durchdringen und mit Hilfe von Adhäsinen (BabA, Sab) an Epithelzellen zu binden (Josenhans et al., 2002; Ottemann et al., 2002; Suerbaum et al., 2002). Es ist jedoch bisher noch nicht bekannt, welche Voraussetzungen für eine erfolgreiche Kolonisation des Magens gegeben sein müssen (Schreiber et al., 2005). Eine Infektion mit *H. pylori* kann auch vorübergehend sein, die lebenslängliche Persistenz ist nicht unausweichlich (Perez-Perez et al., 2003).
Abbildung 1 zeigt Krankheitsbilder, die durch *H. pylori* verursacht werden können, die Dicke der Pfeile korreliert mit den unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten der

einzelnen Krankheiten. Eine erfolgreiche Infektion des Magens durch *H. pylori* führt immer zu einer histologischen Gastritis, die in den meisten Fällen jedoch asymptomatisch bleibt, was bedeutet, dass die Patienten beschwerdefrei sind (Blanchard et al., 2004; Suerbaum et al., 2002). Die Gastritis kann entweder auf Antrum oder Corpus beschränkt sein, oder auch beide Bereiche umfassen (Suerbaum et al., 2002). Bei der Entstehung eines Krankheitsbildes spielen auch regionale Unterschiede in der *H. pylori*-Virulenz eine Rolle, so liegt das Risiko eines Magengeschwürs bei *H. pylori*-infizierten Japanern bei 25%, bei US-Amerikanern dagegen nur bei 3% (Feldman, 2001; Suerbaum et al., 2002). Obwohl die Infektion mit *H. pylori* bei fast allen Patienten zu einer Gastritis mit Infiltration des Magenepithels durch Neutrophile, Granulozyten, Makrophagen, T- und B-Lymphozyten sowie zur Sekretion der Zytokine IL-1ß, IL-2, IL-6, IL-8 und TNF-α führt, kommt es nicht zu einer Eradikation von *H. pylori* durch das Immunsystem (Crabtree et al., 1994; Dooley et al., 1989; Goodwin et al., 1986; Suerbaum et al., 2002; Yamaoka et al., 1997).

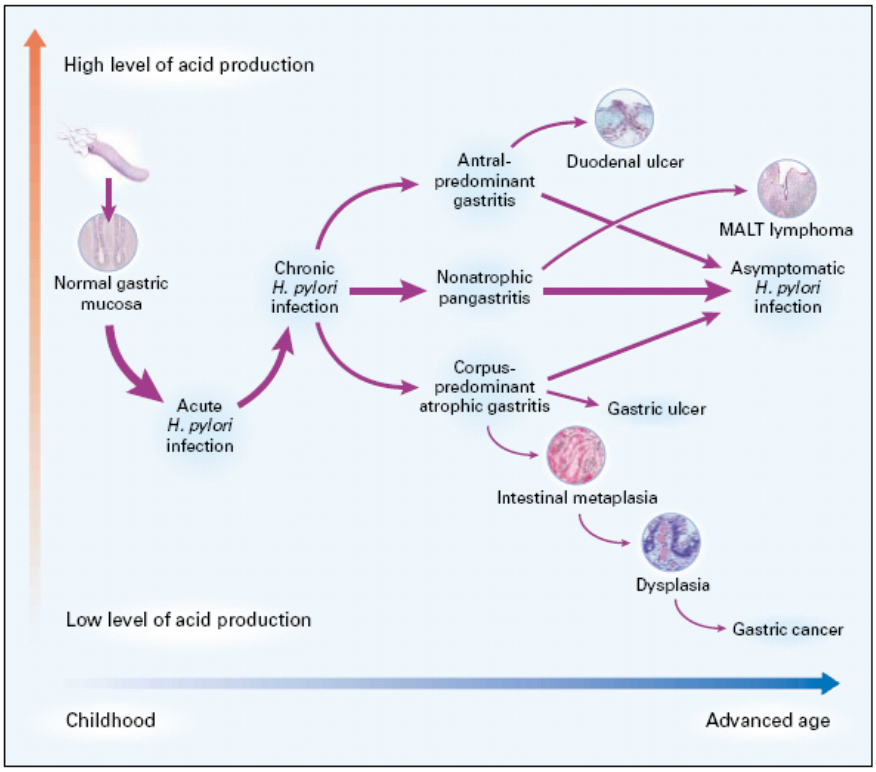


Abbildung 1: Übersicht der von *H. pylori* verursachten Krankheitsbilder aus Suerbaum et al. (2002)

Je nach Lage der Gastritis variiert auch die Manifestation eines Geschwürs. Die Ursache für ein Duodenalulkus liegt meist in einer Antrum-dominierten Gastritis, während eine Corpus-dominierte Gastritis häufig zu einem Magengeschwür führt (Suerbaum et al., 2002). Nach Eradikation von *H. pylori* heilen

Zwölffingerdarmgeschwüre und die meisten Magengeschwüre vollständig aus (Marshall, 2002).
Gemäß einer Studie von Uemura et al. (2001) erkranken knapp 3% der *H. pylori*-infizierten Patienten an Magenkrebs, wobei eine Eradikation von *H. pylori* in Verbindung mit einer Resektion des betroffenen Gewebes Rückfälle verhindert (Uemura et al., 1997). Bei mehr als 75% aller Patienten, die an einem MALT-Lymphom erkrankt sind, liegt auch eine *H. pylori*-Infektion vor. Sie ist damit ein Hauptrisikofaktor für diese Erkrankung (Parsonnet et al., 1994; Wotherspoon, 1998). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde *H. pylori* von der Weltgesundheitsorganisation WHO als Klasse-I-Karzinogen eingestuft (Higashi et al., 2002).

3.2.3 Diagnose

Eine Infektion mit *H. pylori* kann sowohl über invasive, als auch über nicht invasive Methoden nachgewiesen werden. Mit Hilfe endoskopisch gewonnener Biopsien kann eine *H. pylori*-Infektion histologisch direkt in der Magenschleimhaut nachgewiesen werden (Suerbaum et al., 2002).
Beim Urea-Atemtest macht man sich die Harnstoffspaltung durch *H. pylori*-Urease zunutze. Der Patient nimmt dabei eine Lösung mit ^{14}C- oder ^{13}C-markiertem Harnstoff zu sich. Nach 10-20 Minuten kann dann das entsprechende Kohlenstoffisotop im CO_2 der Atemluft nachgewiesen werden (Hirota et al., 2001). Der Test ist jedoch bei Kindern, die jünger als sechs Jahre sind, nicht verlässlich, deshalb wird bei diesen häufig ein Stuhlantigentest durchgeführt (Suerbaum et al., 2002). Dieser Test ist auch zur Überprüfung des Therapieerfolges geeignet, wenn er frühestens acht Wochen nach dem Ende der Therapie gemacht wird (Suerbaum et al., 2002).
Auch der serologische Nachweis von anti-*H. pylori*-Antikörpern ist eine sensitive und spezifische Nachweismethode, allerdings nicht bei Kindern unter sechs Jahren (Suerbaum et al., 2002).
Um *H. pylori* kultivieren zu können, muss in der Regel eine Biopsie entnommen werden (Marshall, 2002). Bei anschließender Kultivierung unter Verwendung verschiedener Selektivmedien wie WC-Dent-Platten oder Skirrow's Agar, kann *H. pylori* spezifisch angereichert werden (Samuels et al., 2000).
Der Nachweis von *H. pylori* durch PCR aus Biopsien ist eine molekulare und kulturunabhängige Methode. Als besonders nützlich hat sich das Ureasegen erwiesen. Unter Verwendung der LightCycler™ PCR lässt sich *H. pylori* schnell und sicher nachweisen (Reischl et al., 2001).

3.2.4 Therapie

Solange ein Patient beschwerdefrei bleibt, wird *H. pylori* in der Regel nicht eradiziert. Klinische Indikationen für eine Behandlung sind aktive peptische Ulzera, Karzinome und gastrische MALT-Lymphome (Suerbaum et al., 2002). Das Ziel einer Behandlung ist die vollständige Elimination von *H. pylori*. Aufgrund des besonderen, stark sauren Magenmilieus werden Antibiotika mit Protonenpumpeninhibitoren (PPI) kombiniert. Diese so genannten Dreifachtherapien bestehen z.B. aus Omeprazol (PPI) in Verbindung mit Amoxicillin und Clarithromycin oder Omeprazol mit Metronidazol und Clarithromycin. In beiden Fällen ist eine mindestens einwöchige Anwendung notwendig (Marshall, 2002; Suerbaum et al., 2002).
Weit verbreitet ist auch eine auf Bismut basierende Therapie, die durch Metronidazol und Tetrazyklin ergänzt wird. Auch hier dauert die Behandlung mindestens eine Woche (Marshall, 2002; Suerbaum et al., 2002).
Schlagen diese Therapien fehl, was meist durch die schlechte *Compliance* des Patienten oder durch eine Anitbiotikaresistenz des Bakteriums verursacht wird, wird z. B. eine Vierfachtherapie angewandt. Liegen keine Daten über Antibiotikaresistenzen vor, besteht diese optimalerweise aus einem Protonenpumpeninhibitor in Kombination mit Bismut, Tetrazyklin und hohen Dosen von Metronidazol für einen Zeitraum von 10-14 Tagen (Suerbaum et al., 2002).

3.2.5 Infektionsmodelle

Ein besonders häufig verwendetes Tiermodell für die *H. pylori*-Infektion ist die Hausmaus, *Mus musculus*. Gründe hierfür sind die gute Verfügbarkeit, einfache Handhabung und eine genaue immunologische und genetische Charakterisierung dieser Tiere. Beispielsweise veröffentlichte Okazaki im Jahre 2002 das Transkriptom der Maus. Auch die Tatsache, dass es bei Mäusen verschiedenste *knock-out*-Stämme gibt, ist ein Vorteil gegenüber anderen Tiermodellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die TLR4-Defektmutante C3H/HeJ verwendet, deren TLR4 aufgrund einer Aminosäuresubstitution nicht funktionsfähig ist (Bäckhed et al., 2003; Underhill et al., 2002).
Ein weiteres Tiermodell ist die mongolische Rennmaus (*Meriones unguiculatus*, Gerbil), deren Gastritis-, Ulkus- und Karzinomentwicklung der des Menschen näher kommt, als die der Maus (Kavermann et al., 2003; Wirth et al., 1998).
Meerschweinchen (*Cavia porcellus*), Ferkel (*Sus scrofa*) oder Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) spielen als Tiermodelle dagegen eine untergeordnete Rolle (Akopyants et al., 1995; Schreiber et al., 2000; Solnick et al., 2003).

3.2.6 Virulenzfaktoren

3.2.6.1 *Cytotoxicity-associated-genes* Pathogenitätsinsel (*cag* PAI)

Die *cag* Pathogenitätsinsel (PAI), die für 27 Gene kodiert, ist ca. 40kb groß und kennzeichnet Typ-I-Stämme von *H. pylori* (Fischer et al., 2001). Cag-negative Stämme werden als Typ-II-Stämme bezeichnet (Xiang et al., 1995). Typ-I-Stämme sind virulenter als Typ-II-Stämme, wobei aufgrund von Varianten in der *cag*A-Sequenz auch Typ-I-Stämme eine unterschiedliche Virulenz zeigen (Guillemin et al., 2002). Aus anderen Bakterien oder *Helicobacter*-Spezies sind keine Homologen zu *cagA* bekannt, das Gen kommt nur in *H. pylori* vor (Blaser et al., 2004). Etwa 50% der westeuropäischen *H. pylori*-Stämme besitzen das *cagA*-Gen (Sharma et al., 1995).

Die *cag* PAI kodiert für den Typ-IV-Sekretionsapparat, der als eine Art „molekulare Spritze“ das Protein CagA in die Zielzellen transportiert (Fischer et al., 2001). Dort lagert es sich auf der Innenseite der Plasmamembran an und wird phosphoryliert (Fischer et al., 2001; Higashi et al., 2002). Dies führt unter anderem zur Dephosphorylierung von bisher unbekannten Wirtsproteinen (Covacci et al., 1998; Fischer et al., 2001; Odenbreit et al., 2001). Auch die Aktivierung von NF-κB und pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF-α wird durch die *cag* PAI vermittelt (Guillemin et al., 2002).

Im Gegensatz zum Protein YopH, das *Yersinia* mittels eines Typ-IV-Sekretionsapparates sezerniert, führt CagA nicht zu einer Herabsetzung der Phagozytosefähigkeit von Immunzellen, die gesamte PAI führt aber zu einer verzögerten Phagozytose durch Makrophagen (Allen et al., 2000; Odenbreit et al., 2001; Ramarao et al., 2001).

Der Typ-IV-Sekretionsapparat vermittelt auch eine morphologische Veränderung der Epithelzellen (Guillemin et al., 2002). Dieses so genannte „*Hummingbird*-Phänomen“ zeichnet sich durch eine Veränderung des Aktinzytoskeletts der Epithelzellen aus, die zur Elongation der Zellen führt (Segal et al., 1999; Segal et al., 1997).

Das Vorhandensein der *cag* PAI erhöht das Risiko an einem peptischen Ulkus oder an Magenkrebs zu erkranken (Guillemin et al., 2002; Higashi et al., 2002). Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Tatsache sein, dass *cag*$^+$-Stämme die direkte Nachbarschaft der Epithelzellen oder die interzellulären Zwischenräume kolonisieren, während *cag*$^-$-Stämme bevorzugt in der Mukusschicht oder auf der apikalen Oberfläche des Epithels vorkommen (Camorlinga-Ponce et al., 2004).

Ostasiatische *H. pylori*-Stämme besitzen *cag* PAI-codierte Proteine mit besonders hoher Virulenz, was zur Folge hat, dass das Risiko an einem Magenkarzinom zu erkranken in Japan oder Korea zu den weltweit höchsten gehört (Higashi et al., 2002).

CagA ist nach neuesten Erkenntnissen auch für eine Anhäufung von β-Catenin im Zellkern verantwortlich, die von einer *H. pylori*-Infektion betroffenen Gerbils zeigten eine sehr hohe Rate von Magenkrebs (Franco et al., 2005). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass β–Catenin eine wichtige Rolle im Frühstadium von Magenkrebs spielt.

3.2.6.2 VacA

Die Sekretion des vakuolisierenden Toxins A (*vacuolating toxin A*, VacA) durch *H. pylori* hat für den Wirtsorganismus verschiedene Folgen. Sie führt zur Vakuolisierung von Epithelzellen, zur Schädigung von Mitochondrien, zur Freisetzung von Zytochrom *c* und zur Apoptose von Epithelzellen (Baldari et al., 2005; Nakayama et al., 2004). Stämme, die VacA nicht sezernieren, so genannte Typ-II-Stämme, sind weniger virulent als Stämme, die diesen Pathogenitätsfaktor besitzen (Typ-I-Stämme) (Baldari et al., 2005). Das 95kDa-Protein VacA induziert die Bildung von membrangebunden Vakuolen in eukaryontischen Zellen (Montecucco et al., 2003). Aufgrund dieser Eigenschaft wurde es bei *in vitro*-Stimulationen von Zellen mit Überstand einer *H. pylori*-Kultur identifiziert (Leunk et al., 1988).
VacA bildet in der Zellmembran hexamere, anionenspezifische Kanäle, welche die Durchlässigkeit der Membran für Chlorid, Bicarbonat und Pyruvat erhöhen, was eine Depolarisierung der Membran zur Folge hat (Czajkowsky et al., 1999).
Verschiedene *H. pylori*-Stämme produzieren unterschiedlich stark aktive VacA-Varianten, die auf die Heterogenität des Gens zurückzuführen sind (Atherton et al., 1997). Diese Heterogenität zeigt sich in 2 verschiedenen Signalsequenzen (s1 und s2) sowie 2 Mittelregionen (m1 und m2) (Blaser et al., 2004). In der Natur kommen alle möglichen Kombinationen vor (Blaser et al., 2004). *H. pylori*-Stämme, welche die Kombination s1/m1 besitzen produzieren größere Mengen an VacA als s1/m2-Stämme. Da die Varianten s2/m1 und s2/m2 nicht sezerniert werden, zeigen Stämme mit diesen Genotypen keine messbare Aktivität (Atherton et al., 1997).

3.2.6.3 Urease

Obwohl *H. pylori* im sauren Magenmilieu überleben kann, gehört er nicht zu den acidophilen Bakterien, d.h. er ist nicht auf ein saures Milieu angewiesen, sondern benötigt ein pH-neutrales Umfeld (Montecucco et al., 2001). Eine der wichtigsten Anpassungen an dieses Biotop ist das Enzym Urease, mit dem *H. pylori* seine unmittelbare Umgebung abpuffert, indem er den vorhandenen Harnstoff zu NH_3 und CO_2 abbaut (Baldari et al., 2005; Mobley, 2001; Montecucco et al., 2001). Durch diese Spaltung verfügt *H. pylori* zudem über Ammoniak, der eine wichtige Stickstoffquelle für Bakterien darstellt (Baldari et al., 2005). Wie wichtig dieses

Enzym für *H. pylori* ist, zeigen die Tatsachen, dass Urease bis 10% des Gesamtproteingehalts von *H. pylori* ausmachen kann und dass Urease-negative *H. pylori*-Stämme den Magen nicht kolonisieren können (Eaton et al., 1991; Montecucco et al., 2001).
Harris et al. (1998) konnten zudem zeigen, dass *H. pylori*-Urease die Bildung von IL-1β, TNF-α und IL-6 in Makrophagen aus der Magenmukosa auslöst. Urease bindet außerdem direkt an MHC-II-Moleküle (Fan et al., 2000).

3.2.6.4 HcpA

Das *Helicobacter-cysteine-rich protein* A (HcpA) ist Teil einer Proteinfamilie, die nur in den Gattungen *Helicobacter*, *Campylobacter* und *Wolinella* vorkommt. Während *Campylobacter* und *Wolinella* jeweils nur ein Protein dieses Typs besitzen, verfügt *H. pylori* über 6-8 paraloge Proteine (Salama et al., 2000), die nach Luthy et al. (2002) als HcpA bis H und HcpX bezeichnet werden. Warum *Helicobacter* als einziger Organismus bis zu 8 Hcps besitzt, ist bisher nicht bekannt. In den Arbeiten unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass HcpA im Mausmodell sowie in humanen PBMCs ähnliche Zytokinsekretionsprofile induziert wie lebender *H. pylori* (Aigner, 2001; Aigner, 2004; Decker, 2000). Die geringe β-Laktamaseaktivität, die Mittl et al., (2000) *in vitro* nachweisen konnten, spielt wohl *in vivo* nur eine untergeordnete Rolle.

3.2.6.5 Adhäsine

Man geht davon aus, dass die Bindung von *H. pylori* an Epithelzellen des Wirtes von entscheidender Bedeutung für die Kolonisierung ist (Odenbreit et al., 2002). Die Adhäsion von *Helicobacter* konnte sowohl in Magenbiopsien von Mensch und Tier als auch in Zelllinien beobachtet werden (Odenbreit et al., 2002). Beispiele für Adhäsine sind AlpA und B, BabA, SabA und HopZ (Ilver et al., 1998; Odenbreit et al., 1999; Odenbreit et al., 2002; Peck et al., 1999). Odenbreit et al. (2002) konnten nachweisen, dass eine Mutation von *alpA* oder/und *alpB* zu einer deutlichen Herabsetzung der Adhärenz führt. Am besten untersucht ist die Interaktion zwischen BabA, das zu den *Outer-membrane proteins* (OMP) gehört, und den Lewis b (Leb) Antigenen (Ilver et al., 1998; Mahdavi et al., 2002).
Auch in der *H. pylori*-induzierte Pathogenese spielen die Adhäsine eine Rolle. So wurde gezeigt, dass *H. pylori*-Stämme, die den *babA2*$^{+}$- oder *sabA*$^{+}$-Genotyp tragen, zu einer Erhöhung des Magenkrebsrisikos beitragen (Gerhard et al., 1999; Mahdavi et al., 2002).

3.2.7 *Immune Evasion*

H. pylori gehört zu den wenigen humanpathogenen Bakterien, die in der Lage sind, eine chronische, meist lebenslange Infektion hervorzurufen (Baldari et al., 2005; Montecucco et al., 2001). Grundvoraussetzung hierfür ist die Fähigkeit, sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort zu entkommen, was als *immune evasion* bezeichnet wird (Baldari et al., 2005). Um die reaktiven Sauerstoffintermediate und das Stickoxid (NO), die von Neutrophilen und Monozyten gebildet werden, zu neutralisieren, sezerniert *H. pylori* Enzyme wie Katalasen und Superoxiddismutasen, die diese aggressiven Moleküle abfangen (Baldari et al., 2005). Außerdem produziert *H. pylori* das Enzym Arginase, welches mit der induzierbaren Stickoxidsynthetase (iNOS) um das Substrat konkurriert. Diese Konkurrenz um das Arginin führt dazu, dass iNOS weniger NO produzieren kann und *H. pylori* aus dem Arginin mehr Harnstoff als Substrat für die Urease zur Verfügung hat (Baldari et al., 2005).

In vitro Experimente zeigten, dass Cag^+- und Vac^+-Stämme (Typ-I-Stämme) langsamer phagozytiert werden als Typ-II-Stämme (Allen et al., 2000; Baldari et al., 2005).

Eine weitere Anpassung stellt das von *H. pylori* produzierte LPS dar. Dieses ist um den Faktor 100-10000 immunstimulatorisch schwächer als das LPS anderer gramnegativer Bakterien (Bliss et al., 1998; Mandell et al., 2004; Muotiala et al., 1992; Perez-Perez et al., 1995). Auch das Flagellin von *H. pylori* wird vom humanen TLR5 deutlich schlechter erkannt als das anderer Bakterien (Gewirtz et al., 2004; Lee et al., 2003).

Die Unterdrückung der T-Zellaktivierung und -Proliferation durch den Virulenzfaktor VacA oder ein VacA-unabhängiges sezerniertes Protein beeinträchtigt das adaptive Immunsystem (Baldari et al., 2005; Gerhard et al., 2005). Auch die Antigenprozessierung in B-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen wird durch VacA behindert (Baldari et al., 2005; Molinari et al., 1998; Montecucco et al., 2001).

Ferner besitzt *H. pylori* im Gegensatz zu anderen Bakterien eine stark methylierte DNA, was zu einer erschwerten Erkennung durch TLR9 führt (Blaser et al., 2004).

H. pylori verfügt also über vielfältige Möglichkeiten, das Immunsystem seines Wirtes zu umgehen und somit eine lebenslange Besiedelung zu vollziehen, ohne dabei den Wirt zu schnell zu schädigen.

3.3 Angeborene Immunantwort

Die Entwicklung des Immunsystems wurde durch den Selektionsdruck, der von pathogenen Mikroorganismen ausgeübt wird, entscheidend beeinflusst (Medzhitov et al., 1997a). Bei Wirbeltieren wird die Immunantwort in angeborene Immunität (*innate*

immunity) und erworbene (adaptive) Immunität unterteilt (Akira et al., 2004; Delves et al., 2000; Takeda et al., 2003). Das angeborene Immunsystem ist die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen eine Vielzahl von Krankheitserregern, die das Immunsystem z. B. mit Hilfe der *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs) von körpereigenen Bestandteilen unterscheiden kann (Akira et al., 2004; Janeway et al., 2002; Kopp et al., 1997; Takeda et al., 2003). Die Bedeutung der Toll-Rezeptoren wurde als erstes in *Drosophila* beschrieben (Lemaitre et al., 1997; Takeda et al., 2003). Ursprünglich wurde Toll als wichtiger Rezeptor in der Embryonalentwicklung von *Drosophila* identifiziert, seine Bedeutung in der Immunantwort wurde erst später entdeckt (Hashimoto et al., 1988; Takeda et al., 2003). Da Säuger über verwandte Rezeptoren verfügen, spricht man dort von *Toll-like*-Rezeptoren (Takeda et al., 2003). Eine weitere Aufgabe der angeborenen Immunantwort ist es, die erworbene Immunantwort zu induzieren (Akira et al., 2004). Nur Wirbeltiere besitzen zusätzlich zur *innate immunity* diese *adaptive immunity* (Takeda et al., 2003).

Nicht nur Wirbeltiere, sondern auch Insekten, Würmer und Pflanzen verfügen über eine angeborene Immunantwort, (Beutler et al., 2004; Medzhitov et al., 1997a). Die Tatsache, dass Tiere und Pflanzen über dieselben Rezeptortypen verfügen, deutet darauf hin, dass die angeborene Immunität bereits vor der Spaltung der beiden Reiche vor ca. 1 Milliarde Jahren entstanden sein könnte (Hoffmann et al., 1999). Das angeborene Immunsystem ermöglicht eine sehr schnelle Antwort auf eine Infektion schon in den ersten Stunden (Hoffmann et al., 1999). Bei Vertebraten umfasst es Neutrophile, Eosinophile, Basophile, Mastzellen, Makrophagen, dendritische Zellen (DCs) und *Natural Killer* (NK) Zellen (Akira et al., 2004; Beutler et al., 2004; Janeway C.A. et al., 2002). Durch die Infektion mit einem pathogenen Mikroorganismus kommt es zu einer Entzündungsreaktion, die zu einer Aktivierung der Zellen des angeborenen Immunsystems führt (Janeway et al., 2002).

Wie komplex die angeborene Immunantwort ist, zeigt beispielsweise die Tatsache, dass seit der Entdeckung von induzierbaren antimikrobiellen Peptiden durch Boman et al. im Jahre 1981 400 Peptide gefunden wurden, die Bestandteil der angeborenen Immunantwort sind (Hoffmann et al., 1999; Steiner et al., 1981).

Durch die Anlagerung an die Magenepithelzellen löst *H. pylori* zuerst die angeborene und später die adaptive Immunantwort aus (George et al., 2003). Die Erkennung des Bakteriums erfolgt dabei unter anderem über TLRs und führt zur Sekretion von Th1-induzierenden Zytokinen wie TNF-α, IL-6 und IL-8 (Janeway et al., 2002; Kranzer et al., 2004; Medzhitov, 2001; Prinz et al., 2003)

3.4 Makrophagen

Makrophagen gehören wie DCs zu den mononukleären Leukozyten und sind im ganzen Körper verteilt (Abbas et al., 2003; Gordon, 1999; Stoy, 2001). Die Tatsache, dass sowohl Makrophagen als auch DCs aus Monozyten hervorgehen zeigt, wie eng diese Verwandtschaft ist (Abbas et al., 2003; Duffield , 2003; Gordon, 1999). Wichtigster Unterschied zwischen den beiden Zelltypen ist, dass Makrophagen hauptsächlich zur Aufnahme von Zellen durch Phagozytose dienen, während DCs der Antigenpräsentation dienen (Aderem et al., 1999; Gordon, 1998; Gordon, 1999; Stoy, 2001). Im Gegensatz zu DCs beseitigen Makrophagen aber auch apoptotische körpereigene Zellen und Zellbestandteile, die nicht mehr benötigt werden, wie etwa die Zellkerne von ausgereiften Erythrozyten (Aderem et al., 1999; Gordon, 1999). Zusammen mit Neutrophilen werden Makrophagen als professionelle Phagozyten bezeichnet. Die Erkennung von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bestimmt auch hier die Unterscheidung von selbst und nicht-selbst (Aderem et al., 1999). Makrophagen können außerdem zwischen pathogenen und nicht-pathogenen Bakterien unterscheiden (Delves et al., 2000).

Makrophagen sind sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunantwort der Prototyp der Effektorzelle (Duffield , 2003; Stoy, 2001). Während der Immunantwort ergänzen sich Makrophagen und DCs, was von Stoy (2001) als eine Art Tandem bezeichnet wird.

Durch die Kombination der Signalmoleküle IFN-γ und TNF-α werden die Makrophagen aktiviert (Mosser, 2003). Durch diese Aktivierung steigt die Fähigkeit von Makrophagen, intrazelluläre Mikroorganismen zu töten und abzubauen (Mosser, 2003). Ähnlich wie bei DCs führt die Stimulation von Makrophagen zur Produktion der Zytokine TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 sowie zur verstärkten Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD80 oder CD86 und Antigen-präsentierenden Molekülen wie MHC-II (Bliss et al., 1998; Garner et al., 1994; Kawai et al., 1999; Ma, 2001; Shibata et al., 1997; Yamamoto et al., 1997).

Durch die Aktivität der pro-inflammatorischen Makrophagen kann es auch zu Gewebeschädigungen kommen, so dass die strikte Regulation der Makrophagenaktivität eine wichtige Rolle während der Entzündungsreaktion spielt (Duffield , 2003; Gordon, 1998). Es gibt Hinweise, dass aktivierte Makrophagen nach einer Entzündung auch die Wundheilung fördern (Duffield , 2003).

3.5 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind die „Wächter des Immunsystems“, sie kontrollieren die Aktivität von T- und B-Zellen und sind die effektivsten Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems (Ackerman et al., 2003; Banchereau et al., 1998; Reis e

Sousa, 2004b; Sallusto et al., 1999; Shortman et al., 2002; Steinman, 1991; Underhill et al., 2002). Eine charakteristische Eigenschaft von DCs ist ihre sternförmige Gestalt. Die Zellen bilden viele dünne zytoplasmatische Fortsätze, die mehr als 10µm lang werden können und durch die Vergrößerung der Zelloberfläche mehr Zell-Zell-Kontakte ermöglichen (Banchereau et al., 1998; Mellman et al., 2001; Steinman, 1991). Es sind die einzigen Blutzellen, die diese Form haben (Banchereau et al., 1998; Steinman, 1991). Meist unterteilt man DCs in unreife (*immature*) und reife (*mature*) DCs, gelegentlich werden als drittes Stadium noch apoptotische DCs gezählt (Banchereau et al., 2000; Rescigno et al., 1997; Underhill et al., 2002; Winzler et al., 1997). Unreife DCs sind sehr selten, sie machen etwa 0,1% der Leukozyten aus und befinden sich mit Ausnahme von Gehirn und Hoden in allen periphären Geweben (Curler et al., 2001; Lutz et al., 1999; Steinman, 1991). Dort sind sie auf der Suche nach Pathogenen, die sie an ihren konservierten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), wie z.B. LPS oder Flagellin erkennen (Banchereau et al., 1998; Banchereau et al., 2000; Janeway et al., 2002; Means et al., 2003; Reis e Sousa, 2004a; Steinman, 1991). Dazu dienen spezielle Rezeptoren, die so genannten *pathogen recognition receptors* (PRRs) zu denen die *Toll-like*-Rezeptoren (3.6) gehören (Akira, 2003; Reis e Sousa, 2004a; Reis e Sousa, 2004b).
Eine Besonderheit von DCs ist ihre Fähigkeit durch *tight junctions* zu migrieren, um den Kontakt mit dem gastrointestinalen Lumen herzustellen (Palucka et al., 2002; Rescigno et al., 2001).
Nach Aufnahme von Mikroorganismen oder deren Bestandteilen (wie LPS) durch Phagozytose oder Makropinozytose, werden die Antigene in den Zellen prozessiert und auf den MHC-II-Molekülen T- oder B-Zellen präsentiert (Banchereau et al., 2000; Inaba et al., 1993; Reis e Sousa et al., 1993; Sallusto et al., 1995; Steinman, 1991). Während der Reifung erfolgt eine Prozessierung der Antigene und die DCs wandern zu den lymphatischen Geweben (Banchereau et al., 1998; Banchereau et al., 2000; Rescigno et al., 1998; Wick, 2003). Durch diesen Reifeprozess verlieren die DCs ihre Fähigkeit zur Phagozytose, dafür wird aber ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation verstärkt (Banchereau et al., 2000; Underhill et al., 2002; Wick, 2003). Dies geschieht durch den erhöhten Transport von MHC-II-Molekülen an die Zelloberfläche (Banchereau et al., 2000). Zudem wird die Expression von für T-Zellen kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD83 und CD86 gesteigert (Ackerman et al., 2003; Banchereau et al., 2000; Curler et al., 2001; Lechmann et al., 2002; Means et al., 2003; Wick, 2003). Diese Steigerung kann bei MHC-II bis zu 20-fach sein, bei CD86 sogar bis zu 100-fach (Hafsi et al., 2004; Mellman et al., 2001). Durch die Antigenpräsentation in Kombination mit der Sekretion großer Mengen pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-8, IL-12 und TNF-α induzieren die DCs die primäre Immunantwort (Banchereau et al., 1998; Banchereau et al., 2000; Chain,

2003; Kranzer et al., 2004; Mellman et al., 2001; Palucka et al., 1999). Abhängig von der Art des erkannten Pathogens reagiert das Immunsystem mit der Induktion verschiedener Signalwege (Agrawal et al., 2003; Chaussabel et al., 2003; Hafsi et al., 2004; Kadowaki et al., 2001). Diese Regulation erfolgt über die TLRs (Agrawal et al., 2003; Akira, 2003; Re et al., 2001; Reis e Sousa, 2004b). DCs leiten abhängig vom Stimulus eine Th1- oder Th2-Antwort ein (Agrawal et al., 2003; Kadowaki et al., 2001). Einige bakterielle Infektionen, wie z.B. mit *H. pylori*, oder virale Infektionen lösen eine IL-12-induzierte Th1-Antwort aus (Agrawal et al., 2003; Moser et al., 2000). Infektionen durch Parasiten, bei denen kein IL-12 freigesetzt wird, führen dagegen zu einer Th2-Antwort (Agrawal et al., 2003; Kadowaki et al., 2001). Welches Zytokin letztlich für die Induktion einer Th2-Antwort ausschlaggebend ist, ist nicht bekannt, es wird jedoch vermutet, dass IL-4 und/oder IL-10 dabei eine Rolle spielen (Hafsi et al., 2004; Moser et al., 2000).

Die Aktivierung von dendritischen Zellen kann durch Viren, ganze Bakterien, oder deren Bestandteile, wie LPS, Flagellin oder CpG, sowie durch Zytokine (IL-1ß, IL-15, TNF-α) erfolgen (Agrawal et al., 2003; Banchereau et al., 2000; Mattei et al., 2001; Wick, 2003; Winzler et al., 1997). DCs sind verantwortlich für die Regulation der T- und B-Zellantwort ebenso wie für die Verbindung von angeborener und adaptiver Immunantwort (Banchereau et al., 2000; Curler et al., 2001; Palucka et al., 1999). DCs aktivieren zudem NK- und NKT-Zellen. Deren Aufgabe ist es, virus-infizierte Zellen, welche häufig durch eine unterdurchschnittliche Expression von MHC-I-Molekülen gekennzeichnet sind, schnell zu vernichten und wichtige Zytokine wie z. B. IFN-γ zu produzieren (Abbas et al., 2003; Banchereau et al., 2000; Ferlazzo et al., 2002; Ferlazzo et al., 2003; Mellman et al., 2001; Palucka et al., 2002).

Wie effektiv DCs bei der Antigenpräsentation sind verdeutlicht die Tatsache, dass eine reife dendritische Zelle ausreicht, um 100-3000 T-Zellen zu stimulieren (Banchereau et al., 1998).

Eine weitere wichtige Funktion von DCs liegt in der Vermittlung von immunologischer Toleranz. DCs sorgen dafür, dass autoreaktive T-Zellen durch Apoptose unschädlich gemacht werden (Banchereau et al., 2000; Shortman et al., 2002).

3.6 *Toll-like*-Rezeptoren

Toll-like-Rezeptoren (TLRs) sind wahrscheinlich der entwicklungsbiologisch älteste Bestandteil des Immunsystems (Kopp et al., 1997; Medzhitov, 2001). Auch Pflanzen und Invertebraten, wie z.B. Insekten, verfügen über dieses System der Pathogenerkennung (Medzhitov, 2001). Es ist daher nicht verwunderlich, dass TLRs von essentieller Bedeutung in der angeborenen Immunantwort von Säugern sind (Beutler, 2004; Means et al., 2003; Medzhitov, 2001; Re et al., 2004; Rehli, 2002; Underhill et al., 2002). Entdeckt wurde dieser Rezeptortyp Ende der 80er Jahre des

20. Jahrhunderts bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als wichtiges Element in der Embryonalentwicklung (Anderson, 2000; Hoffmann et al., 1999; Takeda et al., 2003). Später fand man heraus, dass das Toll-Protein auch in der Fliege eine Rolle in der Abwehr von Pilzinfektionen spielt (Hashimoto et al., 1988; Lemaitre et al., 1997). Die *Toll-like*-Rezeptoren gehören zu den stark konservierten *pattern recognition receptors* (PRRs), die eindringende Pathogene erkennen können (Kopp et al., 1997; Rehli, 2002; Schnare et al., 2001). Sie erkennen beispielsweise konservierte Strukturen wie LPS, Peptidoglycan, Lipoteichonsäure und andere Zellwandkomponenten (Imler et al., 2004; Means et al., 2000; Poltorak et al., 1998). Die Gruppe der TLRs ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein einer Leucin-reichen extrazellulären Domäne und einer zytoplasmatischen Toll/IL-1-Rezeptor (TIR) Domäne, welche der IL-1-Rezeptorfamilie ähnelt (Akira, 2003; O'Neill, 2002a; Re et al., 2004; Takeda et al., 2003). Wichtige Bestandteile der anschließenden Signalkaskade sind MyD88, die IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK), der TNF-Rezeptor-assoziierte Faktor (TRAF) 6, die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) und der *nuclear factor*-κB (NF-κB) (Akira, 2003; Medzhitov, 2001; Re et al., 2004; Takeda et al., 2003). In Abbildung 2 sind verschiedene TLRs mit ihren Agonisten und anschließenden Signalkaskaden abgebildet.

Inzwischen sind 19 verschiedene TLRs bekannt, die alle zur Erkennung bestimmter konservierter Strukturen von Pathogenen, den so genannten PAMPs, dienen (Beutler, 2004; Janeway et al., 2002; Medzhitov, 2001; Rehli, 2002; Roach et al., 2005). TLRs werden in sechs Familien unterteilt, die einen bis vier Rezeptoren umfassen (Roach et al., 2005). Diese Familien sind TLR1, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 und TLR11 (Roach et al., 2005). Am besten untersucht sind die *Toll-like*-Rezeptoren 2 und 4 (Su et al., 2003). TLR2 erkennt verschiedene mikrobielle Strukturen, darunter Peptidoglycan von grampositiven Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, Lipoproteine, Lipopeptide und die Hefe-Zellwandkomponente Zymosan (Takeda et al., 2003). TLR2 bildet Heterodimere mit TLR1 und TLR6 (Poltorak et al., 1998; Takeda et al., 2003). Zudem bindet TLR2 auch strukturell untypisches LPS von *Leptospira interrogans*, *Porphyromonas gingivalis* und, Veröffentlichungen von Mandell et al. (2004) sowie Torok et al. (2005) zufolge, auch das von *H. pylori* (Hirschfeld et al., 2001; Werts et al., 2001).

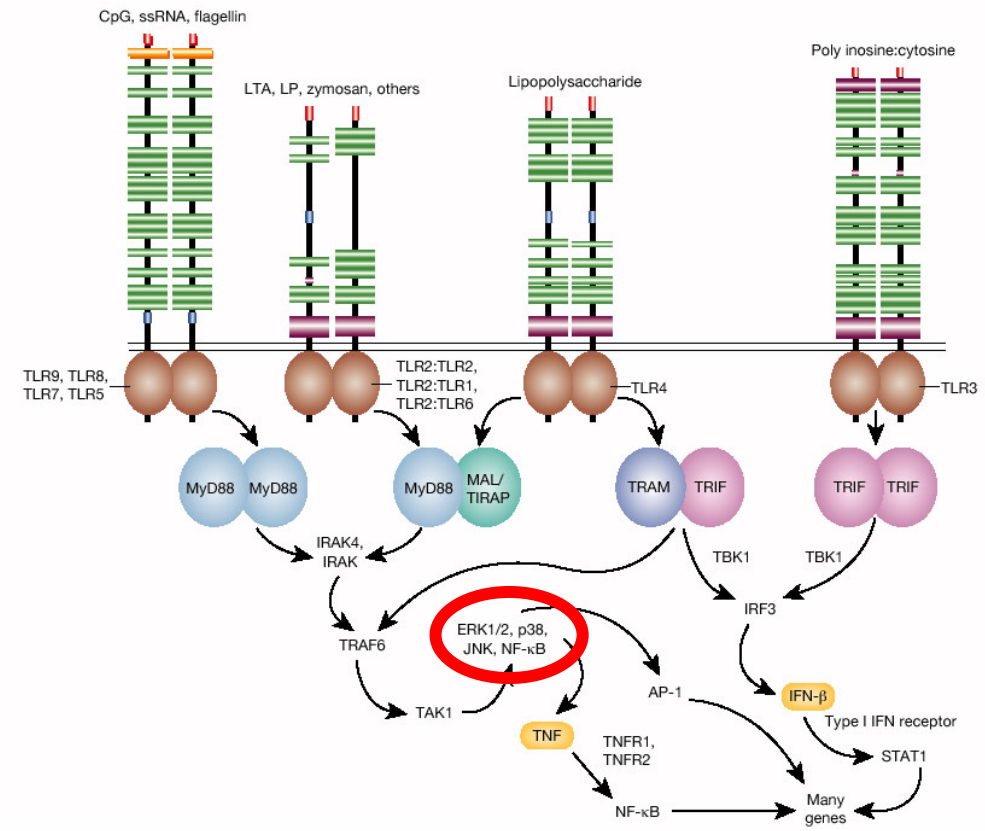


Abbildung 2: Toll-like Rezeptoren mit ihren Agonisten und Signalkaskaden
aus (Beutler, 2004), verändert

TLR4 bindet das Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien wie *E.coli* oder *Salmonella spp*., welches einen der stärksten bakteriellen Stimuli des humanen Immunsystems darstellt (Akira, 2003; Hirschfeld et al., 2001; Su et al., 2003). Dies geschieht indirekt über das LPS-Bindeprotein (LBP), MD-2 und CD14 (Akira, 2003; Dobrovolskaia et al., 2003; Medzhitov, 2001; Shimazu et al., 1999; Takeda et al., 2003). Wie essentiell die Aminosäuresequenz des Rezeptors für die Erkennung von LPS ist, zeigt die Tatsache, dass schon der Austausch von Prolin gegen Histidin an Position 712 der Aminosäurekette dazu führt, dass der Rezeptor nicht mehr funktionsfähig ist (Poltorak et al., 1998).
Der Lipid-A-Teil kann sowohl in einer konischen als auch in einer zylindrischen Form vorliegen. TLR4 erkennt die konische Variante, wie sie z.B. *E. coli* besitzt. Die zylindrische Form von *P. gingivalis* wird dagegen von TLR2 erkannt (O'Neill, 2002a).
TLR5 und 9 erkennen mit Flagellin und OligoDNAs mit CpG-Motiven ebenfalls bakterielle Strukturen, TLR3 dient durch die Aufnahme doppelsträngiger RNA der Immunabwehr bestimmter Viren (Akira, 2003; Hayashi et al., 2001; HEMMI et al., 2000; Means et al., 2003; Takeda et al., 2003). Während TLR7 und 8 antivirale Komponenten wie Imidazoquinoline erkennen, ist die Bedeutung der anderen TLRs noch nicht geklärt (Means et al., 2003).
TLRs sind von entscheidender Bedeutung für die Th1-Antwort, da alle Komponenten, die sie erkennen, eine Th1-Antwort hervorrufen. Th2-Antworten sind vor allem gegen

multizelluläre Organismen gerichtet, die von TLRs nicht erkannt werden (Schnare et al., 2001).
Die Aktivierung von *Toll-like*-Rezeptoren führt zur schnellen Expression einer Vielzahl von pro-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Rezeptoren, sowie zur Einleitung der Migration von DCs zu den Lymphorganen (Re et al., 2004). Die Stimulation unterschiedlicher TLRs hat die Sekretion unterschiedlicher Zytokinprofile zur Folge (Hirschfeld et al., 2001; Re et al., 2001). TLR2 und seine Agonisten bewirken zudem die Reifung von DCs und die erhöhte Expression von zellulären Oberflächenproteinen wie CD40, CD83, CD86 und HLA-DR (Re et al., 2004).

3.7 MAP-Kinasen

An den nächsten Schritte in der Signalkaskade nach Erkennung durch die TLRs (3.6) sind die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen oder MAPKs) beteiligt (Beutler, 2004). MAP-Kinasen steuern die Aktivierung unterschiedlicher Gene als Reaktion auf die Signale, die sie z.B. von den TLRs bekommen, und sind somit wichtige signalübertragende Enzyme (Beutler, 2004; Beyaert et al., 1996; Chang et al., 2001; Chen et al., 2001; Guha et al., 2001). Dies ist am Beispiel derAktivierung durch TLR4 in Abbildung 3 zu sehen.
Die MAP-Kinasen werden gewöhnlich in drei Familien eingeteilt: Die p38-MAPKs mit p38 $\alpha-\delta$, die *extracellular signal regulated kinases* 1/2 (ERK, auch p42/p44-MAPK genannt), sowie die *c-Jun NH_2-terminal kinases* 1-3 (JNK) (Chang et al., 2001; Puig-Kroger et al., 2001). Aicher et al. (1999) zählen ERK5 als vierte Gruppe dazu. Gemeinsames Motiv der MAPKs ist die Doppelphosphorylierungssequenz Thr-X-Tyr, wobei X jede Aminosäure sein kann (Arrighi et al., 2001; Dong et al., 2002; Kikuchi et al., 2003). Die MAP-Kinase Kaskade gehört zu den ältesten und am stärksten konservierten Signalwegen und stellt die Verbindung zwischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche und regulatorischen Strukturen in der Zelle dar (Beyaert et al., 1996; Chang et al., 2001; Dong et al., 2002). Sie dient auch zur Koordinierung und Amplifizierung verschiedener Signale und ermöglicht so eine Vielzahl von Immunantworten (Cobb, 1999; Roux et al., 2004). Jede MAPK-Familie steuert bestimmte Zielgene und hat unterschiedliche Aufgaben, trotzdem gibt es ausgeprägte Interaktionen zwischen den einzelnen MAPKs, so dass man von einem Netzwerk und nicht von unabhängigen parallelen Systemen ausgeht (Cobb, 1999; Rescigno et al., 1998; Zhang et al., 1997).

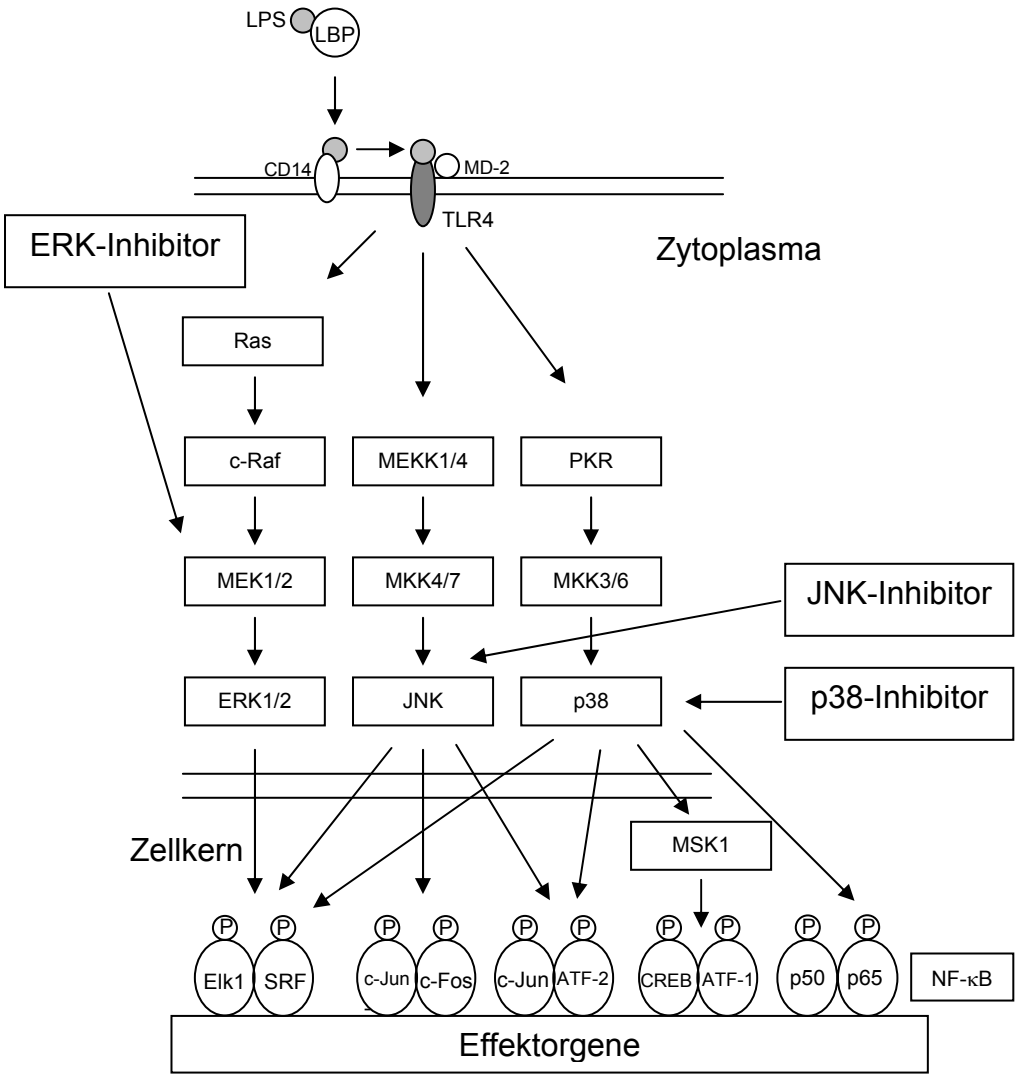


Abbildung 3: Aktivierung von MAP-Kinasen durch TLRs am Beispiel von TLR4
aus (Guha et al., 2001), verändert nach (Bennett et al., 2001; Beyaert et al., 1996; Favata et al., 1998; Li et al., 2002). Die Abbildung zeigt neben den Signalkaskaden auch die Wirkorte der Inhibitoren.

Die ERK-Signalkaskade reguliert Zellproliferation, Differenzierung und zelluläres Überleben als Antwort auf Mitogene und Wachstumsfaktoren, hat aber keinen Einfluss auf die Reifung von DCs (Chang et al., 2001; Guha et al., 2001; Kikuchi et al., 2003; Xie et al., 2005). Die JNK- und p38-Wege werden dagegen hauptsächlich durch Stress, z.B. bakterielle Komponenten wie LPS, induziert und beeinflussen die Reifung von DCs (Arrighi et al., 2001; Bennett et al., 2001; Chang et al., 2001; Craxton et al., 1998; Ichijo, 1999; Kikuchi et al., 2003; Roux et al., 2004). Es konnte ferner gezeigt werden, dass p38 essentiell für die Entwicklung der vollständigen immunstimulatorischen Eigenschaften von DCs ist (Arrighi et al., 2001; Nakahara et al., 2004). Die Reifung von DCs kann durch die Inhibition von ERK dagegen gefördert werden, ERK und p38 üben also gegensätzliche Einflüsse auf DCs aus (Puig-Kroger et al., 2001; Zhang et al., 1997). Einen wichtigen Reiz zur Reifung von

DCs stellt bakterielles LPS dar, weil es durch Stimulation mit LPS zur Aktivierung von p38 und somit zur Reifung der DCs kommt (Arrighi et al., 2001; Puig-Kroger et al., 2001). Wird die Phosphorylierung von p38 als Reaktion auf LPS dagegen durch Blockierung verhindert, kommt es nicht zur Reifung von DCs (Arrighi et al., 2001).
Darüber hinaus ist die Aktivierung der Kinasen auch zelltypabhängig. So konnte gezeigt werden, dass durch LPS JNK und p38, aber auch ERK in Mausmakrophagen aktiviert werden (Hambleton et al., 1996).

Durch die Phosphorylierung von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren (Abbildung 3) werden verschiedene Gene angeschaltet und damit unterschiedliche Antworten ausgelöst (Chang et al., 2001; Chen et al., 2001; Guha et al., 2001). Mit Ausnahme einiger Transkriptionsfaktoren sind die Zielproteine der MAPKs bisher jedoch nicht bekannt (Chang et al., 2001). Es wurde aber beobachtet, dass die Aktivierung der p38-Kinase die IL-12-Bildung fördert, die Aktivierung von ERK sie dagegen hemmt (Aicher et al., 1999; Yanagawa et al., 2002). Mit Hilfe des p38-Inhibitors SB203580 konnte gezeigt werden, dass über die Phosphorylierung von p38 die Expression von Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF-α reguliert wird und p38 eine wichtige Rolle bei der Reifung von DCs aus periphären Blutmonozyten spielt (Arrighi et al., 2001; Beyaert et al., 1996). Durch die Inhibition von p38 wird auch die Aktivierung von NF-κB verhindert (Chen et al., 2001; Kao et al., 2005). Da NF-κB eine wichtige regulatorische Funktion auf die Effektorgene der angeborenen Immunantwort ausübt, kommt es zu einer verringerten Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen (Li et al., 2002; Siebenlist et al., 2005). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Stimulation mit *H. pylori* zur Aktivierung von NF-κB führt, eine indirekte Inhibition von NF-κB durch die Hemmung von p38 sollte also in einer Veränderung der Immunantwort resultieren (Maeda et al., 2000).

3.8 Zytokine

Zytokine sind Proteine, die eine Entzündung und die darauf folgende Immunantwort vermitteln. Sie werden von viele verschiedenen Zelltypen produziert und dienen der Kommunikation zwischen den Zellen des Immunsystems (Abbas et al., 2003). Wichtige Zytokine der angeborenen Immunantwort (*innate immunity*) sind TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und IFN-γ (Abbas et al., 2003; Janeway C.A. et al., 2002; Medzhitov et al., 1997b). Die Wirkungen der einzelnen Zytokine sind sehr unterschiedlich: TNF-α und IL-1 fördern die entzündliche Immunantwort (pro-inflammatorische Zytokine), IL-6 stimuliert die Produktion so genannter „akute-Phase-Proteine“ und rekrutiert Neutrophile, IL-10 hemmt unter anderen die Aktivierung von Makrophagen und verhindert so ein Überreagieren der

Immunantwort (Barton, 1997; Beyaert et al., 1996; Horn et al., 2000; Männel et al., 2000; Medzhitov et al., 1997b; Moore et al., 2001; Mukaida et al., 1994; Murray, 2005). Zudem hemmt IL-10 die Aktivierung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF-α, IL-6, IL-12, und von zellulären Oberflächenproteinen, wie CD80, CD86 und MHC-II (Stoy, 2001). Die Hauptfunktionen von IL-12 liegen in der Ausprägung der Th1-Antwort und der Induktion der IFN-γ-Produktion, sowie der Verbindung von angeborener und adaptiver Immunität (Ma, 2001; Trinchieri, 2003). *H. pylori* ruft sowohl in Menschen als auch in Mäusen eine Th1-Immunantwort hervor, deshalb ist IL-12 wichtig für die Immunreaktion auf *H. pylori* (Smythies et al., 2000). Das Zytokin IL-12 besteht aus zwei Untereinheiten: IL-12p35 und IL-12p40, die zusammengesetzt als IL-12p70 das funktionelle Zytokin bilden (Ma, 2001; Trinchieri, 2003). IFN-γ dient u.a. der Aktivierung von Makrophagen und induziert die Expression von MHC-II-Molekülen (Abbas et al., 2003; Sawai et al., 1999; Trinchieri, 2003). Pro-inflammatorische Zytokine wie TNF-α dienen auch der Steigerung der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 (Mattei et al., 2001).

3.9 Oberflächenproteine

Während Zytokine (3.8) nicht nur direkt von Zelle zu Zelle wirken, dienen Oberflächenproteine wie MHC-I, MHC-II, CD54, CD80 und CD86 dem direkten Zell-Zell-Kontakt. Eine wichtige Rolle spielen hierbei DCs, die als professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) dem Immunsystem Fremdantigene präsentieren. Besondere Aufmerksamkeit verdienen in diesem Zusammenhang die MHC-I- und MHC-II-Moleküle (HLA-ABC bzw. HLA-DR), deren Funktion in der Präsentation von verschiedensten Antigenen liegt, d.h. sie stellen die Verbindung zwischen Antigenen und $CD8^+$- bzw. $CD4^+$-T-Zellen her (Ackerman et al., 2003; Chain, 2003; Curler et al., 2001; Germain et al., 2004; Jeannin et al., 2000; Lehner et al., 2004; Wick, 2003). Neueren Erkenntnissen zufolge spielen MHC-II-Moleküle auch eine Rolle bei der Proliferation, Reifung und dem programmierten Tod von Zellen (Al Daccak et al., 2004). Eine dritte Klasse von Antigen-präsentierenden Molekülen stellen die beiden Gruppen der CD1-Moleküle dar. Sie präsentieren den T-Zellen Lipopeptide, Glycolipide oder Phospholipide aus Mikroorganismen (Burdin et al., 1999; Moody et al., 2004; Porcelli, 1995; Porcelli et al., 1998). Die Expression von CD1a ist ein wichtiges Kennzeichen dafür, dass Monozyten zu DCs differenziert sind (Curler et al., 2001).

Kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 erhöhen durch den Kontakt mit CD28 auf T-Zellen deren Aktivität (Abbas et al., 2003; Dilioglou et al., 2003). Zumindest geringe Mengen von CD80 und CD86 sind nötig, um die immunstimulatorische Wirkung von DCs zu gewährleisten (Fujii et al., 2004). CD83

dient zum einen als Adhäsionsrezeptor, der Monozyten und aktivierte $CD8^+$-T-Zellen bindet, und zum anderen als Reifungsmarker (Scholler et al., 2002; Zhou et al., 1995).
Das Oberflächenmolekül CD40 führt durch Interaktion mit CD154 (CD40L) zur Aktivierung von T-Zellen durch Makrophagen und DCs und spielt somit eine wichtige Rolle in der Sekretion von Zytokinen und Chemotoxinen (Benveniste et al., 2004; Fujii et al., 2004). Durch die Bindung von Antigenen an CD40 wird zudem die Sekretion von IL-12 induziert (Arrighi et al., 2001). Des Weiteren stellt CD40 eine Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar (Fujii et al., 2004).
CD54, auch *intracellular adhesion molecule*-1 (ICAM-1) genannt, ist ein Transmembranprotein, das adhäsive Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen vermittelt (Roebuck et al., 1999; van de Stolpe et al., 1996). Die Bindung an T-Zellen dient zur Koaktivierung (Zuckerman et al., 1998). Durch pro-inflammatorische Zytokine, Hormone, zellulären Stress, bakterielle und virale Infektionen kommt es zur gesteigerten Expression von CD54 (Roebuck et al., 1999).
Die beiden Adhäsionsmoleküle CD11c und CD18 gehören zur Klasse der Integrine und bilden ein Heterodimer (Arnaout, 1990). Dieses Heterodimer spielt eine Rolle bei der Bindung der Immunzelle an das Endothel und der Bindung des Komplementfaktors iC3b, sowie bei der Migration und der Phagozytose von Fremdkörpern (Abbas et al., 2003; Arnaout, 1990). Des Weiteren dient CD11c auf DCs zur Aktivierung naiver $CD8^+$-T-Zellen (Jung et al., 2002).

3.10 Vorarbeiten

Die Untersuchung der immunstimulatorischen Eigenschaften von *H. pylori* und HcpA stellt einen Schwerpunkt innerhalb der Arbeitsgruppe dar. Je zwei Diplomarbeiten (Aigner, 2001; Schütz, 2004) und Dissertationen (Aigner, 2004; Decker, 2000) sind im Rahmen dieser Untersuchungen entstanden. Während dieser Zeit wurde das Maussplenozytenmodell als Modell für die angeborene Immunantwort an Balb/c- und C57BL/6-Mäusen etabliert. Dabei wurde gezeigt, dass die Stimulation mit *H. pylori* zur Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF-α, IL-6 und IFN-γ, sowie zur Sekretion von IL-10 führt.
Anhand von Untersuchungen an Splenozyten konnte ein hypothetischer Signalweg der durch *H. pylori* ausgelösten IFN-γ-Sekretion erstellt werden.

3.11 Zielsetzung

Zu Beginn der Arbeit waren die immunstimulatorischen Eigenschaften von *H. pylori* im Modellsystem der Maussplenozyten bekannt. Zur Erforschung des genauen Verlaufs der Zytokinsekretion sollten die bisherigen Arbeiten um ein detailliertes Sekretionsprofil während des gesamten Stimulationszeitraums von 36 Stunden erweitert werden.

Um den Beitrag einzelner Zellpopulationen zur Immunantwort untersuchen zu können, sollen diese getrennt von den anderen Lymphozyten stimuliert werden. Da aufgrund des geringen Anteils von Makrophagen und DCs an der Gesamtlymphozytenzahl in der Milz (3,5 bzw. 2,4% (Schütz, 2004)) Depletionen nicht erfolgversprechend erscheinen, soll zuerst mit Makrophagen der murinen Zelllinie RAW264.7 gearbeitet werden. Mit dieser einfach zu handhabenden Zelllinie sollen die Grundlagen für die weiteren Untersuchungen an primären Zellen geschaffen werden. Diese sollen an Makrophagen aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen durchgeführt werden, um die *in vivo*-Bedingungen besser zu simulieren.

In den folgenden Versuchen soll der Einfluss von TLR4 auf die von *H. pylori* ausgelöste Immunantwort ermittelt werden. TLR4 ist essentiell für die Erkennung von bakteriellem LPS, daher soll die Interaktion dieses Rezeptors mit *H. pylori* untersucht werden. Zu diesem Zweck werden Makrophagen und DCs der beiden Mäusestämme C3H/HeN und C3H/HeJ verwendet. Bei dem Stamm C3H/HeJ handelt es sich um eine isogene Mutante von C3H/HeN, die über einen nicht funktionellen TLR4 verfügt und nur geringe Reaktionen auf die Stimulation mit LPS zeigt. Zusätzlich zur Messung der Zytokinsekretion sollen Veränderungen der Expression von Oberflächenantigenen untersucht werden. Oberflächenantigene wie CD40, CD54, CD80, CD86, MHC-I und MHC-II dienen der Signalübertragung, Stimulation anderer Zellen sowie der Antigenpräsentation. Durch FACS-Analysen (*fluorescence activated cell sorting*) sollen eventuelle Veränderungen der Expression dieser Moleküle, die durch die Stimulation von Zellen mit nicht funktionellem TLR4 mit *H. pylori* hervorgerufen wird, nachgewiesen werden, im Aufschluß über den Einfluss von TLR4 im Rahmen der *H. pylori*-Stimulation zu erhalten.

Aufgrund der Tatsache, dass *H. pylori* ein bedeutender humanpathogener Organismus ist, sollen zusätzlich Untersuchungen an menschlichen Zellen durchgeführt werden. Da DCs eine wichtige Rolle in der Erkennung von Antigenen sowie in der Steuerung der Immunantwort auf diese Antigene spielen, sollen humane DCs mit *H. pylori* stimuliert werden. In den ersten Experimenten soll die optimale MOI

für eine Stimulation mit *H. pylori* ermittelt und der Einfluss von *H. pylori* auf die Expression von immunstimulatorisch wichtigen Oberflächenproteinen untersucht werden.

Für die Steuerung der Zytokinsekretion und der Expression von Oberflächenproteinen sind innerhalb der Zelle verschiedene MAP-Kinasen von zentraler Bedeutung. Daher soll der Einfluss dieser MAP-Kinasen nach Koinkubation der DCs mit *H. pylori* untersucht werden. Zu diesem Zweck sollen verschiedene MAP-Kinasen selektiv blockiert werden, um mögliche Unterschiede in der Zytokinsekretion bzw. der Expression von Oberflächenantigenen im Vergleich zu einer Stimulation ohne Inhibitor festzustellen. Auf diese Weise soll die Bedeutung einzelner MAP-Kinasen für die *H. pylori*-induzierte Reifung der DCs und die Sekretion der Zytokine ermittelt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Organismen

4.1.1 *H. pylori*-Stamm

Beim verwendeten *H. pylori*-Stamm 2802 handelt es sich um ein Patientenisolat aus Regensburg.

4.1.2 Mäusestämme

Die Mäuse der Stämme Balb/c, C57BL/6, C3H/HeN und C3H/HeJ waren alle weiblich und wurden im Alter von 40-44 Tagen von Harlan-Winkelmann, Borchen, oder von Charles River, Kißlegg, erworben.
C3H/HeJ-Mäuse sind eine Spontanmutante der C3H/HeN-Mäuse, bei der in der Aminosäuresequenz des TLR4 an Position 712 Prolin durch Histidin ersetzt wurde (Bäckhed et al., 2003; Underhill et al., 2002). Dies führt dazu, dass der TLR4 nicht mehr funktionell ist und somit LPS nicht mehr über diesen Rezeptor erkannt wird.
Alle Tiere hatten einen Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden und erhielten eine spezifische Standarddiät und Leitungswasser *ad libitum*.
Die Mäuse wurden in einzeln belüfteten IVC-Käfigen (*Individually Ventilated Cages*, Tecniplast, Buguggiate, Italien) untergebracht und erhielten V1326 ssniff R-Z extrudiertes Alleinfutter für die Rattenzucht (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest)

4.2 Kultivierung von *Helicobacter pylori*

Die Kultivierung von *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) erfolgte auf WC-Dent Platten bei 36°C. Die Platten wurden in Anaerobentöpfen mit einer Gasphase von (11% O_2, 9% CO_2, 80% N_2) inkubiert.

4.3 Immunologische Methoden

4.3.1 Stimulationsexperimente

4.3.1.1 Zell-Präparation

4.3.1.1.1 Maus-Splenozyten

Vor der Milzentnahme wurde die Maus durch zervikale Dislokation euthanasiert, dann wurde die Milz entnommen und in Mausmilzmedium (RT) überführt. Die weiteren Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Alle folgenden Mengenangaben beziehen sich auf eine Milz.
In einem 50ml Falconröhrchen (Falcon #3520070, BD, Heidelberg) wurden 5ml Medium vorgelegt, dann wurde die Milz mittels eines Zellsiebes mit 70µm Porengröße (Falcon #352350, BD, Heidelberg) homogenisiert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Die Suspension wurde bei 300xg 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 5ml AKS-RBC Hämolysepuffer resuspendiert und 5 Minuten unter gelegentlichem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert, was die Erythrozyten lysiert. Die Suspension wurde wie oben beschrieben zentrifugiert. Danach wurde dreimal mit je 5ml Medium gewaschen und zwischen den einzelnen Schritten wie oben zentrifugiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 5ml Milzmedium aufgenommen. Mittels einer „Neubauer improved“ Zählkammer wurde die Zellzahl ermittelt und anschließend auf $2x10^6$ Zellen pro ml eingestellt. Von der fertigen Zellsuspension wurde je 1ml pro *Well* in eine 24-*Well*-Zellkulturplatte (Falcon # 353047, BD) ausgesät.

4.3.1.1.2 Präparation und Differenzierung muriner Knochenmarksmakrophagen

Die Maus wurde durch zervikale Dislokation euthanasiert. Der Körper der Maus wurde im Bereich des Bauchs und der Hinterbeine aufpräpariert, die Beinmuskulatur so weit wie möglich entfernt. Das Bein wurde im Kniegelenk durchtrennt. Anschließend wurden die beiden Femuren und Tibien herauspräpariert und die restliche Muskelmasse mit einem Papiertuch entfernt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Knochen in eine Petrischale mit wenig 70% Ethanol gelegt.
Unter der Sterilbank wurden die Knochenköpfe vorsichtig mit einer Schere abgeschnitten und das Knochenmark mittels einer Spritze mit PBS und einer 0,4mm Kanüle in ein 50ml Falconröhrchen (Falcon #3520070, BD, Heidelberg) gespült. Die Spritze wurde dabei auf und ab bewegt, die Knochenröhre von beiden Seiten gespült. Anschließend wurde bei 4°C und 300xg 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 5ml Medium pro Maus resuspendiert. Die Zellen wurden zur Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypanblau gefärbt,

ausgezählt und die Zellzahl auf $1x10^6$/ml eingestellt. Pro ml Medium wurden 20ng M-CSF (Peprotech, London) zugeben und die Zellen 6 Tage bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank ausdifferenziert. Danach wurden Zellen mit frischem Medium versetzt, einen weiteren Tag inkubiert und für Stimulationen verwendet.

4.3.1.1.3 Präparation und Gewinnung muriner DCs aus Knochenmark

Die Knochenmarkszellen wurden wie unter 4.3.1.1.2 beschrieben gewonnen. Danach wurden 10ml Zellsuspension in einer Konzentration von $4x10^5$ Zellen pro ml in Medium für murine DCs mit 10% Überstand von AG8653-Zellen (4.3.1.1.6) in Petrischalen (Falcon, #353003, BD, Heidelberg) ausgesät. Mit Hilfe der im Überstand von AG8653-Zellen enthaltenen Zytokine differenzieren die Zellen zu DCs (Zal et al., 1994). Am nächsten Tag wurden 10ml Medium ohne Überstand zugegeben. Nach drei Tagen wurden 10 ml Medium abgenommen und 5 Minuten bei 300xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10ml Medium mit 10% Überstand resuspendiert und zu den verbliebenen Zellen gegeben.
Am 5. Tag wurden die Zellen in den Petrischalen vorsichtig resuspendiert, 10ml abpipettiert und erneut bei 300xg 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10ml Medium mit 10% Überstand resuspendiert und in neue Petrischalen überführt. Die Zellen in den „alten“ Petrischalen wurden mit 10ml Medium mit Überstand versetzt. Nach neun Tagen wurden die Zellen mit einer 25ml Pipette im Medium resuspendiert und geerntet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 300xg für 5 Minuten. Die Zellen wurden in Medium mit AG8653-Überstand resuspendiert, ausgezählt und auf eine Konzentration von $1x10^6$/ml gebracht. Danach wurde 1ml/*Well* der Zellsuspension in 24-*Well*-Platten (Falcon # 353047, BD, Heidelberg) ausgesät und mit *H. pylori* stimuliert.

4.3.1.1.4 Kultivierung und Ernte von Makrophagen der Zelllinie RAW264.7

Die Makrophagen der Zelllinie RAW264.7 (ATCC TIB-71) wurden freundlicherweise von der AG Männel, Institut für Immunologie, Regensburg, zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in 175cm² Zellkulturflaschen (Falcon #353112, BD, Heidelberg) inkubiert, dabei wurde das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Sobald die Zellen konfluent gewachsen waren, wurden sie je nach Bedarf im Verhältnis 1:2 bis 1:10 gesplittet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank.
Vor der Ernte wurden das Medium dekantiert und die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurden 5ml 5mM EDTA in PBS zugegeben und 4 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch kräftiges Hin- und Herbewegen auf dem Labortisch wurden die Zellen abgelöst. Zur Verdünnung des EDTAs wurden die Zellen mit 15ml Medium

gemischt. Anschließend wurden die Zellen im gewünschten Verhältnis gesplittet oder für Versuche ausgezählt und eine Konzentration von $2x10^6$ Zellen/ml gebracht.

4.3.1.1.5 Gewinnung und Differenzierung humaner dendritischer Zellen

Humane Monozyten wurden durch Elutriation von Vollblut freiwilliger gesunder Spender am Institut für Hämatologie und Onkologie, Regensburg, gewonnen und freundlicherweise für die Versuche zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von $1x10^6$ Zellen/ml in Zellkulturflaschen angesetzt. Zur Stimulation der Differenzierung wurden 500U/ml rekombinantes IL-4 (Peprotech, London) und 50ng/ml rekombinantes GM-CSF (Peprotech) zugegeben (nach Underhill et al., (2002), verändert). Am dritten Tag der Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurde erneut die halbe Zytokinmenge zugesetzt. Nach sieben Tagen waren die Zellen ausdifferenziert und konnten für Versuche verwendet werden.

4.3.1.1.6 Kultivierung von AG8653-Zellen

Diese Zellinie wurde freundlicherweise von Tim Sparwasser vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München zur Verfügung gestellt. Wie von Zal, T. et al. (1994) veröffentlicht, exprimiert die Zelllinie AG8653 nach Transfektion konstitutiv GM-CSF und sezerniert dieses ins Medium. In einer 75cm² Zellkulturflasche (Falcon, #353108, BD, Heidelberg) wurden $2x10^7$ Zellen in 50ml Medium für AG8653-Zellen ausgesät. Sobald die Zellen dicht gewachsen waren (2-3 Tage), wurden weitere 50ml Medium zugegeben. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis die Flasche vollständig mit Medium gefüllt war. Danach wurde der Überstand abgenommen und 5 Minuten bei RT und 300xg abzentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde aliquotiert und bei –20°C gelagert. Das Zellpellet konnte für die weitere Kultivierung verwendet werden.

4.3.1.2 Stimulation und Ernte des Zellkultur-Überstands

Das jeweilige Stimulus wurde mit PBS ad 100µl aufgefüllt und jeweils einem *Well* der ausgesäten Zellen zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO_2.

4.3.1.2.1 Splenozyten

Der Zellkulturüberstand wurde abpipettiert und 10 Minuten bei 1300xg und 4°C zentrifugiert, das Pellet wurde verworfen. Der Überstand wurde bei –80°C bis zur Verwendung gelagert.

4.3.1.2.2 Makrophagen

Der Zellkulturüberstand wurde wie unter 4.3.1.2.1 beschrieben behandelt. Das *Well* wurde mit 1ml 4°C kaltem FACS-Puffer befüllt. Die adhärenten Makrophagen wurden mit einer 1000µl Pipettenspitze durch horizontales Hin- und Herbewegen der Spitze vom Boden des *Wells* gelöst und in ein 5ml Rundbodenröhrchen (Falcon #2052, BD, Heidelberg) gegeben. Die Suspension wurde bis zur FACS-Färbung im Kühlschrank aufbewahrt.

4.3.1.2.3 Dendritische Zellen

Die DCs wurden im vorhandenen Medium resuspendiert, die adhärenten DCs abgelöst (vgl. 4.3.1.2.2) und abzentrifugiert (vgl. 4.3.1.2.1). Der Überstand wurde in ein ERG pipettiert, das Pellet in 1ml 4°C kaltem FACS-Puffer resuspendiert und bis zur FACS-Färbung im Kühlschrank aufbewahrt.

4.3.1.3 Inkubation humaner DCs mit MAP-Kinase-Inhibitoren

Um die Bedeutung einzelner MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinases*) zu untersuchen, wurden Stimulationen von humanen DCs mit den Inhibitoren folgender MAP-Kinasen durchgeführt:

a) p38 Kinase (p38-Inh., SB203580, Calbiochem, #559389, Merck, Darmstadt)
b) ERK Kinase (ERK-Inh.,U0126, Calbiochem, #662005)
c) JNK Kinase (JNK-Inh., JNK-Inhibitor II, Calbiochem, #420119)

Die Zellen wurden in Gegenwart des jeweiligen Inhibitors eine Stunde vorinkubiert.

4.3.2 Nachweis von Zytokinen durch ELISA

Die Zytokine aus den Überständen von Splenozyten-, Makrophagen- und DC-Kulturen wurden mit OPTEIA Elisa Kits von Pharmingen, Heidelberg, nach Anleitung des Herstellers nachgewiesen. Im Bedarfsfall wurden die Überstände mit Assay Diluent verdünnt.
Bei Graphen, in denen keine Fehlerbalken eingezeichnet sind, wurden die Überstände vor der ELISA-Analyse vereinigt.

4.3.3 FACS-Analysen

FACS-Analysen wurden zum einen zur Bestimmung der Reinheit von Zellpopulationen und zum anderen zur Untersuchung der Veränderung von Oberflächenproteinen nach Stimulation von Makrophagen und DCs eingesetzt. Alle

Analysen wurden mit einem Beckman Coulter EPICS XL MCL und der Software Expo32 (Beckman Coulter, Krefeld) durchgeführt.
In Tabelle 2 werden die FACS-Antikörper gegen verwendeten murine Zellen, in der Tabelle 3 die FACS-Antikörper gegen humane Zellen aufgelistet.

Antigen	Vorkommen	Farbstoff/Hersteller
CD11c	Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen	PE, Pharmingen, Heidelberg
CD40	B-Zellen, Makrophagen, DCs, Endothelzellen	FITC, Pharmingen, Heidelberg
CD54 (ICAM-1)	Endothelzellen, T- und B-Zellen, Monozyten	PE, Pharmingen, Heidelberg
CD80	DCs, aktivierte B-Zellen und Makrophagen	FITC, Pharmingen, Heidelberg
CD86	B-Zellen, DCs, Monozyten, einige T-Zellen	FITC, Pharmingen, Heidelberg

Tabelle 2: Liste der bei murinen Zellen verwendeten Antikörperepitope und deren Vorkommen aus (Abbas et al., 2003)

Ausschließlich zur Überprüfung der Reinheit von Knochenmarksmakrophagen wurde der „Mausmakrophagen Antikörper“ IM2898 von Immunotech, Marseille, verwendet. Das Zielepitop dieses Antikörpers ist aus der zugehörigen Veröffentlichung nicht zu entnehmen (Kraal et al., 1987).

Antigen	Vorkommen	Farbstoff, Hersteller
CD1a	Thymozyten, DCs	FITC, Dako Hamburg
CD80	DCs, aktivierte B-Zellen, Makrophagen	PE, Beckman Coulter, Krefeld
CD83	DCs, germinal center B-Zellen	FITC, Pharmingen, Heidelberg
CD86	B Zellen, Monozyten, DCs, einige T-Zellen	PE, Beckman Coulter, Krefeld
HLA-ABC	Leukozyten	FITC, Beckman Coulter, Krefeld
HLA-DR	Leukozyten	PE, Beckman Coulter, Krefeld

Tabelle 3: Epitope der FACS-Antikörper gegen humane DCs und deren Vorkommen aus (Abbas et al., 2003)

Entgegen der Angaben des Herstellers wurden die Antiköper von Beckman Coulter 1:35 (statt 1:10) und die Antikörper von Pharmingen 1:200 statt 1:50 eingesetzt. Diese Änderungen hatten keinen Einfluss auf die Messungen (Daten nicht gezeigt). Die eigentliche Färbung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Für die FACS-Messungen mussten, um genügend Zellen zu erhalten, die Zellen aus den Parallelansätzen vereinigt werden, weshalb bei den meisten FACS-Messungen keine Berechnung und Darstellung der Standardabweichung möglich war. Die einzige Ausnahme bildet der Versuch zur Kinetik der Expression der Oberflächenproteine humaner dendritischer Zellen. In diesem Versuch standen ausreichend Zellen für eine Dreifachmessung zur Verfügung.
Bei FACS-Messungen konnte die Veränderung zweier Aktivierungsparameter beobachtet werden: zum einen der Prozentsatz der aktivierten Zellen, zum anderen die durchschnittliche Fluoreszenz (*mean fluorescence*) der aktivierten Zellen. Um beide Faktoren in einer Darstellung berücksichtigen zu können, wurde im Folgenden das Produkt aus der Prozentzahl der aktivierten Zellen und deren Durchschnittsfluoreszenz verwendet und als „Gesamtfluoreszenz“ bezeichnet. Auf diese Weise waren kleinere Veränderungen der beiden Einzelparameter besser erkennbar.

4.4 Geräte

Es wurden laborübliche Geräte verwendet. Gerätetyp und Hersteller sind bei der jeweiligen Anwendung angegeben.

4.5 Puffer und Reagenzien

Standardchemikalien wurde von Merck, Darmstadt, in p.a. Qualität bezogen, die molekularbiologischen Enzyme von Roche, Mannheim. Bei allen anderen Reagenzien sind die Hersteller bei der entsprechenden Anwendung angegeben.
Die verwendeten Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung sind in Tabelle 4 angegeben.

Lösung	**Zusammensetzung**
AKS-RBC Hämolysepuffer	150mM NH_4Cl 1mM $KHCO_3$ 0,1mM EDTA pH 7,2 –7,4
DENT (Oxoid, Basingstoke, UK)	5mg Vancomycin 2,5mg Trimethoprim 2,5mg Cefsulodin 2,5mg Amphotericin B ad 500ml Medium
FKS	Fötales Kälberserum (Gibco, Eggenstein) 30min bei 56°C hitzeinaktiviert

RPMI-Mausmilzmedium	RPMI 1640 (PAN Biotech, Aidenbach) 5% FKS 20mM HEPES 50µM 2-Mercaptoethanol
RPMI-Medium für murine Makrophagen und AG8653-Zellen	RPMI 1640 (PAN Biotech, Aidenbach) 10% FKS
RPMI-Medium für murine DCs	RPMI 1640 (PAN Biotech, Aidenbach) 10% FKS 50µM 2-Mercaptoethanol (2mM) 5ml Glutamin (200mM)
RPMI-Medium für humane DCs	RPMI 1640 (PAA, Pasching, Österreich) 5% FKS Vitamine Pyruvat nicht essentielle Aminosäuren (8,9mg/l Alanin, 15mg/ml Asparagin, 13,3mg/ml Asparaginsäure, 14,7mg/ml Glutaminsäure, 7,5mg/ml Glycin, 11,5mg/ml Prolin, 10,5mg/ml Serin)
WC	Wilkins-Chalgren Agar (Oxoid, Basingstoke, UK, nach Anleitung des Herstellers) 10% lysiertes Pferdeblut
FACS-Puffer	PBS 1% FKS 0,1% Na_3N
Assay Diluent	PBS mit 10% FKS

Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

5 Ergebnisse

5.1 Kinetik der Zytokinsekretion von Maus-Splenozyten nach Stimulation mit *H. pylori*

In der Milz sind alle wesentlichen Immunzellen enthalten. Aufgrund der guten Verfügbarkeit und der guten Charakterisierung werden Maus-Splenozyten als Modellsystem in der Immunologie verwendet. In den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde die Zytokinsekretion nach einer Stimulationszeit von 36 Stunden gemessen (Deml et al., 2005). Um einen genaueren Aufschluss über den zeitlichen Verlauf der Sekretion verschiedener Zytokine zu erhalten, sollte eine Sekretionskinetik über einen Zeitraum von 36 Stunden erstellt werden. Dazu wurden Splenozyten mit dem *H. pylori*-Stamm 2802 mit einer MOI von 1 stimuliert. Alle 2 Stunden wurden Überstände abgenommen und mittels ELISA die Konzentrationen von TNF-α, IL-6, IL-10, IL-12 und IFN-γ bestimmt. Die Zellkonzentration betrug $2x10^6$ Zellen/ml. Als Positivkontrolle wurde eine Mischung aus Ionomycin (Iono) mit 4-α-Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) mit einer Endkonzentration von je 1µg/*Well* zugegeben.

Wie in Abbildung 4 dargestellt, setzte die Zytokinsekretion nach Stimulation mit *H. pylori* oder Iono/PMA zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein. Während die pro-inflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-6 bereits nach 4 bzw. 6 Stunden über der jeweiligen Nachweisgrenze lagen, war ein deutlicher Anstieg der Sekretion von IFN-γ erst nach 10 Stunden bei Stimulation mit Iono/PMA (1.681±338pg/ml) bzw. 20 Stunden nach *H. pylori*-Stimulation (1.454±894pg/ml) zu beobachten. Der Anstieg der TNF-α-Sekretion nach Stimulation mit *H. pylori* erfolgte sehr schnell, das Maximum war bereits nach 6 Stunden erreicht. Die Konzentration von IL-6 stieg dagegen kontinuierlich von Stunde 6 bis 36 an und auch die IFN-γ-Sekretion nahm zwischen Stunde 20 und 36 zu.
Deutlich erkennbar war außerdem die starke Zunahme der Konzentration der einzelnen Zytokine im Medium. Bei Stimulation mit *H. pylori* lag das Maximum der TNF-α-Konzentration bei 80$\pm$9pg/ml, das der IL-6 Konzentration bei 312$\pm$9pg/ml (Abbildung 4a+b). Die höchste IFN-γ-Konzentration betrug 20.138$\pm$3.765pg/ml (Abbildung 4c).
Bei der Stimulation mit Iono/PMA zeigte sich ein etwas anderes Zytokinverhältnis. Hier betrug die höchste TNF-α-Konzentration 28$\pm$1pg/ml, die Konzentration von IL-6 war mit 609$\pm$2pg/ml fast doppelt so hoch wie bei Stimulation mit *H. pylori*. Mit

11.064±107pg/ml war die höchste gemessene IFN-γ-Konzentration etwa halb so hoch wie nach *H. pylori*-Stimulation.
Nach beiden Stimulationen zeigte sich, dass die IL-6-Konzentration etwa eine Zehnerpotenz höher war als die von TNF-α. Die Konzentration von IFN-γ war wiederum eine Zehnerpotenz höher als die von IL-6. Kombiniert man den Zeitverlauf der Zytokinsekretion sowie deren Zunahme, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um eine Art Kaskade handelt, bei der ein Zytokin die Menge des nachfolgenden Zytokins reguliert oder zumindest beeinflusst.

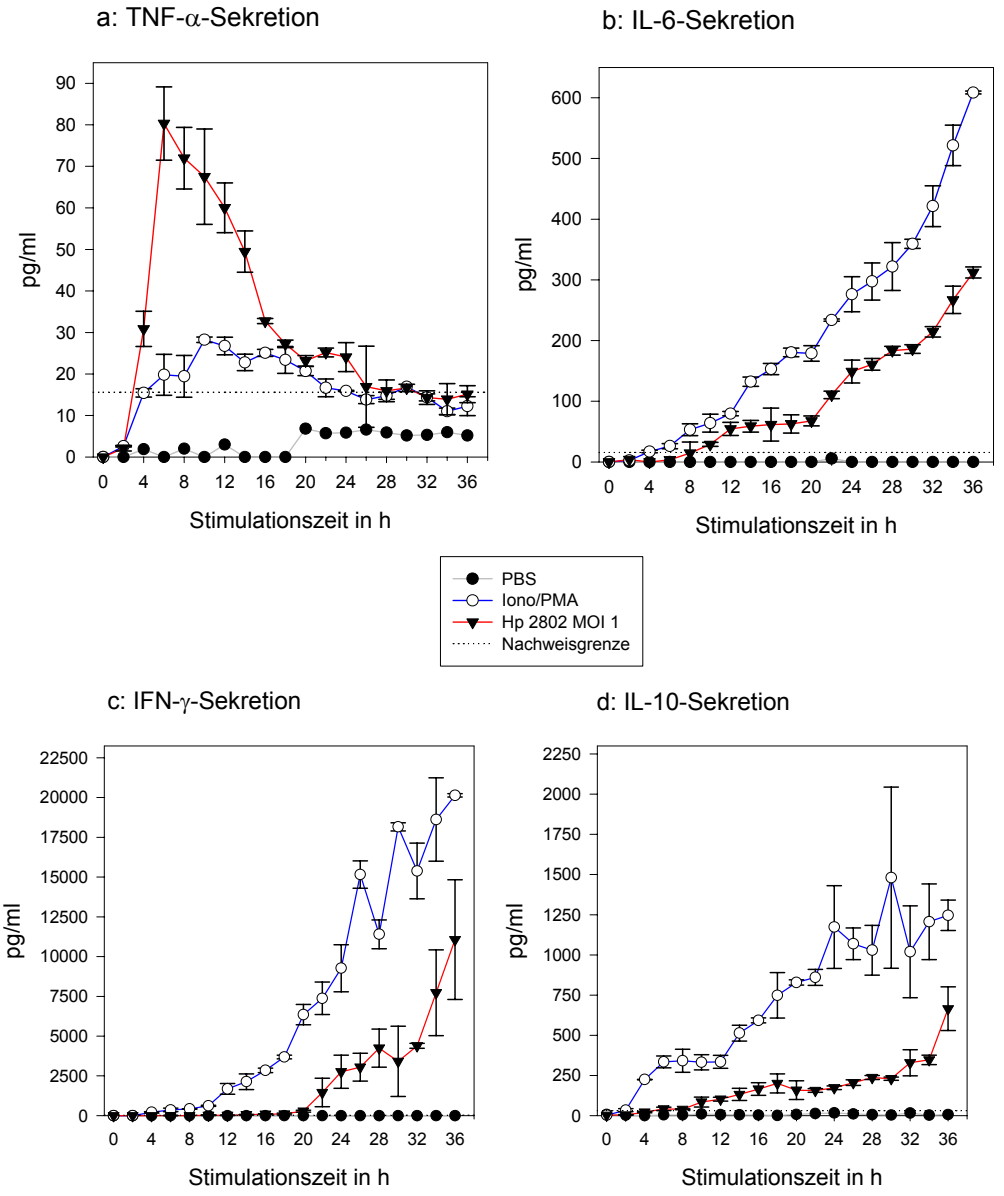


Abbildung 4: Kinetik der Sekretion von TNF-α, IL-6, IFN-γ und IL-10 durch Maussplenozyten nach Stimulation mit *H. pylori* über 36 Stunden, Positivkontrolle: Iono/PMA, Negativkontrolle: PBS, gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und die Standardabweichungen

Die Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 nach 4 (Iono/PMA) und 10 Stunden (*H. pylori*) zeigte, dass eine Hemmung der Sekretion der pro-

inflammatorischen Zytokine durch IL-10 relativ früh einsetzte um eine unkontrollierte Immunantwort zu verhindern (Abbildung 4d). Mit Konzentrationen von 645±136pg/ml (*H. pylori*) und 1.246±564pg/ml (Iono/PMA) war IL-10 nach IFN-γ das Zytokin mit der zweithöchsten Konzentration.
Bei allen vier Zytokinen blieb die Negativkontrolle mit PBS unterhalb der Nachweisgrenze.

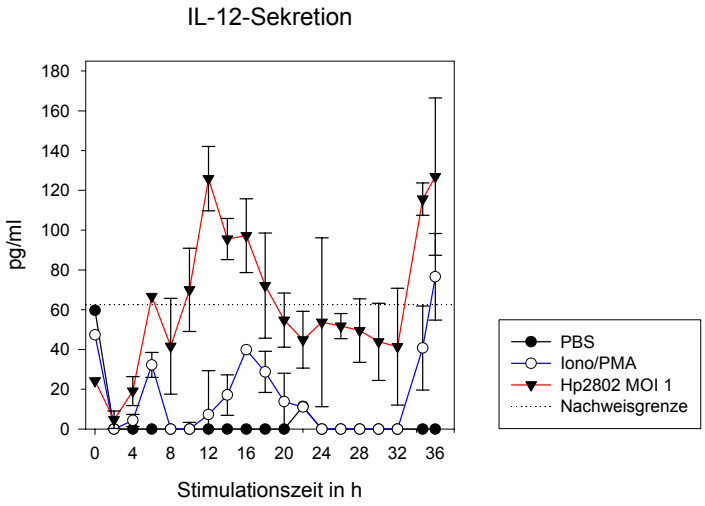


Abbildung 5: Kinetik der IL-12-Sekretion durch Maussplenozyten
nach Stimulation mit *H. pylori* über 36 Stunden, Positivkontrolle: Iono/PMA, Negativkontrolle: PBS, gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und die Standardabweichungen

Im Gegensatz zu anderen Zytokinen waren bei IL-12 keine klaren Phasen mit Anstieg oder Abfall der Sekretion zu erkennen. Obwohl IL-12, wie auch in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe für die Stimulation mit *H. pylori* gezeigt, essentiell für die Induktion der IFN-γ-Sekretion ist, waren die produzierten Mengen nur sehr gering (Abbas et al., 2003; Aigner, 2004). Nach Stimulation mit *H. pylori* wurde nur bei acht von 19 Messpunkten überhaupt die Nachweisgrenze des ELISAs überschritten, bei Stimulation mit Iono/PMA sogar nur in einem Fall (Abbildung 5). Dies deutet darauf hin, dass bereits sehr geringe Mengen zur Stimulation der IFN-γ-Produktion ausreichen.

Allgemein muss zu den Versuchen gesagt werden, dass eine zum Teil erhebliche Variabilität in der Menge der Zytokinsekretion und der Oberflächenproteinexpression festgestellt werden konnte. Dieses Phänomen kann sowohl an der unterschiedlichen Vitalität der zu stimulierenden Zellen, als auch am verwendeten *H. pylori* liegen. Auch Varianzen bei den Zytokinnachweisen lassen sich trotz aller Standardisierung der Versuchsbedingungen nicht vermeiden. Diese Tatsachen sind bekannt und wurden auch innerhalb der Arbeitgruppe mehrfach beobachtet (Aigner, 2004; Decker, 2000).

5.2 Kinetik der Zytokinsekretion von RAW264.7-Makrophagen

Da Makrophagen als wichtige Effektorzellen des angeborenen Immunsystems gelten und eine der Hauptquellen der TNF-α-Sekretion sind, sollte auf Basis der Versuche in 5.1 die Immunantwort von Makrophagen auf *H. pylori* untersucht werden (Abbas et al., 2003; Männel et al., 2000). In Untersuchungen der Arbeitsgruppe zur prozentualen Verteilung der einzelnen Lymphozytenpopulationen innerhalb der Milz konnte gezeigt werden, dass Makrophagen nur etwa 3,5% der Lymphozyten in der Milz ausmachen (Schütz, 2004). Aufgrund dieser Tatsache erschien die Gewinnung von primären Makrophagen aus der Milz nicht praktikabel. Deshalb wurden die Versuche mit Makrophagen der immortalisierten Tumorzelllinie RAW264.7 durchgeführt (Aderem et al., 1999).

Zur Ermittlung der am besten geeigneten MOI wurden die RAW-Makrophagen mit drei verschiedenen MOIs des *H. pylori*-Stammes 2802 stimuliert: 5, 10 und 50. Als Positivkontrolle diente LPS in einer Konzentration von 25µg/ml, PBS wurde als Negativkontrolle verwendet. Die Überstände der Stimulation wurden nach 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 8, 16 und 24 Stunden abgenommen. Für die ELISA-Analysen wurden Überstände von parallelen Ansätzen vereinigt und anschließend gemessen, deshalb konnten die Daten in Abbildung 6 nicht statistisch untersucht werden.
Wie in den Versuchen mit Splenozyten aus der Maus (5.1), zeigte sich auch hier eine zeitliche Abhängigkeit der Zytokinsekretion. Im Makrophagenmodell lag die TNF-α-Konzentration bereits nach einer Stunde deutlich über dem Ausgangsniveau (Abbildung 6a). So betrug die TNF-α-Produktion bei einer MOI von 5 nach einer Stunde 2.036pg/ml im Vergleich zu 736pg/ml nach einer halben Stunde (+177%). Die nachgewiesene TNF-α-Konzentration stieg bei allen verwendeten MOIs kontinuierlich an, bei MOI 5 betrug sie nach 24 Stunden 52.000 pg/ml, bei den MOIs 10 und 50 86.000 bzw. 89.000pg/ml. Bei der Negativkontrolle lagen die TNF-α-Konzentrationen zwischen 400 und 1.000pg/ml, nach 24 Stunden war jedoch ein Anstieg auf 12.800pg/ml zu beobachten. Im Gegensatz zu den Splenozytenversuchen, bei denen die MOI 1 betrug, waren die hier eingesetzten MOIs mit 5, 10 und 50 deutlich höher. Vorversuche zur MOI hatten ergeben, dass eine MOI von mindestens 5 notwendig ist, um eine messbare Zytokinsekretion zu erzielen (Daten nicht gezeigt).
Bei LPS-Stimulation war nach 4 Stunden erstmals eine deutliche Zunahme von IL-6 nachweisbar, die Konzentration lag bei 112pg/ml im Vergleich zum Ausgangswert von weniger als 10pg/ml (Abbildung 6b). Auch hier trat, wie bei den Splenozyten, die Sekretion bei Stimulation mit *H. pylori* zeitlich verzögert auf, die Konzentration lag jedoch nach 8 Stunden bei 1.116pg/ml (MOI 5) und 3.324pg/ml (MOI 10) und damit über dem Wert von LPS (991pg/ml) Zu diesem Zeitpunkt betrug die IL-6-Sekretion

bei einer MOI von 50 nur 358pg/ml. Dies ist ungewöhnlich, weil aufgrund der stärkeren Stimulation eine höhere Zytokinkonzentration zu erwarten gewesen wäre.
In allen vier Versuchen mit unterschiedlichen Stimuli wurde die höchste gemessene IL-6-Konzentration nach 24 Stunden erreicht. Sie lag zwischen 9.112pg/ml für die LPS-Stimulation und 20.940pg/ml bei MOI 50. Die Maximalwerte für MOI 5 und MOI 10 lagen dazwischen. Nach Beginn der Zytokinfreisetzung stieg die IL-6-Konzentration bis zum Versuchsende kontinuierlich an.

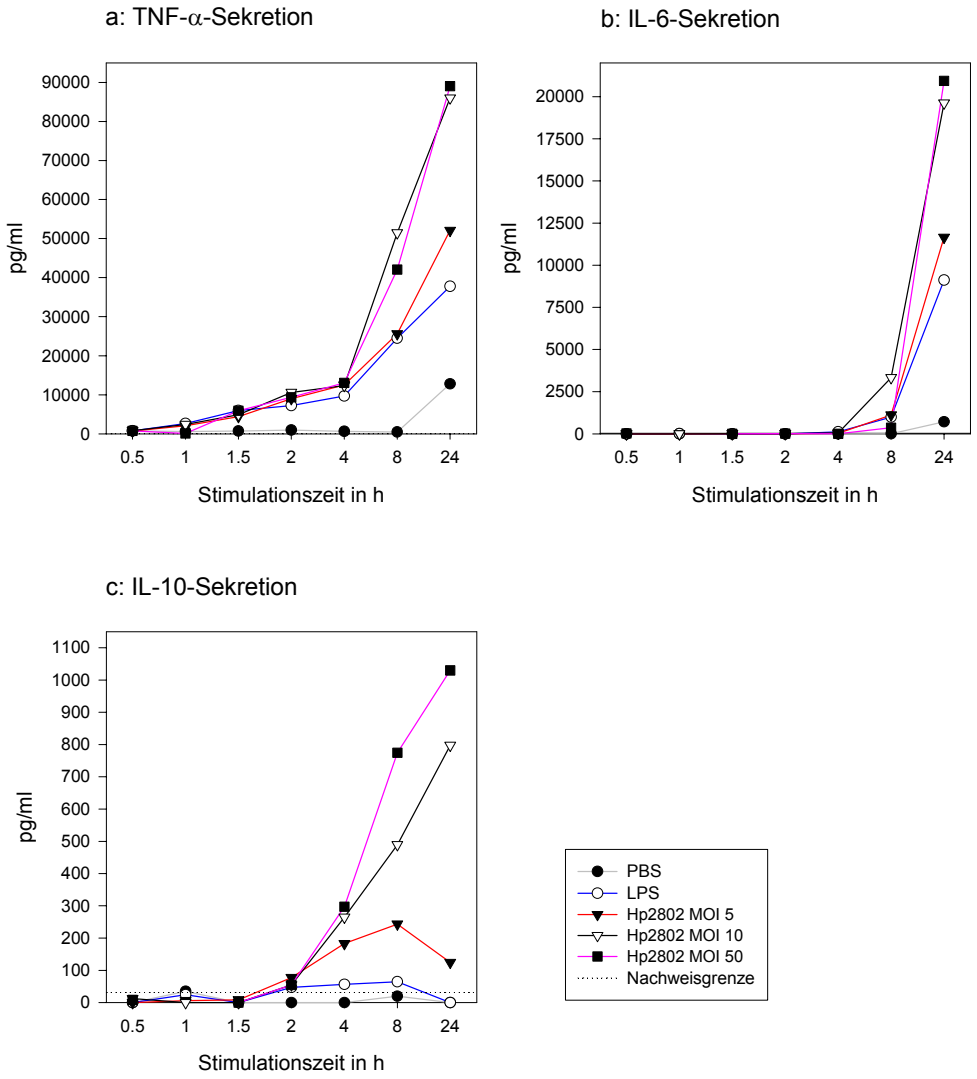


Abbildung 6: Kinetik der TNF-α–, IL-6- und IL-10-Sekretion muriner RAW264.7-Makrophagen nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 5, 10 und 50 über 24 Stunden, Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, repräsentatives Ergebnis, die Proben wurden vor dem ELISA gepoolt

Die Sekretion von IL-10 setzte schon nach 2 Stunden ein. Nach 24 Stunden Stimulation mit *H. pylori* wurden abhängig von der MOI Konzentrationen von 125 (MOI 5) bis 1.030pg/ml (MOI 50) gemessen. Die höchste IL-10-Konzentration nach LPS-Stimulation betrug dagegen nur 65pg/ml. Die Freisetzung von IL-10 zeigte im Gegensatz zu TNF-α und IL-6 nicht nur im Bezug auf die Konzentration, sondern

auch im Sekretionsprofil eine Abhängigkeit von der MOI. Während bei einer MOI von 5 nach 8 Stunden der höchste IL-10-Wert gemessen wurde, wurde bei MOI 10 und 50 die höchste Konzentration nach 24 Stunden erreicht. Trotz dieser frühen Sekretion von IL-10 war nach 24 Stunden noch kein Rückgang der TNF-α-Konzentration erkennbar.

Im Vergleich zu den Splenozyten zeigten sich in der Zytokinsekretion einige Unterschiede, so wurde zum Beispiel bei der TNF-α–Konzentration kein Maximum erreicht.

5.3 Untersuchungen an primären murinen Makrophagen

Wie in 5.2 gezeigt, eignete sich die Zelllinie RAW264.7 nur bedingt als Modell für die Untersuchungen an Makrophagen. Um den beschriebenen Schwierigkeiten mit der Gewinnung von Makrophagen aus der Milz aus dem Weg zu gehen, wurden die Makrophagen aus Monozyten des Knochenmarks differenziert.
Makrophagen wurden wie unter 4.3.1.1.2 beschrieben aus den Hinterbeinknochen (Femur und Tibia) von C57BL/6-Mäusen gewonnen. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass primäre Makrophagen leichter stimulierbar sind als Zellen aus einer immortalisierten Zelllinie (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden die Stimuluskonzentrationen für die Versuche zur Etablierung des Assays deutlich reduziert. LPS wurde in einer Konzentration von 100ng/ml eingesetzt und die Infektion mit *H. pylori* erfolgte mit MOIs von 1 und 5.

Die primären Makrophagen zeigten im Vergleich zu den RAW264.7-Makrophagen einen auffälligen Unterschied: Sowohl bei der Sekretion von TNF-α, als auch bei der Sekretion von IL-10 war bei den primären Zellen ein Maximalwert zu erkennen (Abbildung 7a+c). Besonders auffällig war dies bei TNF-α. Während bei den RAW264.7-Zellen die Sekretion dieses Zytokins über einen Zeitraum von 48 Stunden anstieg (Daten nicht gezeigt), war bei den primären Makrophagen schon nach 4 Stunden ein Maximum erreicht. Der anschließende Rückgang der Zytokinkonzentration war vor allem bei der Stimulation mit LPS stark ausgeprägt, hier sank der Wert von 8.870±2.199pg/ml nach 4 Stunden auf 927±61 nach 12 Stunden. Nach Stimulation mit *H. pylori* war dieser Effekt geringer ausgeprägt. Bei Stimulation mit *H. pylori* 2802 mit einer MOI von 1 sank die TNF-α-Konzentration von 1.922±1.271 auf 396±6pg/ml, bei einer MOI von 5 von 6.672±1.631 auf 4.021±1.450pg/ml. Die TNF-α-Sekretion fiel also bei der Stimulation mit einer MOI von 1 deutlich niedriger aus als bei MOI 5.

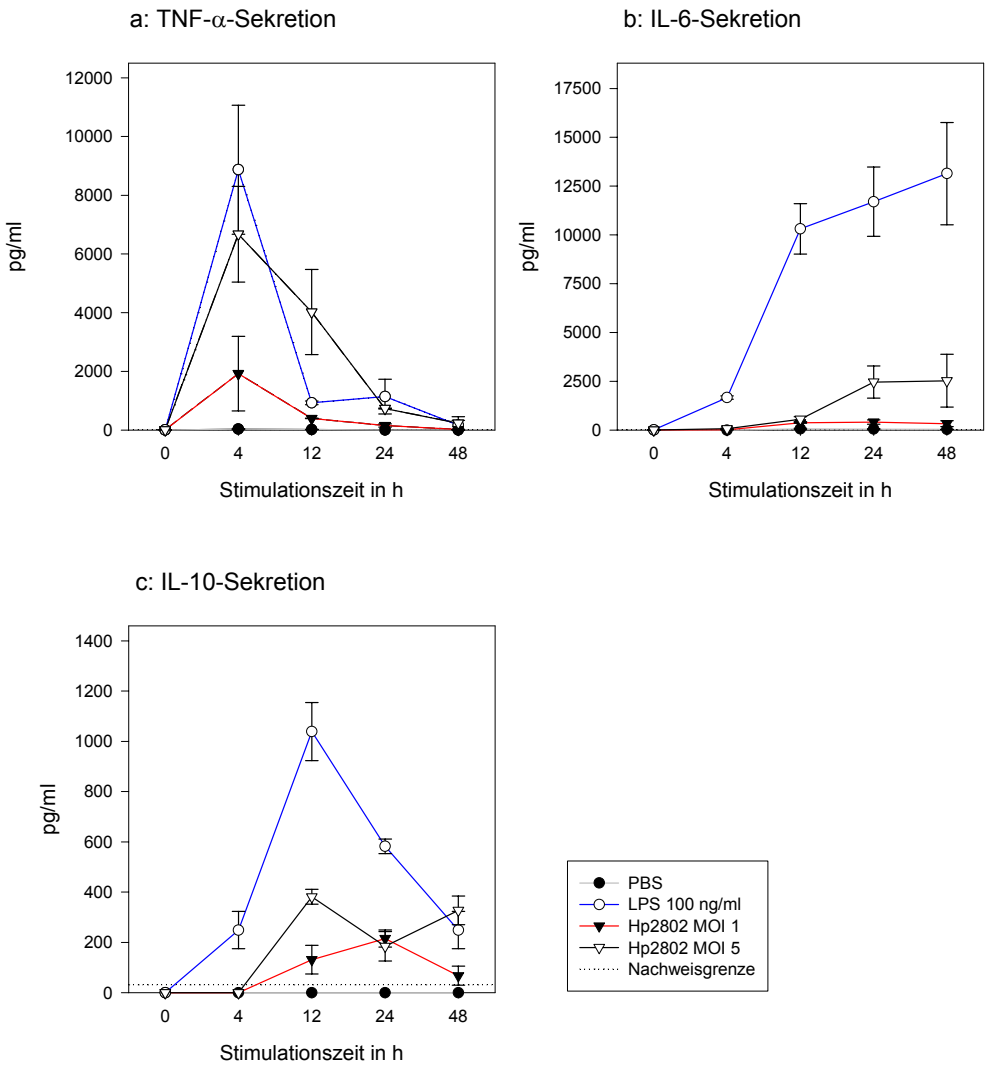


Abbildung 7: Kinetik der Sekretion von TNF-α, IL-6 und IL-10 von Makrophagen aus C57BL/6-Mäusen nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 und 5 über 48 Stunden. Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen

Ähnliches konnte bei der IL-10-Sekretion beobachtet werden, hier trat das Maximum jedoch nach 12 (LPS und *H. pylori* MOI 5) bzw. 24 (*H. pylori* MOI 1) Stunden auf. Insgesamt waren der Anstieg und der Abfall in der IL-10-Sekretion (Abbildung 7c) schwächer ausgeprägt als bei TNF-α. Bei LPS ging die Zytokinkonzentration von 1.039±116 auf 583±29pg/ml zurück, bei *H. pylori* MOI 5 von 382±29 auf 185±59pg/ml. Stärker war die Reduktion bei einer MOI von 1, von 215±34 auf 68±38pg/ml.

Im Gegensatz dazu verhielt sich die Sekretion von IL-6 ähnlich wie bei Splenozyten und RAW264.7-Makrophagen, die sezernierte Zytokinmenge stieg über die Versuchszeit kontinuierlich an (Abbildung 7b). Auffallend war allerdings die Tatsache, dass die Menge des gebildeten IL-6 in etwa auf demselben Niveau lag wie die von TNF-α, während sie bei den RAW264.7-Makrophagen meist etwa eine Zehnerpotenz niedriger war (vgl. 5.2). Konkret lagen die gemessenen IL-6-Maximalwerte bei

13.141±2.621pg/ml für LPS, 2.527±1.351pg/ml für *H. pylori* MOI 5 und 413±108pg/ml für *H. pylori* MOI 1. Obwohl die IL-6-Konzentration bei *H. pylori* MOI 1 weit niedriger war als bei den anderen Stimuli, lag sie immer noch deutlich über dem Wert der Negativkontrolle, dessen Maximum bei 59±33pg/ml lag.

Im Rahmen der Versuche sollte auch eine eventuelle Veränderung von Oberflächenantigenen als Reaktion auf Stimulation mit *H. pylori* untersucht werden. Die Untersuchungen wurden mit dem Adhäsionsmolekül CD54 (*intercellular adhesion molecule*-1, ICAM-1), welches den Zell-Zell-Kontakt verstärkt, und dem T-Zell Interaktionsmolekül CD40, das zur Stimulation von T-Zellen dient, durchgeführt.

Außer bei der Negativkontrolle zeigten alle Ansätze bei zunehmender Stimulationsdauer einen starken Anstieg in der Gesamtfluoreszenz. Am stärksten war die Aktivierung von CD54 durch Stimulation mit *H. pylori* bei MOI 5. Hier lag die maximale Gesamtfluoreszenz bei 4.374, der Wert bei MOI 1 betrug maximal 2.771, der der LPS-Stimulation 3.247. Wie bei der Zytokinsekretion war der Anstieg der Expression der Oberflächenproteine bei MOI 1 geringer als bei MOI 5 und LPS.

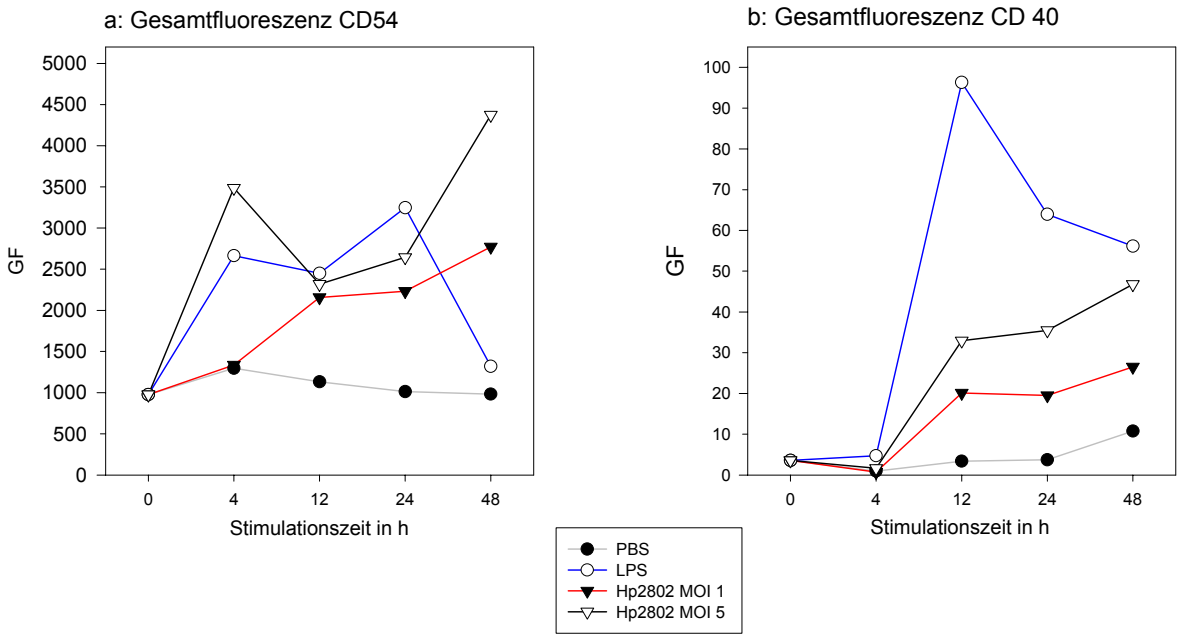


Abbildung 8: Kinetik der CD54- und CD40-Expression von Makrophagen aus C57BL/6-Mäusen nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 und 5 über 48 Stunden. Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, die Zellen aus drei unabhängigen Experimenten wurden vor der FACS-Analyse gepoolt

Als weiterer Oberflächenrezeptor wurde der T-Zell-Interaktionsmarker CD40 untersucht (Abbildung 8b). Obwohl die Absolutmenge der Gesamtfluoreszenz im Vergleich zu CD54 gering war, zeigte sich bei allen Stimulationen nach 12 Stunden ein erkennbarer Anstieg. Die mit LPS stimulierten Proben erreichten zu diesem Zeitpunkt schon den Maximalwert von 93, während bei *H. pylori*-Stimulation die

Werte bis 24 Stunden kontinuierlich anstiegen und zum Endzeitpunkt maximal 27 (MOI 1) bzw. 47 (MOI 5) erreichten.

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass sowohl die Konzentration der untersuchten Zytokine (TNF-α, IL-6 und IL-10) als auch die Expression der Oberflächenproteine CD40 und CD54 von der MOI des eingesetzten *H. pylori* abhängig war. Des Weiteren zeigte sich bei den primären Makrophagen wie bei den Splenozyten ein Maximum in der TNF-α-Sekretion, welches nach 4 Stunden auftrat.

5.4 Einfluss von TLR4 auf die *H. pylori*-Stimulation von murinen Makrophagen und dendritischen Zellen

Im Rahmen dieser Experimente sollte ermittelt werden, welchen Anteil TLR4 an der Immunantwort von Makrophagen und DCs auf *H. pylori* hat. Zu diesem Zweck wurden Mäuse des Stammes C3H verwendet, zum einen der Wildtypstamm (WT) C3H/HeN und zum anderen die Defektmutante (DM) C3H/HeJ. Die Mutante C3H/HeJ hat aufgrund eines Aminosäureaustausches in der TLR4-Sequenz einen nicht funktionellen TLR4 (Bäckhed et al., 2003; Underhill et al., 2002). Da die Funktionalität dieses Rezeptors essentiell für die Immunantwort auf LPS ist, kommt es zu einer weitaus geringeren Reaktion auf LPS, die betroffenen Mäuse sind also hyporesponsiv.

5.4.1 Untersuchung von primären Makrophagen nach Stimulation mit *H. pylori*

Die Versuche mit Makrophagen aus C3H-Mäusen wurden mit einer *H. pylori* MOI von 5 und ansonsten unter denselben Bedingungen durchgeführt wie die Untersuchungen an C57BL/6-Mäusen (5.3).

In Abbildung 9 und Abbildung 10 werden die Folgen dieser Aminosäuresubstitution auf die Zytokinsekretion und die Oberflächenproteinexpression nach Stimulation mit *H. pylori* anhand der Daten eines repräsentativen Versuchs dargestellt.
Abbildung 9a zeigt die TNF-α-Sekretion der beiden Stämme. Erwartungsgemäß war die Zytokinkonzentration nach LPS-Stimulation der DM mit einem Maximalwert von 126±12pg/ml dramatisch geringer als die des WT, bei dem 2.817±299pg/ml, also etwa der 20-fache Wert, gemessen wurde. Im Vergleich zu LPS führte die Stimulation der DM mit *H. pylori* zu geringeren Unterschieden in der Zytokinsekretion. Die Zytokinkonzentration betrug nach 12 Stunden 3.210±397pg/ml für den WT, gegenüber 1.652±52pg/ml für die DM.

Anders zeigte sich der Effekt der TLR4-Defizienz auf die Sekretion von IL-6, in beiden Stimulationen sezernierte die DM etwa die Hälfte der Zytokinmenge wie der WT (Abbildung 9 b). Es zeigte sich kein Unterschied zwischen der Stimulation mit LPS und der mit *H. pylori*. Die IL-6-Konzentration lag etwa eine Zehnerpotenz höher als die von TNF-α.

Die Stimulation mit LPS führte dagegen zu deutlichen Unterschieden in der IL-10-Freisetzung zwischen Makrophagen aus dem WT und der DM. Die Makrophagen aus der DM setze zu allen Zeitpunkten weniger als die Hälfte der Menge des WT frei. Im Gegensatz dazu konnte bei der Sekretion von IL-10 nach Stimulation mit *H. pylori* keine Abhängigkeit von TLR4 festgestellt werden, die Zytokinkonzentration war bei beiden Mausgenotypen fast identisch.

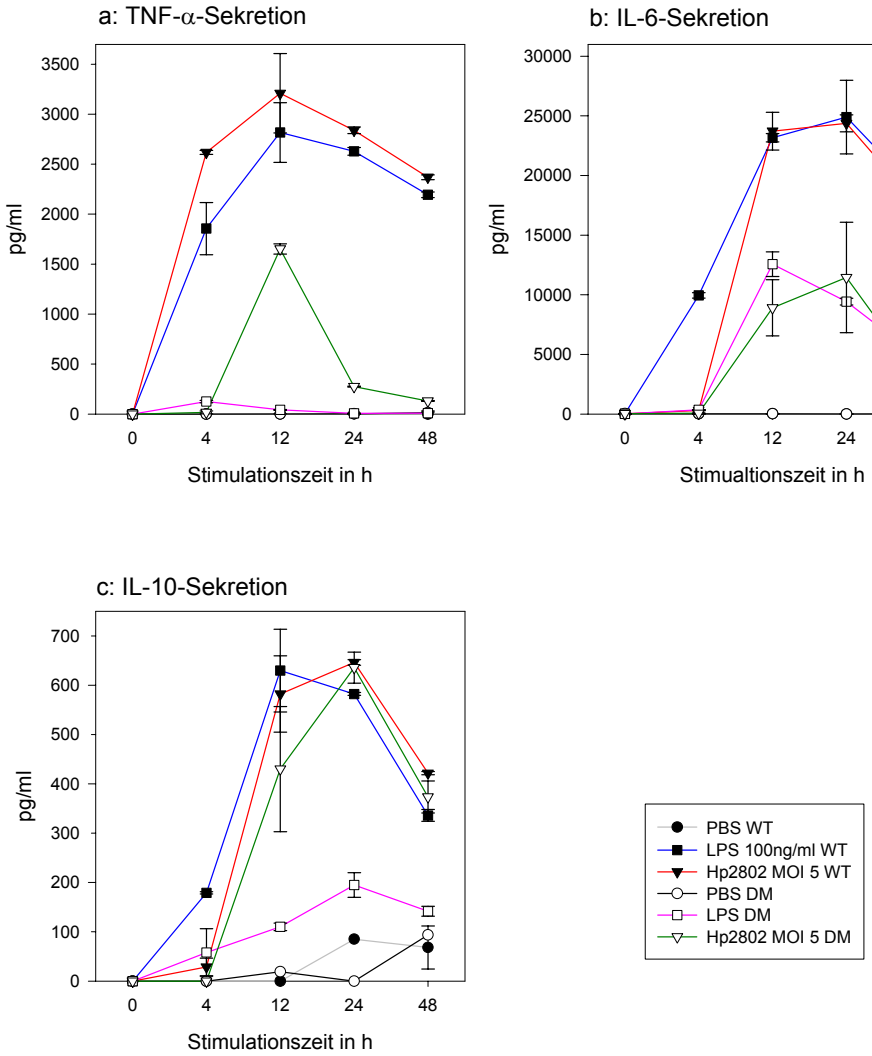


Abbildung 9: Vergleich der TNF-α, IL-6 und IL-10-Sekretion von Makrophagen aus WT und DM nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 5 über 48 Stunden. Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und die Standardabweichungen

Auch in den Analysen von CD40 und CD54 konnte der Einfluss von TLR4 auf die Expression der Oberflächenproteine nachgewiesen werden. Wie aus Abbildung 10a

zu sehen ist, war die CD40-Expression nach Stimulation zumindest teilweise TLR4-abhängig. Am deutlichsten war dieser Effekt bei der Stimulation mit LPS, hier betrug die Gesamtfluoreszenz der DM nur 8,4 im Vergleich zu 50,7 beim WT. Insgesamt geringer fiel die Stimulation durch *H. pylori* aus, beim WT wurde noch eine Gesamtfluoreszenz von 15,2 gemessen, bei der DM nur noch von 6,7.

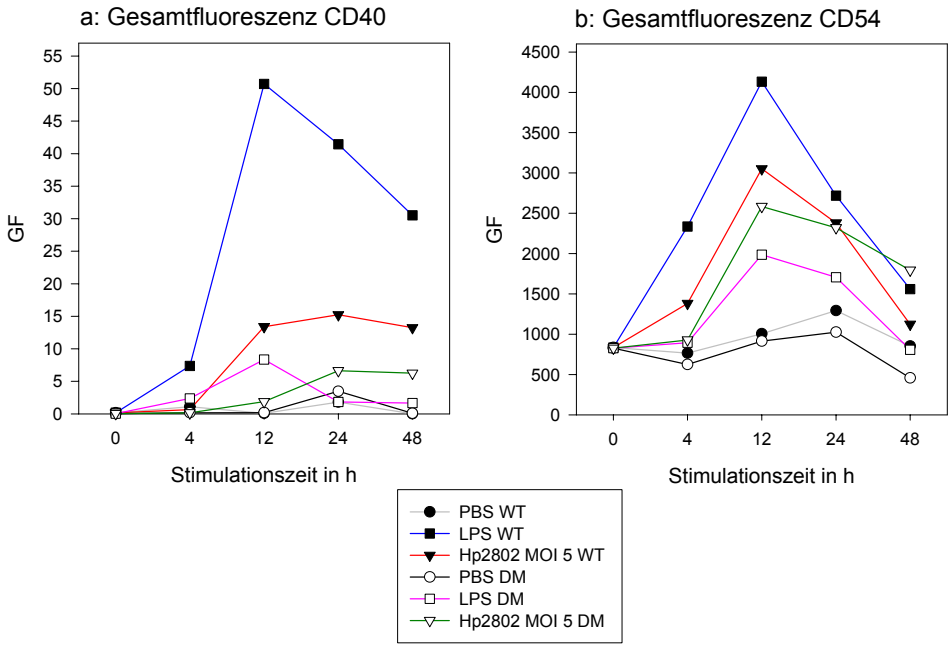


Abbildung 10: Vergleich der Gesamtfluoreszenz von CD40 und CD54 von Makrophagen aus WT und DM nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 5 über 48 Stunden
Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, die Zellen aus drei unabhängigen Experimenten wurden vor der FACS-Analyse gepoolt

Geringere Effekte als bei der CD40- waren bei der CD54-Expression zu erkennen (Abbildung 10b). Die höchsten gemessenen Werte lagen nach Stimulation mit LPS bei 4.100 für den WT und 2.000 für die DM. Auch bei diesem Oberflächenprotein war der stimulatorische Effekt durch *H. pylori* beim WT geringer als durch LPS, die höchsten Werte lagen bei 3.000 (WT) und 2.300 (DM). Auch die Differenz zwischen WT und DM war also kleiner als bei LPS-Stimulation.

Es konnte bei den Makrophagen gezeigt werden, dass die Verringerung der Zytokinsekretion und der Expression der Oberflächenproteine durch den defekten TLR4 bei Stimulation mit *E. coli*-LPS stärker war als nach Stimulation mit *H. pylori*. Es zeigte sich aber auch, dass bei der Immunantwort auf *H. pylori* neben TLR4 noch andere Faktoren eine Rolle spielen, die zur Stimulation der Makrophagen führen.

5.4.2 Untersuchungen von murinen DCs nach Stimulation mit *H. pylori*

Dendritische Zellen spielen als professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) neben makrophagen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort. Die Ruppen von Rescigno et al. (2002) konnte zeigen, dass die Stimulation von TLR4-defizienten Mäusen mit *E. coli* zur Reifung von DCs führt. Um den Einfluss von TLR4 auf die Reifung von DCs nach Stimulation mit *H. pylori* zu untersuchen und die Ergebnisse aus den Versuchen mit den Makrophagen aus C3H-Mäusen zu ergänzen, wurden Experimente mit DCs aus diesen Mäusen mit nicht funktionellem TLR4 durchgeführt. Aus Knochenmarkszellen wurden gemäß Protokoll (4.3.1.1.3) DCs generiert. Diese wurden dann für 0, 4, 12 und 24 Stunden mit *H. pylori* MOI 10 und LPS (100ng/ml) als Positivkontrolle stimuliert. PBS war in allen Versuchen die Negativkontrolle. Vorversuche hatten ergeben, dass bei DCs *H.pylori*-Stimulationen mit einer MOI von 10 durchgeführt werden müssen, da sonst die Zytokinsekretion zu gering ausfällt (Daten nicht gezeigt).

Da die Unterschiede zwischen TLR4-WT und TLR4-DM in den Zytokinsekretionen und der Expression der Oberflächenproteine zu den verschiedenen Zeitpunkten relativ gering waren, wird in diesem Abschnitt nur auf einige repräsentative Werte eingegangen. Die Abbildungen 11 bis 13 stellen die Messwerte der Zytokine bzw. Oberflächenproteine über den gesamten Zeitraum dar.

Die Sekretion des wichtigen pro-inflammatorischen Zytokins TNF-α ist in Abbildung 11a gezeigt. Bei den aus dem Knochenmark gewonnenen DCs trat im Gegensatz zu Makrophagen (5.4.1) das Maximum der TNF-α-Sekretion schon nach 4 und nicht nach 12 Stunden auf. Dieser Effekt war bei WT und DM zu beobachten, es kam also bei der DM nicht zu einer verzögerten Reaktion auf den Stimulus. Wie aufgrund der Untersuchungen an Makrophagen zu erwartet, waren die Auswirkungen der TLR4-Mutation bei Stimulation mit LPS größer als bei Stimulation mit *H. pylori*. Nur bei der Sekretion von TNF-α kam es 12 und 24 Stunden nach Beginn der Stimulation der DM mit *H. pylori* und LPS zu einer signifikant geringeren Zytokinsekretion als beim WT ($p \leq 0{,}001$).

Die sezernierte IL-6-Menge stieg dagegen über den gesamten Stimulationszeitraum von 24 Stunden an, einzige Ausnahme bildete die Stimulation der DM mit *H. pylori*, hier sank die IL-6-Sekretion nach 12 Stunden wieder ab (Abbildung 11b). Trotz der augenscheinlich großen Differenzen, konnten aufgrung der Interassay-Varianz keine signifikanten Unterschiede gemessen werden. Ähnlich wie bei den primären Makrophagen war auch hier die IL-6-Konzentration etwa eine Zehnerpotenz höher als die von TNF-α.

Die Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 war bei der DM nur nach Stimulation mit LPS signifikant geringer als beim WT (Abbildung 11c). So betrugen die Messwerte nach 12 Stunden 391±47 und 89pg/ml für WT und DM. Die Differenz

bei Stimulation mit H. pylori war zum gleichen Zeitpunkt geringer, die Werte lagen bei 341±22pg/ml für den WT bzw. 205±68pg/ml für die DM.

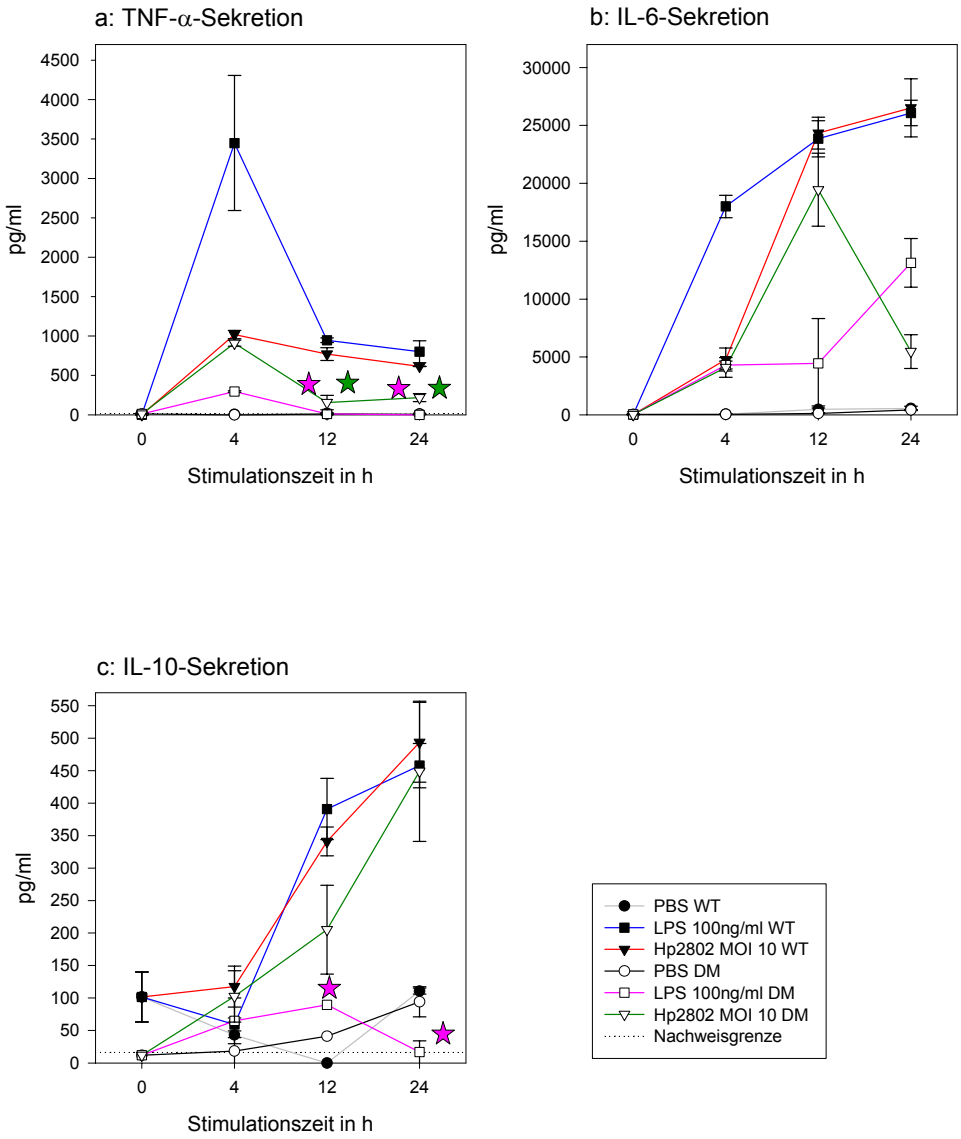


Abbildung 11: Vergleich der TNF-α–, IL-6- und IL-10-Sekretion von DCs aus WT und DM nach Stimulation mit H. pylori MOI 10 über 24 Stunden.
Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und die Standardabweichungen, Signifikanz bezogen auf den WT und den jeweiligen Stimulus

Wie bei den Makrophagen wurden auch bei den DCs verschiedene Oberflächenproteine auf Unterschiede in der Expression untersucht. Da das Molekül CD11c nicht nur als Adhäsionsprotein für andere Zellen fungiert, sondern auch einen Indikator für die Reifung der DCs darstellt, wurde auch dieses untersucht. Bei der Stimulation mit *H. pylori* zeigten sich nur geringe Unterschiede zwischen dem WT und der DM (Abbildung 12a), beide Zellpopulationen reiften also gleich gut aus. Größer waren die Differenzen bei der Stimulation mit LPS, die Gesamtfluoreszenz der DM war mit 418 nach 12 Stunden im Vergleich deutlich niedriger als die des WT

(523). Dies deutet darauf hin, dass LPS für DCs aus der DM einen schwächeren Stimulus zur Reifung darstellt als *H. pylori*.
Der geringe Einfluss der TLR4-Defizienz bei Stimulation mit *H. pylori* ist ein Anzeichen dafür, dass die Fähigkeit der DCs zur Reifung durch die Mutation im TLR4 nicht beeinträchtigt ist.

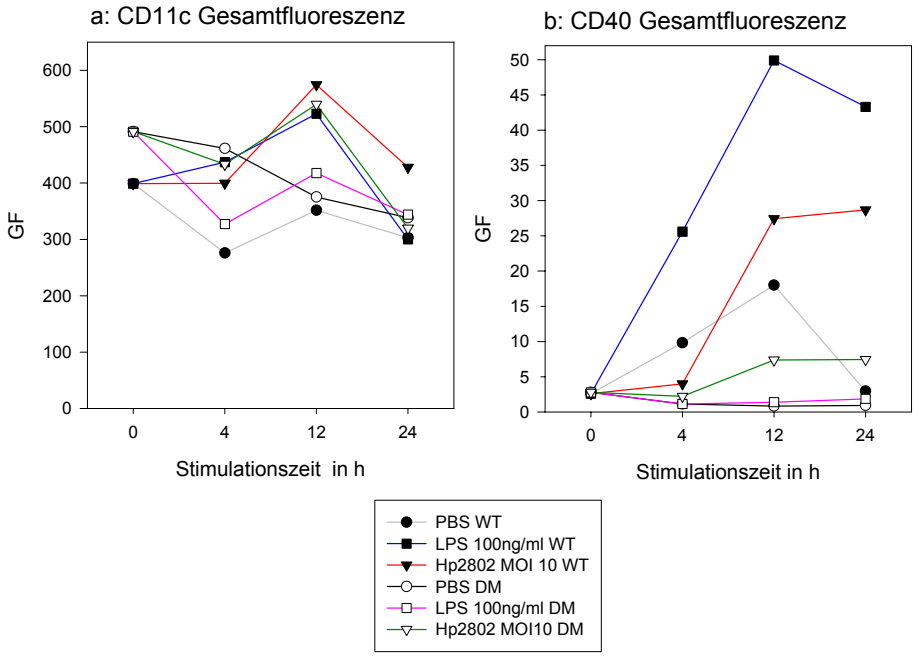


Abbildung 12: Vergleich der Gesamtfluoreszenz von CD11c und CD40 von DCs aus WT und DM nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 10 über 24 Stunden.
Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, die Zellen aus drei unabhängigen Experimenten wurden vor der FACS-Analyse gepoolt

Bei CD40, das zur Aktivierung von T-Zellen dient, konnte der stärkste Einfluss der TLR4-Mutation auf die Gesamtfluoreszenz nach Stimulation beobachtet werden. Bei der DM wurden nach LPS-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle kaum Veränderungen in der Gesamtfluoreszenz gemessen (Abbildung 12b). Die Werte lagen bei 0,9 (Negativkontrolle) und 1,9 (LPS-Stimulation). Etwas stärker war der Anstieg der Gesamtfluoreszenz bei Stimulation mit *H. pylori*, die Gesamtfluoreszenz betrug 7,4. Damit lag sie aber immer noch um den Faktor 4 unter dem Wert des WT von 29. Noch deutlicher war die Differenz bei Stimulation mit LPS erkennbar, der WT erreichte eine Gesamtfluoreszenz von 50, die DM nur von 1,9.
Auch die Expression des Oberflächenproteins CD54 (ICAM-1) zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Stimulation (Abbildung 13a). Von 3.633 zum Ausgangszeitpunkt stieg die Gesamtfluoreszenz auf Maximalwerte von 8.951 (LPS, 12 Std.) bzw. 8.190 (*H. pylori*, 24 Std.). Die Gesamtfluoreszenz nach Stimulation mit *H. pylori* lag damit ca. 25% über dem Wert der Negativkontrolle von 6.190. Vergleichsweise gering waren die Auswirkungen der Stimulation auf die DM. Von

3.838 stieg der Wert bei LPS-Stimulation auf maximal 5.236 nach 4 Stunden, das war etwa ein Drittel weniger als beim WT zur gleichen Zeit. Ähnliche Ergebnisse wurden nach *H. pylori*-Stimulation gemessen. Wie beim WT wurde für die DM die stärkste Gesamtfluoreszenz nach 24 Stunden erreicht, sie war aber mit 5.741 schwächer als der Vergleichswert (WT: 8.190). Bei der Negativkontrolle erfolgte nur ein geringfügiger Anstieg auf 4.605.

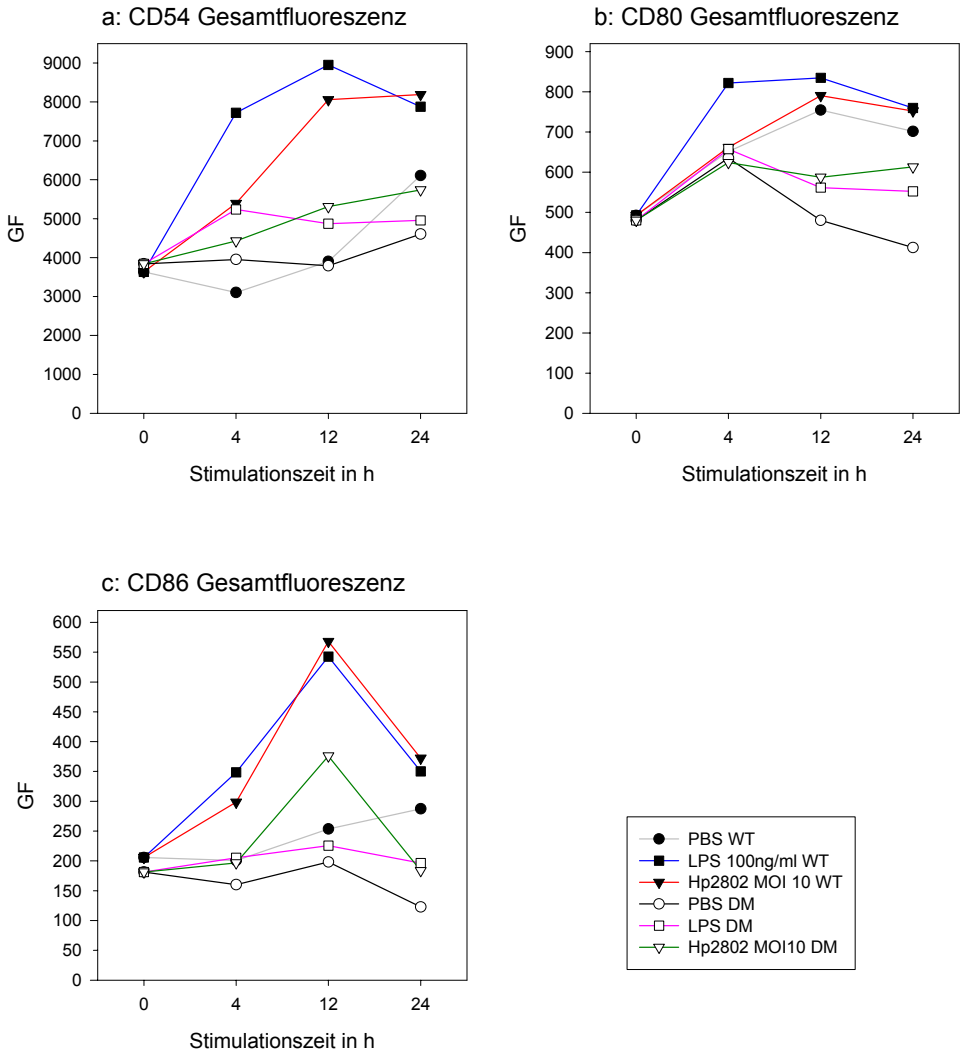


Abbildung 13: Vergleich der Gesamtfluoreszenz von CD54, CD80 und CD86 von DCs aus WT und DM nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 10 über 24 Stunden.
Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, die Zellen aus drei unabhängigen Experimenten wurden vor der FACS-Analyse gepoolt

Insgesamt geringer waren die Veränderungen beim kostimulatorischen Molekül CD80 (Abbildung 13a). Bei Stimulation der WT-Zellen mit *H. pylori* zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle fast keine Veränderung. In beiden Fällen stieg die Gesamtfluoreszenz von 500 auf etwa 650. Bei Stimulation mit LPS war 4 Stunden nach Beginn der Stimulation ein Anstieg auf 822 zu beobachten. Zu den Zeitpunkten 12 und 24 Stunden wurden ähnliche Werte erreicht.

Für die DCs der DM lagen alle Werte von CD80 nach 4 Stunden gleich hoch, erst nach 12 Stunden zeigte sich ein geringer stimulatorischer Effekt. Während die Gesamtfluoreszenz der Negativkontrolle im weiteren Verlauf relativ stark zurückging, blieb sie bei Stimulation mit *H. pylori* gleich. Die Stimulation mit LPS führte nur zu einem leichten Rückgang, was auf einen geringeren stimulatorischen Effekt schließen lässt.

Das ebenfalls kostimulatorische Protein CD86 wurde im Vergleich zum oben beschriebenen CD80 stärker durch die Stimulation beeinflusst (Abbildung 13c). Die stärkste Gesamtfluoreszenz der WT-Zellen nach 12 Stunden war mit Werten von 543 (LPS) bzw. 568 (*H. pylori*) mehr als doppelt so hoch wie für PBS (254). Obwohl beide Werte nach 24 Stunden gesunken waren, blieben sie mit 350 und 372 noch deutlich über dem Wert (287) der nicht stimulierten Zellen.
Die Untersuchung der DM zeigte, dass die Gesamtfluoreszenz nach der LPS-Stimulation geringer angestiegen war als beim WT. Die Stimulation mit *H. pylori* führte nach 12 Stunden fast zu einer Verdoppelung der Gesamtfluoreszenz (+90%), nach 24 Stunden lag der Wert aber wieder auf LPS-Niveau.

Stimulus	**Zytokin**	**Makrophagen**	**DCs**
H. pylori	TNF-α, IL-6	-	-
	IL-10	o	o
LPS	TNF-α, IL-6, IL-10	**- -**	**- -**
	Oberflächenprotein		
H. pylori	CD40, CD54	**-**	**-**
	CD80, CD86	n. g.	**-**
	CD11c	n. g.	o
LPS	CD40, CD54	**- -**	**- -**
	CD11c, CD80, CD86	n. g.	**- -**

Tabelle 5: Vergleich der Zytokinsekretion und der Expression von Oberflächenproteinen der DM im Bezug zum WT. --: starke Abnahme, -: Abnahme, o: keine Veränderung, n.g.: nicht gemessen

Wie bei den Makrophagen führte auch bei dem DCs die Mutation von TLR4 zu einer geringeren Expression von CD40 und CD54 nach Stimulation im Vergleich zum WT. Dies gilt für die Stimulation mit *H. pylori* ebenso wie für die Stimulation mit LPS. Für die DCs konnte zudem gezeigt werden, dass auch die Expression von CD80 und CD86 nach beiden Stimulationen bei der DM geringer ausfällt als beim WT. Dagegen

wurde die Expression von CD11c nur bei Stimulation mit LPS nicht aber nach Stimulation mit *H. pylori* durch den TLR4 beeinflusst.
In Tabelle 5 ist ein Vergleich der Zytokinsekretion sowie der Expression von Oberflächenproteinen von Makrophagen und DCs von DM und WT gezeigt.
Zusammenfassend lässt sich nach der Durchführung von Versuchen mit DCs sagen, dass die Mutation von TLR4 stärkeren Einfluss auf die Immunantwort der Zellen auf LPS als auf *H. pylori* hatte. Dies macht deutlich, dass die Koinkubation mit *H. pylori* eine komplexere Stimulation auslöst, die anscheinend neben TLR4 auch noch von anderen TLRs, z.B. 2 und 5, vermittelt wird. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit Makrophagen konnten also bestätigt werden.

5.5 Versuche mit humanen dendritischen Zellen

Dendritische Zellen (DCs) stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar (Banchereau et al., 1998; Banchereau et al., 2000). Da die Immunantwort humaner Zellen auf eine Infektion mit *H. pylori* von höherem human-medizinischem Interesse ist, als die von murinen Zellen, wurden die folgenden Versuche mit humanen DCs durchgeführt.

5.5.1 Reifung humaner DCs durch Stimulation mit *H. pylori*

Aus der Literatur ist bekannt, dass bakterielle Infektionen zur Reifung von DCs führen, der Einfluss von *H. pylori* auf DCs ist dagegen nur wenig untersucht (Banchereau et al., 2000; Guiney et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit sollte als erstes die optimale *multiplicity of infection* (MOI) für eine Stimulation mit *H. pylori* ermittelt werden.

5.5.1.1 Abhängigkeit der Zytokinsekretion humaner DCs von der *H. pylori*-MOI

Unreife DCs wurden wie unter 4.3.1.1.5 beschrieben aus humanen PBMCs differenziert. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von $1x10^6$ Zellen/ml für 24 Stunden mit *H. pylori* stimuliert. Die untersuchten MOIs lagen zwischen 0,01 und 100. Als Positivkontrolle wurde LPS (100ng/ml), als Negativkontrolle PBS verwendet. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA auf die Zytokine IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 untersucht.

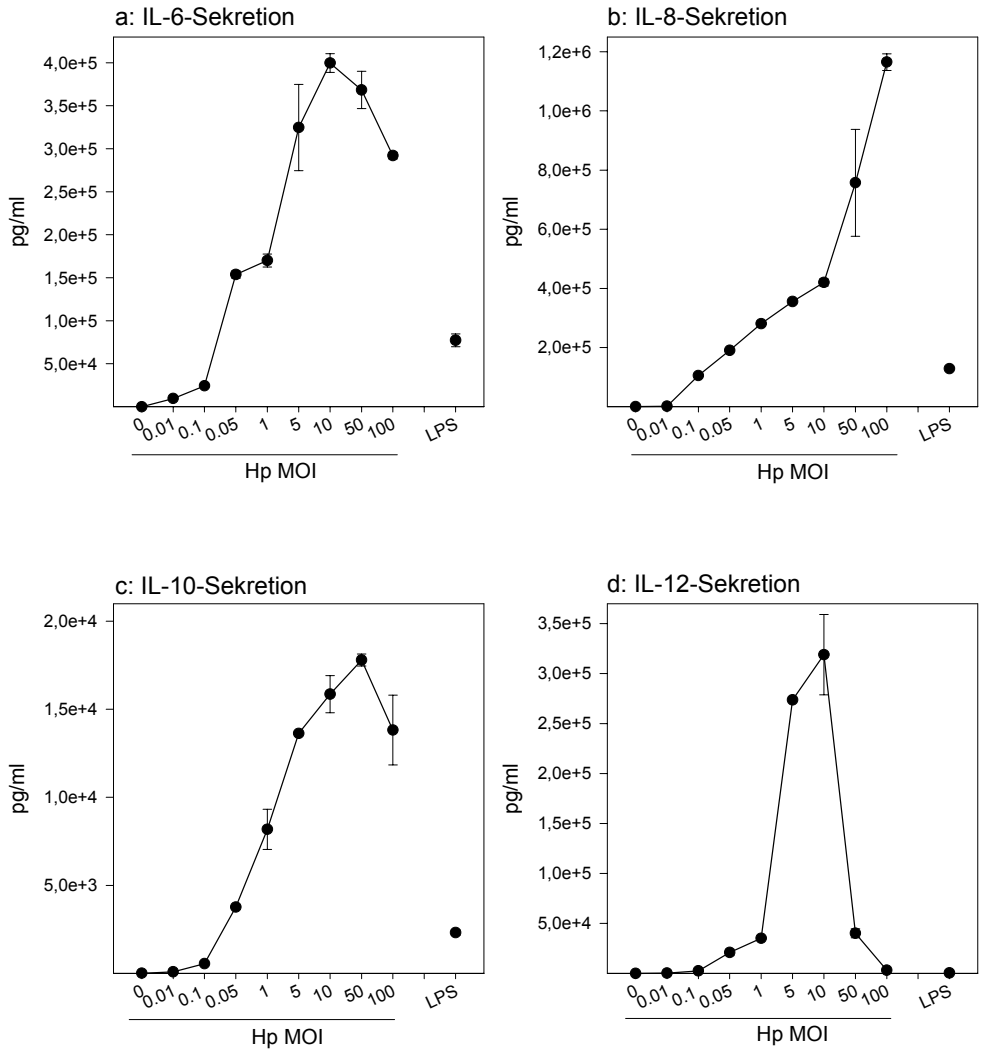


Abbildung 14: Abhängigkeit der Sekretion von IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 humaner DCs von der MOI des eingesetzten *H. pylori*,
Stimulationszeit 24 Stunden, Negativkontrolle: PBS, Positivkontrolle: LPS, gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus einem repräsentativen Experiment

Wie aus Abbildung 14 ersichtlich ist, war die Sekretion der untersuchten Zytokine stark abhängig von der eingesetzten MOI, es zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung der Zytokinfreisetzung. Mit Ausnahme von IL-8 erreichten alle Zytokinkonzentrationen ein Maximum, welches für IL-6 und IL-12 bei einer MOI von 10, für IL-10 bei einer MOI von 50 lag. Durch FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass der Anteil toter Zellen bei MOIs von mehr als 10 über 50% betrug (Daten nicht gezeigt). Schon ab einer MOI von 0,01 lagen die Konzentrationen aller Zytokine oberhalb der Nachweisgrenze, es zeigten sich jedoch erhebliche Unterschiede in den Absolutmengen. Während von IL-10 nur 87±6pg/ml nachweisbar waren, betrug die IL-6-Konzentration 9.553±443. Ähnlich groß waren die Differenzen bei den Maximalwerten. Bei einer MOI von 10 lag die IL-10-Konzentration bei 23.110±1.869pg/ml, die maximale IL-8-Konzentration, die erst bei MOI 100 erreicht

wurde, lag dagegen bei 1.165.000±28.110pg/ml. Die Verwendung von 100ng/ml LPS führte zu einer deutlichen Sekretion aller untersuchten Zytokine.
Aufgrund der gemessenen Zytokinprofile wurde für die weiteren Versuche eine MOI von 1 oder 10 verwendet.

5.5.1.2 Kinetik der Zytokinsekretion humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori*

In weiteren Experimenten sollte der zeitliche Verlauf der Zytokinsekretion näher charakterisiert werden. Dazu wurden 1x10^6 Zellen/ml für 8, 24, 48 oder 72 Stunden mit *H. pylori* MOI 10 stimuliert. LPS wurde als Positivkontrolle eingesetzt, PBS als Negativkontrolle.

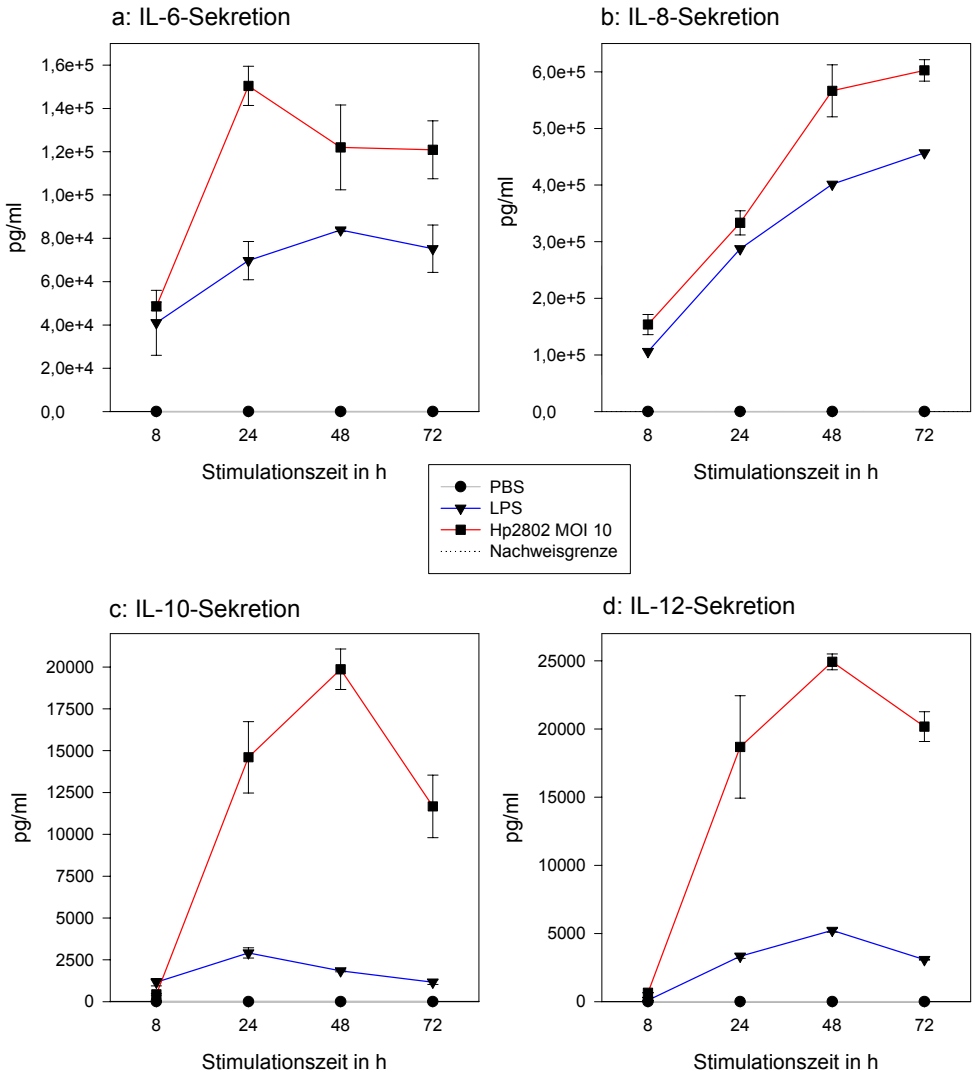


Abbildung 15: Kinetik der Zytokinsekretion von IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 nach Stimulation von DCs mit *H. pylori*, Negativkontrolle: PBS, Positivkontrolle: LPS, gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus einem repräsentativen Experiment

Die Zytokine IL-6 und IL-8 waren im Gegensatz zu IL-10 und IL-12 schon nach acht Stunden in großer Menge nachweisbar (Abbildung 15). Die höchste IL-6-Konzentration (150.400±9.608pg/ml) wurde bereits nach 24 Stunden erreicht, danach blieb die Konzentration auf etwas niedrigerem Niveau.
Nach Stimulation mit LPS oder *H. pylori* stieg die IL-8-Konzentration über 72 Stunden kontinuierlich an. Mit 602.500±18.980pg/ml war der Maximalwert noch einmal deutlich höher als der von IL-6.
Sowohl die Konzentration von IL-10 als auch die von IL-12 erreichten ihr Maximum nach 48 Stunden. Mit Werten von 19.867±1.212pg/ml (IL-10) und 24.929±583pg/ml (IL-12) waren auch die Absolutwerte relativ ähnlich.
Zudem zeigte der Vergleich mit der Zytokinsekretion nach Stimulation mit LPS, dass die Kinetiken beider Sekretionen ähnlich verliefen und *H. pylori* in diesem Versuch zu allen Messzeitpunkten eine höhere Zytokinfreisetzung bewirkte als 100 ng/ml LPS. Besonders deutlich war diese Differenz bei den Zytokinen IL-10 und IL-12. *H. pylori* stellte also einen starken Stimulus für DCs dar.

Aufgrund der Tatsache, dass bereits nach acht Stunden hohe Zytokinkonzentrationen messbar waren, sollte in einem späteren Versuch (5.5.2.2.1) der Zeitraum von 0 bis 24 Stunden genauer untersucht werden.

5.5.1.3 Veränderung von Oberflächenproteinen humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori*

Wie bei murinen DCs (5.4.2) stellen auch bei humanen DCs Oberflächenproteine einen Indikator für die Reifung der Zellen dar. In diesem Versuch wurden die kostimularischen Moleküle CD80, CD83 und CD86 sowie das Antigen-präsentierende Molekül HLA-DR (humanes MHC-II) untersucht. Die Stimulationszeit betrug 72 Stunden, *H. pylori* wurde mit einer MOI von 10 eingesetzt. LPS (100ng/ml) war die Positivkontrolle, PBS die Negativkontrolle. Die Gesamtfluoreszenzen sind in Abbildung 16 dargestellt. Da jeweils nur drei Werte verglichen werden, wurde auf die üblichen Balkendiagramme verzichtet und stattdessen wurden die Daten in einem Histogramm abgebildet. In den Diagrammen sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten dargestellt.
Aus Abbildung 16 ist zu entnehmen, dass *H. pylori* ebenso wie LPS zu einem deutlichen Anstieg der Gesamtfluoreszenz von CD80, CD83, CD86 und MHC-II führte. So stieg zum Beispiel die mittlere Fluoreszenzintensität von CD80 im Vergleich zur Negativkontrolle von 3,2 auf 20,3 nach Stimulation mit *H. pylori*. Ähnlich verhielt es sich mit CD86, hier stieg die Intensität von 12,3 (PBS) auf 66,7 (*H. pylori*). Auch bei den anderen beiden Markern zeigte sich eine gesteigerte Gesamtfluoreszenz (Abbildung 16b+d).

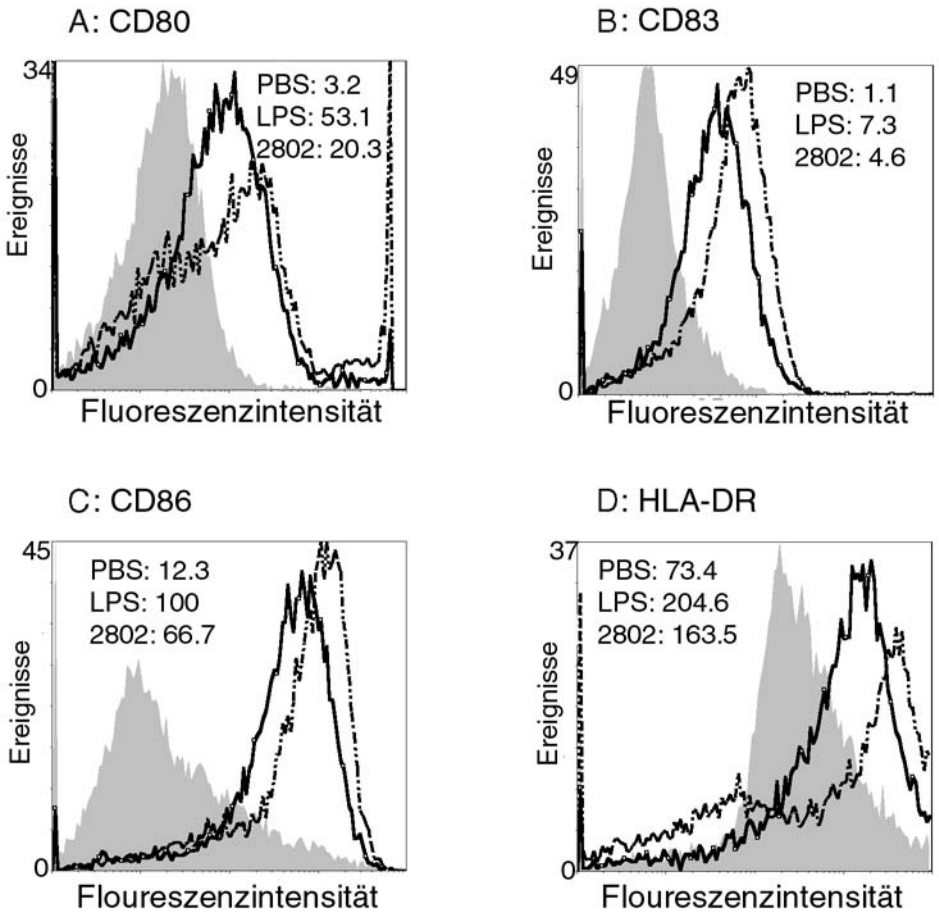


Abbildung 16: Fluoreszenz von CD80, CD83, CD86 und HLA-DR nach Stimulation humaner DCs mit *H. pylori* für 72 Stunden, Negativkontrolle: PBS, Positivkontrolle: LPS, bei den angegebenen Werten handelt es sich um die mittlere Fluoreszenzintensität, grau unterlegt: PBS, durchgezogene Linie: *H. pylori*, gestrichelte Linie: LPS, die Zellen aus drei unabhängigen Experimenten wurden vor der FACS-Analyse gepoolt

Da die Expression der untersuchten Oberflächenproteine auch ein Indikator für die Reifung von DCs ist, und nach Stimulation mit *H. pylori* in allen Fällen eine Erhöhung dieser Expression zur Folge hatte, kann daraus gefolgert werden, dass die Infektion mit *H. pylori* zur Reifung von DCs führt.

5.5.2 Untersuchungen zum Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf humane DCs nach Stimulation mit *H. pylori*

In den Vorversuchen (5.5.1) konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von unreifen DCs mit *H. pylori* zur Reifung dieser DCs führt. Dabei veränderte die Stimulation die Expression von Oberflächenproteinen und initiierte die Sekretion von Zytokinen. Im Rahmen dieses Versuches sollte gezeigt werden, welche intrazellulären Signalwege an der Sekretion der Zytokine TNF-α, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 sowie an der Regulation der Oberflächenproteine CD1a, CD80, CD83, CD86,

HLA-ABC und HLA-DR beteiligt sind. Im Speziellen wurden die MAP-Kinasen (MAPK) p38, ERK und JNK untersucht, welche die wichtigsten MAPKs darstellen (vgl. Abbildung 3). Dazu wurden die DCs eine Stunde mit dem jeweiligen Inhibitor vorinkubiert und dann mit *H. pylori* stimuliert. Aus bisher publizierten Untersuchungen, die mit ausschließlich mit LPS als Stimulus durchgeführt wurden, war zu erwarten, dass die Inhibition der p38-Kinase den stärksten Effekt auf die DCs haben würde. Als Kontrollen für die Stimulation dienten PBS (Negativkontrolle) und LPS (Positivkontrolle). Da die Auswirkungen der Inhibitoren auf DCs oder Makrophagen nach Stimulation mit LPS in der Literatur mehrfach beschrieben werden, wurde auf Stimulationen mit LPS und Inhibitoren verzichtet (Aicher et al., 1999; Arrighi et al., 2001; Bennett et al., 2001; Kikuchi et al., 2003; Nakahara et al., 2004; Utsugi et al., 2003; Yanagawa et al., 2002).

5.5.2.1 Titration der Inhibitormenge

In diesem Versuchsteil sollten die Auswirkungen von unterschiedlichen Konzentrationen der verwendeten MAPK-Inhibitoren ermittelt werden. Alle Inhibitoren wurden in Konzentrationen von 10, 20, 50 und 100µM eingesetzt. Die Versuchsdauer betrug 24 Stunden. Neben der Negativ- und der Positivkontrolle wurden noch Ansätze gemacht, bei denen nur die Inhibitoren ohne zusätzlichen Stimulus zu den Zellen gegeben wurden. Dies sollte mögliche stimulatorische Effekte der Inhibitoren zeigen und wurde mit einer Inhibitorkonzentration von 20µM durchgeführt. In den Darstellungen der Zytokinsekretion wurde zudem auf das Einzeichnen der jeweiligen Nachweisgrenzen verzichtet, da diese so niedrig sind, dass sie in den Graphen nicht erkennbar wären.

5.5.2.1.1 Analyse der Auswirkungen der unterschiedlichen Inhibitor-konzentrationen auf die Zytokinsekretion der DCs nach Stimulation mit *H. pylori*

Um eine mögliche stimulierende Wirkung der Inhibitoren zu ermitteln, wurde ein Ansatz mit einer Konzentration von 20µM des jeweiligen Inhibitors ohne zusätzlichen Stimulus durchgeführt (Abbildung 17 bis Abbildung 19). Bei keinem der Inhibitoren war nach 24 Stunden eine Sekretion der Zytokine TNF-α, IL-10 und IL-12 nachweisbar. Die Zytokinkonzentration von IL-6 blieb mit 55$\pm$14 (p38-Inhibitor), 46$\pm$3 (ERK-Inhibitor) und 76$\pm$17 pg/ml (JNK-Inhibitor) auf dem Niveau der Negativkontrolle (27$\pm$3pg/ml). Die einzig nennenswerte Zytokinkonzentration zeigte sich bei IL-8 unter Verwendung des p38- und des JNK-Inhibitors. Mit 13.714$\pm$6.139pg/ml beim p38-Inhibitor lag der Wert zwar über dem der Negativkontrolle (1.087$\pm$144pg/ml), war

aber immer noch deutlich niedriger als nach *H. pylori*-Stimulation mit Inhibitor (31.325±1.795pg/ml). Bei Verwendung des JNK-Inhibitors ohne Stimulus betrug die IL-8-Konzentration 20.317±7.465pg/ml. Damit war der Wert eine Zehnerpotenz niedriger als bei Stimulation mit *H. pylori* und Inhibitor (309.000±63.614pg/ml). Man kann also davon ausgehen, dass die Inhibitoren alleine keine oder nur eine vergleichsweise geringe Wirkung auf die Zytokinsekretion haben.

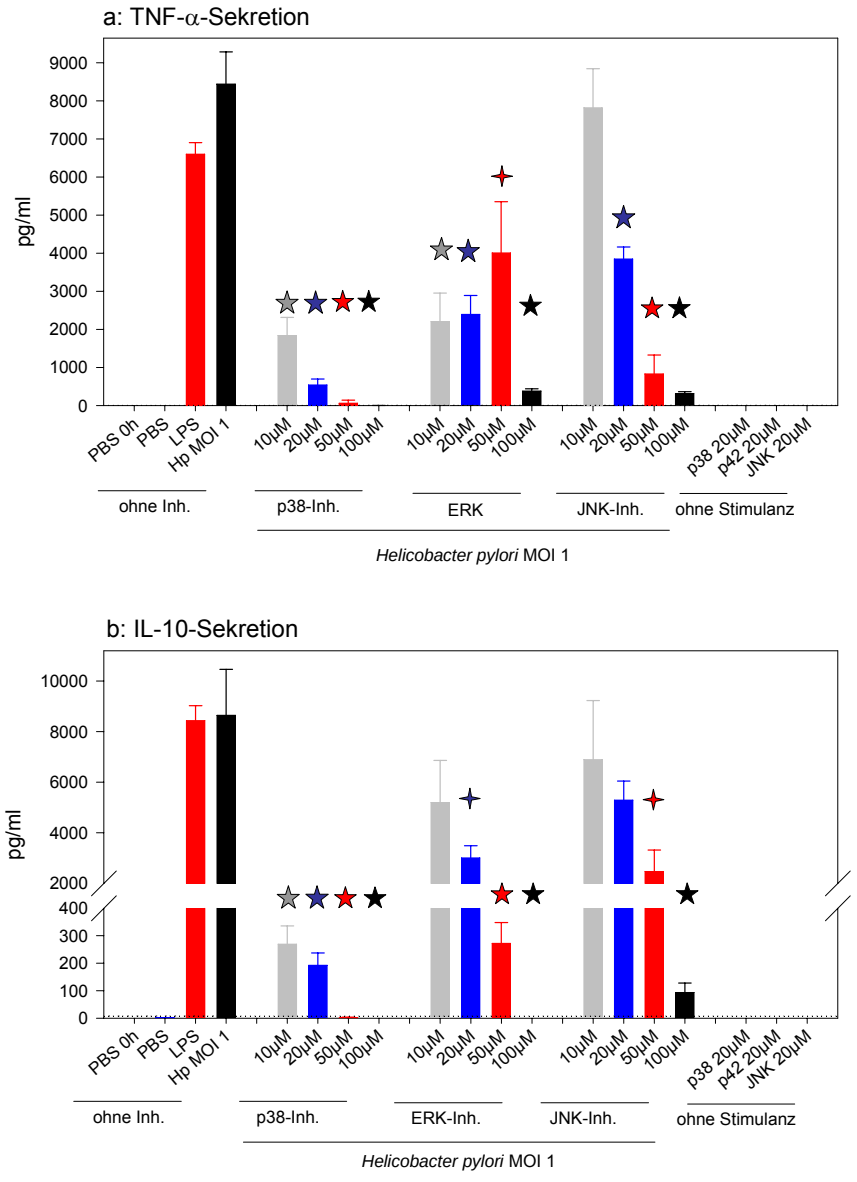


Abbildung 17: Vergleich der TNF-α– und IL-10-Sekretion humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden bei Verwendung unterschiedlichen MAPK-Inihibitorkonzentrationen. Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS; ✦ =p≤0,01, ★ =p≤0,001, Signifikanz bezogen auf *H. pylori* ohne Inhibitor, gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus einem repräsentativen Experiment

Abbildung 17a zeigt die TNF-α-Sekretion humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* mit und ohne Inhibition verschiedener MAPK-Signalwege. In der

Negativkontrolle konnte weder nach 0 noch nach 24 Stunden TNF-α nachgewiesen werden, bei Stimulation mit LPS betrug die TNF-α-Konzentration 6.604±303pg/ml. Noch stärker war die Sekretion nach *H. pylori*-Stimulation, der TNF-α-Wert lag bei 8.441±848pg/ml. Bei Verwendung des p38-Inhibitors zeigte sich eine deutliche dosisabhängige Reduktion der TNF-α-Konzentration, die bei Verwendung von 100µM Inhibitor mehr als 99% betrug. In allen Fällen führte die Inhibition des p38-Weges zu einer signifikant geringeren TNF-α-Konzentration (p≤0,001).
Bei Verwendung des ERK-Inhibitors konnte diese konzentrationsabhängige Senkung der TNF-α-Werte nicht beobachtet werden. Bei Zugabe von 10 bzw. 20µM waren die Werte sehr ähnlich, sie lagen bei 2.209±748 bzw. 2.398±497pg/ml. Bei 50µM stieg die Zytokinmenge auf 4.012±1.341pg/ml an, wohingegen bei 100µM Inhibitorkonzentration nur noch 383±57pg/ml TNF-α gemessen wurden. Die Reduktion war in allen Fällen signifikant.
Zu einer dosisabhängigen Reduktion der TNF-α-Konzentration führte auch der JNK-Inhibitor. So betrug die TNF-α-Menge zwischen 7.823±1.021pg/ml bei 10µM und 317±49pg/ml bei 100µM. Eine statistisch signifikante Reduktion konnte jedoch erst ab 20µM Inhibitorkonzentration festgestellt werden.

Die IL-10-Sekretion zeigte, dass alle drei Inhibitoren zu einer dosisabhängigen Reduktion der freigesetzten Zytokinmenge führten (Abbildung 17b).
Auch auf die IL-10-Konzentration hatte der p38-Inhibitor die stärkste Wirkung. Bereits bei einer Inhibitorkonzentration von 10µM wurden nur noch 269±66pg/ml gemessen. Bei Inhibitorkonzentrationen von 50 und 100µM lagen die Werte unterhalb der Nachweisgrenze (7,8pg/ml). Die Reduktion war in allen vier Fällen signifikant.
Weniger stark, aber ebenfalls dosisabhängig war die Reduktion durch den ERK-Inhibitor. Die verbleibende Sekretion betrug bei 10µM 5.197±1.665pg/ml und 273±75pg/ml bei 50µM. Bei 100µM Inhibitorkonzentration war kein IL-10 mehr nachweisbar.
Noch etwas geringer waren die Auswirkungen des JNK-Inhibitors auf die IL-10-Sekretion. Nur Inhibitorkonzentrationen von 50 und 100µM führten zu einer signifikanten Reduktion. Mit einer IL-10-Konzentration von 934±34pg/ml blieb der Wert auch bei 100µM noch oberhalb der Nachweisgrenze.
Bei der Negativkontrolle lag die IL-10-Menge unterhalb der Nachweisgrenze. Die Ergebnisse der durch Stimulation mit LPS durchgeführten Positivkontrolle lagen mit 8.440±583pg/ml auf dem Niveau der Zytokinproduktion, die durch *H. pylori* ohne Inhibitor (8.644±1.818pg/ml) induziert wurde.

Die Sekretion von IL-6 und IL-8 ist in Abbildung 18 dargestellt. Mit Zytokinkonzentrationen von weniger als 30pg/ml IL-6 waren die Werte der Negativkontrolle bei 0 und 24 Stunden erwartungsgemäß niedrig. Deutlich höhere IL-6-Produktionen wurden nach Stimulation mit LPS (20.672±8.333pg/ml) und *H. pylori* (43.784±6.571pg/ml) gemessen.

Neben der Wirkung auf die TNF-α– und IL-10-Produktion zeigte sich auch bei der IL-6-Freisetzung eine deutliche Reduktion durch den p38-Inhibitor. Jede verwendete Inhibitorkonzentration führte zu einer dosisabhängigen, signifikanten Reduktion der Zytokinsekretion (Abbildung 18a). Die Zytokinkonzentrationen lagen bei weniger als 10% des Ausgangswertes.

Im Gegensatz dazu konnte bei der Untersuchung der Wirkung des ERK-Inihibitors kein konzentrationsabhängiger Rückgang der IL-6-Sekretion nachgewiesen werden.

So führten 10µM des ERK-Inhibitors zu einer Sekretion von 13.952±738pg/ml und 20µM zu 20.236±3.224pg/ml. Zu einer Erhöhung der IL-6-Sekretion führten dagegen 50µM des Inhibitors, der Wert betrug 67.838±9.057pg/ml. Mit 435±71pg/ml war die Sekretion bei Zugabe von 100µM des Inhibitors sehr niedrig. Mit Ausnahme des Wertes bei 20µM ERK-Inhibitor waren alle Veränderungen signifikant.

Im Vergleich zum p38-Inhibitor schwächer, aber immer noch konzentrationsabhängig, war die Reduktion der IL-6-Konzentration durch den JNK-Inhibitor, auch bei einer Konzentration von 100µM waren noch 3.834±2.766pg/ml Zytokin messbar. Eine Signifikanz der Reduktion konnte erst ab 50µM festgestellt werden.

Bei den Untersuchungen der IL-8-Produktion wurden im Vergleich zu den anderen Zytokinsekretionen die höchsten Konzentrationen gemessen (Abbildung 18b). Auch bei der Negativkontrolle stieg die Konzentration in den 24 Stunden des Versuchs von 73±29pg/ml auf 1.087±144pg/ml. Die Stimulation mit LPS oder *H. pylori* führte zu einer Steigerung auf 395.000±89.310pg/ml bzw. 539.000±42.469pg/ml.

Auch die Reduktion der IL-8-Sekretion war bei Verwendung des p38-Inhibitors am stärksten. Bei allen Inhibitorkonzentrationen lagen die Zytokinkonzentrationen unter 15% des Ausgangswertes (Abbildung 18b). Die Differenzen waren aber zu gering, um von einer Konzentrationsabhängigkeit sprechen zu können. Alle Reduktionen waren signifikant ($p \leq 0{,}01$).

Im Gegensatz dazu führte der ERK-Inhibitor zwar zu einer Reduktion der IL-8-Sekretion, bei Inhibitorkonzentrationen zwischen 10µM und 50µM wurde der Effekt des Inhibitors aber geringer. So betrug die IL-8-Konzentration bei 10µM Inhibitorkonzentration 103.000±31.464pg/ml, bei 50µM dagegen 163.000±38.652pg/ml. Der niedrigste Wert wurde mit 87.728±44.266pg/ml bei 100µM gemessen. Nur bei 50µM konnte keine signifikante Reduktion gemessen werden.

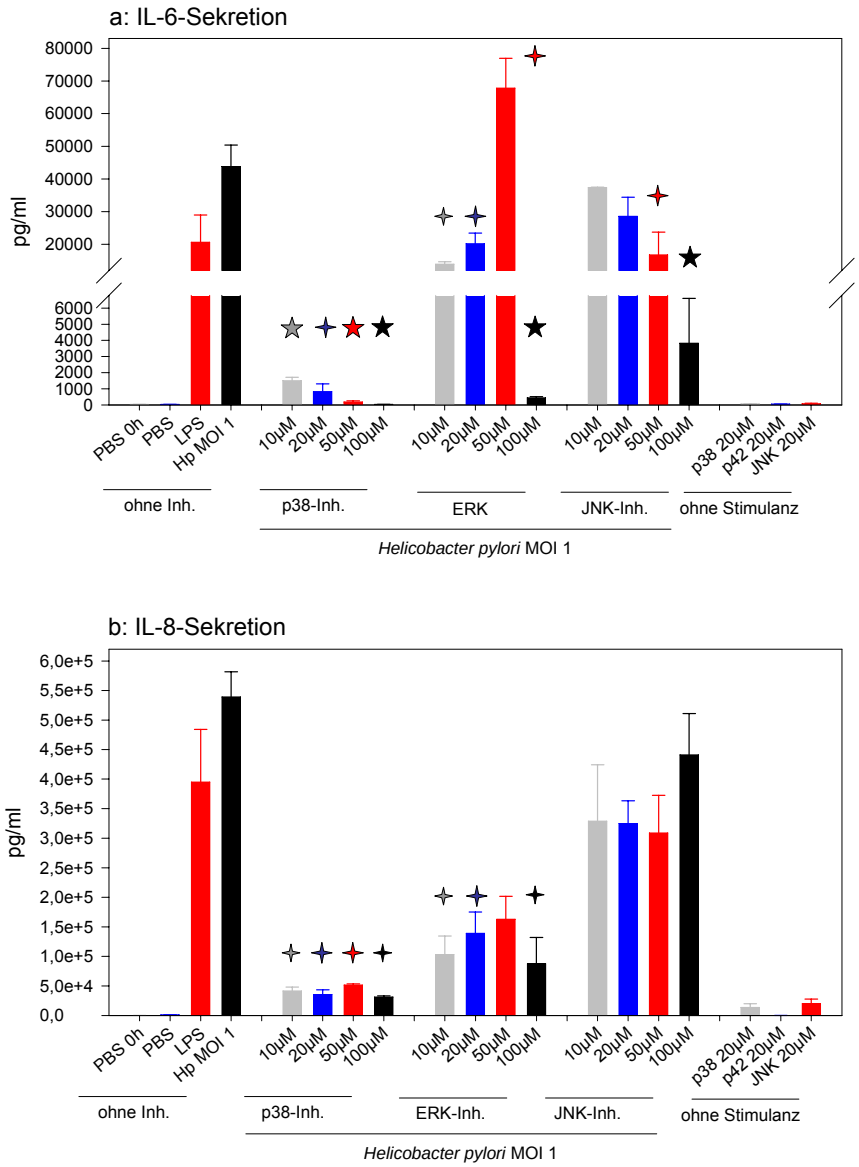


Abbildung 18: Vergleich der IL-6- und IL-8-Sekretion humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden bei Verwendung von unterschiedlichen MAPK-Inhibitorkonzentrationen. Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS; ✦ =p≤0,01, ★ =p≤0,001, Signifikanz bezogen auf *H. pylori* ohne Inhibitor, gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus einem repräsentativen Experiment

Die Wirkung des JNK-Inhibitors blieb im Konzentrationsbereich zwischen 10 und 50µM nahezu gleich. Die freigesetzte Zytokinmenge betrug 329.000±95.397pg/ml bei 10, 325.000±38.299pg/ml bei 20 und 309.000±63.614pg/ml bei 50µM. Den höchsten Wert mit Inhibition erhielt man mit 441.000±70.006pg/ml bei 100µM. Diese Veränderungen waren aber in keinem Fall signifikant.

Abbildung 19 zeigt die IL-12-Sekretion von dendritischen Zellen nach Stimulation mit *H. pylori* und Inhibitoren. Die deutliche Reduktion der Zytokinsekretion durch den p38-Inhibitor konnte auch bei IL-12 bei allen Inhibitorkonzentrationen beobachtet

werden, alle Reduktionen waren signifikant (p≤0,001). Die Zytokinsekretion wurde konzentrationsabhängig reduziert, die Werte bei 50 und 100µM lagen unter der Nachweisgrenze von 7,8pg/ml. Dies galt auch für die Negativkontrolle zu den Zeitpunkten 0 und 24 Stunden. Die Positivkontrolle mit LPS führte zu einer Zytokinfreisetzung von 1.771±232pg/ml.

Auffällig war, dass sowohl eine Inhibition des ERK-Weges als auch des JNK-Weges zu einer Erhöhung der IL-12-Sekretion führte. Vor allem bei Verwendung des ERK-Inhibitors war dieser Effekt sehr ausgeprägt. Schon 10µM des Inhibitors bewirkten eine Erhöhung von 3.141±401pg/ml ohne Inhibition auf 8.241±2.320pg/ml. Noch deutlicher war der Effekt bei 20 und 50µM, hier wurden Zunahmen auf 13.659±1.506 bzw. 13.667±2.745pg/ml beobachtet. Selbst unter Berücksichtigung der Standardabweichung entsprach dies einer Zunahme auf das mindestens dreifache des Ausgangswertes. Bei einer Inhibitorkonzentration von 100µM konnte kein IL-12 mehr nachgewiesen werden.

Auch die Zugabe des JNK-Inhibitors führte bei Konzentrationen von 10 und 20µM zu einer leichten Erhöhung der IL-12-Sekretion auf 5.561±1.671 und 5.754±1.171pg/ml. Bei Inhibitorkonzentrationen von 50 und 100µM trat dagegen eine starke Reduktion der Zytokinmenge auf 338±290 bzw. 117±31pg/ml ein.

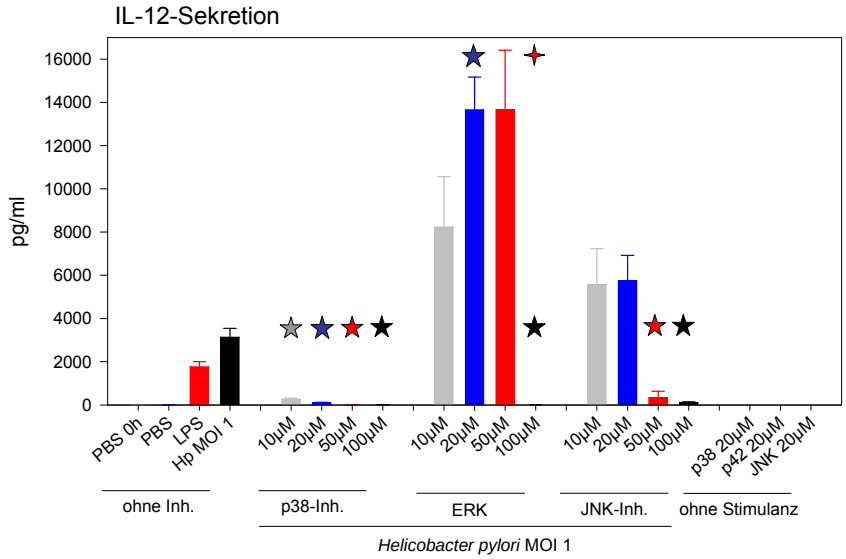


Abbildung 19: Vergleich der IL-12-Sekretion humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden bei Verwendung von unterschiedlichen MAPK-Inhibitorkonzentrationen.
Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, ✦ =p≤0,01, ★ =p≤0,001, Signifikanz bezogen auf *H. pylori* ohne Inhibitor, gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus einem repräsentativen Experiment

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass vor allem der p38-Inhibitor zu einer deutlichen Verringerung der Zytokinsekretion nach anschließender Stimulation mit

H. pylori führte. Die Wirkung der anderen beiden Inhibitoren war zwar meist messbar, aber nicht so deutlich wie bei p38. Unerwartet war in diesem Zusammenhang die Steigerung der IL-12-Sekretion bei Verwendung der ERK- und JNK-Inhibitoren. Da bei Inhibitorkonzentrationen von 50 bzw. 100µM zum Teil auffallend starke Rückgänge in der Zytokinsekretion zu beobachten waren, wirken bei diesen Konzentration möglicherweise zytotoxische Faktoren auf die Zellen. Für die Sekretionskinetik wurde daher die Inhibitorkonzentration auf 20µM festgelegt.

5.5.2.1.2 Einfluss der unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen auf die Expression von Oberflächenproteinen der DCs nach Stimulation mit *H. pylori*

Einen weiteren wichtigen Hinweis auf die Reifung von DCs stellt die Expression von Oberflächenproteinen dar. Sie kann durch Stimulation beeinflusst werden. Für die Versuche mit humanen DCs wurden folgende Oberflächenproteine ausgewählt:

a) CD1a, dient der Präsentation von Antigenen, die keine Peptide sind
b) CD80, CD83 und CD86 als kostimulatorische Moleküle
c) HLA-ABC, humanes MHC-I-Molekül
d) HLA-DR, humanes MHC-II-Molekül

Da die jeweiligen Ansätze gepoolt wurden, konnte keine statische Auswertung der Veränderung der Oberflächenantigene durchgeführt werden.
Bei den Kontrollen für unspezifische Aktivierung, die nur mit den Inhibitoren durchgeführt wurden, waren die Ergebnisse bei den Untersuchungen der Oberflächenproteine weniger eindeutig als bei der Sekretion der Zytokine. Abgesehen von den Werten für HLA-ABC (+36%) und HLA-DR (+31%) blieben die Messergebnisse für den p38-Inhibitor ohne Stimulus unterhalb der Werte für PBS. In beiden Fällen blieben die Gesamtfluoreszenzen niedriger als bei Stimulation mit *H. pylori* und 20µM Inhibitor (Abbildung 22).
Bei Verwendung des ERK-Inhibitors lagen die Werte für CD1a, CD80 und CD86 unter denen der Negativkontrolle, bei CD83 und HLA-ABC leicht darüber (+12 und +8%). Auffallend stark war der Anstieg bei HLA-DR (+53%), hier lag der Wert sogar über dem der Stimulation mit *H. pylori* und Inhibitor.
Gleiches galt für den HLA-DR-Wert des JNK-Inhibitors (+38%). Mit Ausnahme des CD1a-Wertes lagen alle Gesamtfluoreszenzen des JNK-Inhibitors über denen der Negativkontrolle. Trotz der Stimulation durch den Inhibitor blieben bis auf den CD86- und den HLA-DR-Wert alle Gesamtfluoreszenzen unterhalb der Werte für die Stimulation mit JNK-Inhibitor und *H. pylori*.

Das Antigen-präsentierende Protein CD1a zeigte bei der Negativkontrolle im Verlauf des Versuchs eine deutliche Zunahme der Gesamtfluoreszenz von 643 auf 2.729 (Abbildung 20a). Im Vergleich dazu war die weitere Zunahme durch die Stimulation mit LPS bzw. *H. pylori* auf 3.407 bzw. 3.004 relativ gering.
Eine Zunahme der Gesamtfluoreszenz im Vergleich zur Stimulation mit *H. pylori* ohne Inhibitor war auch bei 10µM des p38-Inhibitors messbar, der Wert der Gesamtfluoreszenz stieg auf 3.407. Die Verwendung von 20µM des Inhibitors senkte die Gesamtfluoreszenz auf die Hälfte des Ausgangswertes (1507), dazwischen lagen die Ergebnisse für 50 und 100µM mit Gesamtfluoreszenzen von 2.507 und 2.392.

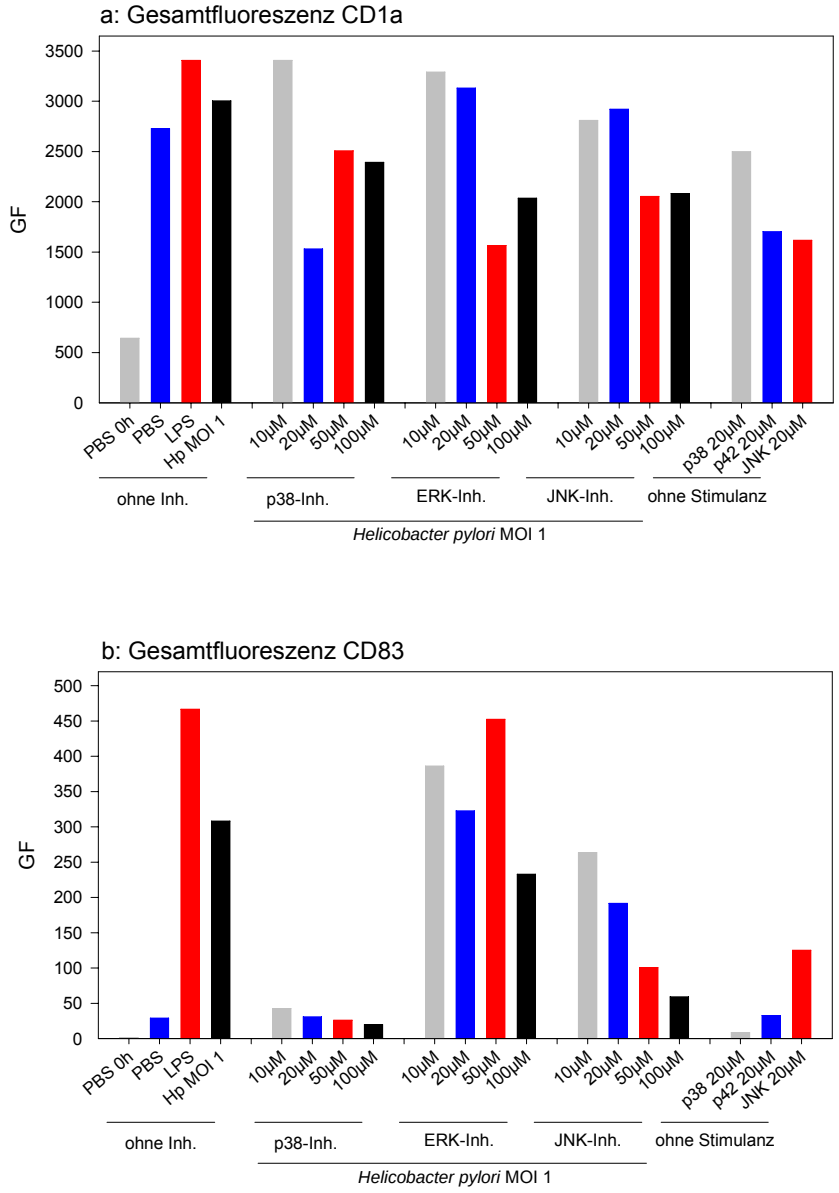


Abbildung 20: Vergleich der Gesamtfluoreszenz von CD1a und CD83 humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden bei Verwendung verschiedener MAPK-Inhibitorkonzentrationen. Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, die Zellen wurden vor der FACS-Analyse gepoolt

Die Verwendung des ERK-Inhibitors bewirkte bei 10 und 20µM eine geringfügige Erhöhung der Gesamtfluoreszenz auf 3.291 bzw. 3.131. Bei einer Inhibitorkonzentration von 50 bzw.100µM sanken die Werte auf 1.565 bzw. 2.036.
Ähnlich gering waren die Auswirkungen von 10 und 20µM des JNK-Inhibitors auf die CD1a-Gesamtfluoreszenz, hier lagen die Werte bei 2.811 bzw. 2.922. Bei einer Erhöhung der Inhibitorkonzentration auf 50 oder 100µM wurde die CD1a-Gesamtfluoreszenz in beiden Fällen auf knapp 70% des Wertes ohne Inhibition reduziert.

Die Gesamtfluoreszenz von CD83 ging durch die Inhibition der p38-MAPK konzentrationsabhängig zurück (Abbildung 20b). Ab einer Inhibitorkonzentration von 20µM betrug die Gesamtfluoreszenz nur noch ein Zehntel oder weniger der Gesamtfluoreszenz bei Stimulation mit *H. pylori* ohne Inhibition.
Bei Inhibition von ERK konnte keine eindeutige Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration festgestellt werden. 10 und 50µM ERK-Inhibitor führten zu einer Steigerung um 25 bzw. knapp 50%. Dagegen zeigte eine Konzentration von 20µM fast keine Wirkung. Eine Reduktion auf 76% des Ausgangswertes der CD83-Gesamtfluoreszenz trat dagegen bei 100µM auf.
Auch der JNK-Inhibitor rief eine konzentrationsabhängige Reduktion hervor, die jedoch schwächer ausgeprägt war als die durch den p38-Inhibitor. So betrug die Gesamtfluoreszenz bei 100µM noch ein Fünftel des Ausgangswertes.
Mit 1,4 und 29,0 (0 bzw. 24 Stunden) lagen die Werte der Negativkontrolle unter allen anderen, LPS-Stimulation führte dagegen mit einer Gesamtfluoreszenz von 466,7 zum höchsten Wert.

Beim Oberflächenprotein CD80 (Abbildung 21a) wurde während der 24-stündigen Inkubationsphase auch mit PBS ein starker Anstieg der Gesamtfluoreszenz von 4,1 auf 309,7 gemessen. Die Stimulation mit LPS und *H. pylori* führte jedoch mit Werten von 694,1 bzw. 801,6 zu einem deutlich stärkeren Anstieg.
Die Inhibition des p38-Weges induzierte bei allen untersuchten Konzentrationen eine Reduktion der Gesamtfluoreszenz, diese war jedoch nicht konzentrationsabhängig. Die geringste Gesamtfluoreszenz wurde bei einer Inhibitorkonzentration von 100µM gemessen, die stärkste bei 20µM. Dazwischen lag die Gesamtfluoreszenz bei 10µM. Aufgrund eines technischen Problems konnte der Wert bei einer Inhibitorkonzentration von 50µM nicht gemessen werden.
ERK-Inhibitorkonzentrationen von 10 und 20µM beeinflussten die CD80-Gesamtfluoreszenz nur wenig, die Werte lagen um ±5% des Ausgangswertes. Eine deutliche Reduktion auf 75 bzw. 23% des Ausgangswertes wurde bei Inhibitorkonzentrationen von 50 bzw. 100µM gemessen.

Ähnliche Ergebnisse lieferte die Stimulation mit dem JNK-Inhibitor, bei einer Konzentration von 10 und 20µM blieb die Gesamtfluoreszenz von CD80 auf Ausgangsniveau. Erst eine Inhibitorkonzentration von 50µM führte zu einer leichten Reduktion, bei 100µM war die Reduktion auf 4% dagegen sehr deutlich.

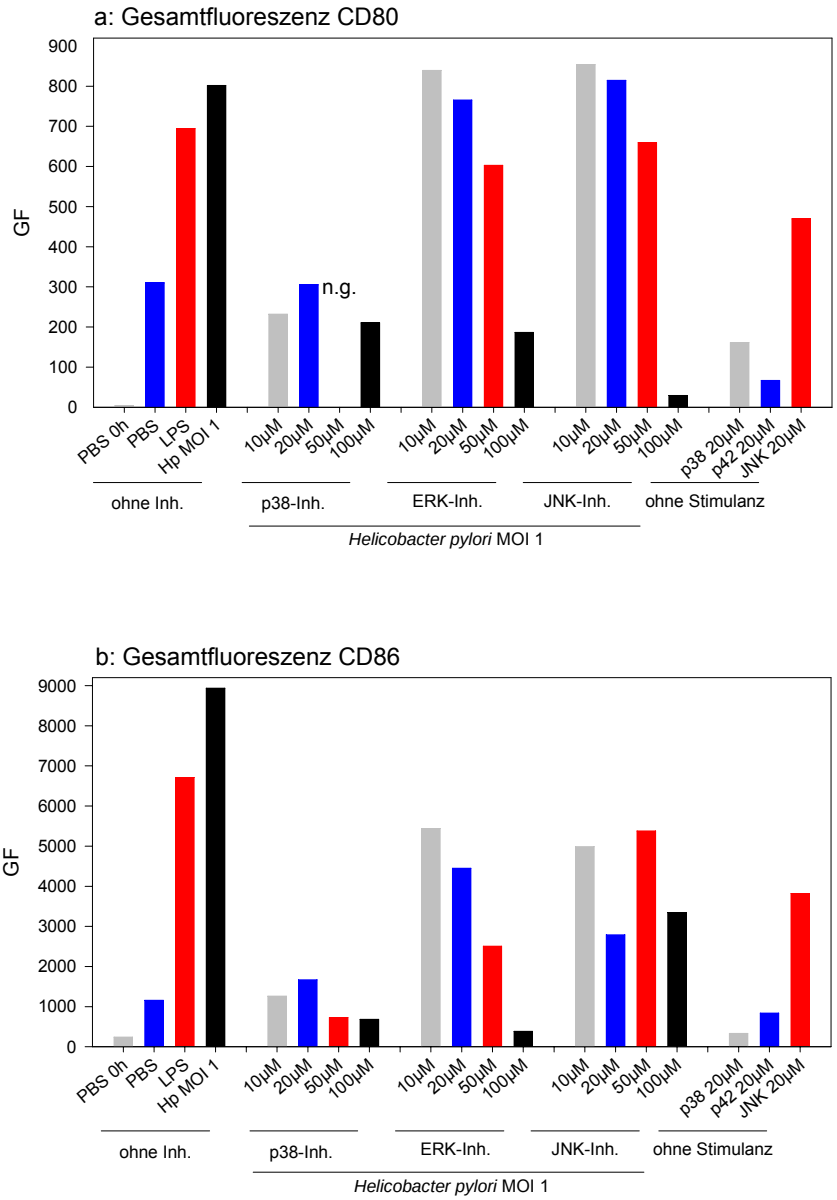


Abbildung 21: Vergleich der Gesamtfluoreszenz von CD80 und CD86 humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden bei Verwendung verschiedener MAPK-Inhibitorkonzentrationen. Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, n. g.: nicht gemessen, die Zellen wurden vor der FACS-Analyse gepoolt

Ein starker Anstieg der Gesamtfluoreszenz durch Stimulation zeigte sich auch bei CD86 (Abbildung 21b). Zwar nahm die Gesamtfluoreszenz bei der Negativkontrolle innerhalb von 24 Stunden von 241,9 auf 1.159 zu, doch stellte diese Erhöhung nur einen Bruchteil der Stimulation durch LPS und *H. pylori* dar. Bei diesen Stimulationen stieg die Gesamtfluoreszenz auf 6.079 bzw. 8.938.

Die Inhibition der p38-MAPK führte zu einer Verringerung der Gesamtfluoreszenz. Bei Inhibitorkonzentrationen von 10 und 20µM lagen die Werte bei 14 und 19%, bei Konzentrationen von 50 und 100µM bei weniger als 10% des Ausgangswertes.
Der ERK-Inhibitor induzierte eine konzentrationsabhängige Reduktion der CD86-Gesamtfluoreszenz, wobei die niedrigste Gesamtfluoreszenz für 100µM bei weniger als 5% des Ausgangswertes lag.
Bei Verwendung des JNK-Inhibitors konnte keine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden, die Messwerte betrugen zwischen 30 und 60% des Wertes ohne Inhibition.

Die höchsten Werte nach Stimulation zeigte das Antigen-präsentierende Molekül HLA-ABC (Abbildung 22a). Die Gesamtfluoreszenz erreichte 9.447 nach LPS-Stimulation und 9.142 nach *H. pylori*-Stimulation. Bei Inkubation mit PBS betrugen die Werte 3.377 und 2.205 (0 und 24 Stunden). Der p38-Inhibitor reduzierte die Gesamtfluoreszenz auf 3.631 und 4.958, dies entsprach 40 und 54% des Ausgangswertes bei 10 und 20µM. Die Inkubation mit 50 und 100µM des Inhibitors führte zu einer weiteren Reduktion auf 1.434 (16%) und 1.271 (14%).
10µM des ERK-Inhibitors bewirkten keine Reduktion, hier lag die Gesamtfluoreszenz bei 8.914 (98%). Erst die höheren Konzentrationen zeigten einen Effekt, 20µM reduzierten auf 8.037, 50µM auf 5.794 und 100µM auf 1331.
Beim JNK-Inhibitor waren die Wirkungen von 10 und 20µM ähnlich, hier betrug die Gesamtfluoreszenz 6.991 bzw. 6.624. Nach Zugabe von 50µM Inhibitor lag der Wert für die Gesamtfluoreszenz bei 5.752, nach 100µM bei 4.067.

Bei den Messungen der Gesamtfluoreszenzen des Antigen-präsentierenden Moleküls HLA-DR konnten vergleichsweise geringe Anstiege durch Stimulation nachgewiesen werden (Abbildung 22b). Die Werte der Negativkontrolle nach 0 und 24 Stunden betrugen 335 bzw. 499. Die Stimulation der DCs mit LPS führte zu einer Steigerung auf 1.397, die mit *H. pylori* auf 1.087. Stimulation mit 10µM des p38-Inhibitors reduzierte die Gesamtfluoreszenz auf 849, bei einer Inhibitorkonzentration von 20 und 50µM kam es zu einer Reduktion auf 734 und 750. Die Verwendung von 100µM des Inhibitors führte zur Erhöhung der Gesamtfluoreszenz auf 1.429.
Die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des ERK-Inhibitors konnte keine Konzentrationsabhängigkeit zeigen. Während 10 bzw. 50µM des Inhibitors die Gesamtfluoreszenz auf 897 bzw. 783 reduzierten, führte eine Konzentration von 20µM zu einer Reduktion der Gesamtfluoreszenz auf 309. Keine Veränderung der Gesamtfluoreszenz wurde bei einer Inhibitorkonzentration von 100µM gemessen.

Die Untersuchung des JNK-Inhibitors zeigte eine nicht konzentrationsabhängige Reduktion der Gesamtfluoreszenz bei allen Inhibitorkonzentrationen außer 100µM, bei dieser Konzentration blieb die Gesamtfluoreszenz unverändert.

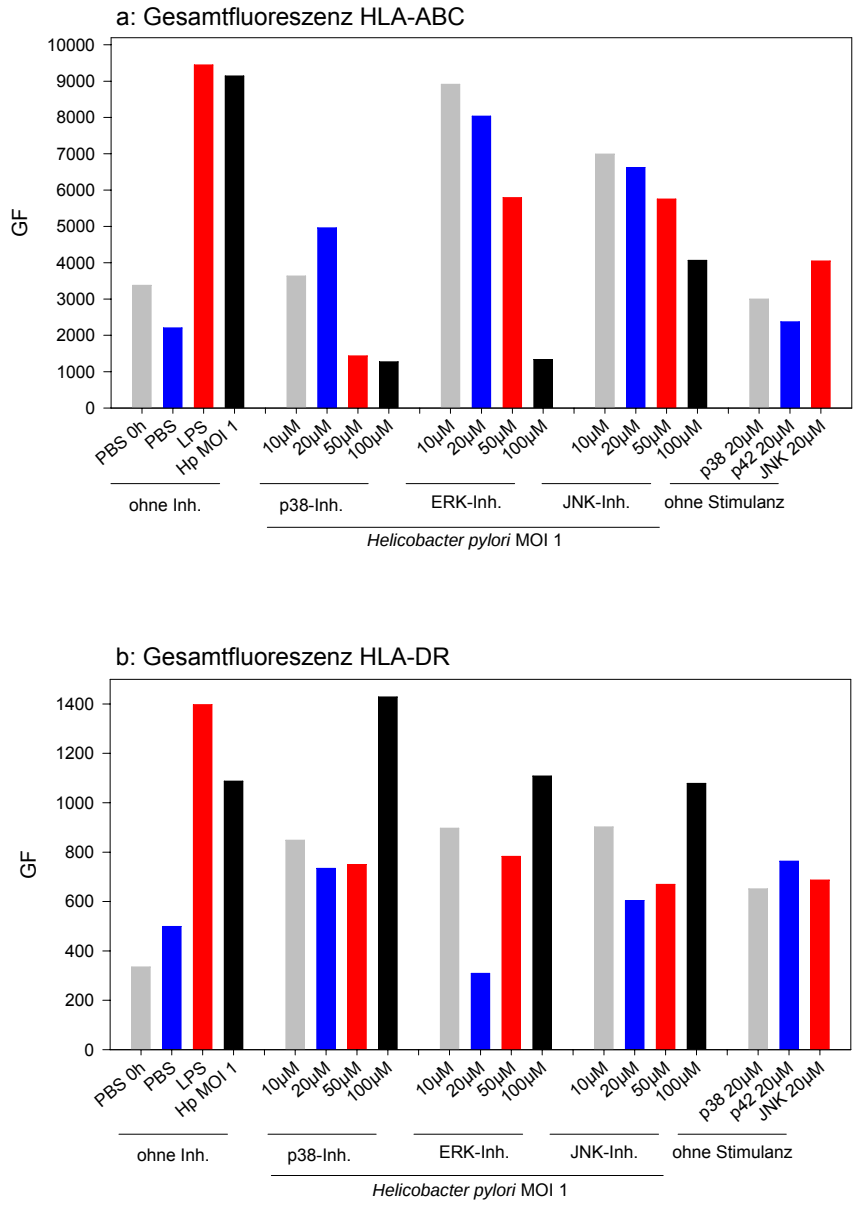


Abbildung 22: Vergleich der Gesamtfluoreszenz von HLA-ABC und HLA-DR humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden bei Verwendung verschiedener MAPK-Inhibitorkonzentrationen. Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, die Zellen wurden vor der FACS-Analyse gepoolt

Da die Auswirkungen der Inhibitoren auf die Oberflächenantigene weniger konzentrationsabhängig waren als auf die Zytokine, wurde für die Untersuchungen der Stimulationskinetik aufgrund der Ergebnisse der Zytokinmessungen eine Inhibitorkonzentration von 20µM festgelegt.

5.5.2.2 Einfluss verschiedener MAP-Kinase-Inhibitoren auf die Stimulation humaner DCs durch *H. pylori*

Nach der Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen auf DCs zu einem bestimmten Zeitpunkt, sollte in diesem Versuch der Einfluss einer Inhibitorkonzentration auf den zeitlichen Verlauf der Stimulation ermittelt werden.
Aufgrund der Ergebnisse der Inhibitortitration (siehe 5.5.2.1) wurde die Stimulation humaner DCs mit einer Inhibitorkonzentration von 20µM durchgeführt. Die Zellzahl betrug $1x10^6$ Zellen/ml. Für die ELISA-Messungen wurden die Überstände nach 0, 0,5, 4, 12 und 24 Stunden abgenommen. Da eine Veränderung der Oberflächenproteine nach 0,5 Stunden noch nicht messbar war, wurde zu diesem Zeitpunkt keine Messung durchgeführt (Vorversuch, Daten nicht gezeigt). Zur FACS-Analyse wurden die Zellen nach 0, 4, 12 und 24 Stunden gefärbt.

5.5.2.2.1 Auswirkung auf die Zytokinsekretion

Zum Zeitpunkt 0,5 Stunden war im Vergleich zur Ausgangsmessung nach 0 Stunden noch keine Veränderung in der Zytokinesekretion erkennbar. Bis auf IL-8 blieben alle Werte unterhalb der Nachweisgrenze. Deshalb waren eventuelle Auswirkungen der Reduktion durch die Inhibitoren im Vergleich zur nicht inhibierten Kontrolle nicht messbar.
Wie bei murinen Makrophagen und DCs war auch bei humanen DCs TNF-α das erste Zytokin, das in größeren Mengen nachweisbar ist. Bereits nach 4 Stunden zeigte sich ein deutlicher Anstieg der sezernierten Zytokinmenge. Während die Zytokinkonzentration der Negativkontrolle unter der Nachweisgrenze blieb, waren bei Stimulation mit LPS und *H. pylori* Werte von 18.458±5.623pg/ml bzw. 5.083±2.029pg/ml nachweisbar (Abbildung 23a). Zu diesem Zeitpunkt zeigten sich die Wirkungen der Inhibitoren besonders deutlich. Nach Behandlung mit dem p38-Inhibitor betrug die gemessene Zytokinkonzentration nur 11±5pg/ml. Auch bei ERK- und JNK-Inhibition waren die Reduktionen sehr stark, hier lagen die Werte bei 468±215pg/ml für den ERK- und 133±47pg/ml für den JNK-Inhibitor.
Nach 12 Stunden zeigte LPS weiterhin den stärksten stimulatorischen Effekt. Die TNF-α-Menge betrug nach LPS-Stimulation 24.853±3.824pg/ml, nach *H. pylori*-Stimulation 19.282±6.590pg/ml. Die Reduktion der TNF-α-Konzentration durch die Inhibitoren war in allen Fällen deutlich. Bei Verwendung des p38-Inhibitors betrug die Konzentration 3.032±1.070pg/ml, bei ERK-Inhibition 8.362±3.273pg/ml und 9.554±3.191pg/ml bei JNK-Inhibition.
Auch 24 Stunden nach Beginn der Stimulation konnte eine deutliche Inhibition der TNF-α-Sekretion beobachtet werden. Während *H. pylori* die Sekretion von 14.859±4.080pg/ml TNF-α induzierte, wurden nach Verwendung des p38-Inhibitors

488±295pg/ml gemessen. Weniger ausgeprägt waren die Reduktionen durch den ERK- und JNK-Inhibitor, hier betrugen die Messwerte 3.887±1.405 und 7.755±337pg/ml. Mit einer TNF-α-Konzentration von 15.340±6.931pg/ml stellte LPS einen ähnlich starken Stimulus wie *H. pylori* dar.

Bei allen Stimulationen war der höchste TNF-α-Wert nach 12 Stunden erreicht, danach sanken die Konzentrationen. Zu allen Zeitpunkten waren die TNF-α-Konzentrationen nach Inhibition signifikant niedriger als ohne Inhibition (vgl. Abbildung 23a).

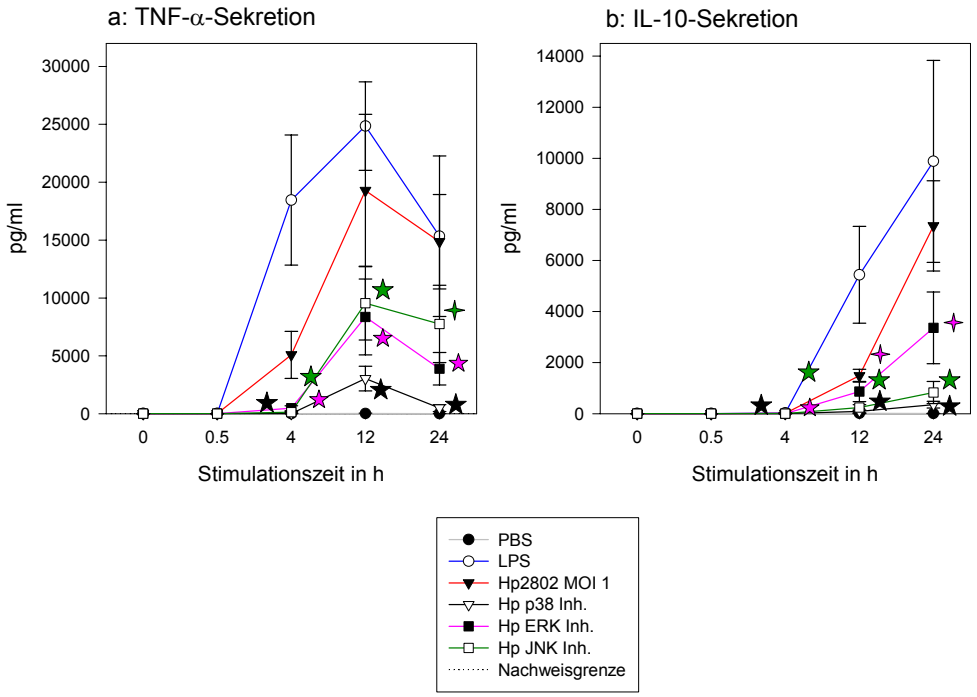


Abbildung 23: Vergleich der TNF-α– und IL-10-Sekretion humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden und Verwendung von MAPK-Inhibitoren
Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, ✦ =p≤0,01, ★ =p≤0,001, Signifikanz bezogen auf *H. pylori* ohne Inhibitor, gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus einem repräsentativen Experiment

Die Produktion des Zytokins IL-10, des Antagonisten von TNF-α, ist in Abbildung 23b dargestellt. Im Gegensatz zu TNF-α war dabei erst nach 12 Stunden eine deutliche Sekretion feststellbar. Nur die Werte der LPS- und der *H. pylori*-Stimulation lagen nach 4 Stunden mit 28±21pg/ml bzw. 15±8pg/ml oberhalb der Nachweisgrenze von 7,8pg/ml.

Im Gegensatz dazu lagen nach 12 Stunden alle Werte über der Nachweisgrenze, die Reduktion der IL-10-Sekretion der humanen DCs durch Inhibition war deutlich. *H. pylori* induzierte die Freisetzung von 1.486±252pg/ml IL-10, die Stimulation mit dem p38-Inhibitor reduzierte diesen Wert auf 92±54pg/ml. Die Inhibition des ERK-

Signalweges führte zu einer IL-10-Konzentration von 865±393pg/ml und die des JNK-Weges zu einer Konzentration von 236±114pg/ml.
Die höchsten IL-10-Konzentrationen wurden nach 24 Stunden Stimulation gemessen. Nach LPS-Stimulation lag diese Konzentration bei 9.882±3.955pg/ml, nach *H. pylori*-Stimulation bei 7.353±1.768pg/ml. Durch die Inhibition von p38 wurde die Zytokinkonzentration auf 356±130pg/ml, bei ERK-Inhibition auf 3.361±1.404pg/ml und bei JNK-Inhibition auf 830±428pg/ml reduziert. Auch bei der Sekretion von IL-10 waren die Veränderungen durch die Inhibitoren zu allen drei Zeitpunkten signifikant.

Die Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 zeigte ebenfalls einen stetigen Anstieg über die gesamte Stimulationszeit (Abbildung 24a). Die Maximalkonzentrationen waren etwa eine Zehnerpotenz höher als bei TNF-α. Im Vergleich zu TNF-α setzte die IL-6-Produktion der DCs nach Stimulation mit *H. pylori* später ein (Abbildung 23 a). So waren nach 4 Stunden Stimulation mit *H. pylori* 5.083±2.029pg/ml TNF-α nachweisbar, aber erst 754±252pg/ml des Zytokins IL-6. Nach 12 Stunden wurde ein starker Anstieg der IL-6-Konzentration beobachtet. Diese übertraf mit 101.197±44.863pg/m den TNF-α-Wert von 19.282±6.590pg/ml deutlich. Nach 24 Stunden setzte sich dieser Trend weiter fort, während die TNF-α-Konzentration auf 14.859±4.080pg/ml sank, stieg die von IL-6 auf 233.222±28.456pg/ml an.
Bei den Auswirkungen der verschiedenen Inhibitoren auf die IL-6-Sekretion der DCs zeigten sich gravierende Unterschiede. Die Inhibition mit dem p38- und ERK-Inhibitor führte zu deutlichen Reduktionen, der JNK-Inhibitor beeinflusste die IL-6-Sekretion nur bis zu 4 Stunden, danach dagegen kaum noch. Die Werte der IL-6-Produktion betrugen bei p38-Inhibition nach 4 Stunden 46±80pg/ml, nach 12 Stunden 4.929±1.761pg/ml und nach 24 Stunden 15.499±8.330pg/ml. Im Vergleich dazu fiel die Reduktion durch den ERK-Inhibitor schwächer aus. Hier lagen die Zytokinkonzentrationen nach 4 Stunden bei 220±114pg/ml, nach 12 Stunden bei 24.988±5.222pg/ml und bei 80.461±34.008pg/ml nach 24 Stunden.
Das Signifikanzniveau der Verringerung der Zytokinkonzentration lag bei beiden Inhibitoren zu den untersuchten Zeitpunkten unter 0,001.
Wie bereits oben angedeutet, zeigte die JNK-Inhibition unterschiedliche Auswirkungen auf die IL-6-Sekretion der Zellen. Nach 4 Stunden lag die Zytokinkonzentration mit 206±99pg/ml signifikant ($p \leq 0{,}001$) unterhalb des Ausgangswertes ohne Inhibitor, nach 12 und 24 Stunden war sie mit 105.334±52.326pg/ml und 233.111±25.653pg/ml unbeeinflusst.

LPS war auch bei den Untersuchungen der IL-6-Produktion der stärkste Stimulus, die Werte lagen zwischen 13.942±4.897pg/ml (4 Stunden) und 262.556±29.911pg/ml (24 Stunden).

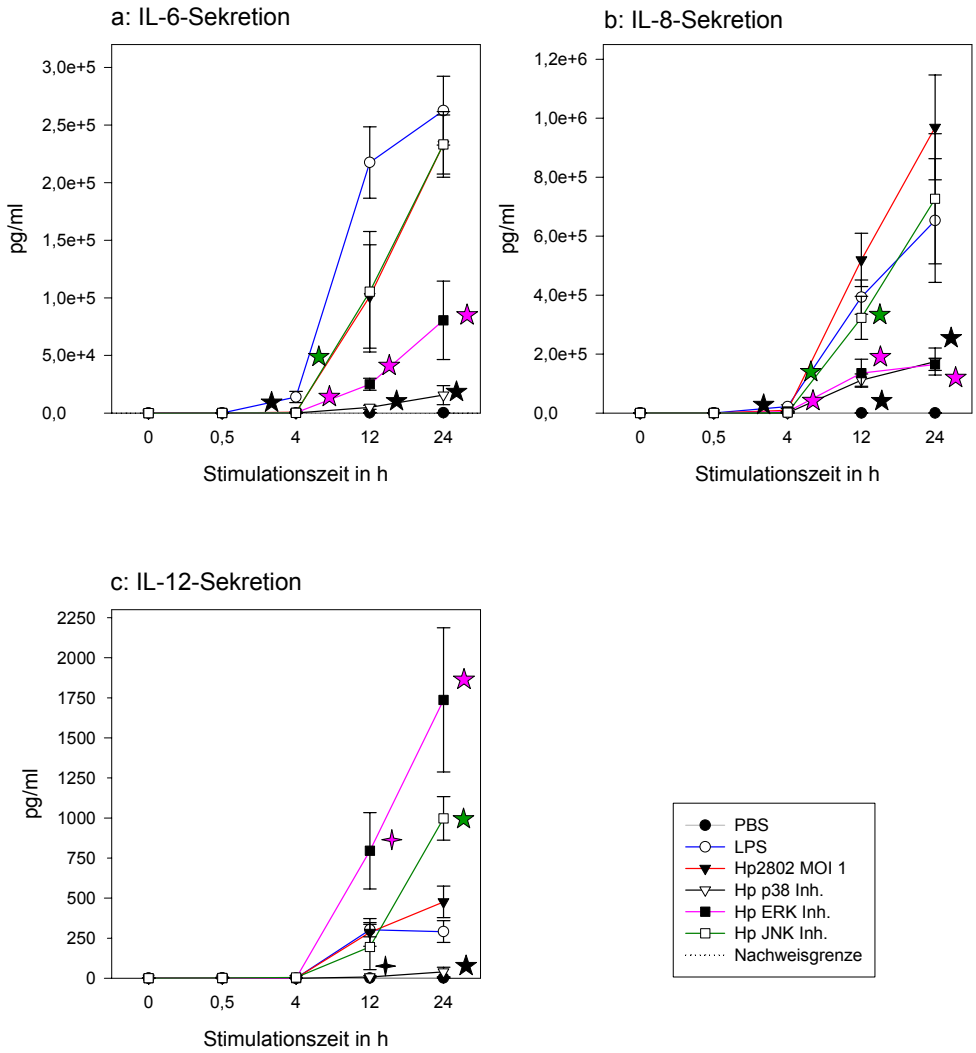


Abbildung 24: Vergleich der IL-6-, IL-8- und IL-12-Sekretion humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden und Verwendung von MAPK-Inhibitoren.
Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, ✦ =p≤0,01, ★ =p≤0,001, Signifikanz bezogen auf *H. pylori* ohne Inhibitor, gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus einem repräsentativen Experiment

Im Rahmen der Untersuchungen war IL-8 das am stärksten sezernierte Zytokin, die höchste Konzentration lag bei über 1µg/ml und wurde nach 24-stündiger Stimulation der DCs mit *H. pylori* erreicht (Abbildung 24b).

Nach 4 Stunden lag die Konzentration bei 9.555±4.845pg/ml für die Stimulation mit *H. pylori* ohne Inhibitor. Nach Inhibition der MAPKs waren die freigesetzten Mengen erneut deutlich niedriger, 116±39pg/ml bei Verwendung des p38-Inhibitors, 4.443±581pg/ml mit dem ERK-Inhibitor und 1.626±1.821pg/ml mit dem JNK-Inhibitor.

Zum Zeitpunkt 12 Stunden wurden Konzentrationen von 519.333±90.354pg/ml für die nicht inhibierte Stimulation und 111.710±20.897 (p38-Inhibitor), 135.159±47.577pg/ml (ERK-Inhibitor) sowie 322.889±73.099pg/ml (JNK-Inhibitor) für die inhibierte Stimulation gemessen.
Auch nach 24 Stunden war die Reduktion der IL-8-Sekretion durch den p38- und den ERK-Inhibitor weiterhin deutlich nachweisbar. Die gemessenen Konzentrationen betrugen 174.546±45.748pg/ml (p38) und 165.000±20.591pg/ml (ERK). Im Vergleich zum Ausgangswert von 968.667±177.936pg/ml zeigte die Inhibition des JNK-Weges nur geringe Auswirkungen, die IL-8-Konzentration lag bei 726.556±220.470pg/ml. Nach 4 und 12 Stunden war die Reduktion der IL-8-Produktion durch die drei verwendeten Inhibitoren signifikant, nach 24 Stunden lag die durch den JNK-Inhibitor induzierte Reduktion der IL-8-Freisetzung außerhalb der Signifikanz.
Im Gegensatz zu den bisher untersuchten Zytokinen ist LPS nur zum Zeitpunkt 4 Stunden der stärkste Stimulus für die IL-8-Sekretion. Die Zytokinmenge betrug hierbei 21.756±5.877pg/ml im Vergleich zu 9.555±4.845pg/ml, die von *H. pylori* induziert wurden. Nach 12 und 24 Stunden lagen die Werte für die Stimulation mit LPS bei 392.889±58.005pg/ml und 652.778±209.748pg/ml.

Ähnlich wie bei IL-10 (Abbildung 23b) blieben auch die Werte für IL-12 (Abbildung 24c) beim Zeitpunkt 4 Stunden unterhalb der Nachweisgrenze (7,8pg/ml).
Nach 12 Stunden konnte ein starker Anstieg der IL-12-Konzentration verzeichnet werden. Bei Stimulation mit *H. pylori* lag der Wert bei 286±86pg/ml. Die Inkubation mit dem p38-Inhibitor zeigte wie bei den anderen untersuchten Zytokinen eine deutliche Verringerung der Zytokinsekretion auf 8,4±8,1pg/ml, also knapp an der Nachweisgrenze. Die ERK-Inhibition führte zu einer Erhöhung der IL-12-Sekretion auf 795±238pg/ml. Der JNK-Inhibitor reduzierte dagegen zu diesem Zeitpunkt die von den DCs freigesetzte IL-12-Menge, sie betrug 195±141pg/ml.
Nach 24 Stunden führte die Inkubation mit dem p38-Inhibitor erneut zu einer Reduktion der Zytokinproduktion auf 39±30pg/ml im Vergleich zum Ausgangswert von 477±99pg/ml. Während der p38-Inhibitor eine signifikante Reduktion der Zytokinsekretion verursachte, kam es sowohl mit dem ERK- als auch mit dem JNK-Inhibitor zu einer ebenso signifikanten Erhöhung der Sekretion. Bei Verwendung des ERK-Inhibitors wurden 1.737±450pg/ml gemessen, mit dem JNK-Inhibitor 998±136pg/ml.
Die IL-12-Sekretion der DCs nach LPS-Stimulation lag nach 12 Stunden im Bereich der *H. pylori*-Stimulation, nach 24 Stunden sank sie dagegen unterhalb des Wertes der Stimulation mit *H. pylori*.

Insgesamt zeigte sich, dass der p38-Inhibitor zu allen Messzeitpunkten ab 4 Stunden und bei allen Zytokinen die stärkste Reduktion hervorrief. Die einzige Ausnahme bildete die IL-8-Konzentration nach 24 Stunden. Hier war die Reduktion durch den ERK-Inhibitor genauso stark. Tabelle 6 zeigt zusammengefasst die Veränderung der Zytokinsekretion bei Inhibition der MAPK-Wege im Vergleich zur Stimulation ohne Inhibitor.

Veränderung der Zytokinsekretion nach Inhibition im Vergleich zur Stimulation mit *H. pylori* ohne Inhibition				
Stimulationszeit	**Zytokine**	**Inhibitor**		
		p38	**ERK**	**JNK**
4 Stunden	TNF-α	**- -**	**- -**	**- -**
	IL-10	**- -**	**- -**	**- -**
	IL-6	**- -**	**- -**	**- -**
	IL-8	**- -**	**- -**	**- -**
	IL-12	o	o	o
12 Stunden	TNF-α	**- -**	**- -**	**- -**
	IL-10	**- -**	-	**- -**
	IL-6	**- -**	**- -**	o
	IL-8	**- -**	**- -**	**- -**
	IL-12	-	+	o
24 Stunden	TNF-α	**- -**	**- -**	-
	IL-10	**- -**	**- -**	**- -**
	IL-6	**- -**	**- -**	o
	IL-8	**- -**	**- -**	
	IL-12	**- -**	**+ +**	**+ +**

Tabelle 6: Veränderung der Zytokinsekretion humaner dendritischen Zellen nach Stimulation mit *H. pylori* und unter Verwendung verschiedener MAPK-Inhibitoren.
--: signifikante Abnahme, $p \leq 0{,}001$, -: signifikante Abnahme, $p \leq 0{,}01$, o: keine signifikante Veränderung, +: signifikante Zunahme, $p \leq 0{,}01$, ++: signifikante Zunahme, $p \leq 0{,}001$

5.5.2.2.2 Auswirkungen der Inhibitoren auf die Expression von Oberflächenproteinen nach Stimulation mit *H. pylori*

Wie bei den Zytokinen wurde auch bei den Oberflächenproteinen die Auswirkung der verschiedenen Inhibitoren auf humane dendritische Zellen getestet.
Die Veränderung der Oberflächenproteinexpression wurde graphisch als Veränderung der Gesamtfluoreszenz (4.3.3) dargestellt. Es wurden drei unabhängige FACS-Messungen pro Oberflächenantikörper durchgeführt.

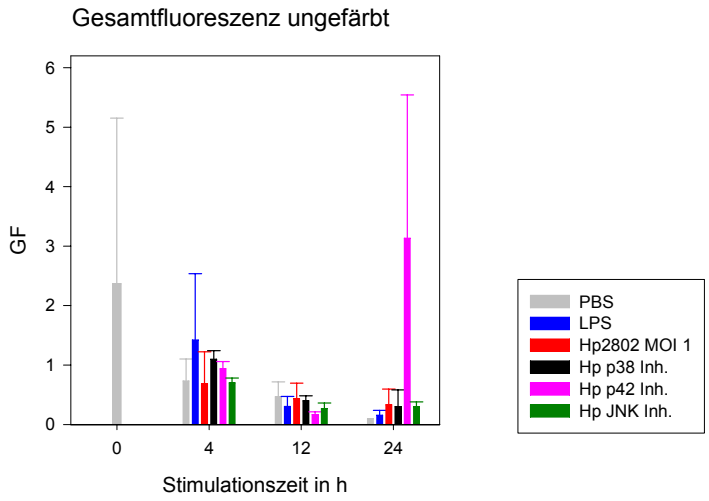


Abbildung 25: Vergleich der Gesamtfluoreszenz ungefärbter Proben humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden mit und ohne Verwendung von MAPK-Inhibitoren
Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus einem repräsentativen Experiment

Neben den Untersuchungen der Oberflächenantigene wurden zu allen Zeitpunkten und mit allen Stimuli Messungen der ungefärbten Proben als Nullkontrollen durchgeführt, diese Hintergrundfluoreszenz ist in Abbildung 25 gezeigt. Abgesehen von den Nullkontrollen bei 0 und 4 Stunden lagen die Werte der Hintergrundfluoreszenz immer um einen Faktor von mindestens sechs unterhalb von CD83, dem Marker mit der geringsten Aktivität. Die Gesamtfluoreszenz von CD83 bei der Nullkontrolle lag zu den Zeitpunkten 0 und 4 Stunden mit Werte von 4,7 bzw. 6,4 nur um einen Faktor 2 bzw. 4,6 über denen der Hintergrundfluoreszenz (2,4 und 1,4).

Die nach 4 Stunden gemessenen Gesamtfluoreszenzen des Antigen-präsentierenden Proteins CD1a zeigten relativ geringe Unterschiede in Abhängigkeit von den einzelnen Stimuli. Der höchste Wert, 2.550±75, hervorgerufen durch die Stimulation mit *H. pylori*, lag nur wenig über dem niedrigsten, 2.145±309, nach Stimulation mit *H. pylori* und dem p38-Inhibitor. Alle anderen Gesamtfluoreszenzen lagen zu diesem Zeitpunkt zwischen diesen Werten.

Nach 12 Stunden war ein allgemeiner Rückgang der CD1a-Gesamtfluoreszenz zu beobachten, mit 1.987±263 war der Wert bei der Nullkontrolle am höchsten. Bei Stimulation mit LPS und *H. pylori* waren die Werte fast gleich, 1.540±120 bzw. 1.557±98. Eine allgemeine Aussage über die Wirkung der MAPK-Inhibitoren auf CD1a konnte nicht gemacht werden. Die Werte lagen bei 1.469±78 nach p38-Inhibition, bei 1.766±154 nach ERK- und 1.501±87 nach JNK-Inhibition.

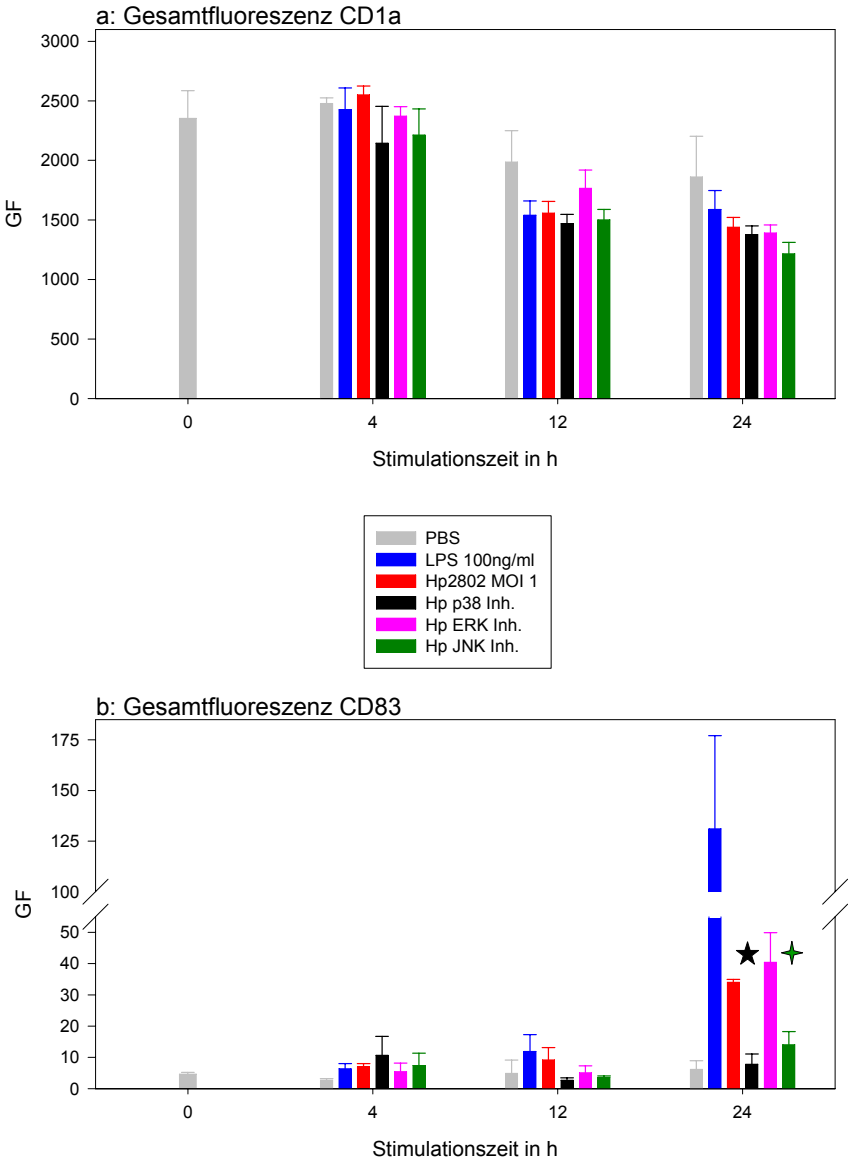


Abbildung 26: Vergleich der Gesamtfluoreszenz von CD1a und CD83 humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden mit und ohne Verwendung von MAPK-Inhibitoren
Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, ✦ =p≤0,01, ★ =p≤0,001, Signifikanz bezogen auf *H. pylori* ohne Inhibitor, gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus einem repräsentativen Experiment

Die Intensitätsabnahme der CD1a-Gesamtfluoreszenz nach Inhibition der MAPK-Wege setzte sich bis 24 Stunden fort. So betrug die Gesamtfluoreszenz 1.376±75 bei p38-Inhibition, 1.392±65 bei ERK-Inhibition und 1.216±96 bei JNK-Inhibition.

Am höchsten war die Intensität nach wie vor bei der Nullkontrolle (1.861±342), gefolgt von LPS (1.589±158) und *H. pylori* ohne Inhibition (1.438±84).
Im Vergleich zu den anderen Oberflächenantigenen zeigte CD83 eine geringe Gesamtfluoreszenz (Abbildung 26b). In den ersten 12 Stunden der Stimulation war fast keine Veränderung der Absolutwerte zu verzeichnen. Einzig der 24 Stundenwert der LPS-Stimulation übertraf mit einer Gesamtfluoreszenz von 131±46, deutlich die anderen Werten, die zwischen 2,7±0,5 und 40±9,5 lagen.
Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen waren nach 4 Stunden alle Gesamtfluoreszenzen fast gleich hoch. Sie betrugen zwischen 4,7±0,5 und 11±6,0.
Eine deutliche Veränderung der Intensität war auch nach 12 Stunden nicht festzustellen. Die Intensität betrug ohne Stimulation 4,9±4,2, nach LPS- und *H. pylori*-Stimulation 12±5,4 bzw. 9,2±3,9. Die Zugabe der Inhibitoren bewirkte eine leichte Verringerung der Floureszenzintensität von CD83 auf Werte zwischen 2,7±0,8 und 5,1±2,2.
Während die Gesamtfluoreszenz der Nullkontrolle mit 6,2±2,8 auch nach 24 Stunden weitgehend unverändert blieb, war besonders bei LPS eine deutliche Steigerung der CD83-Gesamtfluoreszenz zu erkennen, mit 131±46 lag die Intensität etwa zehnfach höher als nach 12 Stunden. Nach Stimulation mit *H. pylori* wurde ein Wert von 34±0,9 gemessen, bei p38-Inhibition lag er dagegen nur bei 7,8±3,3, war also fast unverändert. Auch bei Verwendung des JNK-Inhibitors war die Intensität mit 14±4,2 gering. Der Wert nach ERK-Inhibition blieb dagegen mit 40±9,5 auf dem gleichen Niveau wie ohne Inhibition.

Deutlicher waren die Unterschiede in der Gesamtfluoreszenz beim kostimulatorischen Molekül CD80 (Abbildung 27a). So stieg die Gesamtfluoreszenz der dendritischen Zellen nach Stimulation mit LPS von 33±4,5 auf 1.454±320. Wie bei den meisten Oberflächenproteinen war nach 4 Stunden fast keine Veränderung feststellbar.
Dies änderte sich nach 12 Stunden. Bei der Nullkontrolle mit PBS war ein Anstieg auf 157±57 messbar. Noch größer fiel die Steigerung bei Stimulation mit LPS und *H. pylori* aus, die Intensitäten betrugen 523±13 und 422±105. Die Blockierung des p38-Signalweges führte bei den DCs zu einer deutlichen Reduktion der CD80-Gesamtfluoreszenz auf 33±13. Die beiden anderen Inhibitoren führten dagegen zu einer leichten Erhöhung auf 510±137 (ERK-Inh.) und 519±86 (JNK-Inh.).
Nach 24 Stunden konnte ebenfalls ein Anstieg der Gesamtfluoreszenz beobachtet werden. Die Gesamtfluoreszenz der Negativkontrolle lag mit 283±99 höher als nach 12 Stunden. Noch stärker war der Effekt der Stimulation mit LPS, die Gesamtfluoreszenz betrug 1.454±320. Auch der Anstieg auf 1.047±237 bei

Stimulation mit *H. pylori* war ähnlich deutlich. Wie nach 12 Stunden führte nur der p38-Inhibitor zu einer Abnahme, mit 221±27 lag die Intensität der CD80-Gesamtfluoreszenz deutlich unter der des Ausgangswertes. Die Wirkung der ERK- und JNK-Inhibition war erneut ähnlich, die Messwerte betrugen 1.288±186 bzw. 1.360±167.

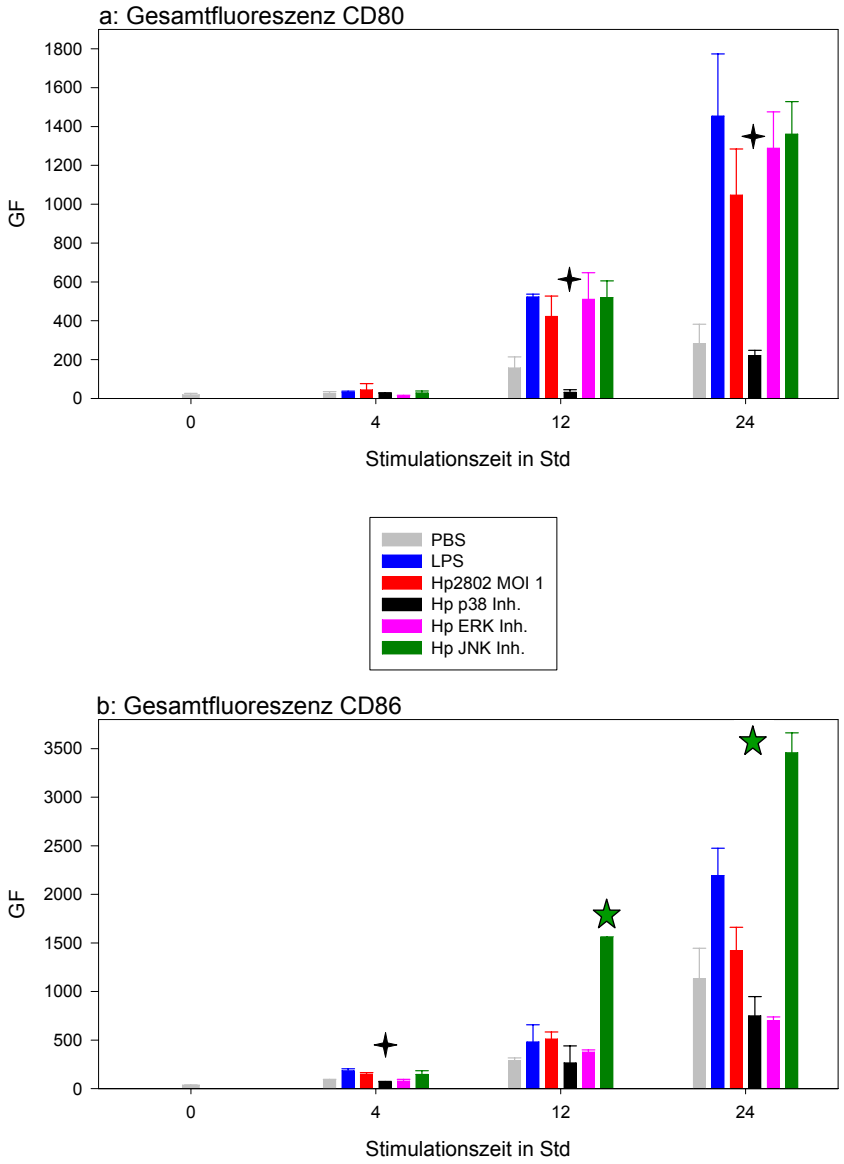


Abbildung 27: Vergleich der Gesamtfluoreszenz von CD80 und CD86 humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden mit und ohne Verwendung von MAPK-Inhibitoren, Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, ✦ =p≤0,01, ★ =p≤0,001, Signifikanz bezogen auf *H. pylori* ohne Inhibitor, gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus einem repräsentativen Experiment

Beim kostimulatorischen Protein CD86 zeigte sich bereits nach 4 Stunden eine erste deutlich Erhöhung der gemessenen Gesamtfluoreszenz (Abbildung 27b).

Die Stimulation der DCs mit LPS führte zu einer Verdoppelung der Intensität von 87±9,6 auf 184±20 im Vergleich zu PBS. Auch durch Stimulation mit *H. pylori* kam es

zu einem starken Anstieg auf 148±17. Während der JNK-Inhibitor keine Wirkung auf CD86 zeigte (Gesamtfluoreszenz 146±39), lagen die Werte nach p38- und ERK-Inhibition mit 68±6,3 bzw. 78±17 auf dem Niveau der Negativkontrolle.
Nach 12 Stunden bewirkten sowohl der p38- als auch der ERK-Inhibitor geringere Steigerungen der Gesamtfluoreszenz. Der JNK-Inhibitor führte dagegen zu einer starken Erhöhung der Gesamtfluoreszenz auf 1.556±14, ein Wert, der etwa dem dreifachen des Wertes ohne Inhibition (511±73) entsprach. Mit 482±176 war die Gesamtfluoreszenz nach Stimulation mit LPS in etwa so hoch wie nach Stimulation mit *H. pylori*, die Negativkontrolle blieb mit 287±29 deutlich darunter.
Ein weiterer Anstieg der Intensität von CD86 war auch nach 24 Stunden zu beobachten. Mit 1.132±313 war der Wert ohne Stimulus deutlich höher als die meisten anderen Werte nach 12 Stunden und ähnlich hoch wie nach Stimulation mit *H. pylori* nach 24 Stunden (1.422±239). Noch höher war die Gesamtfluoreszenz nach LPS-Stimulation mit 2.193±281. Der höchste Wert von 3.458±203 wurde jedoch auch zu diesem Zeitpunkt durch die Stimulation mit *H. pylori* und dem JNK-Inhibitor erreicht. Sowohl nach 12 als auch nach 24 Stunden war diese Erhöhung signifikant (Abbildung 27a). Eine leichte Reduktion der Gesamtfluoreszenz konnte erneut nach Verwendung der Inhibitoren von p38 und ERK gemessen werden.

Die höchste Gesamtfluoreszenz nach Stimulation humaner DCs wurden bei HLA-ABC gemessen (Abbildung 28a). Bereits die Werte der Negativkontrolle bei 0 und 4 Stunden lagen mit 4.338±231 und 4.497±400 über der höchsten Gesamtfluoreszenz anderer Marker. In den ersten 4 Stunden des Versuchs war nur ein sehr geringer Anstieg bei den mit LPS behandelten Zellen zu beobachten, der Wert betrug 4.955±414. Stimulation durch *H. pylori* veränderte die Intensität nicht. Eine leichte Abnahme verursachte die Inhibition von p38 und ERK. Etwas deutlicher fiel die Reduktion durch den JNK-Inhibitor aus.
Während LPS nach 12 Stunden zu einer starken Erhöhung der Intensität auf 6.754±127 gegenüber PBS führte, blieb die Auswirkung der Stimulation mit *H. pylori* mit 4.223±42 relativ gering. Die Inhibition von p38 und JNK zeigte nur wenig Wirkung, der ERK-Inhibitor hatte zum Zeitpunkt 12 Stunden keinen Einfluss auf die HLA-ABC Gesamtfluoreszenz.
Ein weiterer Anstieg der HLA-ABC-Gesamtfluoreszenz war nach 24 Stunden auch bei der Negativkontrolle zu beobachten. Nochmals deutlich höher war die Gesamtfluoreszenz nach Stimulation mit LPS und *H. pylori*, sie betrugen 7.963±36 und 7.346±25. Nach Inhibition von p38 konnte eine ähnliche Reduktion beobachtet werden, wie nach Inhibition von JNK. Eine leichte Erhöhung bewirkte dagegen der ERK-Inhibitor.

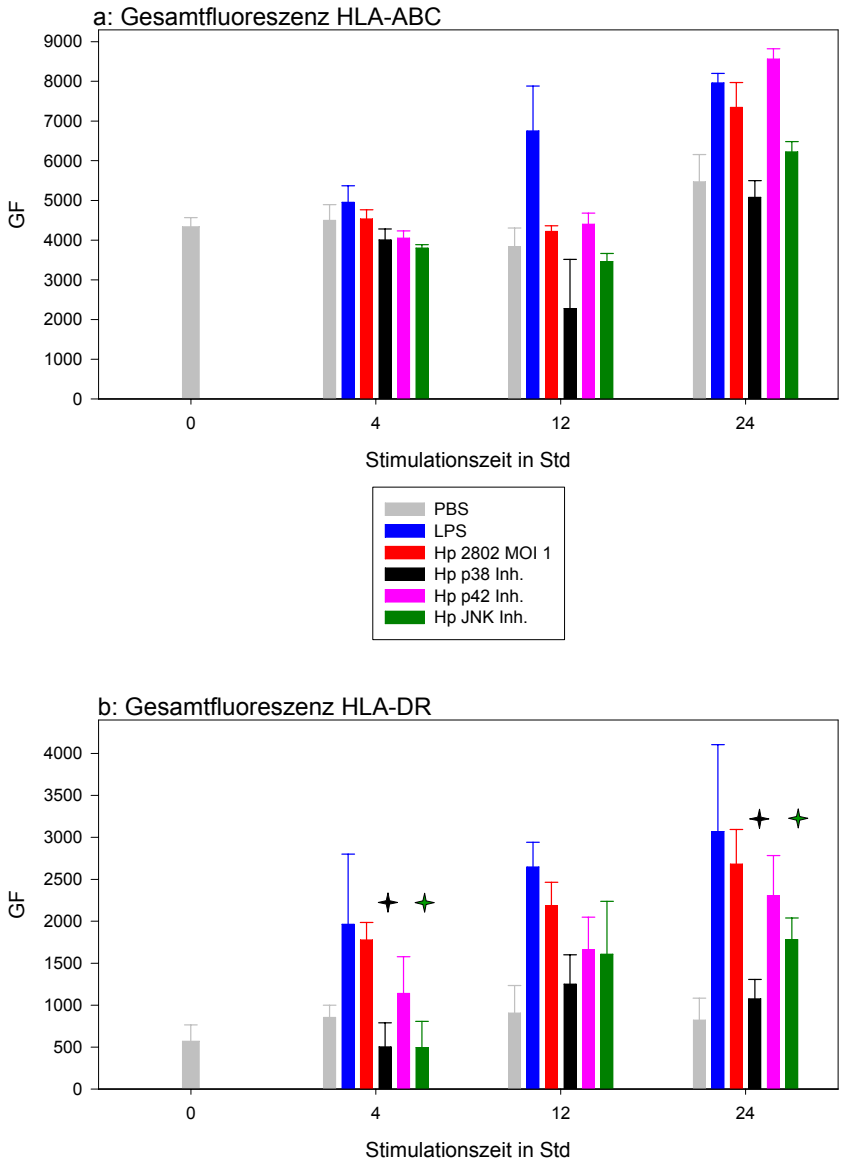


Abbildung 28: Vergleich der Gesamtfluoreszenz von HLA-ABC und HLA-DR humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden mit und ohne Verwendung von MAPK-Inhibitoren. Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, ✦ =p≤0,01 Signifikanz bezogen auf *H. pylori* ohne Inhibitor, gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus einem repräsentativen Experiment

Die gesteigerte Expression des HLA-DR-Moleküls war bereits nach 4 Stunden nachweisbar (Abbildung 28b). Zwar stieg auch die Gesamtfluoreszenz der Negativkontrolle zwischen 0 und 4 Stunden, die Werte für *H. pylori*- und LPS-Stimulation von humanen DCs lagen jedoch etwa doppelt so hoch. Die Inhibition zeigte besonders bei p38 und JNK eine messbare Wirkung, der Rückgang der Gesamtfluoreszenz war in beiden Fällen signifikant. Zwar sank auch die Intensität nach ERK-Inhibition, jedoch nicht signifikant.

Acht Stunden später zeigte die Negativkontrolle nahezu keine Veränderung, die anderen Messwerte waren dagegen gestiegen. Nahezu gleich stark waren die Stimulationen durch LPS (2.649±23) und *H. pylori* (2.185±80). Die Inhibition der

einzelnen MAPKs führte in allen Fällen zu einer leichten, nicht signifikanten Reduktion der Gesamtfluoreszenz.
Auch 24 Stunden nach Beginn der Stimulation war die Gesamtfluoreszenz durch LPS und *H. pylori* erhöht. Im Gegensatz dazu blieb die Negativkontrolle in ihrer Intensität fast unverändert. Die Inhibitoren von p38 und ERK bewirkten zu diesem Zeitpunkt eine signifikant niedrigere Gesamtfluoreszenz, der ERK-Inhibitor zeigte nur eine geringe Reduktion.

Veränderung der Oberflächenproteine nach Inhibition im Vergleich zur Stimulation ohne Inhibitor				
Stimulationszeit	**Oberflächenprotein**	**Inhibitor**		
		p38	**ERK**	**JNK**
4 Stunden	CD1a	o	o	o
	CD83	o	o	o
	CD80	o	o	o
	CD86	-	o	o
	HLA-ABC	o	o	o
	HLA-DR	-	o	o
12 Stunden	CD1a	o	o	o
	CD83	o	o	o
	CD80	-	o	o
	CD86	o	o	**+ +**
	HLA-ABC	o	o	o
	HLA-DR	o	o	o
24 Stunden	CD1a	o	o	o
	CD83	**- -**	o	-
	CD80	-	o	o
	CD86	o	o	**+ +**
	HLA-ABC	o	o	o
	HLA-DR	-	o	-

Tabelle 7: Veränderung der Zytokinsekretion humaner dendritischen Zellen nach Stimulation mit *H. pylori* und unter Verwendung verschiedener MAPK-Inhibitoren,
--: signifikante Abnahme, p≤0,001, -: signifikante Abnahme, p≤0,01, 0: keine signifikante Veränderung, ++: signifikante Zunahme, p≤0,001

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Zytokinsekretion der dendritischen Zellen lassen die aus der Untersuchung der Oberflächenantigene gewonnenen Erkenntnis nur wenig Rückschlüsse auf die Zusammenhänge zwischen MAPKs und

Oberflächenproteinen zu. Zumindest tendenziell zeigte aber auch bei den Oberflächenproteinen der p38-Inhibitor die stärkste Reduktion. Auffällig war zudem die starke Erhöhung der CD86 Gesamtfluoreszenz durch die Inhibition des JNK-Signalweges.
Die Veränderung der Oberflächenproteinexpression sind in Tabelle 7 dargestellt.

6 Diskussion

6.1 Kinetik der Zytokinsekretion von Maus-Splenozyten nach Stimulation mit *H. pylori*

Aufgrund der Tatsache, dass in der Milz alle wesentlichen Immunzellen vorhanden sind, wurden in den Vorarbeiten der Gruppe Splenozyten aus naiven Mäusen als Modell für die angeborene Immunantwort verwendet. Da die bisherigen Untersuchungen nur zum Zeitpunkt 36 Stunden durchgeführt worden waren, sollte in diesem Versuch die Zytokinsekretion im gesamten Zeitraum von 0 bis 36 Stunden gemessen werden. Auf diese Weise sollten auch Konzentrationen von Zytokinen, die in der frühen Phase der Stimulation sezerniert werden, ermittelt werden. Wichtige Zytokine in dieser Phase sind TNF-α und IL-12, die im weiteren Verlauf der Alarmkaskade die Sekretion von IL-6, IFN-γ und IL-10 auslösen (Abbildung 29). Diese Alarmkaskade ist für die Stimulation mit LPS bekannt, im Rahmen unserer Versuche sollte untersucht werden, ob sie auch nach Stimulation mit *H. pylori* eintritt. Um auch die Zytokine der frühen Phase messen zu können, wurden alle 2 Stunden die Zellüberstände der jeweiligen Stimulationen geerntet.

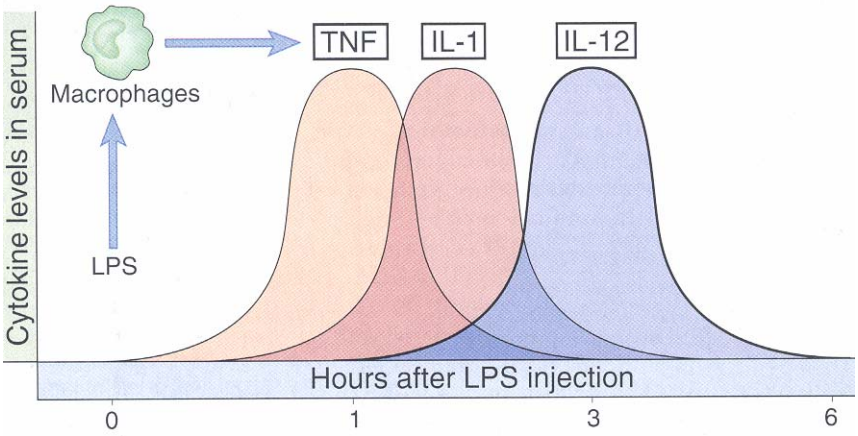


Abbildung 29: Zytokinfreisetzung in der frühen Phase der Immunreaktion auf LPS aus Abbas et al., (2003).

Es konnten erhebliche Unterschiede sowohl im zeitlichen Verlauf als auch in der Konzentration der einzelnen Zytokine festgestellt werden. TNF-α, das Schlüsselzytokin der angeborenen Immunantwort, konnte als erstes nach 4 Stunden nachgewiesen werden (Abbas et al., 2003; Männel et al., 2000; Pfeffer, 2003). Im Vergleich dazu konnten Zhou et al. (2003) in ihren Stimulationen von Maus-Splenozyten mit LPS aus *Salmonella typhimurium* eine Steigerung der Synthese TNF-α-mRNA bereits nach 2 Stunden nachweisen. Da in unseren Versuchen nicht

die mRNA, sondern die Zytokinsekretion ins Medium gemessen wurde, ist der spätere Nachweis von TNF-α im Vergleich zur mRNA von TNF-α erklärbar.
In den Versuchen zeigte sich, dass die Zytokine IL-6 und IFN-γ nach Stimulation mit *H. pylori* erst nach 6 bzw. 20 Stunden nachweisbar waren. Das spätere Einsetzen der Sekretion von IL-6 und IFN-γ deutete auf eine Abhängigkeit dieser beiden Zytokine von TNF-α hin. Aus der Literatur ist die Tatsache bekannt, dass TNF-α die Sekretion anderer pro-inflammatorischer Zytokine auslöst (Abbas et al., 2003; Heller et al., 1994). Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Daten sind ein Indiz dafür, dass TNF-α diese Funktion auch bei Stimulation mit *H. pylori* übernimmt.
Ferner konnten wir bei IL-6 eine höhere Konzentration als bei TNF-α messen. Die Erhöhung der IL-6-Sekretion im Vergleich zu TNF-α wurde auch von Zhou et al. (2003) auf mRNA-Ebene nach Stimulation mit LPS beschrieben. In unseren Untersuchungen konnten wir dies durch ELISA für die Stimulation mit LPS und *H. pylori* beobachten. Es zeigten sich also Parallelen zwischen mRNA einerseits und Zytokinen andererseits.
Während sich bei den pro-inflammatorischen Zytokinen TNF-α, IL-6 und IFN-γ nach Stimulation entweder ein Anstieg der Konzentration mit anschließender deutlicher Verringerung (TNF-α) oder ein kontinuierlicher Anstieg nach Einsetzen der Sekretion (IL-6 und IFN-γ) zeigte, war bei der Untersuchung von IL-12 keine Kontinuität in der Sekretion zu erkennen. Einerseits lag die Sekretion im Bereich der Nachweisgrenze, anderseits waren die Streuungen der einzelnen Messpunkte sehr groß. Auch im Zeitverlauf der Sekretion waren keine längeren Abschnitte mit Zu- oder Abnahme der Zytokinsekretion ersichtlich. IL-12 ist sowohl Teil der angeborenen als auch der erworbenen Immunantwort und stellt einen Schlüsselfaktor in der Aktivierung des Immunsystems nach Infektion mit Bakterien, Parasiten, Pilzen und Viren dar (Parsonnet et al., 1999; Trinchieri, 2003). Trotz des Fehlens direkter IL-12-Nachweise darf die Bedeutung des Zytokins nicht unterschätzt werden, da bereits äußerst geringe Mengen IL-12 für die *H. pylori*-induzierte IFN-γ-Sekretion von murinen Splenozyten verantwortlich sein können. Dies konnte Aigner (2004) mit Hilfe von anti-IL-12-Antikörpern zeigen. In seinen Versuchen konnte Aigner nachweisen, dass es nach Verwendung spezifischer anti-IL-12-Antikörper nicht mehr zur Sekretion von IFN-γ kam. Die Sekretion von IL-12 war also die Voraussetzung zur Freisetzung von IFN-γ.
Im Vergleich zur Stimulation mit LPS aus *E. coli* kam es nach Stimulation mit *H. pylori* zu einer deutlichen späteren Freisetzung von IL-10 (nach 14 statt nach 4 Stunden). Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass durch die Stimulation mit *H. pylori* die Splenozyten mit einer komplexen Mischung aus Antigenen konfrontiert wurden und nicht wie im Falle von LPS mit einem Antigen. Dies könnte dazu geführt

haben, dass die Makrophagen, welche die Hauptproduzenten von IL-10 sind, dieses Zytokin erst später freisetzten (Gordon, 1999; Stoy, 2001).
Auffallend war, dass obwohl *H. pylori* eine mehr als doppelt so hohe TNF-α-Produktion induzierte bei Stimulation mit LPS dosisabhängig die Zytokinkonzentrationen von IL-6, IFN-γ und IL-10 durchweg höher waren als bei *H. pylori*-Stimulation. Da LPS von den Immunzellen nur über TLR4 aufgenommen wird, besteht die Möglichkeit, dass es hierdurch zu einem besonders deutlichen, aber nur von einer Signalkaskade gesteuerten Signal kam (Akira, 2003; Hirschfeld et al., 2001; Su et al., 2003). Im Gegensatz dazu stellt *H. pylori* ein komplexes Signal dar, welches durch mehrere Signalkaskaden, die von TLR2, TLR4 und TLR5 aktiviert werden, weitergeleitet wird. (Akira, S., 2003; Mandell et al., 2004; Torok et al., 2005). Dies könnte dazu geführt haben, dass es zu gegenseitiger Beeinflussung der einzelnen Kaskaden kam, wodurch es zur geringeren Sekretion einzelner Zytokine, wie IL-6, IFN-γ oder IL-10 kommen könnte. Eine alternative Erklärung wäre, dass die Zytokinproduktion nach Stimulation mit *H. pylori* mit Ausnahme der TNF-α-Sekretion länger dauert als nach Stimulation mit LPS. Es wäre also möglich, dass zu späteren Zeitpunkten größere Zytokinkonzentrationen messbar wären.

6.2 Kinetik der Zytokinsekretion von RAW264.7-Makrophagen

Aufgrund der Untersuchungen an Splenozyten (5.1) sollte die Kinetik der Zytokinsekretion unterschiedlicher Teilpopulationen von Lymphozyten ermittelt werden. Dadurch sollte der Beitrag verschiedener Populationen zur Zytokinsekretion gezeigt werden. Da sowohl Makrophagen als auch DCs wichtige Bestandteile der angeborenen Immunantwort sind, wurden diese beiden Zelltypen ausgewählt (Akira et al., 2004; Janeway et al., 2002). Zur Etablierung des Systems wurden Makrophagen der Zelllinie RAW264.7 verwendet, da diese durch ihre einfache Kultivierung und nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit in der Handhabung deutlich weniger aufwändig sind als Primärzellen.
Im Vergleich zu den Splenozyten, die bei einer *H. pylori-multiplicity of infection* (MOI) von 1 und darunter die stärkste immunologische Stimulierbarkeit zeigten, war bei RAW-Zellen eine MOI von 5 oder höher nötig, damit nachweisbare Mengen von Zytokinen produziert wurden (Daten nicht gezeigt) (Aigner, 2001). Bei einer *H. pylori*-MOI von 10 und 50 zeigten die Makrophagen noch einmal eine deutliche Erhöhung der Sekretion aller untersuchten Zytokine. Eine *H. pylori*-MOI von 50 erscheint auf den ersten Blick im Vergleich zu Splenozyten sehr hoch, sie wurde aber beispielsweise von Assmann et al. (2001) als ideal für die Makrophagenzelllinie J774A.1 beschrieben. In der Arbeit von Moese et al. (2002) wurde für U907 und Josk-M Zellen sogar eine *H. pylori*-MOI von 100 verwendet.

Wie bei den Splenozyten war auch bei den Makrophagen TNF-α das erste Zytokin, das sich nach Infektion in größeren Mengen nachweisen ließ. Bei den Makrophagen war TNF-α jedoch schon nach einer Stunde messbar. Die deutlich schnellere Nachweisbarkeit war wahrscheinlich darin begründet, dass in der Zelllinie RAW264.7 nur Makrophagen vorhanden sind, wohingegen die Makrophagen in einer Mausmilz nur etwa 3,5% der Gesamtzellzahl ausmacht (Schütz, 2004). Dies bedeutet, dass bei gleicher Zellzahl im Vergleich etwa 30-mal mehr Makrophagen zur Produktion von TNF-α beitragen, was wiederum zu einem schnelleren Anstieg der TNF-α-Konzentration führen kann.

Die TNF-α-Konzentration war zudem um etwa 3 Zehnerpotenzen höher, als die für Splenozyten ermittelte (5.1). Hierfür gibt es zwei mögliche Ursachen. Erstens handelt es sich bei der Zelllinie um eine reine Makrophagenzelllinie und da Makrophagen zu den Hauptproduzenten von TNF-α gehören, ist die TNF-α-Sekretion wahrscheinlich deutlich höher als in der Milz (Abbas et al., 2003). Zweitens besteht die Möglichkeit, dass Zellen aus Zelllinien in ihrer Zytokinsekretion nicht unbedingt mit primären Zellen vergleichbar sind, und RAW264.7 Zellen besonders viel TNF-α produzieren. Die basale Expression von TNF-α bei der Negativkontrolle mit PBS, die zu Konzentrationen zwischen 400 und 1.000pg/ml führte, wurde schon von Singh et al. (1995) für RAW264.7 Zellen beschrieben, sie war also nicht ungewöhnlich. Der starke Anstieg der TNF-α-Konzentration nach 24 Stunden war vermutlich auf eine Stimulation der Zellen durch Endprodukte des Zellstoffwechsels und eine damit verbundene Verschlechterung des Mediums zurückzuführen.

Im Gegensatz zu den Splenozyten stieg die TNF-α-Konzentration während der ersten 24 Stunden an, ohne ein Maximum zu erreichen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass es bei den Splenozyten zu einer Rückkoppelung durch andere Zytokine oder Signalsubstanzen kommt, die sich negativ auf die TNF-α-Sekretion auswirkt und die bei den RAW264.7-Makrophagen fehlt. Diese fehlende oder zu geringe Rückkopplung könnte bei den RAW-Zellen durch die vergleichsweise geringe Menge an produziertem IL-10 verursacht worden sein. Während bei den Splenozyten und den primären Makrophagen das Verhältnis von TNF-α zu IL-10 bei unter 10:1 lag, lag das Verhältnis bei den RAW-Makrophagen bei etwa 100:1. Da eine der Aufgaben von IL-10 während der Immunantwort darin besteht, TNF-α zu inhibieren, könnte die geringe IL-10-Konzentration der Grund dafür sein, dass die TNF-α-Konzentration nicht gesunken ist (Moore et al., 2001; Murray, 2005). Möglicherweise spielt es aber auch eine Rolle, dass RAW264.7-Makrophagen nur geringe Menge des IFN *regulatory factor* 4 (IRF4) exprimieren (Honma et al., 2005). Durch Honma et al. (2005) konnte gezeigt werden, dass IRF4 die Sekretion von

TNF-α negativ reguliert. Die niedrige Expression von IRF4 in RAW264.7-Makrophagen könnte also zu einer hohen TNF-α-Konzentration geführt haben.
Wie bei den Splenozyten (5.1) zeigte sich bei den RAW-Makrophagen eine zeitliche Verzögerung beim Beginn der IL-6-Sekretion nach Stimulation. Erst nach etwa 8 Stunden war ein Anstieg der Sekretion messbar, der sich in weiteren Versuchen über 72 Stunden fortsetzte (Daten nicht gezeigt). Auch bei IL-6 war die sezernierte Zytokinmenge deutlich höher als bei Splenozyten, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass Makrophagen zu den Hauptproduzenten von IL-6 gehören (Abbas et al., 2003; Gordon, 1998; Mosser, 2003).
Im Unterschied zur Zytokinsekretion bei den Splenozyten wurde weniger IL-6 als TNF-α gebildet. Die Ursache hierfür war vermutlich eine besonders hohe TNF-α-Produktion durch RAW-Zellen, da Makrophagen aus C57BL/6-Mäusen (5.3) ähnliche Mengen IL-6 und TNF-α und C3H-Makrophagen sogar mehr IL-6 als TNF-α bildeten. Wie aus Barton (1997) und Pritts et al. (2002) zu entnehmen ist, kann IL-6 auch die TNF-α-Synthese *in vivo* abschalten. Eine zu geringe IL-6-Konzentration könnte daher neben der IL-10-Konzentration dazu führen, dass dieser Effekt nicht oder nur verspätet eintritt.
Schon nach 2-4 Stunden konnte dagegen IL-10 nachgewiesen werden, ähnlich früh wie bei den Splenozyten. Obwohl Makrophagen neben T-Zellen eine der Hauptquellen von IL-10 sind, war die von RAW264.7-Makrophagen sezernierte Menge im Vergleich zu TNF-α und IL-6 gering (Abbas et al., 2003; Moore et al., 2001). Die Freisetzung von IL-10 zeigte im Gegensatz zu TNF-α und IL-6 nicht nur im Bezug auf die Konzentration, sondern auch im Sekretionsprofil eine Abhängigkeit von der *H. pylori*-MOI. Während bei einer MOI von 5 nach 8 Stunden der höchste IL-10-Wert gemessen wurde, wurde bei MOI 10 und 50 die höchste Konzentration nach 24 Stunden erreicht. Trotz dieser frühen Sekretion von IL-10, das als Antagonist von TNF-α dessen Expression eindämmen soll, war nach 24 Stunden noch kein Rückgang der TNF-α Konzentration erkennbar (Stoy, 2001). Möglicherweise spielte bei der IL-10-Sekretion auch das Verhältnis der Zytokine TNF-α und IL-6 zueinander eine Rolle. Wie oben beschrieben, wurde von den RAW-Zellen im Verhältnis zu TNF-α relativ wenig IL-6 gebildet, diese Beobachtung wurde auch von Singh et al. (1995) gemacht. Die Möglichkeit, dass nicht die geringe IL-10-Konzentration für die hohe TNF-α-Konzentration verantwortlich war, sondern umgekehrt, dass das Verhältnis von TNF-α zu IL-6 die niedrige IL-10-Konzentration verursachte, muss also auch in Betracht gezogen werden.

6.3 Untersuchungen an primären murinen Makrophagen

Da Makrophagen ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort auf Pathogene sind, wurden Stimulationsversuche mit *H. pylori* durchgeführt, um ihre Rolle bei der Infektion mit *H. pylori* zu untersuchen. Wie bereits erwähnt, konnten die Daten, die mit den RAW-Zellen ermittelt wurden, nur bedingt mit den Ergebnissen der Untersuchungen an Splenozyten in Einklang gebracht werden. Deshalb wurden für die folgenden Versuche primäre Makrophagen aus C57BL/6-Mäusen verwendet. Dazu wurden aus dem Knochenmark Monozyten gewonnen, die dann zu Makrophagen differenziert wurden. Der Vorteil primärer Makrophagen gegenüber einer Makrophagenzelllinie besteht darin, dass sie den natürlichen Verhältnissen eher entsprechen als die Zellen einer Zelllinie. Primäre Zellen werden direkt aus dem Organismus gewonnen und nicht wie die RAW264.7-Zellen seit über 25 Jahren im Labor weitergeführt wurden (Raschke et al., 1978). Nachteilig ist dagegen, dass die Präparation der Zellen aus den Knochen vergleichsweise diffizil ist und für die Differenzierung der Zellen acht Tage benötigt werden.

Vorversuche hatten gezeigt, dass primäre Makrophagen leichter stimulierbar waren als RAW264.7-Zellen. Deshalb wurden die Versuche statt mit *H. pylori*-MOIs von 5 bis 50 mit MOIs von 1 und 5 durchgeführt.

Im Vergleich zu den RAW-Zellen zeigten sich zwei wesentliche Unterschiede. Zum einen erreichte sowohl die TNF-α– als auch die IL-10-Sekretion ein Maximum. Für das Zytokin TNF-α war die höchste Konzentration bei allen Stimuli nach 4 Stunden erreicht, bei IL-10 war der höchste Wert nach Stimulation mit LPS und *H. pylori*-MOI 5 nach 12 und für *H. pylori*-MOI 1 nach 24 Stunden erreicht. Zum anderen war die TNF-α-Sekretion etwa um eine Zehnerpotenz niedriger als bei den RAW-Makrophagen, die Sekretionen von IL-6 und IL-10 waren dagegen vergleichbar. Wie bei den Splenozyten zeigte sich ein Maximalwert mit anschließendem steilen Abfall in der TNF-α-Sekretion. Dies war vermutlich auf die höhere Konzentration des TNF-α-Antagonisten IL-10 zurückzuführen, der eine Expression von TNF-α auf mRNA-Ebene verhindert (Murray, 2005; Stoy, 2001). Ebenfalls wie bei den Splenozyten und in den weiteren Versuchen mit DCs, wurde bei IL-6 nach 24 Stunden noch kein Maximalwert erreicht, der Anstieg der Konzentration setzte sich bis 48 Stunden fort. IL-6 wurde also im Gegensatz zu TNF-α während der Versuchsdauer nicht negativ reguliert. Dieser Befund wird durch die Arbeit von Pritts et al. (2002) bestätigt, die intestinale Epithelzellen von Ratten (Zelllinie IEC-6) mit LPS stimulierten. Die höchste IL-6-Sekretion wurde in dieser Untersuchung nach drei Tagen erreicht.

Zusätzlich zur Zytokinsekretion sollte bei den primären Makrophagen die differentielle Expression von Oberflächenantigenen untersucht werden. Oberflächenantigene stellen den direkten Kontakt von Zelle zu Zelle her und dienen dabei der Stimulation

oder der Antikörperpräsentation. Eine positive Korrelation zwischen Stimulus (*H. pylori* und LPS) und Oberflächenantigen konnte in dieser Arbeit für CD54 und CD40 gezeigt werden.

Das Adhäsionsmolekül CD54 (ICAM-1) (Roebuck et al., 1999; van de Stolpe et al., 1996) zeigte nach Stimulation mit *H. pylori* während der gesamten Versuchsdauer eine höhere Gesamtfluoreszenz als die Negativkontrolle. Eine gesteigerte Expression von CD54 nach Stimulation mit *H. pylori* wurde auch von Moese et al. (2002) für Makrophagen der Zelllinie U937 und Josk-M beschrieben, was unsere Beobachtungen untermauert.

Eine positive Korrelation zwischen der Stärke des Stimulus und der Expression konnte auch bei der Untersuchung von CD40 gemessen werden. Die Erhöhung der Gesamtfluoreszenz erwies sich als abhängig von der MOI des eingesetzten *H. pylori.* Die Steigerung der Gesamtfluoreszenz setzte sich über die gesamte Versuchsdauer fort. Noch stärker zeigte sich die Erhöhung der Gesamtfluoreszenz von CD40 bei LPS-Stimulation. Während des Versuches nahm die Gesamtfluoreszenz nach LPS-Stimulation wieder ab. Das Molekül CD40 dient über seinen Liganden CD40L (CD154) zur Interaktion mit T-Zellen (Benveniste et al., 2004; Mukundan et al., 2004; Shortman et al., 2002). Kikuchi et al. (2003) konnten an murinen DCs zeigen, dass Stimulation mit LPS eine signifikante Verstärkung der CD40 Expression zur Folge hatte. Die gemessene Erhöhung der Gesamtfluoreszenz von CD40 nach Stimulation mit *H. pylori* lässt auf eine Aktivierung durch das Bakterium schließen.

6.4 Einfluss von TLR4 auf die *H. pylori*-Stimulation von murinen Makrophagen und dendritischen Zellen

Der *Toll-like*-Rezeptor 4 (TLR4) dient zur Erkennung von LPS gramnegativer Bakterien. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss des Rezeptors auf die angeborene Immunantwort nach Stimulation mit *H. pylori* untersucht werden (Akira, 2003; Janeway et al., 2002; Medzhitov, 2001). C3H/HeJ-Mäuse reagieren durch eine Mutation im TLR4-Gen hyporesponsiv auf die Stimulation mit LPS, das heißt, sie zeigen nur eine schwache Immunreaktion auf LPS (Bäckhed et al., 2003; Hagberg et al., 1984; Means et al., 2000). Da *H. pylori* im Gegensatz zu LPS nicht nur über TLR4 sondern auch durch andere TLRs erkannt wird, waren zwar Unterschiede in der Immunreaktion auf *H. pylori* zwischen TLR4-WT und DM zu warten, sie sollten jedoch geringer ausfallen, als bei Stimulation mit LPS.

Erwartungsgemäß waren bei den Stimulationen mit LPS aus *E. coli* die Mengen, der von der DM gebildeten Zytokine deutlich geringer als beim WT. Da die Stimulation nicht gänzlich ausblieb, könnte dies darauf hin deuten, dass eventuell ein Teil des LPS über TLR2 aufgenommen wurde. Wie bei Hirschfeld et al. (2001) und Torok et

al. (2005) beschrieben, dient TLR2 zur Erkennung von strukturell ungewöhnlichem LPS wie dem von *Porphyromonas gingivalis*. Vielleicht nutzen Zellen mit einer TLR4-Mutation diesen Rezeptor auch zur Aufnahme von *E. coli*-LPS, welches strukturell „normal“ ist. Die Unterschiede der beiden LPS-Arten liegen in der Struktur des Lipid-A-Anteils (Hirschfeld et al., 2001).
Bei allen untersuchten Zytokinen war die Verringerung der Sekretion nach Stimulation der TLR4-DM mit *H. pylori* geringer als nach LPS-Stimulation. Welche Bestandteile von *H. pylori* mit den verschiedenen TLRs interagieren, wird in der Literatur kontrovers dargestellt. Während Mandell et al. (2004) zeigten, dass LPS aus *H. pylori* über TLR4 reagierte, beschrieben Torok et al. (2005) und Smith, Jr. et al. (2003) die Interaktion über TLR2. Auch die Frage, über welche TLRs die Immunantwort auf vollständigen *H. pylori* eingeleitet wird, ist umstritten. Schmausser et al. (2004) beschrieben eine direkte Bindung von *H. pylori* an TLR4, Su et al. (2003) wiesen eine Erhöhung der Transkription des TLR4-Gens als Reaktion auf die Infektion mit *H. pylori* nach. Dagegen beobachteten andere Autoren eine Aktivierung von TLR2, teilweise gemeinsam mit TLR5 (Mandell et al., 2004; Smith, Jr. et al., 2003; Torok et al., 2005). Einig sind sich die Autoren darüber, dass das LPS von *H. pylori* deutlich geringere immunstimulatorische Eigenschaften hat als das von *E. coli*, *Salmonella enterica* oder *Salmonella minnesota* (Bliss et al., 1998; Muotiala et al., 1992; Perez-Perez et al., 1995). Je nach Vergleichsorganismus war die Reaktion auf LPS von *H. pylori* um einen Faktor 100-10000 schwächer als die auf LPS von anderen gramnegativen Bakterien (Bliss et al., 1998; Mandell et al., 2004; Muotiala et al., 1992; Perez-Perez et al., 1995). In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass TLR4 in der Erkennung von *H. pylori* wichtig ist, auch wenn nicht klar ist, ob dieser Rezeptor für die Erkennung von *H. pylori*-LPS verantwortlich ist. Wenn TLR4 bei der Stimulation mit *H. pylori* ausschließlich dessen LPS erkennt, hat dieses LPS, obwohl es vergleichsweise schwach ist, immer noch großen Einfluss auf die Immunreaktion.

Die Sekretion von TNF-α nach Stimulation mit LPS und *H. pylori* fiel sowohl bei den Makrophagen als auch bei den DCs der TLR4-DM deutlich geringer aus als bei den entsprechenden TLR4-WT-Zellen. Ein Unterschied in der IL-6-Sekretion zeigte sich nach Stimulation mit *H. pylori* nur bei den Makrophagen. Makrophagen und DCs zeigten keinen Unterschied in der Sekretion von IL-10 zwischen DM und WT nach Stimulation mit *H. pylori*. Dies bedeutet, dass die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF-α und IL-6, durch TLR4 beeinflusst wurde, nicht aber die Sekretion des anti-inflammatorischen IL-10. Bei der Stimulation mit LPS zeigte die DM dagegen eine deutlich geringere IL-10-Sekretion als der WT.

Neben der Sekretion von Zytokinen wurden auch die Auswirkungen der Stimulation mit *H. pylori* auf verschiedene Oberflächenproteine untersucht. Immunologisch relevante Oberflächenproteine wie CD40, CD80 und CD86 haben kostimulatorische Eigenschaften oder dienen der Antigenpräsentation, wie z.B. MHC-II. Dadurch sind sie neben den Zytokinen wichtig für die Interaktion der einzelnen Zellen des Immunsystems untereinander.
Das Adhäsionsprotein CD11c, das als Indikator für den Reifungsstatus von DCs verwendet wird, wurde in den ersten 12 Stunden bei der TLR4-DM nur geringfügig stärker exprimiert als ohne Stimulation (Chain, 2003; Shortman et al., 2002; Steinman, 1991; Wick, 2003). Da die Unterschiede zum TLR4-WT nur gering waren, konnte man davon ausgehen, dass es in beiden Fällen unabhängig von TLR4 zu einer Ausreifung der DCs kam.
Der deutlichste Unterschied zwischen WT und DM zeigte sich bei CD40, das über CD154 (CD40L) mit T-Zellen interagiert (Benveniste et al., 2004; Kikuchi et al., 2003; Mukundan et al., 2004; Shortman et al., 2002). Sowohl bei den DCs als auch bei den Makrophagen lag die Gesamtfluoreszenz der DM nach Stimulation mit *H. pylori* bei weniger als der Hälfte des WT. Noch größer war die Differenz nach Stimulation mit LPS. Die Unterschiede zwischen beiden Stimuli liegen vermutlich darin begründet, dass es einen direkten Signalweg von TLR4 zu CD40 gibt und LPS zu einer höheren Expression von CD40 führt (Frleta et al., 2003; O'Neill, 2002b). Durch den Defekt im TLR4 wird dieser Signalweg nicht aktiviert, was eine geringere Expression von CD40 zur Folge hat.
Obwohl auch CD80 und CD86 über TLR4 reguliert werden (Frleta et al. ,2003), fiel die Reduktion weniger deutlich aus. In ihrer Arbeit mit murinen DCs konnten Rescigno et al. (2002) zeigen, dass die Expression von CD86 nach Stimulation mit *E. coli* im Vergleich zum WT zwar reduziert war, aber immer noch deutlich über der Expression der unstimulierten Zellen lag. Dagegen bewirkte die Stimulation der DM mit LPS aus *E. coli* nahezu keine Erhöhung der CD86-Expression im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen (Rescigno et al., 2002). Diese Ergebnisse stimmen mit den von uns gemachten Beobachtungen überein. Anscheinend gibt es außer TLR4 noch weitere Rezeptoren, die auf diese beiden kostimulatorischen Marker Einfluss haben (Curler et al., 2001; Shortman et al., 2002). Es könnte sich hierbei um TLR 2 und/oder 6 handeln. Massari et al. (2002) zeigten, dass die Porine von gramnegativen Bakterien der Gattung *Neisseria* TLR2-abhängig zur verstärkten Expression von CD86 auf murinen B-Zellen führten. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass das Porin von *Shigella dysenteriae* eine gesteigerte Expression von CD80 und CD86 auf murinen B-Zellen bewirkte. Diese Regulation war abhängig von TLR2 und TLR6 (Ray et al., 2004). Da *H. pylori* ebenfalls gramnegativ ist und

Porine besitzt, könnte die Regulation von CD80 und CD86 auch über TLR2 und/oder TLR6 erfolgt sein (Suerbaum et al., 2002).
Die Expression des Antigen-präsentierenden Moleküls MHC-II wurde beim WT nach Stimulation mit *H. pylori* oder LPS deutlich erhöht, bei der Mutante blieb dieser Effekt aus. In den Versuchen mit den DCs war die Expression dieses Oberflächenantigens bei der DM ca. 30% niedriger als bei den WT-Zellen. Die geringe Steigerung der Expression von MHC-II war vermutlich auch auf die geringe Stimulation von CD40 zurückzuführen, da CD40 bei unreifen DCs nach Stimulation mit LPS die Expression von MHC-II fördert (Frleta et al., 2003). Daher ist anzunehmen, dass die geringe Stimulation von CD40 ihrerseits nur einen geringen stimulatorischen Effekt auf MHC-II ausübt.
Bei der Expression von CD54 (ICAM-1) nach der Stimulation mit *H. pylori* zeigten sich Unterschiede in der Gesamtfluoreszenz zwischen Makrophagen und DCs. Während die TLR4-Mutation fast keinen Einfluss auf die CD54-Expression der Makrophagen hatte, konnte in den DCs aus der TLR4-DM eine im Vergleich zum WT deutlich niedrigere CD54-Expression gemessen werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass *H. pylori* die Hochregulation von CD54 induziert (Moese et al., 2002). Dies konnte in unseren Versuchen bestätigt werden. Da die Steigerung der Expression von CD54 unter anderem durch TNF-α induziert wird und die TNF-α-Sekretion von Makrophagen und DCs ähnlich niedrig war, wäre eigentlich zu erwarten gewesen, dass Makrophagen und DCs der TLR4-DM gleichermaßen weniger CD54 exprimieren (Roebuck et al., 1999).

Wie die Unterschiede in der IL-6-Sekretion und der CD54-Expression zeigten, reagierten Makrophagen und DCs zwar ähnlich, aber offensichtlich nicht gleich auf die Stimulation mit *H. pylori* wenn eine TLR4-Mutation vorliegt. Diese Beobachtung wird unterstützt durch Untersuchungen von Michael Aigner, der mit Splenozyten aus TLR4-DM und -WT Mäusen Stimulationsversuche durchführte. Unabhängig von der verwendeten *H. pylori*-MOI, konnte er keine signifikanten Veränderungen in der Sekretion der untersuchten Zytokine erkennen (pers. Mitteilung).
Auch in der Literatur finden sich sehr unterschiedliche Aussagen über die Rezeptoren, die für die Stimulation der Immunzellen nach *H. pylori*-Infektion verantwortlich sind. Besonders was die Interaktion zwischen TLR2 und TLR4 mit *H. pylori* angeht gibt es, wie oben ausgeführt, widersprüchliche Aussagen verschiedener Autoren (Gobert et al., 2004; Mandell et al., 2004; Schmausser et al., 2004; Su et al., 2003).
Welcher Bestandteil von *H. pylori* letztlich für die Immunstimulation von TLR4 verantwortlich ist, ist nach wie vor nicht geklärt. Dass TLR4 dennoch bei der Erkennung von *H. pylori* eine Rolle spielt, zeigten die unterschiedlichen

Zytokinspektren von TLR4-WT und –DM. In den Untersuchungen konnte aber auch verdeutlicht werden, dass TLR4 nur ein Aspekt in der Immunreaktion auf *H. pylori* ist. Besonders gut erkennbar ist dies daran, dass die Sekretion von IL-10 durch TLR4 nicht beeinflusst wird. Mögliche andere TLRs, die für die Erkennung von *H. pylori* mitverantwortlich sind, können TLR2 und TLR5 sein. Während TLR2 u.a. Lipoproteine und Lipopeptide erkennt, dient TLR5 der Erkennung von Flagellin (Akira, S., 2003; Takeda et al., 2003). Die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden durch diese TLRs könnte also für die Induktion der IL-10-Produktion ausreichend sein, ohne dass zusätzliche Signal von TLR4 weitergeleitet werden.

6.5 Versuche mit humanen dendritischen Zellen

H. pylori ist eines der bedeutendsten humanpathogenen Bakterien, daher ist die humane Immunantwort auf *H. pylori* von besonderem Interesse (Dixon, 1995; Marshall, 1995). Deshalb wurden die Stimulationen mit *H. pylori* an humanen DCs, die aus PBMCs gewonnen wurden, durchgeführt.

6.5.1 Reifung humaner DCs durch Stimulation mit *H. pylori*

In den Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die Stimulation von DCs mit *H. pylori* zur Produktion von IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 führte. Die Konzentrationen der freigesetzten Zytokine waren abhängig von der Dosis des eingesetzten *H. pylori*. Die Versuche ergaben dabei, dass schon ein Bakterium der Art *H. pylori* auf 100 DCs (MOI 0,01) zur Stimulation von DCs ausreichend war. Bei allen Zytokinen mit Ausnahme von IL-8 wurde bei einer MOI zwischen 10 und 50 ein Maximalwert erreicht. In ihrer Arbeit zeigten Guiney et al. (2003) dagegen, dass durch die Stimulation von DCs mit *H. pylori* wenig IL-6 und IL-12 sowie kein IL-10 freigesetzt wurde. Für diesen scheinbaren Widerspruch gibt es zwei mögliche Ursachen. Zum einen isolierten Guiney et al. (2003) die Monozyten durch Adhärenz an Plastik, während wir in unserem Ansatz Leukophorese verwendeten. Zum anderen wurde in unseren Versuchen eine Zellkonzentration von $1x10^6$Zellen/ml eingesetzt, Guiney et al. (2003) setzten dagegen nur $2x10^5$ Zellen/ml ein. Auf diese Weise kommt es zu unterschiedlichen Zelldichten, was folglich zu geringerem Zell-Zell-Kontakt führt. Dieser verminderte Zell-Zell-Kontakt wiederum kann eine geringere Zytokinsekretion zur Folge haben. Im Bezug auf die Stimulation mit LPS werden unsere Ergebnisse durch Untersuchungen von Langenkamp et al. (2000) bestätigt. Die Gruppe um Langenkamp beschrieb für humane DCs Zytokinfreisetzungen von IL-6, IL-10 und IL-12 nach Stimulation mit LPS aus *Salmonella abortus equi*, die den von uns gemessenen vergleichbar waren.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Magenepithelzellen IL-8 sezernieren (Ismail et al., 2003; Nakachi et al., 2000). Zudem ist aus der Literatur

bekannt, dass es in der Magenschleimhaut nach Infektion zur erhöhten Produktion von Zytokinen wie IL-6 und IL-8 kommt (Ando et al., 2000; Luzza et al., 2000). Da DCs diese Zytokine sezernieren und zudem die Fähigkeit haben, durch *tight junctions* zu migrieren und so den Kontakt zum Magenepithel herzustellen, deuten unsere Daten darauf hin, dass DCs zur Zytokinproduktion im Bereich des Magenepithels beitragen könnten (Palucka et al., 2002; Rescigno et al., 2001).
Zusätzlich zur Sekretion von Zytokinen wurde in einem weiteren Versuch die Expression von Oberflächenproteinen der DCs untersucht. Im Laufe der Reifung erhöht sich bei DCs die Expression von MHC-II (HLA-DR), CD80, CD83 und CD86 (Ackerman et al., 2003; Banchereau et al., 2000; Curler et al., 2001; Means et al., 2003; Wick, 2003). Wie aus den Ergebnissen der FACS-Analysen deutlich wurde, stieg die Expression der genannten Moleküle nach Stimulation mit *H. pylori* an. Je nach Molekül war die Steigerung zwischen zweieinhalb- (HLA-DR) und siebenfach (CD80). In der Literatur sind Steigerungen um das 20- (CD80) bis 100-fache (HLA-DR) beschrieben (Hafsi et al., 2004; Mellman et al., 2001). In unserem Experiment waren die Steigerungen zwar nicht so deutlich wie in der Literatur, wir konnten aber zweifelsfrei nachweisen, dass es durch Stimulation mit *H. pylori* zur Reifung der DCs kam.

6.5.2 Untersuchungen zum Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf humane DCs nach Stimulation mit *H. pylori*

Für die in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse konnten nicht immer vergleichbare Daten aus der Literatur herangezogen werden. Das lag zum einen daran, dass die Untersuchungen der einzelnen Arbeitsgruppen unter unterschiedlichen Bedingungen sowie unter Verwendung verschiedener Inhibitoren durchgeführt wurden, zum anderen wurden bei diesen Untersuchungen unterschiedliche Zelltypen verwendet: DCs, Makrophagen und Monozyten (Bennett et al., 2001; Nakahara et al., 2004; Utsugi et al., 2003). Darüber hinaus ist *H. pylori* ein wesentlich komplexerer Stimulus als LPS, welches von den anderen Arbeitsgruppen zur Stimulation eingesetzt wurde. Da *H. pylori* im Gegensatz zu LPS nicht eine sondern mehrere TLR-Kasakaden aktiviert, besteht die Möglichkeit, dass der Beitrag der enzelnen MAPKs zur Immunreaktion anders ist, als bei Stimulation mit LPS. Dies könnte dazu führen, dass sich die Inhibition einer MAPK bei Stimulation mit *H. pylori* anders auswirkt, als bei LPS-Stimulation.

6.5.2.1 Titration der Inhibitormenge

Säuger exprimieren mindestens vier verschiedene Mitogen-aktivierte Proteinkinase-familien (MAP-Kinasen, MAPKs), von denen mindestens drei an der Reifung von

DCs beteiligt sind (Chang et al., 2001; Nakahara et al., 2004). Dies sind die *extracellular signal-regulated kinases* 1/2 (ERK, auch p42/p44-Kinasen genannt), die *c-Jun N-terminal kinases* (JNK) und die p38-MAPK (Nakahara et al., 2004). Die zentrale Bedeutung dieser Kinasen im Rahmen der TLR-vermittelten Immunantwort wird aus Abbildung 2 deutlich. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, sind diese drei MAPKs eine wichtige Schaltstelle in der Signalkaskade nach Stimulation aller untersuchten TLRs mit Ausnahme von TLR3. Dies bedeutet, dass sie bei der Regulation fast aller TLR-vermittelten Immunantworten eine Rolle spielen. Um zu ermitteln, in wie weit die einzelnen MAPKs an der Immunantwort auf *H. pylori* beteiligt sind, wurden sie durch spezifisch Inhibitoren gehemmt. Auf diese Weise war es möglich, den Anteil jeder MAPK an der Zytokinsekretion und der Expression verschiedener Oberflächenproteine festzustellen.
In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von unreifen DCs mit *H. pylori* sowohl im humanen als auch im murinen System zu deren Ausreifung führte (Kranzer et al., (2004) und diese Arbeit). Darauf aufbauend stellte sich uns die Frage, welchen Anteil die verschiedenen MAP-Kinasen an der Ausreifung der DCs haben. Die Bedeutung der MAPKs in der Immunantwort war vor Beginn dieser Arbeit zwar durch Stimulationsexperimente mit LPS, nicht aber mit *H. pylori* untersucht worden.

Am Beispiel der TLR4-Signalkaskade wurde in der Einleitung erläutert, dass die einzelnen MAPKs unterschiedliche Gene regulieren (Abbildung 3). Zudem wurden in dieser Abbildung die Proteine gekennzeichnet, die durch die MAPK-Inhibitoren gehemmt werden. Um die Bedeutung der MAPKs bei der durch die Stimulation mit *H. pylori* ausgelösten Reifung der DCs zu untersuchen, wurden Inhibitoren für p38, ERK und JNK eingesetzt. Nach Stimulation wurde mittels ELISA die Zytokinsekretion und durch FACS-Analyse die Veränderung der Expression von Oberflächenproteinen ermittelt. Aus der Literatur ist bekannt, dass Stimuli wie TNF-α oder LPS zur Ausreifung von DCs führen (Kikuchi et al., 2003; Rescigno et al., 1997). Aicher et al. (1999) zeigten zudem, dass der p38-Inhibitor SB203580 die IL-12-Produktion humaner DCs blockiert.
Die verwendeten Inhibitoren, SB203580 für p38, U0126 für ERK und SP600125 für JNK, werden in der Literatur als spezifisch für die jeweiligen MAPKs angesehen (Beyaert et al., 1996; Davies et al., 2000; Favata et al., 1998; Kikuchi et al., 2003; Nakahara et al., 2004). Um für die Versuche, in denen die Kinetik der Zytokinsekretion und der Oberflächenproteinexpression erforscht werden sollte, die richtigen Inhibitormengen zu ermitteln, wurde unter Berücksichtigung der Ergebnisse von mehreren Veröffentlichungen eine Titration für die Inhibitoren durchgeführt (Aicher et al., 1999; Arrighi et al., 2001; Bennett et al., 2001; Kikuchi et al., 2003;

Nakahara et al., 2004; Utsugi et al., 2003; Yanagawa et al., 2002). Es wurden Konzentrationen von 10, 20, 50 und 100µM des jeweiligen Inhibitors eingesetzt. Aufgrund von Vorversuchen der Arbeitsgruppe waren 24 Stunden als Zeitraum für die Kinetik festgelegt. Um eventuelle negative Folgen der Inhibitoren bei 24-stündiger Koinkubation mit den DCs festzustellen, wurde der Titrationsversuch über 24 Stunden durchgeführt.
Je nach Quelle sind die Vorinkubationszeiten mit den Inhibitoren unterschiedlich. Während Nakahara et al. (2004) vollständig auf die Vorinkubation verzichteten, sind in anderen Arbeiten 15-120 Minuten angegeben (Arrighi et al., 2001; Bennett et al., 2001; Beyaert et al., 1996; Kikuchi et al., 2003; Nakayama et al., 2004; Puig-Kroger et al., 2001; Utsugi et al., 2003; Yanagawa et al., 2002). Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen betrug die Vorinkubationszeit 1 Stunde. Dies ermöglichte die frische Herstellung einer *H. pylori*-Suspension. Eine möglichst frische *H. pylori*-Suspension ist wichtig, um Beeinträchtigungen der Vitalität des Bakteriums durch unterschiedliche lange Zeiten in der vergleichsweise O_2-reichen Umgebungsluft auszuschließen. Bei einer Vorinkubation von 1 Stunde war es problemlos möglich, die Präparation von *H. pylori* genau zum Beginn der eigentlichen Stimulation fertig zu stellen.

Die Titration des p38-Inhibitors zeigte, dass die Zytokinsekretion von TNF-α, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12p70 von humanen DCs schon bei einer Inhibitorkonzentration von 10µM signifikant gesenkt wurde. Eine Erhöhung der Inhibitorkonzentration führte zu einer weiteren Verringerung der Zytokinkonzentration. Die Reduktion von TNF-α, IL-10 und IL-12p70 war so stark, dass diese Zytokine bei einer Konzentration des p38-Inhibitors von 50 bzw. 100µM nicht mehr nachweisbar waren. Diese Resultate stehen in Einklang mit den Ergebnissen von Nakahara et al. (2004), die beschrieben, dass der p38-Inhibitor SB203580 bei einer Konzentration von 50µM die Produktion von IL-6, IL-12p40, IL-12p70 und TNF-α durch DCs nach Stimulation mit LPS vollständig abschaltete. Ähnliches beobachteten Aicher et al. (1999) auf mRNA-Ebene für IL-12p40 und IL-10 bei Stimulation von DCs über CD40. Sie konnten zudem die konzentrationsabhängige Reduktion der IL-12p40-Sekretion durch ELISA zeigen.

Deutlich geringer waren die Effekte des ERK-Inhibitors U0126 auf die Zytokinsekretion. Reduktionen auf weniger als 1/4 der Ausgangskonzentration wurden außer bei IL-8 erst ab 50µM beobachtet. In den Untersuchungen von Puig-Kroger et al. (2001) wurde beschrieben, dass die Verwendung des ERK-Inhibitors U0126 bei Stimulation von DCs mit LPS aus *E. coli* zu einer Erhöhung der IL-12p70-Sekretion führte. Für die Stimulation von DCs mit *H. pylori* konnte in der vorliegenden

Arbeit dieselbe Aussage getroffen werden. Während Puig-Kroger et al. (2001) nach 8-12 stündiger LPS-Stimulation der DCs eine Erhöhung um einen Faktor von 2-6 beschrieben, zeigte sich in dieser Arbeit, je nach Inhibitorkonzentration eine Erhöhung um den Faktor 2-4 nach 24 Stunden Stimulation mit *H. pylori*. Eine Erhöhung der IL-12-Sekretion durch Inhibition von ERK mit PD98059 oder U0126 bei Stimulation von humanen Monozyten mit *E. coli*-LPS wurde auch in der Arbeit von (Wittmann et al., 2002) beschrieben. Sowohl die signifikanten Verringerungen der IL-10-Sekretion durch PD98059 als auch die Erhöhung der IL-12-Sekretion beschrieben Xia et al. (2003) für humane DCs nach LPS-Stimulation in ihrer Arbeit. Es konnte ferner gezeigt werden, dass die Suppression von IL-10 zu einer Erhöhung der IL-12-Sekretion führte, umgekehrte hat die IL-12-Sekretion aber keinen Einfluss auf IL-10 (Xia et al., 2003). Yanagawa et al. (2002) konnten in murinen DCs eine negative Regulation der IL-12p70-Produktion durch ERK nachweisen. Die inhibitorische Wirkung des p38-Inhibitors SB203580 und der stimulatorische Effekt des ERK-Inhibitors PD98059 auf die Transkription von IL12p40-mRNA in murinen Makrophagen wurden von Feng et al. (1999) beschrieben. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse der Stimulation von humanen DCs mit *H. pylori* im Bezug auf die IL-12-Sekretion nach Inhibition verschiedener MAPK-Wege durch die Literatur bestätigt werden. In einem Kontrollversuch konnte zudem gezeigt werden, dass der ERK-Inhibitor ohne Stimulus nicht zur Sekretion von IL-12 führte, eine Induktion der IL-12-Produktion durch den Inhibitor konnte also ausgeschlossen werden (siehe unten).
In den Versuchen von Nakahara et al. (2004), wurde der ERK-Inhibitor PD98059, der die Signalkaskade an derselben Stelle inhibiert wie U0126, verwendet (Puig-Kroger et al., 2001). Während in der vorliegenden Arbeit unreife DCs verwendet wurden, konnten Nakahara et al. (2004) auch mit reifen DCs zeigen, dass die ERK-Inhibition zur Verringerung der TNF-α-Sekretion bei Stimulation mit LPS führte. Nicht bestätigt werden konnte dagegen die Aussage von Nakahara et al. (2004), dass die Inhibition des ERK-Signalweges keinen Einfluss auf die IL-6-Sekretion hat. Hierfür gibt es zwei möglichen Erklärungen. Erstens, die Wirkung von PD98059 ist trotz desselben Angriffpunktes nicht identisch mit der von U0126, zweitens, und dies erscheint wahrscheinlicher, kann der Unterschied auch darin liegen, dass Nakahara et al., (2004) nicht unreife, sondern reife DCs verwendet haben (Favata et al., 1998).

Den geringsten Einfluss auf die Zytokinsekretion zeigte der JNK-Inhibitor SP600125. Auffallend war auch hier, dass die IL-12-Sekretion bei Verwendung von 10 und 20µM erhöht wurde. Dieses Ergebnis wurde auch von Utsugi et al. (2003) für humane Monozyten, die mit *E. coli*-LPS stimuliert wurden, beschrieben. Andererseits zeigten Nakahara et al. (2004), dass SP600125 die IL-12p70- und die TNF-α-Produktion von

reifen DCs nach Stimulation inhibierte. Dieser scheinbare Widerspruch bei der Sekretion von IL-12p70 lässt sich vermutlich dadurch entkräften, dass im Rahmen dieser Arbeit die DCs erst durch die Stimulation reiften. Bei der TNF-α-Produktion zeigte sich dagegen erst ab Konzentrationen über 20µM ein inhibitorischer Effekt. Nakahara et al. (2004) beobachteten diesen Effekt schon bei 10µM SP600125, sie verwendeten jedoch LPS aus *E. coli* als Stimulus und nicht *H. pylori*. Die dosisabhängige Reduktion der TNF-α-Sekretion wurde auch von Bennett et al. (2001) für Monozyten nach Stimulation mit *E. coli*-LPS beschrieben. Dagegen konnte in dieser Arbeit eine Reduktion der IL-6-Konzentration gemessen werden, während Bennett et al. (2001) diese auf mRNA-Ebene nicht nachweisen konnten. Die unterschiedlichen Auswirkungen können daran liegen, dass Bennett et al. (2001) Monozyten und nicht DCs verwendet haben. Es ist nicht auszuschließen, dass JNK in Monozyten andere regulatorische Eigenschaften besitzt als in DCs und Monozyten deshalb bei JNK-Inhibition anders reagieren. Eine Zytotoxizität, wie sie Nakahara et al. (2004) bei Konzentrationen über 20µM beschreiben, konnte zumindest auf Zytokinebene nicht festgestellt werden.

In den Untersuchungen zur Zytokinsekretion nach Stimulation mit *H. pylori* und gleichzeitiger Inhibition verschiedener MAPKs konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibition von p38 den größten Einfluss auf die Zytokinfreisetzung hat. Da das Ausmaß der Zytokinfreisetzung ein Zeichen für die Aktivierung der DCs durch einen Stimulus ist, bedeutet dies, dass p38 die wichtigste MAPK in der Signalkaskade nach Stimulation mit *H. pylori* ist. Ohne die Aktivierung dieser Kinase kommt es zu einer deutlich verringerten Zytokinausschüttung und somit zu einer entscheidend schwächeren Antwort durch das angeborene Immunsystem. Aufgrund der Tatsache, dass das angeborene Immunsystem auch das adaptive Immunsystem aktiviert, fällt die Immunantwort insgesamt nur sehr gering aus. Die ebenfalls untersuchten MAPKs ERK und JNK besitzen zwar auch eine gewisse Bedeutung für die Aktivierung der Zytokinproduktion, ihr Anteil ist aber deutlich kleiner als der von p38.

Die Auswirkungen der Inhibition der verschiedenen MAPK-Wege auf die Expression der Oberflächenproteine waren weniger einheitlich als auf die Zytokinsekretion.

Die Gesamtfluoreszenz des Oberflächenproteins CD1a zeigte die deutlichste Veränderung nach Inhibition von p38. Bei einer Konzentration von 10µM war eine leichte Erhöhung messbar, bei 20µM betrug die Gesamtfluoreszenz etwa die Hälfte des Ausgangswertes ohne Inhibitor. Bei Inhibitorkonzentrationen von 50 und 100µM lagen die Gesamtfluoreszenzen dazwischen. Arrighi et al. (2001) zeigten dagegen, allerdings mit bereits reifen DCs, eine konzentrationsabhängige Abnahme der

Gesamtfluoreszenz nach Stimulation mit LPS. Sowohl bei ERK- als auch bei JNK-Inhibition brachten Konzentrationen von 10 und 20µM fast keine Veränderung, Inhibitorkonzentrationen von 50 und 100µM führten in beiden Fällen zu einer Reduktion der Gesamtfluoreszenz um bis zu 50%. Es zeigte sich also, dass diese beiden Inhibitoren im Gegensatz zum p38-Inhibitor erst ab relativ hohen Konzentrationen die Expression von CD1a beeinflussten. Aus der Literatur liegen hierfür keine Vergleichswerte vor. Da die Expression von CD1a ein wichtiges Merkmal von DCs ist, ist die geringere Gesamtfluoreszenz von CD1a nach Inhibition von p38 ein Indiz für die Beeinträchtigung der Ausreifung der DCs durch den Inhibitor (Curler et al., 2001; Hafsi et al., 2004).
Der p38- und der JNK-Inhibitor führten dagegen zu einer deutlichen, konzentrationsabhängigen Reduktion der CD83-Expression, wie sie auch Arrighi et al. (2001) für die p38-Inhibition bei durch LPS stimulierten DCs beschrieben. Nakahara et al. (2004) haben die Wirkung des JNK-Inhibitors auf DCs nur bei einer Konzentration von 40µM untersucht, der Vergleich bestätigt aber unsere Messwerte. Obwohl die Veränderungen der Gesamtfluoreszenz durch beide Inhibitoren konzentrationsabhängig waren, zeigte die Inhibition des p38-Signalweges eine stärkere Reduktion der Gesamtfluoreszenz als die Inhibition des JNK-Weges. Die in dieser Arbeit beobachtete Erhöhung der CD83-Expression bei Stimulation und Verwendung des ERK-Inhibitors bei 10 bis 50µM wurde auch in Untersuchungen von Puig-Kroger et al. (2001) an humanen DCs beschrieben.

Bei der Regulation von CD80 war der Einfluss des p38-Inhibitors weniger ausgeprägt als bei CD83, aber immer noch deutlich. Eine Dosisabhängigkeit war in diesem Fall nicht zu erkennen, die Reduktion war auch schwächer als von Arrighi et al. (2001) für die Stimulation von DCs mit LPS veröffentlicht. Dosisabhängig war dagegen die Veränderung der CD80-Gesamtfluoreszenz der DCs bei ERK- und JNK-Inhibition, eine deutliche Reduktion trat aber erst bei einer Inhibitorkonzentration von 100µM auf. Diese Beobachtung deckt sich mit den Resultaten von Nakahara et al. (2004) und Yanagawa et al. (2002) für ERK bei humanen und murinen DCs. Die Reduktion durch die Inhibition von JNK fiel etwas geringer aus als bei Nakahara et al. (2004), was aber wohl durch Interassay-Varianzen erklärt werden kann.
Die Abnahme der Gesamtfluoreszenz von CD86 nach Stimulation der DCs mit *H. pylori* war bei Inhibition des p38-Weges konzentrationsabhängig. Die gemessenen Veränderungen werden in der Literatur bei Inhibitorkonzentrationen von 10 und 50µM durch Untersuchungen von Arrighi et al. (2001) an mit LPS stimulierten DCs bestätigt.
Auch bei Verwendung des ERK-Inhibitors war eine konzentrationsabhängige Reduktion der CD86-Gesamtfluoreszenz zu beobachten. Diese Reduktion war

geringer als bei Inhibition von p38. Nakahara et al. (2004) zeigten in ihren Versuchen mit reifen DCs ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit. Im Gegensatz zur Inhibition von ERK und p38 konnte in dieser Arbeit bei Verwendung des JNK-Inhibitors keine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden, die Gesamtfluoreszenz stieg bei Konzentrationen von 20 und 50µM wieder an, ein Phänomen, das Nakahara et al. (2004) bei 10 und 20µM in humanen DCs nach LPS-Stimulation beschrieben.

Was den Einfluss der MAPKs auf die HLA-ABC-Expression anbelangt, so liegen nur für den ERK-Inhibitor Vergleichswerte vor. Yanagawa et al. (2002) konnten bei 50µM keine Wirkung auf mit LPS stimulierte murine DCs beobachten. In dieser Arbeit zeigte sich jedoch eine konzentrationsabhängige Reduktion, die bei 50µM etwa ein Drittel des Ausgangswertes betrug. Auch bei Inhibition des JNK-Weges wurde eine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt. Bei niedrigen Konzentrationen war die Reduktion etwas stärker als bei ERK-Inhibition, ab Inhibitorkonzentrationen von 50µM dagegen schwächer. Insgesamt war die Reduktion der Gesamtfluoreszenz von HLA-ABC durch den p38-Inhibitor am stärksten, bis auf einen Anstieg bei 20µM war auch sie abhängig von der eingesetzten Inhibitormenge. Das heißt, dass der p38-Weg von den drei untersuchten Signalwegen den stärksten Einfluss auf die HLA-ABC-Expression hatte.

Bei HLA-DR war bei p38-Inhibitorkonzentrationen zwischen 10 und 50µM eine Verringerung der Gesamtfluoreszenz auf Werte zwischen 78 und 68% erkennbar. Damit lagen die Reduktionen im Bereich der Ergebnisse, die Arrighi et al. (2001) und Nakahara et al. (2004) bei Stimulation von humanen DCs mit *E. coli*-LPS beschrieben. Bei 100µM trat eine Erhöhung der Gesamtfluoreszenz um 31% auf, die auf einen stimulatorischen Effekt des Inhibitors bei dieser relativ hohen Konzentration zurückzuführen sein könnte.

Eine Reduzierung der HLA-DR-Gesamtfluoreszenz zeigte sich bei ERK-Inhibitorkonzentrationen von 10 und 20µM, bei 50µM stieg der Wert und bei 100µM war der Ausgangswert wieder erreicht. Im Vergleich dazu beobachteten Nakahara et al., (2004) bei 10 und 20µM eine Erhöhung der Gesamtfluoreszenz. Da auch Nakahara et al. (2004) humane DCs verwendeten, diese aber mit LPS über 48 Stunden stimulierten, könnten die unterschiedlichen Ergebnisse entweder auf den Stimulus oder die Stimulationsdauer zurückgeführt werden.

Während Yanagawa et al. (2002) und Nakahara et al. (2004) keine oder fast keine Veränderung durch den JNK-Inhibitor beschreiben, konnte in dieser Arbeit eine Reduktion bei Inhibitorkonzentrationen von 10 bis 50µM beobachtet werden, bei 100µM wurde keine Veränderung festgestellt. Vermutlich liegen die Unterschiede auch in diesem Falle am Stimulus und/oder der Stimulationsdauer.

Durch die Untersuchungen der Gesamtfluoreszenz der genannten Oberflächenantigene nach Inhibition der MAPK-Signalwege konnte gezeigt werden, dass p38 den größten Einfluss auf die von *H. pylori*-induzierte Reifung und anschließenden Immunantwort von humanen DCs hatte. Zwar regulierten auch ERK und JNK die Immunreaktion auf *H. pylori*, ihre Bedeutung war jedoch nicht so ausgeprägt wie die von p38. Die Arbeitsgruppe von Ardeshna et al. (2000) machte bei der Stimulation von humanen DCs mit LPS und Inhibition der p38-MAPK bei den kostimulatorischen Molekülen CD80, CD83 und CD86 dieselben Beobachtungen wie in der vorliegenden Arbeit. Bei den drei Molekülen wurde eine signifikante Reduktion beschrieben, wobei diese für CD80 am geringsten ausfiel. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Ardeshna et al. (2000) wurde jedoch in dieser Arbeit eine Verringerung der Gesamtfluoreszenz von HLA-DR und CD1a durch den p38-Inhibitor beobachtet. Diese Differenzen liegen vermutlich an den unterschiedlichen Stimuli (LPS bzw. *H. pylori*).
Die Moleküle CD80 und CD86 dienen der Stimulation von T-Zellen durch die APCs. Durch die Inhibition von p38 bei Stimulation mit *H. pylori* wird die Expression dieser Moleküle weniger stark gesteigert als ohne Inhibition. Dies führt dazu, dass die Aktivierung der T-Zellen geringer ausfällt, was in der Folge eine schwächere Immunantwort durch diesen Zelltyp bewirkt. Wie bereits gezeigt, wird durch die Inhibition von p38 auch die Zytokinausschüttung deutlich reduziert, es kommt also zur Schwächung zweier zentraler Säulen der Immunantwort. Die verringerte Fähigkeit der APCs zur Aktivierung von T-Zellen nach Blockade von p38 wird auch durch die reduzierte Expression von CD1a erkennbar. CD1a ist neben seiner Rolle als Antigen-präsentierendes Molekül ein Marker für den Reifungsstatus der DCs (Curler et al., 2001; Moody, D. B. et al., 2004). Auch die geringere Expression des kostimulatorischen Moleküls CD83 im Vergleich zur Stimulation ohne Inhibitor ist ein Indiz für eine Beeinträchtigung der Ausreifung (Scholler et al., 2002). Zusammengenommen zeigen all diese Verringerungen in der Expression der verschiedenen Oberflächenproteine, welch entscheidende Rolle p38 in der Immunantwort auf *H. pylori* spielt.
Ähnlich wie bei den Zytokinen ist die Bedeutung von ERK und JNK auf die Regulation der Oberflächenproteine geringer als die von p38. Die veränderte Expression dieser Oberflächenantigene durch die Inhibition von ERK und JNK zeigt, dass p38 zwar die wichtigste Kinase in der Aktivierung durch *H. pylori* ist, die Reaktion der Immunzellen aber durch das Zusammenspiel der verschiedenen Kinasen gesteuert wird.

In einem Kontrollversuch mit 20µM des jeweiligen Inhibitors ohne zusätzlichen Stimulus sollte ausgeschlossen werden, dass die Inhibitoren immunstimulatorische

Eigenschaften besitzen. Bei den ELISA-Messungen konnten die Zytokine IL-10, IL-12 und TNF-α nicht nachgewiesen werden (Abbildung 17 bis Abbildung 19). Die IL-6-Konzentrationen lagen in allen drei Fällen zwei bis dreimal so hoch wie bei der Negativkontrolle, aber immer noch um einen Faktor von mindestens 10 unterhalb des Wertes der entsprechenden Inhibitorkonzentration nach *H. pylori*-Stimulation. Diese Ergebnisse stimmen mit den Angaben aus der Literatur überein. Kikuchi et al. (2003) beobachteten keine Erhöhung der IL-12p40 Konzentration bei 20µM SB203580 (p38-Inhibitor), Nakahara et al. (2004) bei 10µM SB203580 und 30µM SP600125 (JNK-Inhibitor). Beyaert et al. (1996) konnten ebenfalls keine Veränderung der Sekretion von IL-6 bei einer Konzentration von 10µM SB203580 feststellen. Diese Untersuchungen wurden mit DCs (human und murin) sowie mit der Fibroblastenzelllinie L929 durchgeführt (Beyaert et al., 1996; Kikuchi et al., 2003; Nakahara et al., 2004). Für den Inhibitor U0126 (ERK) liegen keine Daten aus der Literatur vor, eine ähnliche Wirkung wie bei den anderen Inhibitoren kann aber aufgrund ähnlicher Inhibitoreigenschaften vorausgesetzt werden.

Auffällig waren einzig die IL-8-Sekretionen, die durch die Inhibitoren induziert wurde. Während die Werte für die Kontrolle mit dem ERK-Inhibitor unterhalb des PBS-Wertes lagen, lagen die Werte für den p38- und den JNK-Inhibitor um eine Zehnerpotenz über den Werten der Negativkontrolle. Diese auf den ersten Blick hohen Werte relativieren sich jedoch, wenn man die zugehörigen Stimulationen mit *H. pylori* und Inhibitor zum Vergleich heranzieht. Dabei lag der p38-Wert immer noch um den Faktor 2,5 unter dem Wert der vergleichbaren Stimulation mit *H. pylori* (13.714 zu 35.317pg/ml), der JNK-Wert sogar um mehr als einen Faktor 100 (20.317 zu 325.000pg/ml). Eine mögliche Ursache für die relativ hohe spontane Sekretion von IL-8 nach Inhibition von p38 und JNK könnte sein, dass die beiden MAPKs die Sekretion von IL-8 hemmen, solange keine Stimulation erfolgt. Werden die MAPKs inhibiert, könnte es zu einem Anstieg der IL-8-Sekretion ohne spezifischen Stimulus kommen.

Aicher et al. (1999) berichteten jedoch auch in ihrer Untersuchung von substantieller IL-8-mRNA-Expression in unstimulierten DCs. Auch Aigner (2001) beschrieb in seiner Arbeit relativ hohe IL-8-Konzentrationen bei den Negativkontrollen mit PBS. Eine hohe spontane IL-8-Sekretion in Magenepithelzellen wurde von Fan et al. (2000) gezeigt. Es kann sich also durchaus um eine Sekretion von IL-8 gehandelt haben, die nicht durch einen äußeren Stimulus ausgelöst wurde.

In den genannten Arbeiten gibt es keine Daten über die Expression der Oberflächenproteine bei Verwendung der Inhibitoren ohne Stimulus. Auffallend war, dass der JNK-Inhibitor die Expression aller Oberflächenproteine außer CD1a stark stimulierte, die Gesamtfluoreszenzen lagen im Falle von CD86 und HLA-DR sogar über denen der Stimulation mit *H. pylori* und gleicher Inhibitorkonzentration. Da die

Gesamtfluoreszenz von CD86 und HLA-DR bei Stimulation mit *H. pylori* nicht konzentrationsabhängigen Veränderungen unterlag, muss dem hohen Wert ohne Stimulus wohl nur eine geringe Bedeutung beigemessen werden. Dies gilt auch für die Expression von HLA-DR bei Verwendung des ERK-Inhibitors, sonst blieben die Werte unter denen der Stimulation.

Aufgrund der deutlichen Veränderungen in der Sekretion der untersuchten Zytokine und der sehr unterschiedlichen Konzentrationsangaben in der Literatur, wurde in den Versuchen zur Kinetik der Zytokinsekretion und Oberflächenproteinexpression von DCs für alle Inhibitoren eine Konzentration von 20µM festgelegt (Arrighi et al., 2001; Bennett et al., 2001; Beyaert et al., 1996; Kikuchi et al., 2003; Nakahara et al., 2004; Nakayama et al., 2004; Utsugi et al., 2003; Yanagawa et al., 2002). Der Vorteil dieser Konzentration war, dass starke Effekte messbar waren, ohne dass es zu einer Schädigung der Zellen kam.

6.5.2.2 Einfluss verschiedener MAP-Kinase-Inhibitoren auf die Stimulationskinetik humaner DCs

Nachdem in den Vorversuchen die optimale Inhibitorkonzentration festgestellt wurde, sollte nun die Stimulationskinetik über einen Zeitraum von 24 Stunden analysiert werden. Auf diese Weise sollten mögliche zeitliche Unterschiede in der Sekretion der Zytokine TNF-α, IL-6, IL-8, IL-10, und IL-12 festgestellt werden. Wie in den Versuchen mit den Splenozyten (5.1) gezeigt, werden die Zytokine zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in verschiedenen Konzentrationen freigesetzt. In den Vorversuchen wurden nachgewiesen, dass die MAPK-Inhibitoren zu einer verringerten Freisetzung von Zytokinen führen. Anhand einer Kinetik sollte nun festgestellt werden, ob die Produktion der einzelnen zur gleichen Zeit aber schwächer einsetzt, oder ob es zu einer verspäteten Zytokinfreisetzung kommt. Parallel dazu wurde die Expression der Oberflächenproteine CD1a, CD80, CD83, CD86, HLA-ABC und HLA-DR mittels FACS-Analyse gemessen. Aus der Literatur sind keine Daten zu Zeitverläufen bei der Inhibition von MAPKs bekannt, die jeweiligen Autoren beschränkten sich in ihren Versuchen auf einen Zeitpunkt.

Die Zytokinwerte wurden in diesen Versuchen zu den Zeitpunkten 0, 0,5, 4, 12 und 24 Stunden gemessen. In allen Fällen, außer bei IL-8 lagen die Zytokinkonzentrationen nach 0,5 Stunden unterhalb der Nachweisgrenze des jeweiligen ELISA-Systems. Die IL-8-Werte lagen nach 0,5 Stunden ohne Inhibition zwischen 33 und 37pg/ml, was in etwa dem Ausgangswert bei 0 Stunden entsprach.

Bei Zugabe der Inhibitoren war eine Reduktion der IL-8-Sekretion um 50% zu erkennen.
Abgesehen von IL-12 waren nach 4 Stunden bei allen Zytokinen Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze erreicht. Bei IL-12 war nur nach Stimulation mit *H. pylori* die Nachweisgrenze knapp überschritten. Die Hemmung der Zytokinsekretion durch die drei Inhibitoren war nach 4 Stunden sehr deutlich. Die Tatsache, dass bei p38-Inhibition nur maximal 10% der Zytokinkonzentration der nicht inhibierten Vergleichsstimulation erreicht wurden, bestätigte die Ergebnisse der Titration (5.5.2.1). Auch die Zugabe der beiden anderen Inhibitoren führte zu einer starken Hemmung der *H. pylori*-induzierten Zytokinsekretion. Besonders auffällig war dies bei TNF-α, die Zytokinsekretion betrug nur 0,2, 2,1 und 7,5% (p38-, JNK- bzw. ERK-Inhibitor) des Wertes der *H. pylori*-Stimulation ohne Inhibition. Alle Werte waren deutlich niedriger als bei der Titration nach 24 Stunden. Dies bedeutet, dass die Hemmung durch die Inhibitoren in der frühen Phase der Stimulation besonders ausgeprägt war. Vermutlich konnten aufgrund der kurzen Stimulationsdauer keine alternativen intrazellulären Reaktionskaskaden induziert werden. Bei den Zytokinen IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 war eine starke Reduktion nach 4 Stunden ebenfalls gegeben, jedoch nicht ganz so ausgeprägt wie bei TNF-α. Die Tatsache, dass außer IL-12 alle Zytokine auch nach der Inhibition zum Zeitpunkt 4 Stunden nachweisbar waren, zeigt, dass es nicht zu einer zeitlichen Verzögerung der Sekretion sondern zu einer Abschwächung der Zytokinproduktion durch die Inhibitoren kommt.

Zum Zeitpunkt 12 Stunden waren die Auswirkungen der Inhibitoren weiterhin sehr stark, vor allem bei der Inhibition von p38, die erneut den deutlichsten Effekt bewirkte. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich erstmals eine Erhöhung der IL-12p70-Produktion durch den ERK-Inhibitor, der Wert lag etwa doppelt so hoch wie der Wert ohne Inhibitor. Diese Steigerung der Zytokinsekretion, wie sie auch von Puig-Kroger et al. (2001) und Yanagawa et al. (2002) in humanen bzw. murinen DCs beschrieben wurde, ergab sich vermutlich aus der Hemmung der IL-12-Produktion durch ERK. Durch die Blockade von ERK wurde diese negative Regulation aufgehoben und in der Folge nach Stimulation mehr IL-12 produziert (Puig-Kroger et al., 2001; Yanagawa et al., 2002). Die MAPKs p38 und ERK hatten also gegenteilige Effekte auf die Sekretion von IL-12. Während p38 die Induktion von IL-12 förderte, wurde sie durch ERK inhibiert. Diese Effekte wurden auch von Feng et al. (1999) für mit LPS stimulierte murine Makrophagen beschrieben. Zhang et al. (1997) zeigten zudem, dass p38 zur negativen Regulation von ERK führte. Des Weiteren wird in der Literatur beschrieben, dass die Inhibition von ERK die Reduktion der IL-10-Sekretion bewirkt (Xia et al., 2003). Da IL-10 auch die Sekretion von IL-12 hemmt, kommt es

durch Hemmung von ERK in DCs zu einer höheren IL-12-Freisetzung (Xia et al., 2003). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.
Die von Utsugi et al. (2003) in Makrophagen beobachtete Stimulation der IL-12-Sekretion nach 24 Stunden bei Verwendung des JNK-Inhibitors SP600125 konnte in unserem Versuch ebenfalls nach 24 Stunden gemessen werden. Nach 12 Stunden Stimulation mit Inhibitor lag der IL-12-Wert noch bei der Hälfte der Konzentration ohne Inhibition. Dagegen betrug er nach 24 Stunden das Doppelte der Ausgangskonzentration. Der stimulatorische Effekt, den die Blockierung von ERK auf die IL-12-Sekretion ausübte, zeigte sich nach 24 Stunden noch deutlicher. Die Sekretion durch die DCs wurde im Vergleich zur nicht inhibierten *H. pylori*-Stimulation um den Faktor drei gesteigert.
Auch die Konzentrationen der anderen Zytokine entsprachen den Ergebnissen der Titration der Inhibitoren. Der Einfluss des p38-Inhibitors auf die Zytokinsekretion war während des gesamten Zeitverlaufs am deutlichsten. Die einzige Ausnahme bildete die IL-8-Sekretion nach 24 Stunden, zu diesem Zeitpunkt waren die Wirkungen der p38- und der ERK-Inhibition gleich.
Im Gegensatz zum Versuch zur Titration der Inhibitorkonzentrationen wurde die IL-6-Sekretion durch eine ERK-Inhibitorkonzentration von 20µM nach 12 und 24 Stunden nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis trat bei der Titration erst bei einer Inhibitorkonzentration von 50µM ein. In ihrer Veröffentlichung bestätigen Nakahara et al. (2004) diese Beobachtung nach Stimulation von DCs mit LPS aus *E. coli* über 48 Stunden und einer Inhibitorkonzentration von 40µM.

Im Zeitverlauf waren TNF-α, IL-6 und IL-8 als erste Zytokine nach Infektion von DCs mit *H. pylori* in größeren Mengen nachweisbar. Im Gegensatz zu IL-6 und IL-8 erreichte TNF-α aber schon nach 12 Stunden die höchste Konzentration, die Konzentrationen der beiden anderen Zytokine stiegen bis 24 Stunden an. Die Konzentration von TNF-α war als einzige bereits nach 4 Stunden relativ nahe am Maximalwert. In ihrer Arbeit beschreiben Zhou et al. (2003) für die Synthese von TNF-α-mRNA nach Stimulation von Splenozyten mit LPS ein Maximum nach 2 Stunden. Das zeitlich unterschiedliche Maximum im Vergleich zur vorliegenden Arbeit kann durch die Tatsache erklärt werden, dass nicht die Zytokinsekretion, sondern die mRNA-Synthese gemessen wurde. Des Weiteren wurde mit LPS stimuliert, welches von den Zellen schneller aufgenommen und verarbeitet werden kann als *H. pylori*.
In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass die Freisetzung von IL-6, IL-8 und IL-12 mindestens bis Stunde 72 nicht rückläufig war, während die Konzentration von IL-10 nach 48 Stunden zurückging. Weil IL-10 unter anderem zur negativen Regulation von TNF-α dient, führt eine hohe TNF-α-Konzentration zu einer hohen

IL-10-Konzentration (Moore et al., 2001). Sinkt die TNF-α-Konzentration dann in Folge der IL-10-Sekretion, kommt es nach der Neutralisierung von TNF-α zu einem Rückgang der IL-10-Freisetzung. Der Rückgang der IL-10-Konzentration nach 48 Stunden war also vermutlich auf die zu diesem Zeitpunkt ebenfalls rückläufige TNF-α-Konzentration zurückzuführen. Da TNF-α auch für die Induktion der IL-6-Sekretion verantwortlich ist, wird durch die Reduktion der TNF-α-Sekretion in der Folge IL-6 nicht mehr so stark induziert.

In den Experimenten mit DCs fiel auf, dass IL-8 als einziges Zytokin auch in unstimulierten DCs in größere Menge auftrat. Diese Beobachtung machen auch Aicher et al. (1999) im Rahmen ihrer Untersuchung auf mRNA-Ebene. Wie stark diese spontane Sekretion von IL-8 sein kann zeigten Sharma et al. (1995). In ihren Stimulationsversuchen mit verschiedenen humanen Magenepithelzelllinien ist die spontane Sekretion von IL-8 durch MKN28 Zellen genauso hoch wie die IL-8-Sekretion von AGS Zellen nach Stimulation mit *H. pylori*-MOI 1000 (sic!).
In unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass kein Zusammenhang zwischen dem hohen Ausgangsniveau von IL-8 und der Zugabe von IL-4 und GM-CSF in den DC-Medien besteht (Daten nicht gezeigt). Eine Vorstimulation durch diese Zytokine war also nicht gegeben. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das in Medium enthalten FKS zur Sekretion von IL-8 führte. In Untersuchungen der Arbeitsgruppe an RAW264.7-Makrophagen konnten nachgewiesen werden, dass unterschiedliche FKS-Konzentrationen zu unterschiedlichen Basalleveln in der Zytokinkonzentration führen (C. Schütz, pers. Mitteilung).

Wie bereits in den Untersuchungen zur optimalen Inhibitorkonzentration hat auch im Zeitverlauf der Zytokinsekretion der p38-Inhibitor den stärksten Einfluss auf die Freisetzung der untersuchten Zytokine. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die geringeren Effekte der anderen Inhibitoren nach 24 Stunden nicht darauf zurückzuführen sind, dass die Wirksamkeit der ERK- und JNK-Inhibitoren zu diesem Zeitpunkt schon verringert ist. Die Auswirkungen der Inhibition von ERK und JNK sind immer geringer als die der Inhibition von p38, unabhängig von der Zeit.
Wichtiger ist jedoch, dass es durch die Versuche zur Kinetik der Zytokinsekretion gelungen ist, nachzuweisen, dass die Inhibitoren die Immunreaktion nicht verlangsamen. Wie aus dem Profil der TNF-α-Sekretion zu erkennen ist, erreicht die TNF-α-Konzentration bei allen Stimulationen ihren Maximalwert, unabhängig davon, ob eine MAPK inhibiert wurde oder nicht. Würde es dagegen zu einer Verlangsamung der Zytokinfreisetzung kommen, müsste dieses Maximum zu einem späteren Zeitpunkt gemessen werden. Diese Aussage gilt auch für die Zytokine IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12. Die Tatsache, dass IL-12 nach 4 Stunden nur bei Stimulation

mit *H. pylori* ohne Inhibitor nachweisbar war, nicht aber bei den anderen Stimuli, sollte meiner Meinung nach nicht überbewertet werden. Der Unterschied ob ein Zytokin nachweisbar ist oder nicht liegt im Bereich weniger pg. Nach Stimulation mit *H. pylori* war diese Grenze nach 4 Stunden gerade überschritten, bei den anderen Stimuli vermutlich gerade nicht.

Auch zum Zeitverlauf der Expression von Oberflächenproteinen liegen bei Inhibition keine Literaturdaten vor, die einen Vergleich erlauben würden.
Da in Vorversuchen gezeigt wurde, dass die Oberflächenproteinexpression sich nach 0,5 Stunden nicht veränderte (Daten nicht gezeigt), erfolgten die ersten Messungen in diesem Versuch nach 4 Stunden. Auch nach 4 Stunden waren die Veränderungen außer bei CD86 und HLA-DR insgesamt recht gering. Bei der HLA-DR-Expression der DCs zeigte sich eine signifikante Reduktion durch den p38- und den JNK-Inhibitor. Die Gesamtfluoreszenz von CD86 wurde durch die p38- und ERK-Inhibitoren auf Werte um 50% reduziert, der JNK-Inhibitor hatte keinen Einfluss auf die Expression von CD86.
Für die Gesamtfluoreszenz von CD1a ließ sich über die gesamten 24 Stunden eine leichte Abnahme feststellen, die jedoch durch die Inhibitoren nicht oder nur geringfügig beeinflusst wurde. Diese Ergebnisse stimmten mit denen aus dem Versuch zur Titration der Inhibitorkonzentration überein. Auch in diesem Versuch waren mit Ausnahme der p38-Inhibition bei 20µM die Abnahmen relativ gering. Das Antigen-präsentierende Molekül CD1a kommt früh im Reifungsprogramm von DCs vor und beeinflusst durch die Interaktion mit T-Zellen die Reifung der DCs (Moody et al., 2004). Ein Rückgang der Expression während der Stimulation mit *H. pylori* ist also ein Anzeichen für eine beeinträchtigte Reifung der DCs. Diese Beeinträchtigung wird durch die Inhibition von p38 noch verstärkt. In ihren Untersuchungen zeigten Arrighi et al. (2001), dass die Aktivierung von p38 zur Reifung von DCs führt und mit einer gesteigerten Expression von CD1a korreliert. Im Gegensatz zu MHC-Molekülen binden Moleküle der beiden CD1-Gruppen Glycolipide oder Lipopeptide, aber nicht Peptide (Burdin et al., 1999; Moody et al., 2004; Porcelli et al., 1998). Moody et al. (2004) zeigten, dass CD1a bisher unbekannte Lipopeptide aus *Mycobacterium tuberculosis* bindet und präsentiert. Welche anderen Fremdantigene noch von CD1a gebunden werden, ist bisher nicht bekannt (Moody et al., 2004). Im Gegensatz dazu zeigten Xie et al. (2005), dass die Inhibition von ERK während der Ausdifferenzierung von Monozyten zu DCs zu einer verlangsamten Reifung und zur teilweisen Apoptose der Zellen führt. Die Inhibition von p38 fördert dagegen die Phosphorylierung von ERK und somit die Differenzierung der Monozyten (Xie et al., 2005). Die Tatsache, dass die Inhibition von ERK die Differenzierung der Monozyten zur unreifen DCs hemmt, nicht aber die Reifung der DCs zeigt, dass diese beiden

zellulären Entwicklungsprozesse durch unterschiedliche Signalkaskaden gesteuert werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass ERK die Differenzierung von DCs steuert, während JNK und p38 die Reifung induzieren (Chang et al., 2001; Kikuchi et al., 2003; Roux et al.; 2004). Die Beobachtung, dass die Hemmung von ERK die Reifung der DCs nicht beeinflusst ist daher nur folgerichtig und steht im Einklang mit den Ergebnissen aus der Literatur.

Die gemessene Gesamtfluoreszenz des kostimulatorischen Rezeptors CD83 war während der ersten 12 Stunden vergleichsweise niedrig (Scholler et al., 2002). Ein signifikanter Anstieg erfolgte erst nach 24 Stunden. Dieser Anstieg zeigte sich besonders deutlich nach Stimulation der DCs mit LPS, was für die Bedeutung von CD83 für die Antwort auf LPS spricht. Trotz ERK-Inhibitor wurde eine ähnliche Gesamtfluoreszenz erreicht wie bei der *H. pylori*-Stimulation ohne Inhibitor. Die Inhibitoren von p38 und JNK führten dagegen zu einer signifikanten Reduktion der CD83-Gesamtfluoreszenz. Die Unterschiede in den Intensitäten der Gesamtfluoreszenz von CD83 unter Verwendung der einzelnen Inhibitoren entsprachen in etwa denen, die Nakahara et al. (2004) in ihrer Arbeit bei Stimulation von humanen DCs mit LPS beobachteten. Die Erhöhung der Expression des kostimulatorischen Moleküls CD83 erfolgte vergleichsweise langsam. Eine mehr als 30-fache Erhöhung der Gesamtfluoreszenz, wie sie Hafsi et al. (2004) bei 48-stündiger Stimulation mit *H. pylori* beschrieben, konnte nach 24 Stunden noch nicht beobachtet werden. Die Zunahme war in diesem Experiment 5,5-fach, bei der Titration war sie 10-fach. Insgesamt deutet der Vergleich mit den Daten von Hafsi et al. (2004) darauf hin, dass die Steigerung der Expression nach 24 Stunden noch nicht abgeschlossen ist. Es muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass Hafsi et al. (2004) eine *H. pylori*-MOI von 5 verwendeten, während in unseren Experimenten die MOI 1 betrug. In ihren Untersuchungen verwendeten Hafsi et al. (2004) den *H. pylori*-Wildtypstamm G27, der wie der von uns eingesetzte Stamm 2802 zu den Typ-I-Stämmen zählt. Obwohl beide Stämme also zur selben Kategorie zählen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie unterschiedlich starke stimulatorische Eigenschaften besitzen und es deshalb zu verschieden starken Erhöhungen der CD83-Gesamtfluoreszenzen kam. Wie in den Experimenten mit der RAW264.7-Zellinie und mit primären Makrophagen gezeigt wurde, spielte auch die verwendete MOI eine Rolle bei der Stärke der Immunreaktion auf einen bestimmten pathogenen Organismus. Es ist also durchaus möglich, dass bei einer höheren MOI eine höhere Gesamtfluoreszenz von CD83 zu beobachten gewesen wäre.

Ebenso wurde in den Versuchen mit humanen DCs die Expression von CD80 und CD86, die auch als B7.1 und B7.2 bezeichnet werden, nach Stimulation mit *H. pylori*

stark gesteigert. Beides sind kostimulatorische Moleküle für T-Zellen, die deren Aktivität über Interaktion mit dem T-Zellrezeptor CD28 fördern (Abbas et al., 2003; Stoy, 2001; Zuckerman et al., 1998). Eine Steigerung der Expression dieser kostimulatorischen Moleküle führt somit zur Verbesserung der Interaktion zwischen DCs und T-Zellen. Neben den Zytokinen hat die Interaktion zwischen DCs und T-Zellen eine große Bedeutung für den weiteren Verlauf der Immunantwort nach der Präsentation der Antigene durch die APCs. Die verringerte Expression von CD80 und CD86 reduziert damit die Induktion der T-Zellantwort und verschlechtert somit die Fähigkeit des Immunsystem angemessen auf eine Infektion zu reagieren.

Bereits nach 12 Stunden Stimulation konnte ein Anstieg der CD80-Gesamtfluoreszenz gemessen werden, der sich auch zum Zeitpunkt 24 Stunden fortsetzte. Eine Inhibition von CD80 trat nur durch den p38-Inhibitor auf, bei den anderen Inhibitoren war zu beiden Zeitpunkten eine Zunahme der Gesamtfluoreszenz unabhängig von der Inhibition erkennbar. Diese Ergebnisse sind ein Anzeichen dafür, dass die Regulation der CD80-Gesamtfluoreszenz nur über p38 erfolgte. Arrighi et al. (2001) zeigten in ihrer Veröffentlichung, dass die Inhibition von p38 die Steigerung der CD80-Gesamtfluoreszenz bei DCs verhinderte, die Inhibition von ERK hingegen keinen Einfluss auf die CD80-Gesamtfluoreszenz hatte. Was die Auswirkungen des JNK-Inhibitors auf CD80 anbelangt, kamen Nakahara et al. (2004) bei Stimulation von DCs mit LPS zu einem ähnlichen Ergebnis wie in der vorliegenden Arbeit. Sie beschrieben, dass die Inhibition des JNK-Weges nur eine geringe Reduktion der CD80-Gesamtfluoreszenz hervorrief. Dies bedeutet, dass die Regulation der Expression von CD80 nur zu einem kleinen Teil durch JNK erfolgt.

Ein Anstieg der Gesamtfluoreszenz über 24 Stunden war auch für das kostimulatorische Molekül CD86 auf DCs nach Stimulation mit *H. pylori* zu erkennen. Die Inhibition des JNK-Weges bei gleichzeitiger Stimulation mit *H. pylori* führte zu einer Steigerung der Gesamtfluoreszenz um einen Faktor von 2-3 nach 24 bzw. 12 Stunden gegenüber dem Vergleichswert ohne Inhibitor. Eine derartige Beobachtung wurde im Titrationsversuch nicht gemacht. Puig-Kroger et al. (2001) zeigten in ihren Versuchen jedoch ebenfalls eine gesteigerte Gesamtfluoreszenz von DCs nach Inhibition von JNK bei gleichzeitiger Stimulation mit 20.000pg/ml TNF-α. In den Kontrollansätzen in denen Puig-Kroger et al. (2001) nur mit TNF-α stimulierten, war die Steigerung der CD86-Expression nach 48 Stunden deutlich geringer. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede zwischen den Veränderungen der CD86-Expression in den Titrationsversuchen und den Kinetikexperimenten könnte sein, dass bei Inhibition von JNK die Konzentration des gebildeten TNF-α einen Einfluss auf die Expression von CD86 hat. Während im Titrationsversuch nach 24 Stunden eine TNF-α-Konzentration von 3.849±316pg/ml gemessen wurden, lag sie im Kinetikexperiment bei 7.760±337pg/ml. Obwohl in beiden Versuchen die Reduktion

im Vergleich zum nicht inhibierten Ansatz signifikant war, waren die Absolutkonzentrationen im Titrationsversuch nur etwa halb so hoch, wie in den Untersuchungen zur Kinetik. Es besteht also die Möglichkeit, dass die deutlich erhöhte TNF-α-Produktion die Steigerung der CD86-Expression in Verbindung mit der JNK-Inhibition induzierte.
Im Gegensatz dazu entsprachen die Messwerte für das Antigen-präsentierende Molekül HLA-ABC (MHC-I) den Ergebnissen der Inhibitortitration. Der p38-Inhibitor bewirkte im Vergleich zur Stimulation ohne Inhibition eine Reduktion der HLA-ABC-Gesamtfluoreszenz. Der ERK- und der JNK-Inhibitor hatten keinen oder nur geringen Einfluss auf HLA-ABC. Der geringe Einfluss der Inhibition von ERK auf HLA-ABC wurde auch von Yanagawa et al. (2002) bei mit LPS stimulierten murinen DCs beschrieben. Ein Anstieg der HLA-ABC-Gesamtfluoreszenz war nach 24 Stunden bei allen Ansätzen zu sehen. Wahrscheinlich kam es während des Versuchszeitraums auch ohne Stimulation zu einer weiteren Ausreifung und somit zu einer gesteigerten HLA-ABC-Expression, welche ein Kennzeichen der Reifung von DCs ist (Ackerman et al., 2003). Eine Steigerung der HLA-ABC-Expression wurde während der 24-stündigen Stimulation auch bei der Negativkontrolle beobachtet. Außerdem ist der Unterschied zwischen den unstimulierten und den stimulierten DCs geringer als bei HLA-DR. Die Funktion von HLA-ABC besteht in der Präsentation von Antigenen, die durch intrazelluläre Viren, Bakterien oder parasitäre Protozooen gebildet wurden (Pamer et al., 1998; Wong et al., 2003). Bakterien, die eine Aktivierung von HLA-ABC induzieren sind z. B. *Listeria monocytogenes, Mycobakterium tuberculosis* und *Salmonella typhimurium* (Wong et al., 2003). Da *H. pylori*, abgesehen von den Proteinen, die über den Typ-IV-Sekretionsapparat in die Zellen sezerniert werden, extrazellulär ist, ist die geringe Verstärkung der Expression von HLA-ABC bei Konfrontation der DCs mit *H. pylori* nachvollziehbar. Die Tatsache, dass *H. pylori*, wie intrazelluläre Bakterien eine Th1-Antwort induziert, scheint für die Expression von HLA-ABC keine Bedeutung zu haben.

Schon nach 4 Stunden verursachte eine Stimulation der DCs mit *H. pylori* oder LPS eine Erhöhung der HLA-DR- (MHC-II-) Gesamtfluoreszenz, diese setzte sich bis 24 Stunden fort. Während die Inhibition von p38 nach 4 und nach 24 Stunden zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtfluoreszenz von HLA-DR führte, kam es bei JNK-Inhibition nur nach 24 Stunden zu einer signifikanten Reduktion. Der ERK-Inhibitor hatte keinen signifikanten Einfluss auf die HLA-DR-Expression. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass ERK nur bei der Differenzierung, nicht aber bei der Reifung wichtig ist. Dagegen werden p38 und JNK aktiviert, wenn die Reifung der DCs induziert wird (Chang et al., 2001; Kikuchi et al., 2003; Roux et al., 2004).

Die schnelle Steigerung der HLA-DR-Expression ist ein Zeichen für die schnelle Antigenpräsentation von DCs. HLA-DR ist Teil der menschlichen MHC-II-Struktur, welche die Präsentation von extrazellulärem Antigen in APCs bewirkt (Abbas et al., 2003). DCs sind neben Makrophagen die Vertreter der APCs der angeborenen Immunantwort, in der erworbenen Immunantwort übernehmen B-Zellen diese Aufgabe (Al Daccak et al., 2004; Chain, 2003; Steinman, 1991). Eine rasche Prozessierung von Fremdantigenen ist für eine schnelle erste Immunantwort von entscheidender Bedeutung. Über HLA-DR werden gezielt $CD4^+$-T-Zellen stimuliert (Banchereau et al., 2000). Lundin et al. (2000) zeigten *in situ*, dass es bei Patienten mit *H. pylori*-Infektion zu einem Anstieg der MHC-II- und der B7-positiven Zellen kam. Diese Moleküle spielen also eine wichtige Rolle in der Immunantwort nach Infektion mit *H. pylori*. Es wurde ferner beschrieben, dass die Urease von *H. pylori* an MHC-II von epithelialen Zellen bindet und dadurch Apoptose auslöst (Fan et al., 2000). Eine Reduktion der Gesamtfluoreszenz von HLA-DR durch Inhibition von p38 wurde in der Literatur bei Stimulation von DCs mit LPS gezeigt (Nakahara et al., 2004). Es traten also ähnliche Effekte auf, wie nach Stimulation mit *H. pylori*.

In der Untersuchungen zur Kinetik der Veränderung der Oberflächenprotein-expression zeigte sich im Gegensatz zur Sekretionskinetik der Zytokine, dass nach 4 Stunden keine signifikanten Änderungen durch die Inhibition erfolgten. Die einzigen Ausnahmen bildeten die Hemmung von CD86 und HLA-DR durch den p38-Inhibitor. Die Inhibition von ERK hatte bei keinem der untersuchten Oberflächenproteine zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung zur Folge. Dies bestätigt Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass ERK die Differenzierung von Zellen, nicht aber deren Reifung reguliert (Kikuchi et al., 2003). Überraschend war in diesem Zusammenhang, dass die Inhibition von JNK zu einer Erhöhung der CD86-Expression führte. Vergleiche mit den Daten Puig-Kroger et al. (2001) legen die Vermutung nahe, dass es dabei eine positive Korrelation mit der TNF-α-Konzentration gibt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Versuche zur Kinetik der Zytokinsekretion und der Expression von Oberflächenantigenen bei Stimulation mit *H. pylori* und gleichzeitiger Inhibition der MAP-Kinasen, die Ergebnisse der Versuche zur Titration der Inhibitorkonzentration bestätigten. Über den gesamten Versuchszeitraum bewirkte die Verwendung des p38-Inhibitors die deutlichste Reduktion der Zytokinsekretion und der Expression der Oberflächenantigene. Es wurden zwar im Vergleich zur Titration geringe Abweichungen gemessen, aber in diesem Zusammenhang muss berücksichtigt werden, dass die Monozyten, aus denen die DCs gewonnen wurden, für die Titration und die Kinetik von

unterschiedlichen Spendern stammten. Daher ist eine gewisse Variabilität in den Ergebnissen, wie sich ja auch in den unterschiedlichen Absolutmengen der Zytokinsekretion und der Oberflächenproteinexpression zeigten, unvermeidlich.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal die besondere Bedeutung von p38 für die Reaktion des Immunsystems nach Infektion mit *H. pylori* gezeigt werden. Die Untersuchungen haben verdeutlicht, dass die p38-MAPK ein entscheidendes Bindeglied in der Immunantwort auf *H. pylori* ist. Sie stellt die wichtiges Verbindung zwischen den Rezeptoren, wie den TLRs, und der Aktivierung und Reifung von DCs dar. Ohne ihre Aktivität kommt es zu einer deutlicher schwächeren Immunantwort auf *H. pylori*. Dies betrifft sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem, welche ohne ausreichende Induktion nicht aktiv werden kann. Durch die Blockade der p38-Signalkaskade kommt es zu einer signifikanten Verringerung der Sekretion wichtiger Zytokine, wie TNF-α, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12. Da eine Inhibition von p38 gleichermaßen die Sekretion von Zytokinen und die Expression von Oberflächenantigenen (z.B. CD80, CD83, CD86) negativ beeinträchtigt, werden zwei wichtige Bestandteile des angeborenen Immunsystems erheblich geschwächt. Eine adäquate Immunreaktion ist dann nicht mehr möglich.

Die Bedeutung von TLR4 in der Immunantwort auf *H. pylori* ist, wie in der Versuchen mit murinen Makrophagen und DCs gezeigt, dagegen geringer. Zwar trägt auch TLR4 zur Immunantreaktion bei, ist aber im Gegensatz zu p38 nur ein Faktor von mehreren. Ein nicht funktioneller TLR4 führt nur zu einer verringerten Sekretion der untersuchten Zytokine, während die Inhibtion von p38 praktisch den Zusammenbruch der Zytokinsekretion bewirkt.

Immunreaktion	Humane DCs	Murine DCs
1. gemessenes Zytokin	TNF-α	TNF-α
Höchste Konzentration TNF-α	12 Stunden	4 Stunden
Kontinuierlicher Anstieg nach Beginn der Sekretion von IL-6 und IL-10	+	+
Reifung der DCs durch *H. pylori*	+	+
Gesteigerte Expression von CD80, CD86	+	+

Tabelle 8: Vergleich der Reaktion von humanen und murinen DCs auf die Stimulation durch *H. pylori*

In den Vergleichen der Immunantwort von humanen und murinen DCs konnte viele Gemeinsamkeiten festgestellt werden, obwohl die Immunreaktionen der Gesamtorganismen unterschiedlich ausfallen. So ist zum Beispiel aus der Literatur bekannt, dass sich im Magen Mäuse im Gegensatz zum Menschen nach Infektion mit *H. pylori* nur selten eine Gastritis manifestiert (Jeremy et al., 2005). In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnten dagegen sowohl in der Sekretion von Zytokinen als auch in der Regulation von Oberflächenproteinen nach Stimulation mit *H. pylori* Paralellen zwischen murinen und humane DCs aufgezeigt werden. Eine Übersicht hierzu ist in Tabelle 8 dargestellt.

Die Ähnlichkeiten in der Reaktion auf *H. pylori* verdeutlichen, dass der Unterschiede in den Gesamtorganismen zwischen Mensch und Maus, murine Immunzellen eine geeignetes Modell für die humane Immunreaktion auf *H. pylori* sind.

7 Anhang

7.1 Eigene Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

7.1.1 Veröffentlichungen

1. **Deml, L., M. Aigner, A. Eckhardt, J. Decker, N. Lehn, and W. Schneider-Brachert.** 2004. Application of single-cell cultures of mouse splenocytes as an assay system to analyze the immunomodulatory properties of bacterial components. Methods Mol. Med. **94:159-75.:**159-175.

2. **Kranzer, K., A. Eckhardt, M. Aigner, G. Knoll, L. Deml, C. Speth, N. Lehn, M. Rehli, and W. Schneider-Brachert.** 2004. Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by *Helicobacter pylori*. Infect Immun. **72:**4416-4423.

3. **Deml, L., Aigner, M., Decker, J., Eckhardt, A., Schütz, C., Mittl, P.R., Barabas, S., Denk, S., Knoll, G., Lehn, N., Schneider-Brachert, W.** 2005, Characterization of the Helicobacter cysteine-rich protein A as a T-helper cell type 1 polarizing agent. Infect. Immun. **73**: 4732-42

7.1.2 Kongressbeiträge

2002:

21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie im Jahr 2002 in Konstanz

A Novel Thermophilic Heterokont from Vulcano Island, Italy
A. Eckhardt, M. Baumgartner, K.O. Stetter
Posterpräsentation

4. Helicobacter pylori-Workshop der Fachgruppen „Gastrointestinale Infektionen“ und „Mikrobielle Pathogenität“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) in Herrsching am Ammersee

Helicobacter Cysteine-rich Protein A (HcpA)
A. Eckhardt, M. Aigner, J. Decker, L. Deml, G. Knoll, N. Lehn, W. Schneider-Brachert
Vortrag

2004:

6th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in Helicobacter Infections, Helsingør

Impact of TLR4 for *Helicobacter pylori*-induced Activation of Macrophages
A. Eckhardt, M. Aigner, N. Lehn, and W. Schneider-Brachert
Posterpräsentation

2005

5. Helicobacter pylori-Workshop der Fachgruppen „Gastrointestinale Infektionen“ und „Mikrobielle Pathogenität“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) in Herrsching am Ammersee

Influence of p38 MAP-Kinase on cytokine secretion of human dendritic cells after stimulation with *Helicobacter pylori*
A. Eckhardt, S. Denk, J. Röhrl, G. Bachl, N. Lehn, W. Schneider-Brachert
Vortrag

7.2 Verzeichnisse

7.2.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der von *H. pylori* verursachten Krankheitsbilder aus (Suerbaum et al., 2002) 13
Abbildung 2: Toll-like Rezeptoren mit ihren Agonisten und Signalkaskaden 25
Abbildung 3: Aktivierung von MAP-Kinasen durch TLRs am Beispiel von TLR4 27
Abbildung 4: Kinetik der Sekretion von TNF-α, IL-6, IFN-γ und IL-10 durch Maussplenozyten 42
Abbildung 5: Kinetik der IL-12-Sekretion durch Maussplenozyten 43
Abbildung 6: Kinetik der TNF-α–, IL-6- und IL-10-Sekretion muriner RAW264.7-Makrophagen 45
Abbildung 7: Kinetik der Sekretion von TNF-α, IL-6 und IL-10 von Makrophagen aus C57BL/6-Mäusen 47
Abbildung 8: Kinetik der CD54- und CD40-Expression von Makrophagen aus C57BL/6-Mäusen 48
Abbildung 9: Vergleich der TNF-α, IL-6 und IL-10-Sekretion von Makrophagen aus WT und DM nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 5 über 48 Stunden. Positivkontrolle: LPS, Negativkontrolle: PBS, gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und die Standardabweichungen 50
Abbildung 10: Vergleich der Gesamtfluoreszenz von CD40 und CD54 von Makrophagen aus WT und DM nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 5 über 48 Stunden 51
Abbildung 11: Vergleich der TNF-α–, IL-6- und IL-10-Sekretion von DCs aus WT und DM nach Stimulation mit H. pylori MOI 10 über 24 Stunden. 53
Abbildung 12: Vergleich der Gesamtfluoreszenz von CD11c und CD40 von DCs aus WT und DM nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 10 über 24 Stunden. 54
Abbildung 13: Vergleich der Gesamtfluoreszenz von CD54, CD80 und CD86 von DCs aus WT und DM nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 10 über 24 Stunden. 55
Abbildung 14: Abhängigkeit der Sekretion von IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 humaner DCs von der MOI des eingesetzten *H. pylori*, ... 58
Abbildung 15: Kinetik der Zytokinsekretion von IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 nach Stimulation von DCs 59
Abbildung 16: Fluoreszenz von CD80, CD83, CD86 und HLA-DR nach Stimulation humaner DCs 61
Abbildung 17: Vergleich der TNF-α– und IL-10-Sekretion humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden bei Verwendung unterschiedlichen MAPK-Inihibitorkonzentrationen. 63
Abbildung 18: Vergleich der IL-6- und IL-8-Sekretion humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden bei Verwendung von unterschiedlichen MAPK-Inhibitorkonzentrationen. 66
Abbildung 19: Vergleich der IL-12-Sekretion humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden bei Verwendung von unterschiedlichen MAPK-Inhibitorkonzentrationen. 67
Abbildung 20: Vergleich der Gesamtfluoreszenz von CD1a und CD83 humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden bei Verwendung verschiedener MAPK-Inhibitorkonzentrationen. 69
Abbildung 21: Vergleich der Gesamtfluoreszenz von CD80 und CD86 humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden bei Verwendung verschiedener MAPK-Inhibitorkonzentrationen. 71
Abbildung 22: Vergleich der Gesamtfluoreszenz von HLA-ABC und HLA-DR humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden bei Verwendung verschiedener MAPK-Inhibitorkonzentrationen. 73

Abbildung 23: Vergleich der TNF-α– und IL-10-Sekretion humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden und Verwendung von MAPK-Inhibitoren 75
Abbildung 24: Vergleich der IL-6-, IL-8- und IL-12-Sekretion humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden und Verwendung von MAPK-Inhibitoren 77
Abbildung 25: Vergleich der Gesamtfluoreszenz ungefärbter Proben humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden mit und ohne Verwendung von MAPK-Inhibitoren 80
Abbildung 26: Vergleich der Gesamtfluoreszenz von CD1a und CD83 humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden mit und ohne Verwendung von MAPK-Inhibitoren 81
Abbildung 27: Vergleich der Gesamtfluoreszenz von CD80 und CD86 humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden mit und ohne Verwendung von MAPK-Inhibitoren, ... 83
Abbildung 28: Vergleich der Gesamtfluoreszenz von HLA-ABC und HLA-DR humaner DCs nach Stimulation mit *H. pylori* MOI 1 über 24 Stunden mit und ohne Verwendung von MAPK-Inhibitoren. 85
Abbildung 29: Zytokinfreisetzung in der frühen Phase der Immunreaktion auf LPS aus 88

7.2.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der bekannten *Helicobacter*-Arten und ihrer Wirte 11
Tabelle 2: Liste der bei murinen Zellen verwendeten Antikörperepitope und deren Vorkommen aus . 38
Tabelle 3: Epitope der FACS-Antikörper gegen humane DCs und deren Vorkommen aus 38
Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen 40
Tabelle 5: Vergleich der Zytokinsekretion und der Expression von Oberflächenproteinen der DM im Bezug zum WT. --: starke Abnahme, -: Abnahme, o: keine Veränderung, n.g.: nicht gemessen 56
Tabelle 6: Veränderung der Zytokinsekretion humaner dendritischen Zellen nach Stimulation mit *H. pylori* und unter Verwendung verschiedener MAPK-Inhibitoren. 79
Tabelle 7: Veränderung der Zytokinsekretion humaner dendritischen Zellen nach Stimulation mit *H. pylori* und unter Verwendung verschiedener MAPK-Inhibitoren, ... 86
Tabelle 8: Vergleich der Reaktion von humanen und murinen DCs auf die Stimulation durch *H. pylori* 117

7.2.3 Literaturverzeichnis

1. **Anonym**, 1994, Kapitel "Helicobacter" in Bergey's Manual of Bacteriology, 9, 42-43

2. **Abbas, A. K. and Lichtman, A. H.**, 2003, Cellular and Molecular Immunology, 249-249

3. **Ackerman, A. L. and Cresswell, Peter**, 2003, Regulation of MHC Class I Transport in Human Dendritic Cells and the Dendritic-Like Cell Line KG-1, The Journal of Immunology, 170:10, 4178-4188

4. **Aderem, A. and Underhill, D. M.**, 1999, Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages, Annu Rev Immunol, 17, 593-623

5. **Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Van Dyke, T., and Pulendran, B.**, 2003, Cutting Edge: Different Toll-Like Receptor Agonistes Instruct Dendritic Cells to Induce Distinct Th Responses via Differential Modulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Fos, J Immunol, 171 (10), 4984-4989

6. **Aicher, A., Shu, G. L., Magaletti, D., Mulvania, T., Pezzutto, A., Craxton, A., and Clark, E. A.**, 1999, Differential Role for p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Regulating CD40-Induced Gene Expression in Dendritic Cells and B Cells, Journal of Immunology, 163:11, 5786-5795

7. **Aigner, M.**, 2001, Funktionsanalyse des IFN induzierenden Proteins HcpA (Helicobacter cysteine-rich protein A)

8. **Aigner, M.**, 2004, Untersuchung der Immunstimulatorischen Eigenschaften des *Helicobacter-cysteine-rich protein A* (HcpA)

9. **Akira, Shizuo**, 2003, Mammalian Toll-like receptors, Current Opinion in Immunology, 15:1, 5-11

10. **Akira, Shizuo and Takeda, Kiyoshi** , 2004, Functions of Toll-like receptors: lessons from KO mice, Comptes Rendus Biologies, 327:6, 581-589

11. **Akopyants, N. S., Eaton, K. A., and Berg, D. E.**, 1995, Adaptive mutation and cocolonization during Helicobacter pylori infection of gnotobiotic piglets, Infect.Immun., 63:1, 116-121

12. **Al Daccak, Reem, Mooney, Nuala, and Charron, Dominique**, 2004, MHC class II signaling in antigen-presenting cells, Current Opinion in Immunology, 16:1, 108-113

13. **Allen, L. A. H., Schlesinger, L. S., and Kang, B.**, 2000, Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages, J.Exp.Med., 191, 115-127

14. **Anderson, Kathryn V.**, 2000, Toll signaling pathways in the innate immune response, Current Opinion in Immunology, 12:1, 13-19

15. **Ando, T., Perez-Perez, G. I., Kusugami, K., Ohsuga, M., Bloch, K. C., and Blaser, M. J.**, 2000, Anti-CagA immunoglobulin G responses correlate with interleukin-8 induction in human gastric mucosal biopsy culture, Clin.Diagn.Lab Immunol., 7:5, 803-809

16. **Ardeshna, Kirit M., Pizzey, Arnold R., Devereux, Stephen, and Khwaja, Asim**, 2000, The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappa B signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells, Blood, 96:3, 1039-1046

17. **Arnaout, M. A.**, 1990, Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18, Blood, 75:5, 1037-1050

18. **Arrighi, Jean Francois, Rebsamen, Michela, Rousset, Francoise, Kindler, Vincent, and Hauser, Conrad**, 2001, A Critical Role for p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in the Maturation of Human Blood-Derived Dendritic Cells Induced by Lipopolysaccharide, TNF-{{alpha}}, and Contact Sensitizers, The Journal of Immunology, 166:6, 3837-3845

19. **Assmann, I. A., Enders, G., Püls, J., Rieder, G., Haas, R., and Hatz, R. A.**, 2001, Role of virulence factors, cell components and adhesion in *Helicobacter pylori*-mediated iNOS induction in murine macrophages, FEMS Immunol.Med.Microbiol., 30, 133-138

20. **Atherton, J., Peek, R., Tham, K., Cover, T., and Blaser, M.**, 1997, Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of Helicobacter pylori, Gastroenterology, 112:1, 92-99

21. **Atherton, J. C., Cao, P., Peek, R. M., Jr., Tummuru, M. K., Blaser, M. J., and Cover, T. L.**, 1995, Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter

pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration, J Biol.Chem., 270:30, 17771-17777

22. **Baldari, Cosima T., Lanzavecchia, Antonio, and Telford, John L.**, 2005, Immune subversion by Helicobacter pylori, Trends in Immunology, 26:4, 199-207

23. **Banchereau, J., Briere, Francine, Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y-J., Pulendran, B., and Palucka, K.**, 2000, Immunobiology of Dendritic Cells, Annu Rev Immunol, 18, 767-811

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

25. **Barton, Beverly E.**, 1997, IL-6: Insights into Novel Biological Activities, Clinical Immunology and Immunopathology, 85:1, 16-20

26. **Bäckhed, F., Rokbi, B., Torstensson, E., Zhao, Y., Nilsson, C., Seguin, D., Normark, S., Buchan, A. M., and Richter-Dahlfors, A.**, 2003, Gastric Mucosal Recognition of *Helicobacter pylori* Is Independent of Toll-Like Receptor 4, Journal of Infectious Diseases, 187, 829-836

27. **Bennett, Brydon L., Sasaki, Dennis T., Murray, Brion W., O'Leary, Eoin C., Sakata, Steve T., Xu, Weiming, Leisten, Jim C., Motiwala, Aparna, Pierce, Steve, Satoh, Yoshitaka, Bhagwat, Shripad S., Manning, Anthony M., and Anderson, David W.**, 2001, SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase, Proceedings of the National Academy of Sciences, 98:24, 13681-13686

28. **Benveniste, E. N, Nguyen, V. T., and Wesemann, D. R.**, 2004, Molecular regulation of CD40 gene expression in macrophages and microglia, Brain, Behavior and Immunity, 18, 7-12

29. **Beutler, Bruce**, 2004, Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling, Nature, 430:6996, 257-263

30. **Beutler, Bruce and Hoffmann, Jules**, 2004, Innate immunity, Current Opinion in Immunology, 16:1, 1-3

31. **Beyaert, R., Cuenda, A., Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Lee, J. C., Haegeman, G., Cohen, P., and Fiers, W.**, 1996, The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis in response to tumour necrosis factor, EMBO Journal, 15:8, 1914-1923

32. **Bizzozero, G.**, 1893, Über die schlauchförmigen Drüsen des Magen-Darmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithle der Schleimhaut, Arch.mikro.Anatomie, 42:82

33. **Blanchard, T. G., Drakes, M. L., and Czinn, S. J.**, 2004, *Helicobacter* infection: pathogenesis, Current Opinion in Gastroenterology, 20, 10-15

34. **Blaser, M. J. and Atherton, J. C.** , 2004, Helicobacter pylori persistence: biology and disease, J.Clin.Invest, 113:3, 321-333

35. **Bliss, C. M. Jr., Golenbock, D. T., Keates, S., Linevsky, J. K., and Kelly, C. P.**, 1998, *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharide Binds to CD14 and Stimulates Release of Interleukin-8, Epithelial Neutrophil-Activating Peptide 78 and Monocyte Chemotactic Protein 1 by Human Monocytes, Infect Immun, 66:11, 5357-5363

36. **Burdin, Nicolas and Kronenberg, Mitchell**, 1999, CD1-mediated immune responses to glycolipids, Current Opinion in Immunology, 11:3, 326-331

37. **Camorlinga-Ponce, M., Romo, C., Gonzalez-Valencia, G., Munoz, O., and Torres, J.**, 2004, Topographical localisation of cagA positive and cagA negative Helicobacter pylori strains in the gastric mucosa; an in situ hybridisation study, Journal of Clinical Pathology, 57:8, 822-828

38. **Chain, Benjamin M.**, 2003, Current issues in antigen presentation--focus on the dendritic cell, Immunology Letters, 89:2-3, 237-241

39. **Chang, L. and Karin, M.**, 2001, Mammalian MAP kinase signalling cascades, Nature, 410:6814, 37-40

40. **Chaussabel, Damien, Semnani, Roshanak Tolouei, McDowell, Mary Ann, Sacks, David, Sher, Alan, and Nutman, Thomas B.**, 2003, Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites, Blood, 102:2, 672-681

41. **Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., and Cobb, M. H.**, 2001, MAP kinases, Chem.Rev., 101:8, 2449-2476

42. **Cobb, Melanie H.**, 1999, MAP kinase pathways, Progress in Biophysics and Molecular Biology, 71:3-4, 479-500

43. **Covacci, Antonello and Rappuoli, Rino**, 1998, Helicobacter pylori: molecular evolution of a bacterial quasi-species, Current Opinion in Microbiology, 1:1, 96-102

44. **Crabtree, J. E., Farmery, S. M., Lindley, I. J., Figura, N., Peichl, P., and Tompkins, D. S.**, 1994, CagA/cytotoxic strains of Helicobacter pylori and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines, Journal of Clinical Pathology, 47:10, 945-950

45. **Craxton, Andrew, Shu, Geraldine, Graves, Jonathan D., Saklatvala, Jeremy, Krebs, Edwin G., and Clark, Edward A.**, 1998, p38 MAPK Is Required for CD40-Induced Gene Expression and Proliferation in B Lymphocytes, The Journal of Immunology, 161:7, 3225-3236

46. **Curler, C. W., Jotwani, R., and Pulendran, B.**, 2001, Dendritic cells: Immune Saviors or Achilles' Heel?, Infect Immun, 69:8, 4703-4708

47. **Czajkowsky, Daniel M., Iwamoto, Hideki, Cover, Timothy L., and Shao, Zhifeng**, 1999, The vacuolating toxin from Helicobacter pylori forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH, Proceedings of the National Academy of Sciences, 96:5, 2001-2006

48. **Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., and Cohen, P.**, 2000, Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors, Biochemical Journal, 351, 95-105

49. **Decker, J.**, 2000, Funktionelle Charakterisierung eines neuartigen immunmodulatorischen Proteins aus *Helicobacter pylori*

50. **Delves, P. J. and Roitt, I. M.**, 2000, The Immune System, New.Engl.J.Med., 343:1, 37-49

51. **Deml, Ludwig, Aigner, Michael, Decker, Jochen, Eckhardt, Alexander, Schutz, Christian, Mittl, Peer R. E., Barabas, Sascha, Denk, Stefanie, Knoll, Gertrud, Lehn, Norbert, and Schneider-Brachert, Wulf**, 2005, Characterization of the Helicobacter pylori Cysteine-Rich Protein A as a T-Helper Cell Type 1 Polarizing Agent, Infection and Immunity, 73:8, 4732-4742

52. **Dilioglou, Smaroula, Cruse, Julius M., and Lewis, Robert E.**, 2003, Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells, Experimental and Molecular Pathology, 75:3, 217-227

53. **Dixon, Michael F.**, 1995, 3 Histological responses to Helicobacter pylori infection: gastritis, atrophy and preneoplasia, Bailliere's Clinical Gastroenterology, 9:3, 467-486

54. **Dobrovolskaia, M. A. and Vogel, S. N.**, 2003, Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS, Microbes and Infection, 4:9, 903-913

55. **Dong, Chen, Davis, Roger J., and Flavell, Richard A.**, 2002, MAP KINASES IN THE IMMUNE RESPONSE, Annual Review of Immunology, 20:1, 55-72

56. **Dooley, C. P., Cohen, H., Fitzgibbons, P. L., Bauer, M., Appleman, M. D., Perez-Perez, G. I., and Blaser, M. J.**, 1989, Prevalence of Helicobacter pylori infection and histologic gastritis in asymptomatic persons, The New England Journal of Medicine, 321:23, 1562-1566

57. **Duffield , J. S.**, 2003, The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde, Clinical Science, 104:1, 27-38

58. **Eaton, K. A., Brooks, C. L., Morgan, D. R., and Krakowka, S.**, 1991, Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by Helicobacter pylori in gnotobiotic piglets, Infect.Immun., 59:7, 2470-2475

59. **El Omar, E. M., Carrington, M., Chow, W. H., McColl, K. E., Bream, J. H., Young, H. A., Herrera, J., Lissowska, J., Yuan, C. C., Rothman, N., Lanyon, G., Martin, M., Fraumeni, J. F., Jr., and Rabkin, C. S.**, 2000, Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer, Nature, 404:6776, 398-402

60. **Fan, Xuejun, Gunasena, Harshani, Cheng, Zhijei, Espejo, Rosario, Crowe, Sheila E., Ernst, Peter B., and Reyes, Victor E.**, 2000, Helicobacter pylori Urease Binds to Class II MHC on Gastric Epithelial Cells and Induces Their Apoptosis, The Journal of Immunology, 165:4, 1918-1924

61. **Favata, Margaret F., Horiuchi, Kurumi Y., Manos, Elizabeth J., Daulerio, Andrea J., Stradley, Deborah A., Feeser, Wendi S., Van Dyk, Drew E., Pitts, William J., Earl, Richard A., Hobbs, Frank, Copeland, Robert A., Magolda, Ronald L., Scherle, Peggy A., and Trzaskos, James M.**, 1998, Identification of a Novel Inhibitor of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase, Journal of Biological Chemistry, 273:29, 18623-18632

62. **Feldman, R. A.**, 2001, Epidemiologic observations and open questions about disease and infection caused by *Helicobacter pylori*, 29-51

63. **Feng, Gui Jie, Goodridge, Helen S., Harnett, Margaret M., Wei, Xiao Qing, Nikolaev, Andrei V., Higson, Adrian P., and Liew, Foo Y.**, 1999, Extracellular Signal-Related Kinase (ERK) and p38 Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinases Differentially Regulate the Lipopolysaccharide-Mediated Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase and IL-12 in Macrophages: Leishmania Phosphoglycans Subvert Macrophage IL-12 Production by Targeting ERK MAP Kinase, The Journal of Immunology, 163:12, 6403-6412

64. **Ferlazzo, Guido, Morandi, B., D'Agostino, A., Meazza, R., Melioli, Giovanni, Moretta, Alessandro, and Moretta, Lorenzo**, 2003, The interaction between NK cells and dendritic cells in bacterial infections results in rapid induction of NK cell activation and in the lysis of uninfected dendritic cells, Eur.J Immunol., 33:2, 306-316

65. **Ferlazzo, Guido, Tsang, Ming L., Moretta, Lorenzo, Melioli, Giovanni, Steinman, Ralph M., and Munz, Christian**, 2002, Human Dendritic Cells Activate Resting Natural Killer (NK) Cells and Are Recognized via the NKp30 Receptor by Activated NK Cells, The Journal of Experimental Medicine, 195:3, 343-351

66. **Fischer, W., Puls, J., Buhrdorf, R., Gebert, B., Odenbreit, S., and Haas, R.**, 2001, Systematic mutagenesis of the Helicobacter pylori cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8, Mol.Microbiol., 42:5, 1337-1348

67. **Franco, Aime T., Israel, Dawn A., Washington, Mary K., Krishna, Uma, Fox, James G., Rogers, Arlin B., Neish, Andrew S., Collier-Hyams, Lauren, Perez-Perez, Guillermo I., Hatakeyama, Masanori, Whitehead, Robert, Gaus, Kristin, O'Brien, Daniel P., Romero-Gallo, Judith, and Richard, M.**, 2005, Activation of {beta}-catenin by carcinogenic Helicobacter pylori, Proceedings of the National Academy of Sciences, 0504927102

68. **Frleta, Davor, Noelle, Randolph J., and Wade, William F.**, 2003, CD40-mediated up-regulation of Toll-like receptor 4-MD2 complex on the surface of murine dendritic cells, Journal of Leukocyte Biology, 74:6, 1064-1073

69. **Fujii, Shin ichiro, Liu, Kang, Smith, Caroline, Bonito, Anthony J., and Steinman, Ralph M.**, 2004, The Linkage of Innate to Adaptive Immunity via Maturing Dendritic Cells In Vivo Requires CD40 Ligation in Addition to Antigen

Presentation and CD80/86 Costimulation, The Journal of Experimental Medicine, 199:12, 1607-1618

70. **Garner, R. E., Rubanowice, K., Sawyer, R. T., and Hudson, J. A.**, 1994, Secretion of TNF-alpha by alveolar macrophages in response to Candida albicans mannan, Journal of Leukocyte Biology, 55:2, 161-168

71. **George, John T., Boughan, Parjeet K., Karageorgiou, Haris, and Bajaj-Elliott, Mona**, 2003, Host anti-microbial response to Helicobacter pylori infection, Molecular Immunology, 40:7, 451-456

72. **Gerhard, M., Schmees, C., Voland, P., Endres, N., Sander, M., Reindl, W., Rad, R., Oelsner, M., Decker, T., Mempel, M., Hengst, L., and Prinz, C.**, 2005, A secreted low-molecular-weight protein from Helicobacter pylori induces cell-cycle arrest of T cells, Gastroenterology, 128:5, 1327-1339

73. **Gerhard, Markus, Lehn, Norbert, Neumayer, Nina, Boren, Thomas, Rad, Roland, Schepp, Wolfgang, Miehlke, Stephan, Classen, Meinhard, and Prinz, Christian**, 1999, Clinical relevance of the Helicobacter pylori gene for blood-group antigen-binding adhesin, Proceedings of the National Academy of Sciences, 96:22, 12778-12783

74. **Germain, Ronald N. and Jenkins, Marc K.**, 2004, In vivo antigen presentation, Current Opinion in Immunology, 16:1, 120-125

75. **Gewirtz, A. T., Yu, Y., Krishna, U. S., Israel, D. A., Lyons, S. L., and Peek, R. M., Jr.**, 2004, Helicobacter pylori flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity, J.Infect.Dis., 189:10, 1914-1920

76. **Gobert, Alain P., Bambou, Jean Christophe, Werts, Catherine, Balloy, Viviane, Chignard, Michel, Moran, Anthony P., and Ferrero, Richard L.**, 2004, 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, Journal of Biological Chemistry, 279:1, 245-250

77. **Goodman, K. J., Correa, P., Tengana Aux, H. J., Ramirez, H., DeLany, J. P., Guerrero Pepinosa, O., Lopez Quinones, M., and Collazos Parra, T.**, 1996, Helicobacter pylori infection in the Colombian Andes: a population- based study of transmission pathways, American Journal of Epidemiology, 144:3, 290-299

78. **Goodwin, C. S., Armstrong, J. A., and Marshall, B. J.**, 1986, Campylobacter pyloridis, gastritis, and peptic ulceration, Journal of Clinical Pathology, 39:4, 353-365

79. **Gordon, S.**, 1998, The role of the macrophage in immune regulation, Research in Immunology, 149:7-8, 685-688

80. **Gordon, S.**, 1999, Macrophages and the Immune Response, 4:15, 533-545

81. **Guha, M. and Mackman, N.**, 2001, LPS induction of gene expression in human monocytes, Cellular Signalling, 13(2), 85-94

82. **Guillemin, K., Salama, N. R., Tompkins, L. S., and Falkow, S.**, 2002, Cag pathogenicity islan-specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection, PNAS, 99:23, 15136-15141

83. **Guiney, Donald G., Hasegawa, Patty, and Cole, Sheri P.**, 2003, Helicobacter pylori Preferentially Induces Interleukin 12 (IL-12) Rather than IL-6 or IL-10 in Human Dendritic Cells, Infection and Immunity, 71:7, 4163-4166

84. **Hafsi, Nadia, Voland, Petra, Schwendy, Susanne, Rad, Roland, Reindl, Wolfgang, Gerhard, Markus, and Prinz, Christian**, 2004, Human Dendritic Cells Respond to Helicobacter pylori, Promoting NK Cell and Th1-Effector Responses In Vitro, The Journal of Immunology, 173:2, 1249-1257

85. **Hagberg, L., Hull, R., Hull, S., McGhee, J. R., Michalek, S. M., and Svanborg Eden, C.**, 1984, Difference in Susceptibility to Gram-Negative Urinary Tract Infection Betwenn C3H/HeJ and C3H/HeN Mice, Infect Immun, 46:3, 839-844

86. **Hambleton, Julie, Weinstein, Steven L., Lem, Lawrence, and DeFranco, Anthony L.**, 1996, Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages, Proceedings of the National Academy of Sciences, 93:7, 2774-2778

87. **Harris, P. R., Ernst, P. B., Kawabata, S., Kiyono, H., Graham, M. F., and Smith, P. D.**, 1998, Recombinant *Helicobacter pylori* Urease Activates Primary Mucosal Macrophages, J Infect.Dis., 178, 1516-1520

88. **Hashimoto, Carl, Hudson, Kathy L., and Anderson, Kathryn V.**, 1988, The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein, Cell, 52:2, 269-279

89. **Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A.**, 2001, **The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5**, Nature, 410, 1099-1103

90. **Heller, R. A. and Kronke, M.**, 1994, Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways, The Journal of Cell Biology, 126:1, 5-9

91. **HEMMI, H., Takeuchi, O, KAWAI , T., Kaisho, T., SATO, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., WAGNER, H., Takeda, K., and Akira, S.**, 2000, A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA, Nature, 408:6813, 740-744

92. **Higashi, Hideaki, Tsutsumi, Ryouhei, Fujita, A., Yamazaki, S., Azuma, T., and Hatakeyama, Masanori**, 2002, Biological activity of the Helicobacter pylori virulence factor Cag A is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites, PNAS, 99 :22, 14428-14433

93. **Hirota, K., Nagata, K., Norose, Y., Futagami, S., Nakagawa, Y., Senpuku, H., Kobayashi, M., and Takahashi, H.**, 2001, Identification of an antigenic epitope in Helicobacter pylori urease that induces neutralizing antibody production, Infect.Immun., 69:11, 6597-6603

94. **Hirschfeld, Matthew, Weis, Janis J., Toshchakov, Vladimir, Salkowski, Cindy A., Cody, M. Joshua, Ward, Dawn C., Qureshi, Nilofer, Michalek, Suzanne M., and Vogel, Stefanie N.**, 2001, Signaling by Toll-Like Receptor 2 and 4 Agonists Results in Differential Gene Expression in Murine Macrophages, Infection and Immunity, 69:3, 1477-1482

95. **Hoffmann, Jules A., Kafatos, Fotis C., Janeway, Charles A., Jr., and Ezekowitz, R. A.**, 1999, Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity, Science, 284:5418, 1313-1318

96. **Honma, Kiri, Udono, Heiichiro, Kohno, Tomoko, Yamamoto, Kazuo, Ogawa, Asako, Takemori, Toshitada, Kumatori, Atsushi, Suzuki, Shoichi, Matsuyama, Toshifumi, and Yui, Katsuyuki**, 2005, Interferon regulatory factor 4 negatively regulates the production of proinflammatory cytokines by macrophages in response to LPS, Proceedings of the National Academy of Sciences, 0504226102

97. **Horn, F., Henze, C., and Heidrich, K.**, 2000, Interleukin-6 Signal Transduction and Lymphocyte Function, Immunobiology, 202:2, 151-167

98. **Hulten, K., Han, S. W., Enroth, H., Klein, P. D., Opekun, A. R., Gilman, R. H., Evans, D. G., Engstrand, L., Graham, D. Y., and El Zaatari, F. A.**, 1996, Helicobacter pylori in the drinking water in Peru, Gastroenterology, 110:4, 1031-1035

99. **Ichijo, H.**, 1999, From receptors to stress-activated MAP kinases, Oncogene, 18, 6087-6093

100. **Ilver, Dag, Arnqvist, Anna, Ogren, Johan, Frick, Inga Maria, Kersulyte, Dangeruta, Incecik, Engin T., Berg, Douglas E., Covacci, Antonello, Engstrand, Lars, and Boren, Thomas**, 1998, Helicobacter pylori Adhesin Binding Fucosylated Histo-Blood Group Antigens Revealed by Retagging, Science, 279:5349, 373-377

101. **Imler, J. L. and Hoffmann, J. A.** , 2004, Toll receptors in innate immunity, Trends in Cell Biology, 11, 304-311

102. **Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., and Steinman, R. M.**, 1993, Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo, The Journal of Experimental Medicine, 178:2, 479-488

103. **Ismail, S., Hampton, M. B., and Keenan, J. I.**, 2003, Helicobacter pylori outer membrane vesicles modulate proliferation and interleukin-8 production by gastric epithelial cells, Infect.Immun., 71:10, 5670-5675

104. **Janeway C.A. and Medzhitov, R.**, 2002, Innate Immune Recognition, Annu Rev Immunol, 20, 197-216

105. **Jeannin, P, Renno, T, Goetsch, L, Miconnet, I, Aubry, J-P, Delneste, Y, Herbault, N, Baussant, T, Magistrelli, G, Soulas, C, Romero, P, Cerottini, J-C, and Bonnefoy, J-Y**, 2000, OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway., Nature Immunology, 1:6, 502-509

106. **Jeremy, A. H., Du, Y., Dixon, M. F., Robinson, P. A., and Crabtree, J. E.**, 2005, Protection against Helicobacter pylori infection in the Mongolian gerbil after prophylactic vaccination, Microbes Infect, .

107. **Josenhans, C. and Suerbaum, S.**, 2002, The role of motility as a virulence factor in bacteria, J.Med.Microbiol, 291:605, 614

108. **Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los, Santos K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., Pamer, E. G., Littman, D. R., and Lang, R. A.**, 2002, In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens, Immunity, 17:2, 211-220

109. **Kadowaki, Norimitsu, Ho, Stephen, Antonenko, Svetlana, Waal Malefyt, Rene, Kastelein, Robert A., Bazan, Fernando, and Liu, Yong Jun**, 2001, Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens, The Journal of Experimental Medicine, 194:6, 863-870

110. **Kao, Shang Jyh, Lei, Hui Chieh, Kuo, Chen Tzu, Chang, Ming Shyan, Chen, Bing Chang, Chang, Yau Chong, Chiu, Wen Ta, and Lin, Chien Huang**, 2005, Lipoteichoic acid induces nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide synthase expression via phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and p38 MAPK in RAW 264.7 macrophages, Immunology, 115:3, 366-374

111. **Kavermann, Holger, Burns, Brendan P., Angermuller, Katrin, Odenbreit, Stefan, Fischer, Wolfgang, Melchers, Klaus, and Haas, Rainer**, 2003, Identification and Characterization of Helicobacter pylori Genes Essential for Gastric Colonization, The Journal of Experimental Medicine, 197:7, 813-822

112. **Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S.**, 1999, Unresponsiveness of MyD88-defiecent mice to endotoxin, Immunity, 11, 115-122

113. **Kikuchi, K., Yanagawa, Y., Iwabuchi, K., and Onoe, K.**, 2003, Differential role of mitogen-activated protein kinases in CD40-mediated IL-12 production by immature and mature dendritic cells, Immunology Letters, 89 (2), 149-154

114. **Kopp, E. B. and Medzhitov, R.**, 1997, The Toll-receptor family and control of innate immunity, Current Opinoin in Immunology, 11:1, 13-18

115. **Kraal, G., Rep, M., and Janse, M.**, 1987, Macrophages In T and B Cell Compartments and Other Tissue Macrophages Recognized by Monoclonal Antibody MOMA-2, Scand J.Immunology, 26, 653-661

116. **Kranzer, K., Eckhardt, A., Aigner, M., Knoll, G., Deml, L., Speth, C., Lehn, N., Rehli, M., and Schneider-Brachert, W.**, 2004, Induction of Maturation and Cytokine Release of Human Dendritic Cells by *Helicobacter pylori*, Infect Immun, 72:8, 4416-4423

117. **Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F.**, 2000, Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells, Nat.Immunol., 1:4, 311-316

118. **Lechmann, Matthias, Berchtold, Susanne, Steinkasserer, Alexander, and Hauber, Joachim**, 2002, CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation, Trends in Immunology, 23:6, 273-275

119. **Lee, S. K., Stack, A., Katzowitsch, E., Aizawa, S. I., Suerbaum, S., and Josenhans, C.**, 2003, Helicobacter pylori flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5, Microbes.Infect., 5:15, 1345-1356

120. **Lehner, Paul J. and Cresswell, Peter**, 2004, Recent developments in MHC-class-I-mediated antigen presentation, Current Opinion in Immunology, 16:1, 82-89

121. **Lemaitre, B., Reichart, J. M., and Hoffmann, J. A.**, 1997, *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms, PNAS, 94:26, 14614-14619

122. **Leunk, R. D., Johnson, P. T., David, B. C., Kraft, W. G., and Morgan, D. R.**, 1988, Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of Campylobacter pylori, Journal of Medical Microbiology, 26:2, 93-99

123. **Li, Q. and Verma, I. M.**, 2002, NF-kappaB regulation in the immune system, Nat.Rev.immunol., 2:10, 725-734

124. **Lundin, S., Mattson-Rydberg, A., Bergquist, C., Edebo, A., and Svennerholm, A-M.**, 2000, Increased Expression of MHC Class II and B-7 in the Lamina Propria of the Antrum in *Helicobacter pylori*-infected Individuals, Scand J.Immunology, 52, 418-419

125. **Luthy, Lucas, Grutter, Markus G., and Mittl, Peer R. E.**, 2002, The Crystal Structure of Helicobacter pylori Cysteine-rich Protein B Reveals a Novel Fold for a Penicillin-binding Protein, Journal of Biological Chemistry, 277:12, 10187-10193

126. **Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L. J., Rößner, S., Koch, F., Romani, N., and Schuler, G.**, 1999, An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow, J of Immunological Methods, 223, 77-92

127. **Luzza, F., Parrello, T., Monteleone, G., Sebkova, L., Romano, M., Zarrilli, R., Imeneo, M., and Pallone, F.**, 2000, Up-regulation of IL-17 is associated with bioactive IL-8 expression in Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa, J.Immunol., 165:9, 5332-5337

128. **Ma, Xiaojing**, 2001, TNF-[alpha] and IL-12:a balancing act in macrophage functioning, Microbes and Infection, 3:2, 121-129

129. **Maeda, S., Yoshida, H., Ogura, K., Mitsuno, Y., Hirata, Y., Yamaji, Y., Akanuma, M., Shiratori, Y., and Omata, M.**, 2000, *H.pylori* Activates NF-κB Through a Signaling Pathway Involving IκB Kinases, NF-κB-Inducing Kinase, TRAF2, and TRAF6 in Gastric Cancer Cells, Gastroenterology, 119:1, 97-108

130. **Mahdavi, Jafar, Sonden, Berit, Hurtig, Marina, Olfat, Farzad O., Forsberg, Lina, Roche, Niamh, Angstrom, Jonas, Larsson, Thomas, Teneberg, Susann, Karlsson, Karl Anders, Altraja, Siiri, Wadstrom, Torkel, Kersulyte, Dangeruta, Berg, Douglas E., Dubois, Andre, Petersson, Christoffer, Magnusson, Karl Eric, Norberg, Thomas, Lindh, Frank, Lundskog, Bertil B., Arnqvist, Anna, Hammarstrom, Lennart, and Boren, Thomas**, 2002, Helicobacter pylori SabA Adhesin in Persistent Infection and Chronic Inflammation, Science, 297:5581, 573-578

131. **Malaty, H. M. and Graham, D. Y.**, 1994a, Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of Helicobacter pylori infection, Gut, 35:6, 742-745

132. **Malaty, Hoda M., Engstrand, Lars, Pedersen, Nancy L., and Graham, David Y.**, 1994b, Helicobacter pylori Infection: Genetic and Environmental Influences: A Study of Twins, Annals of Internal Medicine, 120:12, 982-986

133. **Mandell, L., Moran, A. P., Cocchiarella, A., Houghton, J. M., Taylor, N., Fox, J. G., Wang, T. C., and Kurt-Jones, E. A.**, 2004, Intact Gram-Negative *Helicobacter pylori, Helicobacter felis* and *Helicobacter hepaticus* Bacteria Activate Innate Immunity via Toll-Like Receptor 2 but NOt Toll-Like Receptor 4, Infect Immun, 72, 6446-6454

134. **Marshall, B.**, 2002, *Helicobacter pylori*: 20 years on, Clinical Medicine, 2:2, 147-152

135. **Marshall, B. J.**, 1995, The 1995 Albert Lasker Medical Research Award. Helicobacter pylori. The etiologic agent for peptic ulcer, JAMA, 274:13, 1064-1066

136. **Massari, Paola, Henneke, Philipp, Ho, Yu, Latz, Eicke, Golenbock, Douglas T., and Wetzler, Lee M.**, 2002, Cutting Edge: Immune Stimulation by Neisserial Porins Is Toll-Like Receptor 2 and MyD88 Dependent, The Journal of Immunology, 168:4, 1533-1537

137. **Mattei, Fabrizio, Schiavoni, Giovanna, Belardelli, Filippo, and Tough, David F.**, 2001, IL-15 Is Expressed by Dendritic Cells in Response to Type I IFN, Double-Stranded RNA, or Lipopolysaccharide and Promotes Dendritic Cell Activation, The Journal of Immunology, 167:3, 1179-1187

138. **Mähler, M., Janke, C., Wagner, S., and Hedrich, H. J.**, 2002, Differential Susceptibility of Inbred Mouse Strains to *Helicobacter pylori* Infection, Scan Journ of Gastroenterology, 11:3, 267-278

139. **Männel, D. N. and Echtenacher, B.**, 2000, TNF in the inflammatory response, Chemical Immunology, 74, 141-161

140. **Means, T. K., Golenbock, D. T., and Fenton, M. J.**, 2000, The biology of Toll-like receptors, Cytokine & Growth Factor Reviews, 11:3, 219-232

141. **Means, T. K., Hayashi, F., Smith, K. D., Aderem, A., and Luster, A. D.**, 2003, The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells, J.Immunol., 170:10, 5165-5175

142. **Medzhitov, R.**, 2001, Toll-Like Receptors And Innate Immunity, Nat.Rev.immunol., 1, 135-145

143. **Medzhitov, R. and Janeway C.A.**, 1997a, Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal Sytem of Recognition, Cell, 91:2, 295-298

144. **Medzhitov, Ruslan and Janeway, Jr**, 1997b, Innate immunity: impact on the adaptive immune response, Current Opinion in Immunology, 9:1, 4-9

145. **Mellman, Ira and Steinman, Ralph M.**, 2001, Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Processing Machines, Cell, 106:3, 255-258

146. **Mittl, Peer R. E., Luthy, Lucas, Hunziker, Peter, and Grutter, Markus G.**, 2000, The Cysteine-rich Protein A from Helicobacter pylori Is a beta -Lactamase, Journal of Biological Chemistry, 275:23, 17693-17699

147. **Mobley, HLT**, 2001, *Helicobacter pylori* urease, 29-51

148. **Moese, S., Selbach, M., Meyer, T. F., and Brackert, S.**, 2002, cag+ Helicobacter pylori Induces Homotypic Aggregation of Macrophage-Like Cells by Up-Regulation of Intracellular Adhesion Molecule 1 to the Cell Surface , Infect Immun, 70:8, 4687-4691

149. **Molinari, M., Salio, M., Galli, C., Norais, N., Rappuoli, R., Lanzavecchia, A., and Montecucco, C.**, 1998, Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by Helicobacter pylori toxin VacA, J.Exp.Med., 187:1, 135-140

150. **Montecucco, C. and Bernard, M. de**, 2003, Immunosuppressive and Proinflammatory Activities of the VacA Toxin of *Helicobacter pylori*, J Exp Med, 198:12, 1767-1771

151. **Montecucco, C. and Rappuoli, R.**, 2001, Living dangerously: how Helicobacter pylori survives in the human stomach, Nat.Rev.Mol.Cell Biol., 2:6, 457-466

152. **Moody, D. Branch, Young, David C., Cheng, Tan Yun, Rosat, Jean Pierre, Roura-mir, Carme, O'Connor, Peter B., Zajonc, Dirk M., Walz, Andrew, Miller, Marvin J., Levery, Steven B., Wilson, Ian A., Costello, Catherine E., and Brenner, Michael B.**, 2004, T Cell Activation by Lipopeptide Antigens, Science, 303:5657, 527-531

153. **Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., and O'Garra**, 2001, Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor, Annu Rev Immunol, 19, 683-765

154. **Moser, M. and Murphy, K.**, 2000, Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development, Nat.Immunol, 1:3, 199-205

155. **Mosser, D. M.**, 2003, The many faces of macrophage activation, Journal of Leukocyte Biology, 73, 209-212

156. **Mukaida, N., Okamoto, S., Ishikawa, Y., and Matsushima, K.**, 1994, Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression, Journal of Leukocyte Biology, 56:5, 554-558

157. **Mukundan, L., Milhorn, D. M., Matta, B., and Suttles, J.**, 2004, CD40-mediated activation of vascular smooth mascle cell chemokine production through a Src-initiated , MAPK-dependent pathway, Cellular Signalling, 16, 375-384

158. **Muotiala, A., Helander, I. M., Pyhälä, L., Kosunen, T. U., and Moran, A. P.**, 1992, Low Biological Activity of *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharide, Infect Immun, 60:4, 1714-1716

159. **Murray, Peter J.**, 2005, The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription, Proceedings of the National Academy of Sciences, 102:24, 8686-8691

160. **Nakachi, N., Klein, T. W., Friedman, H., and Yamamoto, Y.**, 2000, Helicobacter pylori infection of human gastric epithelial cells induces IL-8 and TNFalpha, but not TGFbeta1 mRNA, FEMS Immunol.Med.Microbiol., 29:1, 23-26

161. **Nakahara, T., Uchi, H., Urabe, K., Chen, Q., Furue, M., and Moroi, Y.**, 2004, Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells, International Immunity, 16:2, 1701-1709

162. **Nakayama, M., Kimura, M., Wada, A., Yahiro, K., Ogushi, K., Niidome, T., Fujikawa, A., Shirasaka, D., Aoyama, N., Kurazono, H., Noda, M., Moss, J., and Hirayama, T.**, 2004, *Helicobacter pylori* VacA Activates the p38/Activating Transcription Factor 2-mediated Signal Pathway in AZ-521 Cells, Journal of Biological Chemistry, 279:8, 7024-7028

163. **Nguyen, T. N., Barkun, A. N., and Fallone, C. A.**, 1999, Host determinants of Helicobacter pylori infection and its clinical outcome, Helicobacter., 4:3, 185-197

164. **O'Neill, L. A. J.**, 2002a, Wanted: A Molecular Basis for Specificity in Toll-like Receptor Signal Transduction, Molecular Cell, 10:5, 969-971

165. **O'Neill, Luke A. J.**, 2002b, Toll-like receptor signal transduction and the tailoring of innate immunity: a role for Mal?, Trends in Immunology, 23:6, 296-300

166. **Odenbreit, S., Gebert B., Püls, J., Fischer, W., and Haas, R.**, 2001, Interaction of *Helicobacter pylori* with fessional phagocytosis: role of the professional phagocytosis: role of the *cag* pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA, Cellular Microbiology, 3:1, 21-31

167. **Odenbreit, Stefan, Faller, Gerhard, and Haas, Rainer**, 2002, Role of the AlpAB proteins and lipopolysaccharide in adhesion of Helicobacter pylori to human gastric tissue, International Journal of Medical Microbiology, 292:3-4, 247-256

168. **Odenbreit, Stefan, Till, Markus, Hofreuter, Dirk, Faller, Gerhard, and Haas, Rainer**, 1999, Genetic and functional characterization of the alpAB gene

locus essential for the adhesion of Helicobacter pylori to human gastric tissue, Molecular Microbiology, 31:5, 1537-1548

169. **Okazaki, Y.**, 2002, Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs, Nature, 420:6915, 563-573

170. **Ottemann, K. M. and Lowenthal, A. C.**, 2002, Helicobacter pylori uses motility for initial colonization and to attain robust infection, Infect.Immun., 70:4, 1984-1990

171. **Palucka, Karolina and Banchereau, Jacques**, 1999, Dendritic Cells: A Link Between Innate and Adaptive Immunity, Journal of Clinical Immunology, 19:1, 12-25

172. **Palucka, Karolina and Banchereau, Jacques**, 2002, How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses, Current Opinion in Immunology, 14:4, 420-431

173. **Pamer, Eric and Cresswell, Peter** , 1998, MECHANISMS OF MHC CLASS I RESTRICTED ANTIGEN PROCESSING, Annual Review of Immunology, 16:1, 323-358

174. **Parsonnet, J., Friedman, G. D., Vandersteen, D. P., Chang, Y., Vogelman, J. H., Orentreich, N., and Sibley, R. K.**, 1991, Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma, The New England Journal of Medicine, 325:16, 1127-1131

175. **Parsonnet, J., Shmuely, H., and Haggerty, T.**, 1999, Fecal and oral shedding of Helicobacter pylori from healthy infected adults, JAMA, 282:23, 2240-2245

176. **Parsonnet, Julie, Hansen, Svein, Rodriguez, Larissa, Gelb, Arnold B., Warnke, Roger A., Jellum, Egil, Orentreich, Norman, Vogelman, Joseph H., and Friedman, Gary D.**, 1994, Helicobacter pylori Infection and Gastric Lymphoma, The New England Journal of Medicine, 330:18, 1267-1271

177. **Peck, B., Ortkamp, M., Diehl, K. D., Hundt, E., and Knapp, B.**, 1999, Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of Helicobacter pylori, Nucleic Acids Research, 27:16, 3325-3333

178. **Perez-Perez, G. I., Shepherd, V. L., Morrow, J. D., and Blaser, M. J.**, 1995, Activation of Human THP-1 Cells and Rat Bone Marrow-Derived

Macrophages by *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharide, Infect Immun, 63:4, 1183-1187

179. **Perez-Perez, Guillermo I., Sack, R. Bradley, Reid, Raymond, Santosham, Mathuram, Croll, Janne, and Blaser, Martin J.**, 2003, Transient and Persistent Helicobacter pylori Colonization in Native American Children, Journal of Clinical Microbiology, 41:6, 2401-2407

180. **Pfeffer, Klaus**, 2003, Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors, Cytokine & Growth Factor Reviews, 14:3-4, 185-191

181. **Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M-Y, Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alero, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B.**, 1998, Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in *Tlr4* Gene, Science, 282:5396, 2085-2089

182. **Porcelli, S. A.**, 1995, The Cd1 Family: A Third Lineage of Antigen-Presenting Molecules, Advances in Immunology, 59:1, 1-98

183. **Porcelli, Steven A., Segelke, Brent W., Sugita, Masahiko, Wilson, Ian A., and Brenner, Michael B.**, 1998, The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules, Immunology Today, 19:8, 362-368

184. **Prinz, Christian, Hafsi, Nadia, and Voland, Petra**, 2003, Helicobacter pylori virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination, Trends in Microbiology, 11:3, 134-138

185. **Pritts, Timothy, Hungness, Eric, Wang, Quan, Robb, Bruce, Hershko, Dan, and Hasselgren, Per Olof**, 2002, Mucosal and enterocyte IL-6 production during sepsis and endotoxemia - role of transcription factors and regulation by the stress response, The American Journal of Surgery, 183:4, 372-383

186. **Puig-Kroger, Amaya, Relloso, Miguel, Fernandez-Capetillo, Oskar, Zubiaga, Ana, Silva, Augusto, Bernabeu, Carmelo, and Corbi, Angel L.**, 2001, Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells, Blood, 98:7, 2175-2182

187. **Ramarao, N. and Meyer, T. F.**, 2001, *Helicobacter pylori* Resists Phagocytosis by Macrophages: Quantitative Assessment by Confocal Microscopy and Fluorescence-Activated cell Sorting, Infect Immun, 69:4, 2604-2611

188. **Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, R., and Nakoinz, I.**, 1978, Functional Macrophage Cell Lines Transformed by Abelson Leukemia Virus, Cell, 15, 261-267

189. **Ray, Avijit, Karmakar, Parimal, and Biswas, Tapas**, 2004, Up-regulation of CD80-CD86 and IgA on mouse peritoneal B-1 cells by porin of Shigella dysenteriae is Toll-like receptors 2 and 6 dependent, Molecular Immunology, 41:12, 1167-1175

190. **Re, F. and Strominger, J. L.**, 2001, Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells, J.Biol.Chem., 276:40, 37692-37699

191. **Re, Fabio and Strominger, Jack L.**, 2004, Heterogeneity of TLR-induced responses in dendritic cells: from innate to adaptive immunity, Immunobiology, 209:1-2, 191-198

192. **Rehli, Michael**, 2002, Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression, Trends in Immunology, 23:8, 375-378

193. **Reis e Sousa, Stahl, P. D., and Austyn, J. M.**, 1993, Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro, The Journal of Experimental Medicine, 178:2, 509-519

194. **Reis e Sousa, Caetano**, 2004a, Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity, Current Opinion in Immunology, 16:1, 21-25

195. **Reis e Sousa, Caetano**, 2004b, Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls, Seminars in Immunology, 16:1, 27-34

196. **Reischl, U., Leppmeier, B., Heep, M., Beck, D., and Lehn, N.**, 2001, Rapid and Specific Detection of *Helicobacter pylori* by LightCycler PCR:33, 323-330

197. **Rescigno, M., Urbano, M., Rimoldi, M., Valzasina, B., Rotta, G., Granucci, F., and Ricciardi-Castagnoli, P.**, 2002, Toll-like receptor 4 is not required for the full maturation of dendritic cells or for the full maturation of dendritc cells or for the degradation of Gram-negative bacteria, Eur.J Immunol., 32:10, 2800-2806

198. **Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., and Ricciardi-Castagnoli, P.**, 2001, Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria, Nat.Immunol, 2:4, 361-367

199. **Rescigno, M., Winzler, C., Delia, D., Mutini, C., Lutz, M. B., and Ricciardi-Castagnoli, P.**, 1997, Dendritic cell maturation is required for initiation of the immune response, Journal of Leukocyte Biology, 61, 415-421

200. **Rescigno, Maria, Martino, Manuela, Sutherland, Claire L., Gold, Michael R., and Ricciardi-Castagnoli, Paola**, 1998, Dendritic Cell Survival and Maturation Are Regulated by Different Signaling Pathways, The Journal of Experimental Medicine, 188:11, 2175-2180

201. **Roach, Jared C., Glusman, Gustavo, Rowen, Lee, Kaur, Amardeep, Purcell, Maureen K., Smith, Kelly D., Hood, Leroy E., and Aderem, Alan**, 2005, The evolution of vertebrate Toll-like receptors, Proceedings of the National Academy of Sciences, 0502272102

202. **Roebuck, K. A. and Finnegan, A.**, 1999, Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression, Journal of Leukocyte Biology, 66:6, 876-888

203. **Romaniuk, P. J., Zoltowska, B., Trust, T. J., Lane, D. J., Olsen, G. J., Pace, N. R., and Stahl, D. A.**, 1987, Campylobacter pylori, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true Campylobacter sp, J.Bacteriol., 169:5, 2137-2141

204. **Roux, Philippe P. and Blenis, John**, 2004, ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 68:2, 320-344

205. **Rowland, M., Kumar, D., Daly, L., O'Connor, P., Vaughan, D., and Drumm, B.**, 1999, Low Rates of *Helicobacter pylori* Reinfection in Chidren, Gastroenterology, 117, 336-341

206. **Salama, Nina, Guillemin, Karen, McDaniel, Timothy K., Sherlock, Gavin, Tompkins, Lucy, and Falkow, Stanley**, 2000, A whole-genome microarray reveals genetic diversity among Helicobacter pylori strains, Proceedings of the National Academy of Sciences, 97:26, 14668-14673

207. **Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A.**, 1995, Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products, The Journal of Experimental Medicine, 182:2, 389-400

208. **Sallusto, F. and Lanzavecchia, A.**, 1999, Mobilizing Dendritic Cells for Tolerance, Priming, and Chronic Inflammation, J Exp Med, 189:4, 611-614

209. **Samuels, A. L., Windsor, H. M., Ho, G. Y., Goodwin, L. D., and Marshall, B. J.**, 2000, Culture of Helicobacter pylori from a gastric string may be an alternative to endoscopic biopsy, J.Clin.Microbiol., 38:6, 2438-2439

210. **Sawai, N., Kita, M., Kodama, T., Tanahashi, T., Yamaoka, Y., Tagawa, Y-I., Iwakura, Y., and Imanishi, J.**, 1999, Role of Gamma Interferon in *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Inflammatory Responses in a Mouse Model, Infect Immun, 67:1, 279-285

211. **Schmausser, B., Andrulis, M., Endrich, S., Lee, K. S., Josenhans, C., Müller-Hermelink, H.-K., and Eck, M.**, 2004, Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithlium in *Helicobacter pylori* infection, Clin Exp.Immunology, 136:3, 521-526

212. **Schnare, M., Barton, G. M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S., and Medzhitov, R.**, 2001, Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses, Nat.Immunol, 2:10, 947-950

213. **Scholler, Nathalie, Hayden-Ledbetter, Martha, Dahlin, Amber, Hellstrom, Ingegerd, Hellstrom, Karl Erik, and Ledbetter, Jeffrey A.**, 2002, Cutting Edge: CD83 Regulates the Development of Cellular Immunity, The Journal of Immunology, 168:6, 2599-2602

214. **Schreiber, Soren, Nguyen, Thanh Hoa, Stuben, Manuela, and Scheid, Peter**, 2000, Demonstration of a pH gradient in the gastric gland of the acid-secreting guinea pig mucosa, AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology, 279:3, G597-G604

215. **Schreiber, Sören, Bucker, Roland, Groll, Claudia, Azevedo-Vethacke, Marina, Garten, Desiree, Scheid, Peter, Friedrich, Susanne, Gatermann, Soren, Josenhans, Christine, and Suerbaum, Sebastian**, 2005, Rapid Loss of Motility of Helicobacter pylori in the Gastric Lumen In Vivo, Infection and Immunity, 73:3, 1584-1589

216. **Schütz, C.**, 2004, Analyse der Helicobacter pylori -abhängigen Zytokine-Induktion im naiven Maus-Splenozytenmodell, 28-28

217. **Segal, E. D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., and Tompkins, L. S.**, 1999, Altered states: Involvement of phosphorylated CagA in the induction of host

cellular growth changes by Helicobacter pylori, Proceedings of the National Academy of Sciences, 96:25, 14559-14564

218. **Segal, Ellyn D., Lange, C., Covacci, A., Tompkins, L. S., and Falkow, S.**, 1997, Induction of host signal transduction pathways by Helicobacterápylori, Proceedings of the National Academy of Sciences, 94:14, 7595-7599

219. **Sharma, S. A., Tummuru, M. K., Miller, G. G., and Blaser, M. J.**, 1995, Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to Helicobacter pylori stimulation in vitro, Infect Immun., 63:5, 1681-1687

220. **Shibata, Y., Metzger, W. J., and Myrvik, Q. N.**, 1997, Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production, The Journal of Immunology, 159:5, 2462-2467

221. **Shimazu, Rintaro, Akashi, Sachiko, Ogata, Hirotaka, Nagai, Yoshinori, Fukudome, Kenji, Miyake, Kensuke, and Kimoto, Masao**, 1999, MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4á, The Journal of Experimental Medicine, 189:11, 1777-1782

222. **Shortman, K. and Liu, Y-J.**, 2002, Mouse and Human dendritic cell subtypes, Nat.Rev.immunol., 2, 151-161

223. **Siebenlist, U., Brown, K., and Claudio, E.**, 2005, Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB, Nat.Rev.immunol., 5:6, 435-445

224. **Singh, A. K. and Mao, C. M.**, 1995, Constitutive and LPS-induced Expression of Proinflammatory Cytokines in RAW264.7 Monocytes, Journal of the American Society of Nephrology, 6:3, 854-854

225. **Smith, Michael F., Jr., Mitchell, Anastasia, Li, Guolian, Ding, Song, Fitzmaurice, Ann Marie, Ryan, Kieran, Crowe, Sheila, and Goldberg, Joanna B.**, 2003, Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR5, but Not TLR4, Are Required for Helicobacter pylori-induced NF-{kappa}B Activation and Chemokine Expression by Epithelial Cells, Journal of Biological Chemistry, 278:35, 32552-32560

226. **Smythies, Lesley E., Waites, Ken B., Lindsey, J. Russell, Harris, Paul R., Ghiara, Paolo, and Smith, Phillip D.**, 2000, Helicobacter pylori-Induced Mucosal Inflammation Is Th1 Mediated and Exacerbated in IL-4, But Not IFN-{gamma}, Gene-Deficient Mice, The Journal of Immunology, 165:2, 1022-1029

227. **Solnick, J. V.**, 2003, Clinical significance of Helicobacter species other than Helicobacter pylori, Clin.Infect.Dis., 36:3, 349-354

228. **Solnick, J. V., Chang, K., Canfield, D. R., and Parsonnet, J.**, 2003, Natural acquisition of Helicobacter pylori infection in newborn rhesus macaques, J.Clin.Microbiol., 41:12, 5511-5516

229. **Solnick, Jay V. and Schauer, David B.**, 2001, Emergence of Diverse Helicobacter Species in the Pathogenesis of Gastric and Enterohepatic Diseases, Clinical Microbiology Reviews, 14:1, 59-97

230. **Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H., and Boman, H. G.**, 1981, Sequence and specificity of two antibacterial protein involved in insect immunity, Nature, 292, 246-248

231. **Steinman, R. M.**, 1991, The Dendritic Cell System and its Role In Immunogenicity, Annu Rev Immunol, 9, 271-296

232. **Stoy, N.**, 2001, Macrophage Biology and Pathobiology in the Evolution of Immune Responses: A Functional Analysis, Pathobiology, 68:4, 179-211

233. **Su, B., Ceponis, P. J. M., Lebel, S., Huynh, H., and Sherman, P. M.**, 2003, Helicobacter pylori activates Toll-Like Receptor 4 Expression in Gastrointestinal Epithelial Cells, Infect Immun, 71:6, 3496-3502

234. **Suerbaum, S. and Michetti, P.**, 2002, *Helicobacter Pylori* Infection, New.Engl.J.Med., 347:15, 1175-1186

235. **Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S.**, 2003, Toll-like receptors, Annu Rev Immunol, 21, 335-376

236. **Torok, Anastasia M., Bouton, Amy H., and Goldberg, Joanna B.**, 2005, *Helicobacter pylori* Induces Interleukin-8 Secretion by Toll-Like Receptor 2- and Toll-Like Receptor 5-Dependent and -Independent Pathways, Infection and Immunity, 73:3, 1523-1531

237. **Trinchieri, G.**, 2003, Interleukin-12 And The Regulation of innate Resistance and Adaptive Immunity, Nat.Rev.immunol., 3, 133-146

238. **Uemura, N., Mukai, T., Okamoto, S., Yamaguchi, S., Mashiba, H., Taniyama, K., Sasaki, N., Haruma, K., Sumii, K., and Kajiyama, G.**, 1997, Effect of Helicobacter pylori eradication on subsequent development of cancer

after endoscopic resection of early gastric cancer, Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention, 6:8, 639-642

239. **Uemura, Naomi, Okamoto, Shiro, Yamamoto, Soichiro, Matsumura, Nobutoshi, Yamaguchi, Shuji, Yamakido, Michio, Taniyama, Kiyomi, Sasaki, Naomi, and Schlemper, Ronald J.**, 2001, Helicobacter pylori Infection and the Development of Gastric Cancer, The New England Journal of Medicine, 345:11, 784-789

240. **Underhill, D. M. and Ozinsky, A.** , 2002, Toll-like receptors: key mediators of microbe detection, Current Opinoin in Immunology, 14:1, 103-110

241. **Utsugi, Mitsuyoshi, Dobashi, Kunio, Ishizuka, Tamotsu, Endou, Katsuaki, Hamuro, Junji, Murata, Yukie, Nakazawa, Tsugio, and Mori, Masatomo**, 2003, c-Jun N-Terminal Kinase Negatively Regulates Lipopolysaccharide-Induced IL-12 Production in Human Macrophages: Role of Mitogen-Activated Protein Kinase in Glutathione Redox Regulation of IL-12 Production, The Journal of Immunology, 171:2, 628-635

242. **van de Stolpe, A. and van der Saag, P. T.**, 1996, Intercellular adhesion molecule-1, Journal of Molecular Medicine, 74:1, 13-33

243. **Warren, J. R. and Marshall, B.**, 1983, Unidentified curved Bacili On Gastric Epithelium In Active Chronic Gastritis, Lancet, 321, 1273-1275

244. **Webb, P. M., Knight, T., Greaves, S., Wilson, A., Newell, D. G., Elder, J., and Forman, D.**, 1993, Relation between infection with Helicobacter pylori and living conditions in childhood: evidence for person to person transmission in early life, BMJ, 308, 750-753

245. **Werts, C., Tapping, R. I., Mathison, J. C., Chuang, T-H., Kravchenko, V., Saint Girons, I., Haake, D. A., Godowski, P. J., Hayashi, F., Ozinsky, A., Underhill, D. M., Kirschning, C. J., Wagner, H., Aderem, A., Tobias, P. S., and Ulevitch, R. J.**, 2001, Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism, Nat.Immunol, 2:4, 346-352

246. **Wick, Mary Jo**, 2003, The role of dendritic cells in the immune response to Salmonella, Immunology Letters, 85:2, 99-102

247. **Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V. S., Davoust, J., and Ricciardi-Castagnoli, P.**, 1997,

Maturation Stages of Mouse Dendritic Cells in Growth Factor-dependent Long-Term Cultures, J Exp Med, 185:2, 317-328

248. **Wirth, H. P., Beins, M. H., Yang, M., Tham, K. T., and Blaser, M. J.**, 1998, Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant Helicobacter pylori strains, Infect.Immun., 66:10, 4856-4866

249. **Wittmann, Miriam, Kienlin, Petra, Mommert, Susanne, Kapp, Alexander, and Werfel, Thomas**, 2002, Suppression of IL-12 Production by Soluble CD40 Ligand: Evidence for Involvement of the p44/42 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway, The Journal of Immunology, 168:8, 3793-3800

250. **Wong, P. and Pamer, E. G.**, 2003, CD8 T cell responses to infectious pathogens, Annu.Rev.Immunol, 21:29-70. Epub;%2001 Dec;%19., 29-70

251. **Wotherspoon, RC**, 1998, Helicobacter pylori and gastric lymphoma, Brit Med Bulletin, 54, 79-85

252. **Xia, C. Q. and Kao, K. J.**, 2003, Suppression of Interleukin-12 Production through Endogenously Secreted Interleukin-10 in Activated Dendritic Cells: Involvement of Activation of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase, Scandinavian Journal of Immunology, 58:1, 23-32

253. **Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P. F., Telford, J. L., Figura, N., Rappuoli, R., and Covacci, A.**, 1995, Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of Helicobacter pylori reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin, Infection and Immunity, 63:1, 94-98

254. **Xie, Jin, Qian, Jianfei, Yang, Jing, Wang, Siqing, Freeman III, Muta E., and Yi, Qing**, 2005, Critical roles of Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling and inactivation of p38 MAP kinase in the differentiation and survival of monocyte-derived immature dendritic cells, Experimental Hematology, 33:5, 564-572

255. **Yamamoto, Y., Klein, T. W., and Friedman, H.**, 1997, Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL- 1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of Candida albicans to macrophages, Infection and Immunity, 65:3, 1077-1082

256. **Yamaoka, Y., Kita, M., Kodama, T., Sawai, N., Kashima, K., and Imanishi, J.**, 1997, Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive Helicobacter pylori strains, Gut, 41:4, 442-451

257. **Yanagawa, Y., Iijima, N., Iwabuchi, K., and Onoe, K.**, 2002, Activation of extracellular signal-related kinase by TNF-α controls the maturation and function of murine dendritic cells, J.Leukocyte Biology, 71, 125-132

258. **Zal, T., Volkmann, A., and Stockinger, B.**, 1994, Mechanism of Tolerance Induction in Major Histocompatibility Complex Class II-restricted T Cells Specific of a Blood-borne Self-Antigen, J Exp Med, 180:12, 2089-2099

259. **Zhang, Cheng, Baumgartner, Rudolf A., Yamada, Koji, and Beaven, Michael A.**, 1997, Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Regulates Production of Tumor Necrosis Factor-alpha and Release of Arachidonic Acid in Mast Cells. INDICATIONS OF COMMUNICATION BETWEEN p38 AND p42 MAP KINASES, Journal of Biological Chemistry, 272:20, 13397-13402

260. **Zhou, Hui Ren, Islam, Zahidul, and Pestka, James J.**, 2003, Kinetics of lipopolysaccharide-induced transcription factor activation/inactivation and relation to proinflammatory gene expression in the murine spleen, Toxicology and Applied Pharmacology, 187:3, 147-161

261. **Zhou, L. J. and Tedder, T. F.**, 1995, Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily, The Journal of Immunology, 154:8, 3821-3835

262. **Zuckerman, Linda A., Pullen, Lara, and Miller, Jim**, 1998, Functional Consequences of Costimulation by ICAM-1 on IL-2 Gene Expression and T Cell Activation, The Journal of Immunology, 160:7, 3259-3268

8 Danksagung

Diese Arbeit wurde von Juli 2002 bis November 2005 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg angefertigt.

Bedanken möchte ich mich in erster Linie bei Prof. Dr. Norbert Lehn, der mir nach Problemen an einem anderen Institut die Möglichkeit zu dieser Arbeit gegeben hat. Unter seiner Betreuung hatte ich immer einen kompetenten AnsprecHpartner, der mir durch hervorragende äußere Bedingungen eigenständiges Arbeiten ermöglicht hat.

Mein Dank gilt weiter Prof. Dr. Widmar Tanner, der die Arbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg bereitwillig vertreten hat.

Dr. Wulf Schneider danke ich für die fachlich hervorragende Betreuung und die intensiven Diskussionen während der Anfertigung der Arbeit im Rahmen der Teilprojekts B3 des SFB585 „Regulation der Immunfunktionen im Verdauungstrakt“

Für die sehr angenehme Laboratmosphäre und praktische Hilfestellungen im Laboralltag bedanke ich mich bei Dr. Gertrud Knoll, Dr. Michael Aigner, Dr. Katharina Kranzer, Stefanie Denk, Johannes Röhrl, Oliver Merkel, Maria Kurz, Gabi Bachl, Ines Tschertner, Regine Birngruber, Thomas Holzmann und Andreas Neumayr

Christian Schütz danke ich für die Unterstützung bei den Versuchen zur Zytokinkinetik der Splenozyten, ebenso wie bei den StudentInnen Nicole Kirner, René Kallies und Björn Neubauer für die Durchführung von ELISAs

Thomas Grundler und Peter Neumann danke ich für die Herstellung der Nährmedien

Außerdem möchte ich mich bei den nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen des Instituts bedanken, die zum angenehmen Arbeitsklima am Institut beigetragen habe.

Besonderer Dank gilt abschließend meinen Eltern, die mich immer, vor allem aber in der schwierigen Phase vor Beginn dieser Arbeit, unterstützt haben.